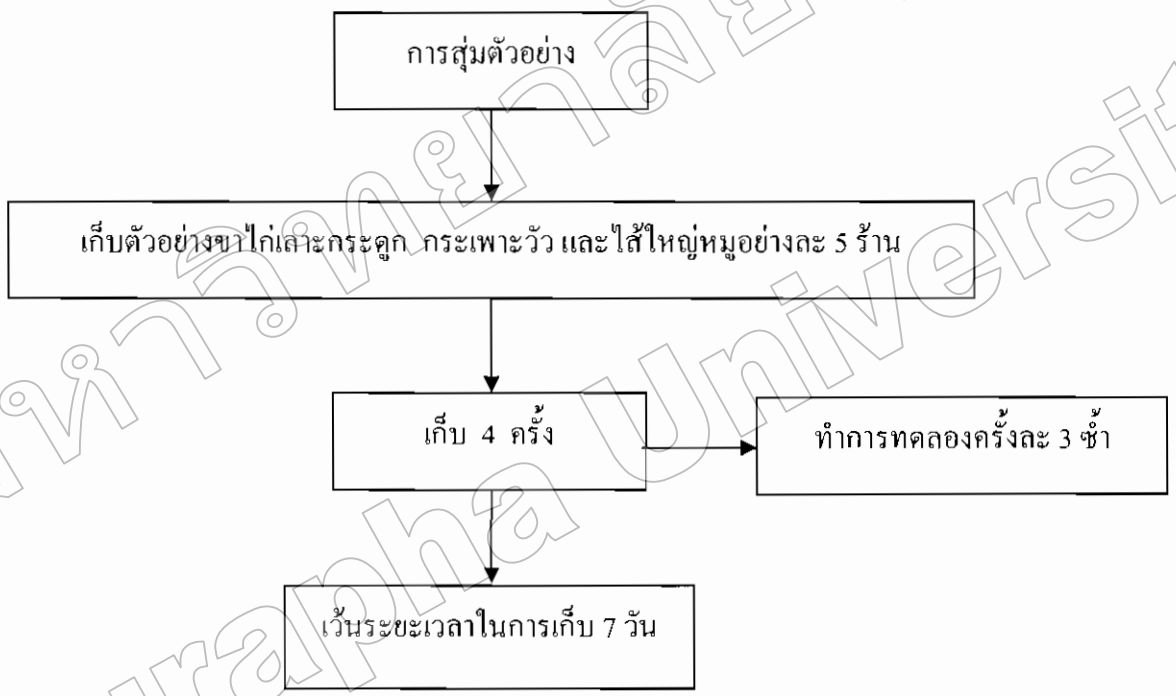
บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ระเบียบวิธีวิจัย

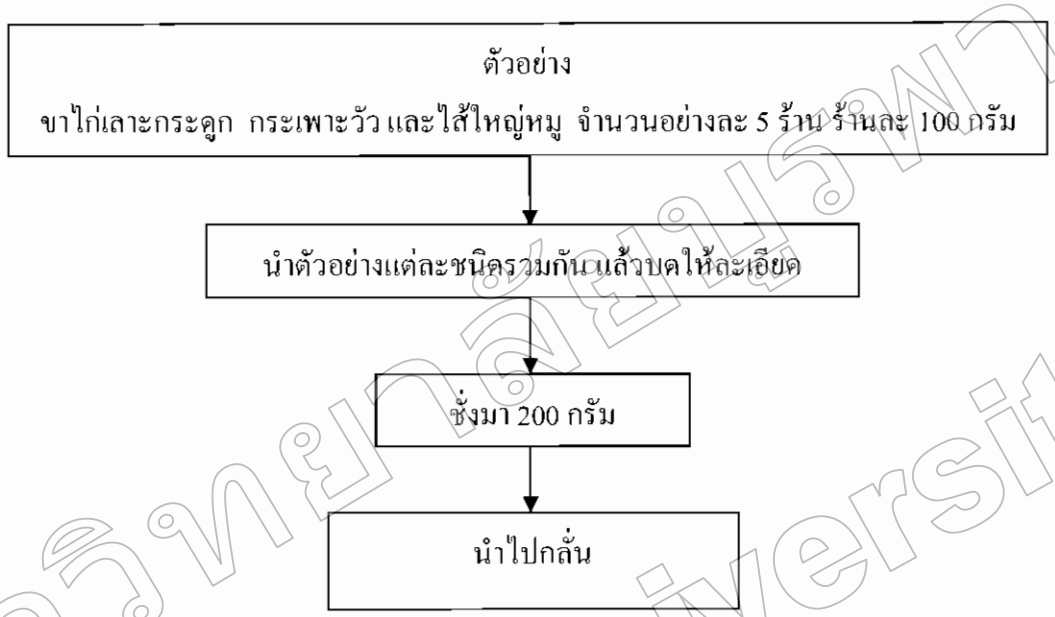
1. การสุ่มตัวอย่าง สุ่มตัวอย่างอาหารสด ได้แก่ ขาไก่เลาะกระดูก กระเพาะวัว และไส้ใหญ่หมู จำนวนอย่างละ 5 ร้าน เก็บตัวอย่าง 4 ครั้ง เว้นในระยะเวลาห่างกันครั้งละ 7 วัน โดยในแต่ละครั้งของการสุ่มตัวอย่างไม่จำเป็นต้องเป็นร้านเดียวกันทุกครั้ง



