บทที่ 3

ขั้นตอนและวิธีดำเนินการศึกษา

ในการศึกษาสารประกอบของสารหนูในผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากสัตว์ทะเล มีขั้นตอนและวิธีดำเนินการศึกษา ดังต่อไปนี้

3.1 ขั้นตอนการศึกษา

3.1.1 การศึกษาความใช้ได้ของการวิเคราะห์โดยใช้ HG-AAS ดังนี้ : Calibration Range , LOD (Limit of Detection) , Accuracy , Precision

3.1.2 ศึกษาการหาปริมาณสารหนูรวม ในผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากสัตว์ทะเล โดยใช้ HG-AAS

3.1.3 ศึกษาการหาปริมาณของสารหนูอนินทรีย์ และสารหนูอินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากสัตว์ทะเล โดยใช้ เทคนิคการสกัด และตรวจปริมาณสารหนูโดยใช้ HG-AAS เทคนิค

3.1.4 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงสารหนูของกระบวนการหมักระยะต่างๆใน น้ำปลา และไตปลา

3.1.5 ศึกษาการหาสารประกอบของสารหนูในผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากสัตว์ทะเล โดยใช้ HPLC-ICP-MS

3.2 สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการศึกษานี้ (สารเคมีที่ใช้ทุกชนิดแบบ AR grade)

- Nitric acid
- Hydrogen peroxide
- Sulfuric acid
- Toluene
- Hydrochloric acid
- Potassium Iodide
- Methanol

3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือวิจัย

3.3.1 อุปกรณ์

- หลอดเหวี่ยง (Centrifuge tube) ชนิด Polypropylene ขนาด 15 มิลลิลิตร
- บีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 25, 50, 100, 250 มิลลิลิตร
- ขวดวัดปริมาตร (Volumetric flask) ขนาด 10, 50, 100 มิลลิลิตร
- กระจกนาฬิกา (Watch glass dish)

- กระดาษกรอง (Filter paper) Whatman เบอร์ 42/125 มิลลิเมตร
- กระบอกตวง (Cylinder) ขนาด 10, 100, 250 มิลลิลิตร
- กรวยกรอง (Funnel filter)
- ปิเปต (Pipette) ขนาด 1, 5, 10, 25 มิลลิลิตร
- พาสเจอร์ปิเปต (Pasteur pipette) ขนาด 1 มิลลิลิตร

3.3.2 เครื่องมือวิจัย

- เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น IEC:SER 42900961
- เครื่องชั่งชนิดละเอียด Mattler:Pj3600
- เครื่อง Hydride Generation-Atomic Absorption Spectrometry (HG-AAS) Analytik Jena Nova 300 ต่อกับ Automated Hydride generation system AS52 ประมวลผลโดย Software Analytik Jena
- เครื่อง Freeze dryer ของ LABCONCO:Model 77520
- pH meter ของ ORION:920A
- เครื่องเขย่า (Shaker)
- Homogenizer

3.4 วิธีดำเนินการวิจัย

การดำเนินการวิจัยนี้ มีขั้นตอนดังนี้

3.4.1 การเตรียมการทดลอง

3.4.1.1 การเตรียมสารละลาย

3.4.1.1.1 6M Hydrochloric acid solution

ปิเปต 12M Hydrochloric acid solution 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ได้ 500 มิลลิลิตร

3.4.1.1.2 9M Hydrochloric acid solution

ปิเปต 12M Hydrochloric acid solution 75 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร

3.4.1.1.3 3% v/v Hydrochloric acid solution

ปิเปต 12M Hydrochloric acid solution 8.2 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร

3.4.1.1.4 50% w/v Potassium Iodide solution

ชั่ง Potassium Iodide 50 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

3.4.1.1.5 การเตรียมสารมาตรฐานสารหนู (Standard solution)

3.4.1.1.5.1 Stock standard solution ความเข้มข้น 1000 , 100 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ppm)

- สารละลายมาตรฐานสารหนู 100 ppm

ปิเปตสารละลายสต็อกสารหนู 1000 ppm 10 มิลลิลิตร เติมด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

