10

248163

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

248163

รายงานการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2552

ที่ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย ประจำปีงบประมาณ พ.ศ.2552 ตามมติคณะรัฐมนตรี

โครงการวิจัยเรื่อง: การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณคาร์บอนมอนอกไซด์ในเนื้อสัตว์แช่แข็งในบรรจุภัณฑ์ดัดแปรบรรยากาศ

Development of the determination methods of carbon monoxide in modified atmosphere packaged frozen meat

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปี งบประมาณ พ.ศ.2552 **จำนวนเงิน** 180,000 **บาท**

ระยะเวลาการทำวิจัย 2 ปี **เริ่มทำการวิจัย** 1 ตุลาคม 2551

รายงานการวิจัย ปี 2552 **ระหว่าง** 1 ตุลาคม 2551 **ถึง** 30 กันยายน 2552

รายนามคณะผู้วิจัย พร้อมทั้งหน่วยงานที่สังกัดและหมายเลขโทรศัพท์

1. ผ.ศ.พรพรรณ อุดมกาญจนนันท์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทร. 02-218-7614
2. ผ.ศ.ดร.สุชาดา จูอนุวัฒนกุล ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทร.02-218-7614

(ลงชื่อ)..หัวหน้าโครงการ

(พรพรรณ อุดมกาญจนนันท์)

............../................./.............

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
248163

รายละเอียดเกี่ยวกับผลงานความก้าวหน้าของการวิจัย(แนบท้าย) มีดังนี้

1. วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณคาร์บอนมอนอกไซในเนื้อสัตว์แช่แข็งในบรรจุภัณฑ์ดัดแปรบรรยากาศ ที่ถูกต้อง แม่นยำ และรวดเร็ว

2. ตารางเปรียบเทียบระหว่างแผนงานวิจัยตามที่เสนอไว้ในโครงการกับงานวิจัยที่ได้ดำเนินการไป

แผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัย

กิจกรรม	ปีที่ 1												ปีที่ 2	
	เดือน												เดือน	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1-6	6-12
1. ประมวลข้อมูล วิเคราะห์ข้อมูลจากงานวิจัยที่มีผู้ทำแล้ว	↔ (แผน) ↔ (ดำเนินการ)													
2. เขียนร่างวิธีวิเคราะห์		↔ (แผน) ↔ (ดำเนินการ)												
3. จัดเตรียมสารมาตรฐาน สารเคมี เครื่องมือ อุปกรณ์		↔ (แผน) ↔ (ดำเนินการ)												
4. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์โดยใช้สารมาตรฐาน			↔ (แผน) ↔ (ดำเนินการ)	↔ ↔	↔ ↔									
5. ออกแบบวิธีเตรียมสารตัวอย่าง การสกัด และการกลั่นกัด						↔ (แผน) ↔ (ดำเนินการ)	↔ ↔	↔ ↔	↔ ↔	↔ ↔	↔ ↔	↔ ↔	↔ (แผน)	
6. วิเคราะห์ตัวอย่าง รายงานผล พร้อมค่าบ่งชี้ความถูกต้องและแม่นยำของวิธีวิเคราะห์						↔ (แผน) ↔ (ดำเนินการ)	↔ ↔	↔ ↔	↔ ↔	↔ ↔	↔ ↔	↔ ↔	↔ (แผน)	
7. วิเคราะห์ สรุปผลการวิจัย และเขียนรายงาน														↔ (แผน)

6. เขียนบทความเพื่อเสนอ ผลงานในการประชุมวิชา การหรือตีพิมพ์ในวารสาร														◀▶