ภาพที่ 3-1 แผนผังการสุ่มตัวอย่าง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2. การเตรียมสารละลายตัวอย่าง เตรียมตัวอย่างอาหารสด ได้แก่ ขาไก่เลาะกระดูก กระเพาะวัว และไส้ใหญ่หมู จำนวนอย่างละ 5 ร้าน ร้านละ 100 กรัม นำตัวอย่างแต่ละชนิดที่สุ่มมาทั้ง 5 ร้านรวมกัน แล้วนำไปบดให้ละเอียด ชั่งมาจำนวน 200 กรัม



ภาพที่ 3-2 แผนผังการเตรียมตัวอย่าง

3. การทดลอง ทำการวิเคราะห์ปริมาณฟอร์มัลดีไฮด์โดยใช้ชุดทดสอบฟอร์มาลีนในอาหาร และวิเคราะห์ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ และเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้จากวิธีทั้งสอง

เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี

1. เครื่องมือ อุปกรณ์

1.1 เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์รุ่น Genesys 20 ของบริษัท Thermo Spectronic

1.2 เครื่องชั่งไฟฟ้า

1.3 เตาไฟฟ้า

1.4 เทอร์โมมิเตอร์

1.5 กระบอกตวง

1.6 แท่งแก้ว

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

1.7 หลอดหยด

1.8 ปิเปต

1.9 หลอดทดลอง

1.10 เครื่องอังไอน้ำ

1.11 ขวดวัดปริมาตร

1.12 บีกเกอร์

1.13 เครื่องบด

1.14 ชุดกลั่น

2. สารเคมี

2.1 กรดฟอสฟอริก (Phosphric acid) 85% AR Grade ของ LAB-SCAN Analytical sciences

2.2 สารละลายฟอร์มัลดีไฮด์ (Formaldehyde solution) 36.5-38.0% w/w AR Grade ของ AJAX-Chemicals

2.3 สารป้องกันการเกิดฟอง (Silicone antifoam) AR Grade ของ Fluke Chemie AG CH-9471 Buchs

2.4 กรดแอซิติก (Glacial Acetic acid) AR Grade ของ J.T.Baker

2.5 แอมโมเนียมอะซิเตท (Ammonium acetate) AR Grade ของ AJAX-Chemicals

2.6 อะซิติลอะซิโตน (Acetyl acetone) AR Grade ของ s d fune-chem Ltd.