- สารละลายมาตรฐานสารหนู 1 ppm

ปิเปตสารละลายสต็อกสารหนู 100 ppm 1 มิลลิลิตร เติมด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

- สารละลายมาตรฐานสารหนู 100 ppb

ปิเปตสารละลายสต็อกสารหนู 1 ppm 10 มิลลิลิตร เติมด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

3.4.1.1.5.2 Working standard solution ความเข้มข้น 50, 40, 30, 20, 10, 5, 2 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (ppb) เตรียมได้ดังต่อไปนี้

- สารละลายมาตรฐานสารหนู 50 ppb

ปิเปตสารละลายสต็อกสารหนู 1 ppm 5 มิลลิลิตร เติมด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

T 25201574

- สารละลายมาตรฐานสารหนู 40 ppb

ปิเปตสารละลายสต็อกสารหนู 1 ppm 4 มิลลิลิตร เติมด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

- สารละลายมาตรฐานสารหนู 30 ppb

ปิเปตสารละลายสต็อกสารหนู 1 ppm 3 มิลลิลิตร เติมด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

- สารละลายมาตรฐานสารหนู 20 ppb

ปิเปตสารละลายสต็อกสารหนู 1 ppm 2 มิลลิลิตร เติมด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

- สารละลายมาตรฐานสารหนู 10 ppb

ปิเปตสารละลายสต็อกสารหนู 1 ppm 1 มิลลิลิตร เติมด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

- สารละลายมาตรฐานสารหนู 5 ppb

ปิเปตสารละลายสต็อกสารหนู 100 ppb 5 มิลลิลิตร เติมด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

- สารละลายมาตรฐานสารหนู 2 ppb

ปิเปตสารละลายสต็อกสารหนู 100 ppb 2 มิลลิลิตร เติมด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

3.4.2 การศึกษาความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารหนูโดยใช้ HG-AAS

3.4.2.1 การศึกษาช่วงการตรวจวัดปริมาณสารหนูที่เหมาะสม (Calibration range)

เพื่อหาช่วงของความเข้มข้นที่สามารถตรวจวัดสารหนูได้โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานสารหนู ความเข้มข้น 0 , 2 , 5 , 10 , 20 , 30 ,40 , 50 ppb (เตรียมตาม 3.4.1.1.5.2) นำมาวิเคราะห์ด้วย HG-AAS ที่ 193.7 นาโนเมตร แล้วนำผลที่ได้มาเขียนกราฟระหว่าง Peak area กับความเข้มข้นของสารหนู และหาค่า Linear regression

3.4.2.2 การหา Limit of Detection (LOD)

เพื่อศึกษาความสามารถของเครื่องมือที่จะตรวจวัดสารหนูในระดับต่ำสุด โดยดูจากสัญญาณเครื่อง ทำได้โดยการใช้สารละลายแบลงค์มาวัดการดูดกลืนแสงของสารหนู โดยใช้สภาวะการศึกษาตาม 3.4.2.1 ทำการทดลองซ้ำ 5 ครั้ง และวัด Peak area มาหาค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากนั้นนำค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานมาคูณ3 แล้วบวกค่าเฉลี่ย และนำค่าที่ได้มาคำนวณความเข้มข้นของสารหนู จะได้ค่า Limit of detection

3.4.2.3 การหาค่าความแม่นยำ (Precision) ในรูปของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (RSD)

เพื่อหาความแม่นยำของปริมาณสารหนูในตัวอย่างอาหารหมักจากสัตว์ทะเลทำได้โดยนำ CRM DORM-2 (Dogfish muscle) มาทำการวิเคราะห์ ซ้ำ 3ครั้ง ภายใต้สภาวะการศึกษาตามข้อ 3.4.2.1 และดูค่าความแม่นยำโดยใช้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

3.4.3 การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

วิธีการวิเคราะห์และความถูกต้องของวิธีโดยใช้ CRM (Certified Refference Material)

3.4.3.1 นำ CRM มาทำการหาปริมาณสารหนูรวม โดยย่อยด้วยกรดไนตริก กรดซัลฟุริก และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ใช้หลักการเดียวกับข้อ 3.4.4.3