◀ ▶ แผนงานวิจัยตามที่เสนอไว้ในโครงการ ◀——▶ แผนงานวิจัยที่ได้ดำเนินการแล้ว

3. รายละเอียดผลงานวิจัยที่ได้ดำเนินการไปแล้ว

3.1 มูลเหตุจูงใจและความสำคัญของปัญหา

เนื้อสัตว์เป็นผลิตภัณฑ์ที่เน่าเสียเนื่องจากการกระทำของเชื้อจุลินทรีย์ได้ง่ายมาก สามารถเก็บได้เพียง 2-3 วัน ที่อุณหภูมิตู้เย็น ซึ่งไม่นานเพียงพอสำหรับการผลิตและจำหน่ายในระดับอุตสาหกรรม จึงมีการนำวิทยาการต่างๆมาใช้เพื่อช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์และเพิ่มอายุการเก็บรักษา ต่อมาได้มีการวิจัยมากมายเกี่ยวกับการใช้บรรจุภัณฑ์แบบดัดแปรบรรยากาศ (modified atmosphere packaging, MAP) และการบรรจุภายใต้สุญญากาศ (vacuum packaging)กับเนื้อสัตว์ชนิดต่างๆ ที่นิยมบริโภคกันทั่วไป เช่น เนื้อวัว เนื้อหมู เนื้อลูกวัวและเนื้อแกะ เป็นต้น ซึ่งประสบความสำเร็จในระดับหนึ่ง อย่างไรก็ตามอุณหภูมิที่ใช้เก็บรักษายังคงเป็นปัจจัยที่สำคัญมาก อาจกล่าวได้ว่าเป็นปัจจัยที่กำหนดอายุการเก็บรักษาเนื้อสัตว์ การใช้ MAP หรือการบรรจุภายใต้สุญญากาศจะไม่บังเกิดประโยชน์ที่น่าพอใจถ้าไม่ควบคุมอุณหภูมิให้ต่ำเพียงพอ (ไม่เกิน 4°ซ)

การเสื่อมเสียคุณภาพของเนื้อสัตว์ - การเปลี่ยนแปลงสี

สีเป็นคุณภาพทางประสาทสัมผัสแรกที่ผู้บริโภคใช้ในการตัดสินคุณภาพของเนื้อสัตว์ที่วางจำหน่าย ซึ่งเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค แม้ว่าบางครั้งสีแดงสดของเนื้อสัตว์ที่ผู้บริโภคต้องการนั้นมิได้เกี่ยวข้องโดยตรงกับความสดหรือความนุ่มของเนื้อสัตว์ สีแดงสดของเนื้อสัตว์มีความเสถียรต่ำเมื่อเก็บไว้ 2-3 วันในตู้เย็น โดยจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลคล้ำ การเปลี่ยนแปลงสีของเนื้อสัตว์นี้ เป็นปัญหาที่สำคัญมากต่อการเก็บรักษาของเนื้อวัว ในขณะที่เนื้อหมู และเนื้อลูกแกะนั้นปัญหานี้ไม่ค่อยรุนแรงเท่าใด เนื่องจากสีเนื้อประเภทนี้ตามธรรมชาติมีสีซีดจางอยู่แล้ว การเปลี่ยนแปลงสีของเนื้อสัตว์ในที่นี้จะหมายถึงสีของสัตว์เนื้อแดงเป็นสำคัญ ซึ่งสามารถจำแนกสาเหตุการเปลี่ยนแปลงได้ดังนี้

1. ปริมาณก๊าซออกซิเจนไม่เพียงพอที่จะรักษาสีแดงสดไว้ได้
2. การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ชอบอากาศ (aerobic bacteria) ทำให้ปริมาณก๊าซออกซิเจนลดลง ไม่เพียงพอที่จะรักษาสีแดงสดไว้ได้

3. การสูญเสียความชื้นที่ผิวเนื้อ

เนื้อชำแหละใหม่ๆจะมีสีแดงแกมม่วงของไมโอโกลบิน (Myoglobin) ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยาออกซิจิเนชั่น(Oxygenation) กับก๊าซออกซิเจนในอากาศได้ออกซิไมโอโกลบิน (Oxymyoglobin) ทำให้เนื้อมีสีแดงสดซึ่งเป็นสีที่ผู้บริโภคต้องการ แต่เนื่องจากออกซิไมโอโกลบินมีความเสถียรต่ำ เมื่อเก็บไว้ในอากาศต่อไปจะถูกออกซิไดส์เป็นเมตไมโอโกลบิน(Metmyoglobin) ทำให้เนื้อมีสีน้ำตาลคล้ำที่ผู้บริโภคไม่ยอมรับ