2.7 น้ำกลั่น (Distilled water)

2.8 สารป้องกันการระเบิด (Pumic stone)

2.9 ชุดทดสอบฟอร์มาลีนในอาหาร (Test Kit Formalin in Food)

การเตรียมสารละลาย

1. การเตรียมสารละลายมาตรฐานฟอร์มัลดีไฮด์ 1000 ppm

ปิเปตสารละลายฟอร์มัลดีไฮด์เข้มข้น จำนวน 0.25 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

2. การเตรียมสารละลายมาตรฐานฟอร์มัลดีไฮด์เข้มข้นที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

2.1 การเตรียมสารละลายฟอร์มัลดีไฮด์เข้มข้น 100 ppm

ปิเปตสารละลายฟอร์มัลดีไฮด์ 1000 ppm จำนวน 10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.2 การเตรียมสารละลายฟอร์มัลดีไฮด์เข้มข้น 0.1 ppm

ปิเปตสารละลายฟอร์มัลดีไฮด์ 100 ppm จำนวน 0.1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

2.3 การเตรียมสารละลายฟอร์มัลดีไฮด์เข้มข้น 0.3 ppm

ปิเปตสารละลายฟอร์มัลดีไฮด์ 100 ppm จำนวน 0.3 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

2.4 การเตรียมสารละลายฟอร์มัลดีไฮด์เข้มข้น 0.5 ppm

ปิเปตสารละลายฟอร์มัลดีไฮด์ 100 ppm จำนวน 0.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

2.5 การเตรียมสารละลายฟอร์มัลดีไฮด์เข้มข้น 0.7 ppm

ปิเปตสารละลายฟอร์มัลดีไฮด์ 100 ppm จำนวน 0.7 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

2.6 การเตรียมสารละลายฟอร์มัลดีไฮด์เข้มข้น 1.0 ppm

ปิเปตสารละลายฟอร์มัลดีไฮด์ 100 ppm จำนวน 1.0 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

2.7 การเตรียมสารละลายฟอร์มัลดีไฮด์เข้มข้น 1.5 ppm

ปิเปตสารละลายฟอร์มัลดีไฮด์ 100 ppm จำนวน 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

2.8 การเตรียมสารละลายฟอร์มัลดีไฮด์เข้มข้น 2.0 ppm

ปิเปตสารละลายฟอร์มัลดีไฮด์ 100 ppm จำนวน 2.0 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

3. การเตรียมแนชส์รีเอเจนต์ (Nash's reagent)

แอมโมเนียมอะซิเตท (Ammonium acetate)	15 กรัม
กรดแอซิติก (Acetic acid)	0.3 มิลลิลิตร
อะซิติลอะซิโตน (Acetylacetone)	0.2 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	20 มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานฟอร์มัลดีไฮด์

1. นำสารละลายฟอร์มัลดีไฮด์เข้มข้น 0.1 ppm, 0.3 ppm, 0.5 ppm, 0.7 ppm, 1.0 ppm, 1.5 ppm, และ 2.0 ppm จำนวน 4 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง 7 หลอด ตามลำดับ

2. เติมแนชส์รีเอเจนต์จำนวน 2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองทั้ง 7 หลอด เขย่าให้เข้ากัน

3. นำไปอุ่นในเครื่องอังไอน้ำ 37°C เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น

4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 413 นาโนเมตร

5. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ และค่าความเข้มข้นของสารละลายฟอร์มัลดีไฮด์ไปเขียนกราฟ โดยให้ค่าการดูดกลืนแสงอยู่ที่แกน y และความเข้มข้นของสารละลายฟอร์มัลดีไฮด์อยู่ที่แกน x

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณฟอร์มัลดีไฮด์

1. การวิเคราะห์ปริมาณฟอร์มัลดีไฮด์ โดยใช้ชุดทดสอบฟอร์มาลีนในอาหาร

1.1 นำขาไก่เลาะกระดูก กระเพาะวัว และไส้ใหญ่หมู มา 200 กรัม แช่ในน้ำกลั่น 150 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที

1.2 นำน้ำแช่ตัวอย่าง ใส่ลงในขวดสารทดสอบที่ 1 ประมาณ 1 ใน 3 ของขวด

1.3 ถ่ายของเหลวจากขวดสารทดสอบที่ 1 ลงในขวดสารทดสอบที่ 2 ปิดฝาขวดและเขย่าเล็กน้อย

1.4 ถ่ายของเหลวจากขวดสารทดสอบที่ 2 ลงในขวดสารทดสอบที่ 3 แล้วรีบปิดฝาขวดแกว่งเบา ๆ ให้ของเหลวเข้ากัน สังเกตสีที่เกิดขึ้น