3.4.3.2 นำ CRM มาหาปริมาณสารหนูอนินทรีย์ และสารหนูอินทรีย์ โดยทำการสกัด ใช้หลักการเดียวกับข้อ 3.4.4.4

3.4.3.3 การวัดปริมาณสารหนูในตัวอย่าง CRM และการคำนวณ ใช้หลักการเดียวกับข้อ 3.4.4.6และ 3.4.4.7

3.4.4 การศึกษาปริมาณสารหนูในผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากสัตว์ทะเล

3.4.4.1 การกำหนดสถานที่เก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากสัตว์ทะเล

กำหนดสถานที่เก็บตัวอย่างโดย นำตัวอย่างจากจังหวัดที่ติดทะเลซึ่งมีการผลิตอาหารหมักจากสัตว์ทะเล คือ สมุทรปราการ สมุทรสาคร ระยอง นครศรีธรรมราช พัทลุง ปัตตานี นราธิวาส

3.4.4.2 การเตรียมตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากสัตว์ทะเล

1.นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากสัตว์ทะเลที่เก็บในตู้แช่แข็งที่ –20 องศาเซลเซียส ออกมาไว้ที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งไว้จนมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง

2. ทำให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วย Homogenizer

3. วัด pH ของตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากสัตว์ทะเล โดยนำมาเจือจางน้ำให้ได้ 50% w/v

4. นำมาทำ Freeze dried เพื่อหา %Moisture

5. นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากสัตว์ทะเลมาทำการย่อยเพื่อหาสารหนูรวมตามวิธี 3.4.4.3

6. นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากสัตว์ทะเลมาทำการสกัดเพื่อหาสารหนูอนินทรีย์ ตามข้อ 3.4.4.4

3.4.4.3 การวิเคราะห์หาสารหนูรวมในผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากสัตว์ทะเล

นำตัวอย่างอาหารทะเลหมักที่เป็นเนื้อเดียวกัน 1.xxxx กรัม มาทำการย่อยด้วยกรดไนตริก ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และกรดซัลฟุริก บนเตาจนสารละลายใส ตั้งทิ้งให้เย็น ทำให้เจือจางด้วย 3 % กรดไฮโดรคลอริก 10 มิลลิลิตร

3.4.4.4 การวิเคราะห์หาสารหนูอนินทรีย์ ในผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากสัตว์ทะเล

3.4.4.4.1 การสกัดตัวอย่างอาหารหมัก (Suner et al., 2001)

1 นำผลิตภัณฑ์อาหารหมักมา Homogenized

2 นำตัวอย่างที่ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน 1 กรัม ใส่ขวดรูปชมพู่ (ทำซ้ำ 2 ครั้ง)

3 เติมกรดไฮโดรคลอริก 6 โมลต่อลิตร 50 มิลลิลิตร

4 เขย่า 30 นาที เซนติฟิวจ์ที่ 2000 รอบ 10 นาที

5 นำสารละลายส่วนใส เติมกรดไฮโดรคลอริก 12 M 10 มิลลิลิตร และสารละลาย โพแทสเซียมไอโอไดด์ 50 % 1.5 มิลลิลิตร

6 ตั้งทิ้งไว้มากกว่า 15 นาที เทใส่กรวยแยก ขนาด 100 มิลลิลิตร

7 เติมโทลูอีน 10 มิลลิลิตร เขย่า 10นาที ตั้งทิ้งให้แยกชั้น นำชั้นโทลูอีนใส่ใน ขวดรูปชมพู่ (ทำซ้ำ 3 ครั้ง)

8 เติมกรดไฮโดรคลอริก 9 M 10 มิลลิลิตร และสารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ 50 % 0.5 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีชั้นโทลูอีน

9 เทใส่กรวยแยก ขนาด 100 มิลลิลิตร เขย่าแยกชั้นโทลูอีน

10 เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เขย่า 10 นาที แยกชั้นน้ำใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร (ทำซ้ำ 2 ครั้ง)

11 นำชั้นน้ำที่สกัดได้มาทำการย่อย โดยเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 5 นาที และเติมกรดไนตริก 30 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ ตลอดคืน