ในกรณีที่เก็บเนื้อไว้ภายใต้บรรยากาศที่มีก๊าซออกซิเจนน้อยๆ เช่นการบรรจุภายใต้สุญญากาศ ซึ่งมักจะพบว่ามีก๊าซออกซิเจนหลงเหลืออยู่บ้างเสมอ ปริมาณก๊าซนี้สามารถออกซิไดซ์ไมโอโกลบินและออกซิไมโอโกลบินให้เป็นเมตไมโอโกลบินได้ อัตราการเกิดปฏิกิริยานี้จะสูงสุดเมื่อความดันย่อยของก๊าซออกซิเจนมีค่าประมาณ 0.0013-0.0018 atm หรืออีกนัยหนึ่งเมตไมโอโกลบินจะมีมากกว่าเม็ดสีอื่นๆ และปฏิกิริยานี้จะเกิดช้าลงเมื่อปริมาณก๊าซออกซิเจนมีมากกว่าร้อยละ 5 ขึ้นไป

เมื่อก๊าซออกซิเจนที่หลงเหลืออยู่นั้นถูกใช้ไปจนกระทั่งมีเหลือน้อยกว่าร้อยละ 0.1 เมตไมโอโกลบินจะถูกเอนไซม์ที่เนื้อสร้างขึ้นมารีดิวซ์เป็นไมโอโกลบินซึ่งมีความเสถียรสูงในสภาพไร้ก๊าซออกซิเจน สีของเนื้อจะกลายเป็นแดงแกมม่วง

แบคทีเรียที่พบมากในเนื้อตามปกติเป็นพวกที่ชอบอากาศ เช่น *Pseudomonas aeroginosa, Pseudomonas geniculata, Pseudomonas fluorescens, Achromobacter faciens* และ *Flavobacterium rehenanus* เป็นต้น แบคทีเรียเหล่านี้จะใช้ก๊าซออกซิเจนเพื่อการเจริญเติบโต ทำให้ปริมาณก๊าซออกซิเจนลดลง ออกซิไมโอโกลบินจะเปลี่ยนเป็นเมตไมโอโกลบินและไมโอโกลบินตามลำดับ ทำให้เนื้อมีสีแดงแกมม่วง

บรรจุภัณฑ์แบบดัดแปรบรรยากาศ (MAP)

บรรจุภัณฑ์แบบดัดแปรบรรยากาศ (MAP) นิยมใช้เพื่อการขายปลีกซึ่งต้องการอายุการเก็บไม่มากเท่ากับการบรรจุภายใต้สุญญากาศ เมื่อนำเนื้อชิ้นใหญ่ๆซึ่งผ่านการบรรจุภายใต้สุญญากาศมาก่อน มาตัดแบ่งเป็นชิ้นเล็กๆแล้วบรรจุในสภาพบรรยากาศที่มีก๊าซเป็นองค์ประกอบ โดยสภาพบรรยากาศมีผลต่อ 1.สีของเนื้อ 2.คุณภาพทางจุลินทรีย์ และ3.คุณภาพทางประสาทสัมผัส

ก๊าซชนิดต่างๆที่มีในบรรจุภัณฑ์แบบดัดแปรบรรยากาศได้แก่

ก๊าซออกซิเจน--แอโรบิกแบคทีเรียที่ปนเปื้อนมากับเนื้อจะใช้ก๊าซออกซิเจนและให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกมา ทำให้สีของเนื้อเกิดการเปลี่ยนแปลง

ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์--การใช้คาร์บอนไดออกไซด์ใน MAP มีจุดประสงค์หลักเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ประเภทแอโรบิคแบคทีเรีย

ก๊าซไนโตรเจน เพื่อแทนที่ก๊าซออกซิเจนและรักษาความดันภายในภาชนะบรรจุมิให้ลดต่ำเกินไป เนื่องจากก๊าซออกซิเจนและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์บางส่วนจะสูญหายไประหว่างการเก็บรักษา ก๊าซไนโตรเจนไม่ได้มีผลโดยตรงต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์หรือการเปลี่ยนแปลงสีของเนื้อ

ก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์--ทำให้เนื้อมีสีแดงสดเป็นระยะเวลานาน เนื่องจากคาร์บอกซีไมโอโกลบิน (Carboxymyoglobin) มีความเสถียรสูง