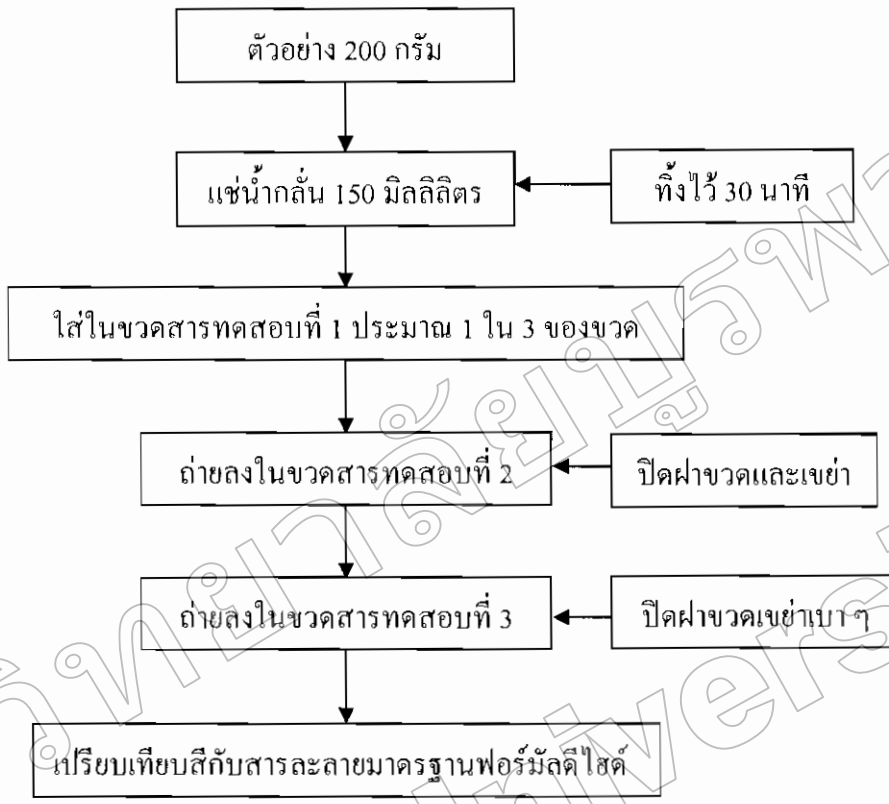
1.5 นำสารละลายมาตรฐานฟอร์มัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้น 0.1 ppm, 0.3 ppm, 0.5 ppm, 0.7 ppm, 1.0 ppm, 1.5 ppm, และ 2.0 ppm มาทดสอบด้วยชุดทดสอบสารฟอร์มาลีนในอาหาร สังเกตสีที่เกิดขึ้น

1.6 เปรียบเทียบสีของสารละลายในขวดสารทดสอบที่ 3 จากน้ำแช่ตัวอย่างอาหารกับสีของสารละลายมาตรฐานฟอร์มัลดีไฮด์ที่เตรียมได้จากชุดทดสอบ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ศรีสุข เมือง จ.ชลบุรี 20131

การวิเคราะห์หาปริมาณฟอร์มัลดีไฮด์โดยใช้ชุดทดสอบฟอร์มาลีนในอาหาร



ภาพที่ 3-3 แผนผังการวิเคราะห์หาปริมาณฟอร์มัลดีไฮด์โดยใช้ชุดทดสอบฟอร์มาลีนในอาหาร

2. การวิเคราะห์ปริมาณฟอร์มัลดีไฮด์ โดยใช้วิธีมาตรฐาน [AOAC(1990)] ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

2.1 นำขาไก่เลาะกระดูก กระเพาะวัว และไส้ใหญ่หมูที่บดละเอียด ชั่งมา 200 กรัม ใส่ในขวด ก้นกลม เติมน้ำกลั่น 150 มิลลิลิตร

2.2 ทำให้เป็นกรดด้วยกรดฟอสฟอริก (H_3PO_4) 85% จำนวน 1 มิลลิลิตร

2.3 ใส่สารป้องกันการเกิดฟอง 2 หยด และใส่สารป้องกันการระเบิด (Pumic stone) 3-4 เม็ด ต่อเข้ากับ เครื่องกลั่น ทำการกลั่นช้า ๆ เก็บ Distillate 50 มิลลิลิตร