12 ย่อย (digest)ใช้ flaskโดยให้ความร้อนบนเตาจนสารละลายใส ทำให้เจือจางด้วย 3 %ไฮโดรคลอริก 10 มิลลิลิตร (ดู 3.4.4.3)

3.4.4.5 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารหนูในกระบวนการผลิตอาหารหมัก

นำอาหารหมัก เช่น น้ำปลา และไตปลา ที่ระยะต่างๆมาทำการหาสารหนูรวมและสกัดสารหนูอนินทรีย์และเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงสารหนูของแต่ละระยะ

3.4.4.5.1 การเตรียมตัวอย่าง

1. นำตัวอย่างอาหารหมักระยะต่างๆ มาทำให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยการ Homogenized เพื่อหาปริมาณสารหนูรวม แล้วย่อยด้วยกรด และใช้หลักการเดียวกับข้อ 3.4.4.3

2. นำตัวอย่างอาหารหมักระยะต่างๆ ที่คนให้เป็นเนื้อเดียวกันมาทำการสกัด แยกสารหนูอนินทรีย์ออกจากสารหนูอินทรีย์ใช้หลักการเดียวกับข้อ 3.4.4.4.1

3.4.4.6 การวัดปริมาณสารหนู ในผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากสัตว์ทะเล โดยมีสภาวะการใช้เครื่องดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 สภาวะการใช้เครื่อง HG-AAS

Parameter	As
Sample load time (sec)	20
Pump speed	6
Argon flow rate (L/h)	12
Flow rate (ml/min)	55
Delay time (sec)	5
Integration time (sec)	55
Reaction time (min)	25
HCL current (mA)	8
As wavelength (nm)	193.7
Slit (nm)	1.2
Cell Temperature (C)	950
Measurement	Peak area

การวัดปริมาณสารหนูรวม และสารหนูอนินทรีย์ ทำได้โดยนำสารละลายที่ได้มาทำการย่อย ตามข้อ 3.4.4.3 และ ข้อ 3.4.4.4 ตามลำดับ จนสารละลายใส และนำมาทำการวิเคราะห์ โดยใช้เครื่อง HG-AAS แล้วนำผลที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารหนู ที่ความเข้มข้น 2, 5, 10, 20, 30, 40 และ 50 ppb จะได้ปริมาณสารหนู

3.4.4.7 การคำนวณหาปริมาณสารหนู

$$\text{ปริมาณสารหนู} = \frac{Q \times V}{W} \quad \text{ng/g (ppb)}$$

โดยทำ Q = ความเข้มข้นของสารหนู (ng/ml) อ่านจากกราฟมาตรฐาน

V = ปริมาณทั้งหมดของสารละลาย (ml)

W = น้ำหนักเป็นกรัมของตัวอย่างที่ใช้ (g)

3.4.5 การหาสารประกอบของสารหนูในผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากสัตว์ทะเล

3.4.5.1 การสกัดตัวอย่าง

1 นำผลิตภัณฑ์อาหารหมักมา Homogenized

2 นำตัวอย่างที่ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน 5 กรัม ชั่งใส่หลอดเซนติฟิวจ์

3 เติมส่วนผสม 1:1 ของ methanol/water 10 มิลลิลิตร

4 นำมาสกัดโดยการเขย่า และนำไป centrifuge 10 นาที 5000 รอบ/นาที

5 เทสารสกัดใส่ขวดก้นกลม

6 ทำซ้ำ 4 ครั้ง ข้อ 3) – 5)

7 นำสารสกัดที่อยู่ในชั้นน้ำนำมารวมกัน ทำให้แห้งโดยเครื่อง rotary evaporated ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

8 ละลายสารที่เหลือในขวดทำให้มีปริมาตร 10 มิลลิลิตร ด้วย MeOH

3.4.5.2 ทำการวิเคราะห์ ด้วยเครื่อง HPLC-ICP-MS (ทำการตรวจวัดที่คณะเคมี วิเคราะห์สิ่งแวดล้อม ได้รับการอนุเคราะห์จาก Dr. Jorg Feldmann : Aberdeen University, Scotland, UK)