การบรรจุผลิตภัณฑ์เนื้อภายใต้ MAP ก๊าซที่นิยมใช้กันมากคือคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 20-25 ส่วนที่เหลือเป็นไนโตรเจน โดยไม่ต้องมีก๊าซออกซิเจน นิยมใช้กับผลิตภัณฑ์ที่ตัดเป็นแผ่นบางๆ เนื่องจากสามารถลอกออกมาได้ง่ายกว่าการบรรจุภายใต้สุญญากาศ การบรรจุจะใช้เครื่องขึ้นรูป-บรรจุ-ปิดผนึกในแนวนอน ขึ้นรูปถาดแบบเทอร์โมฟอร์มซึ่งนิยมใช้ PVC ความหนาตั้งแต่ 150 ไมครอน ทั้งนี้ขึ้นกับน้ำหนักผลิตภัณฑ์ที่บรรจุ เมื่อบรรจุก๊าซผสมที่ต้องการแล้วจะต้องปิดถาดทันทีด้วยฟิล์มที่ป้องกันการซึมผ่านของก๊าซได้ดี เช่น PVC/PVDC /PVC หรือฟิลม์ที่ใช้กับการบรรจุภายใต้สุญญากาศ

ก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์มีประสิทธิภาพในการจับกับไมโอโกลบินได้ดีกว่าออกซิเจนประมาณ 100-250 เท่า โดยเมื่อเกิดเป็นสารเชิงซ้อนแล้วจะมีความเสถียรสูง ซึ่งเป็นเหตุผลที่ทำให้เนื้อมีสีแดงสดเป็นระยะเวลาที่ยาวนานนั่นเอง ด้วยเหตุนี้การที่มีปริมาณก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ใน MAP มากเกินไป จะทำให้เกิดสภาวะลวงต่อผู้บริโภคได้ว่า เนื้อสัตว์นั้นยังคงสดและใหม่ ทั้งๆที่อาจมีทอกซินที่เกิดจากแบคทีเรียและเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค ในหลายประเทศทั้งสหรัฐอเมริกาและกลุ่มประเทศยุโรปปฏิเสธผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ เนื่องจากเกรงปัญหาที่อาจก่อผลเสียต่อสุขภาพของผู้บริโภคได้ ดังนั้นในหลายประเทศจึงมีการตรวจสอบและกำหนดมาตราของการใช้ก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ในบรรจุภัณฑ์ของเนื้อสัตว์แช่แข็ง

ในปัจจุบันนี้ทั้งในกลุ่มทวีปยุโรปและสหรัฐอเมริกาได้ปฏิเสธการรับสินค้าที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ ในบางประเทศที่ยังรับสินค้า แต่ก็มีข้อกำหนดว่าปริมาณคาร์บอนมอนอกไซด์ในเนื้อสัตว์มีได้ไม่เกิน 1μg/mL โดยตัวอย่างเช่น วันที่ 15/08/2007ประเทศอิตาลีได้ตรวจพบเนื้อปลาที่นำเข้าจากประเทศเนเธอร์แลนด์พบว่ามีคาร์บอนมอนอกไซด์ในเนื้อปลา จึงได้ปฏิเสธการรับสินค้านั้น

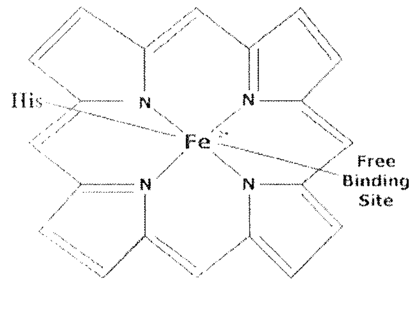
งานวิจัยนี้ได้ประยุกต์วิธีทาง Visible absorption spectrophotometry และ Gas chromatography-Mass spectrometry (GC-MS) มาวิเคราะห์ตรวจหาปริมาณก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ตกค้างหรือแทรกซึมในเนื้อสัตว์แช่แข็ง เนื่องจากวิธี Visible absorption spectrophotometry เป็นการตรวจสอบคร่าวๆและรวดเร็วว่าเนื้อสัตว์นั้นมีการผ่านก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์หรือไม่ และการ

ตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี GC-MS ซึ่งเป็นเทคนิคขั้นสูงและสามารถหาปริมาณก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ที่แทรกซึมอยู่ในเนื้อสัตว์ได้อย่างแม่นยำ