2.4 ปิเปต Distillate มา 4 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง 3 หลอด เติมแนชส์รีเอเจนต์ หลอดละ 2 มิลลิลิตร เขย่าเบา ๆ

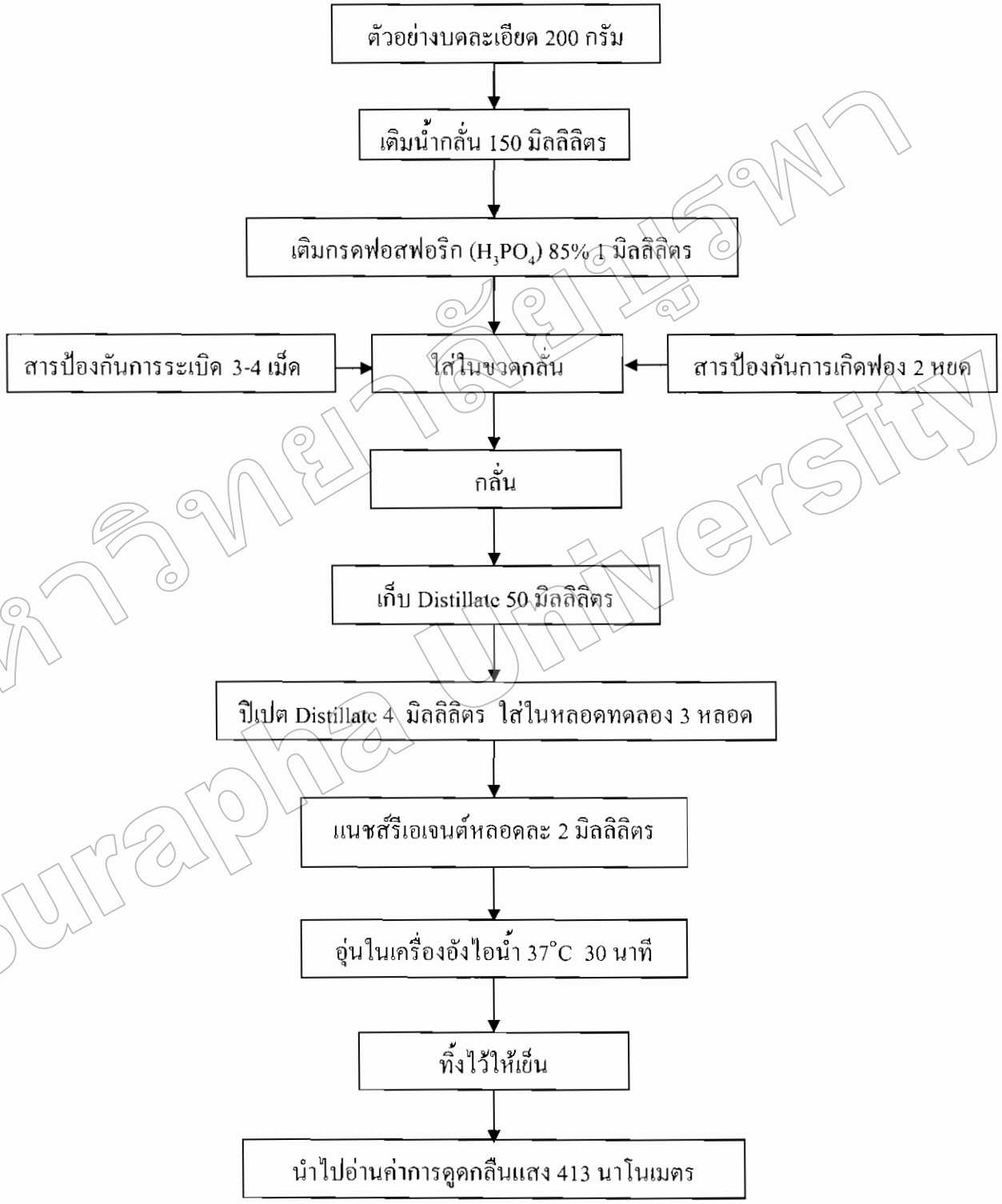
2.5 นำไปอุ่นในเครื่องอังไอน้ำ 37°C นาน 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น

2.6 นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 413 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปหาความเข้มข้นของฟอร์มัลดีไฮด์ในตัวอย่างจากกราฟมาตรฐาน

ผค CT
ว 742 ก 270645

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การวิเคราะห์หาปริมาณฟอร์มัลดีไฮด์ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์



ภาพที่ 3-4 แผนผังการวิเคราะห์หาปริมาณฟอร์มัลดีไฮด์ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การทดสอบประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

1. การทดสอบความเที่ยง จากการวิเคราะห์หาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative standard deviation, RSD)

1.1 นำขาไก่เลาะกระดูก กระเพาะวัว และไส้ใหญ่หมู จากตัวอย่าง 1 ร้าน บดให้ละเอียด ชั่งมา 200 กรัม ใส่ในขวดก้นกลม เติมน้ำกลั่น 150 มิลลิลิตร

1.2 ทำให้เป็นกรดด้วยกรดฟอสฟอริก (H_3PO_4) 85% จำนวน 1 มิลลิลิตร

1.3 ใส่สารป้องกันการเกิดฟอง 2 หยด และใส่สารป้องกันการระเบิด (Pumic stone) 3-4 เม็ด ต่อเข้ากับ เครื่องกลั่น ทำการกลั่นช้า ๆ เก็บ Distillate 50 มิลลิลิตร

1.4 ปิเปต Distillate มา 4 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีแนชส์รีเอเจนต์ 2 มิลลิลิตร เขย่าเบา ๆ ทำจำนวน 3 หลอด

1.5 นำไปอุ่นในเครื่องอังไอน้ำ 37°C นาน 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น

1.6 นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 413 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปหาความเข้มข้นของฟอร์มัลดีไฮด์ในตัวอย่างจากกราฟมาตรฐาน

1.7 ทำซ้ำข้อ 1.1-1.6 ทั้งหมด 6 ซ้ำ แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณ ดังสูตร

$$RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100$$

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N}(x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

เมื่อ RSD = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative standard deviation)

SD = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation)

x_i = ความเข้มข้นของฟอร์มัลดีไฮด์ในแต่ละตัวอย่าง

$\bar{x}$ = ความเข้มข้นของฟอร์มัลดีไฮด์เฉลี่ย

n = จำนวนตัวอย่าง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2. ขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of Detection, LOD) (แม้น อมรสิทธิ์ และคณะ, 2552)

หมายถึง ปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ แต่ไม่สามารถแสดงปริมาณได้อย่างมีความแม่นในกรณีที่ทดสอบสารปริมาณน้อย มีการรายงานผลว่าตรวจไม่พบ จำเป็นต้องรายงานค่าขีดจำกัดในการตรวจพบด้วย การตรวจสอบขีดจำกัดในการตรวจวัดที่นิยมคือการทดสอบแบลงค์ของตัวอย่าง ทำการทดสอบซ้ำ 10 ครั้ง คำนวณส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และประมาณค่าขีดจำกัดในการตรวจวัด ดังนี้

$$LOD = \overline{X}_{blank} + 3S_{blank}$$

$\overline{X}_{blank}$ คือค่าเฉลี่ยของแบลงค์

S_{blank} คือส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของแบลงค์

3. ขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation, LOQ)

หมายถึง ปริมาณต่ำสุด ที่สามารถวัดเชิงปริมาณได้อย่างมีความแม่นและความเที่ยง มีความไม่แน่นอนของการวัดอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ ขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณเป็นคุณสมบัติของการวัดที่แสดงความสามารถของวิธีในการรายงานปริมาณที่ตรวจวัดได้ โดยมีความมั่นใจว่ามีความเที่ยง ความแม่น และค่าความไม่แน่นอนของการวัดอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ

การตรวจสอบขีดจำกัดในการตรวจวัดเชิงปริมาณ ทำโดยการประมาณค่า LOQ จากการทดสอบแบลงค์ของตัวอย่าง วัดซ้ำ 10 ครั้ง คำนวณค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ดังนี้

$$LOQ = \overline{X}_{blank} + 10S_{blank}$$

$\overline{X}_{blank}$ คือค่าเฉลี่ยของแบลงค์

S_{blank} คือส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของแบลงค์

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University