3.2 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

ในการผ่านก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ลงในบรรจุภัณฑ์แบบดัดแปรบรรยากาศสำหรับเนื้อสัตว์ประเภทเนื้อแดงมีวัตถุประสงค์หลัก 2 ประการคือ ลดการเกิดจุลินทรีย์เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ และเพื่อทำให้ผลิตภัณฑ์มีสีแดงสดเป็นระยะเวลาที่ยาวนาน ซึ่งสามารถใช้กับอาหารได้ดีเนื่องจากก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ เป็นก๊าซที่ปราศจากกลิ่น สี และรสชาด ซึ่งก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์จะเพิ่มประสิทธิภาพของการบรรจุเนื้อสัตว์แช่แข็งแบบ MAP เพื่อเป็นสินค้าส่งออก

องค์ประกอบที่ทำให้เนื้อปลาทูน่ามีสี เกิดจากสารไมโอโกลบินซึ่งเป็นองค์ประกอบของเลือด ไมโอโกลบินทำหน้าที่สำคัญในการเก็บรักษาออกซิเจนในกล้ามเนื้อของสิ่งมีชีวิต ไมโอโกลบินประกอบด้วย วง porphyrin ของ Fe^{2+} ด้านหนึ่งจับกับฮีสทีดีน (His) ส่วนอีกด้านหนึ่งเป็นตำแหน่งที่ว่างที่ก๊าซ เช่น ออกซิเจน หรือ ก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์จะเข้ามาจับ เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของไมโอโกลบินได้ ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 สารประกอบเชิงซ้อนของไมโอโกลบิน

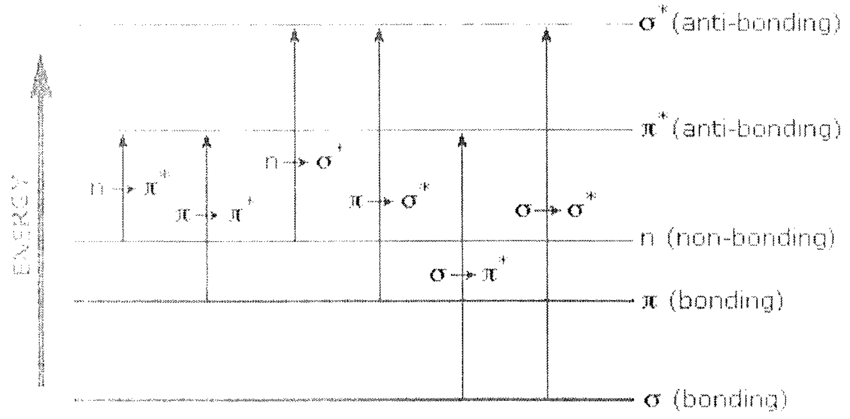
ดังนั้นในการดำเนินการวิเคราะห์จึงได้ประยุกต์วิธีทาง Visible Absorption Spectrophotometry และวิธีทาง Gas Chromatography/Mass Spectrometry มาตรวจหาคาร์บอนมอนอกไซด์ในเนื้อปลาทูน่าแช่แข็ง และประยุกต์หาในเนื้อแดงอื่นๆด้วย

Visible Absorption Spectrophotometry

เนื่องจากว่า ไมโอโกลบินที่สกัดออกมาได้ เป็นสารละลายที่มีสีแดง ดังนั้นการนำมาตรวจวิเคราะห์ จึงสามารถใช้เทคนิค visible absorbtion spectrophotometry ได้ ซึ่งข้อจำกัดของวิธีนี้คือสารละลายนั้นต้องเป็นเนื้อเดียวกัน โดยเครื่องมือนี้จะอาศัยหลักการการดูดกลืนแสงของโมเลกุลที่มีโครโมฟอร์ (chromophore) โดยพลังงานที่ดูดกลืนถูกนำไปใช้ในการเคลื่อนที่ของอิเล็กตรอนวง

นอกจากหรืออิเล็กตรอนที่เคลื่อนที่ง่ายจากระดับพลังงานต่ำสู่ระดับพลังงานสูง การเคลื่อนที่แบบต่างๆ ของอิเล็กตรอนแสดงในภาพไดอะแกรม (รูปที่ 2)

สารประกอบเชิงซ้อนของไมโอโกลบินในแบบต่างๆ ได้แก่ oxymyoglobin (oxygen-bound myoglobin), carboxymyoglobin (carbonmonoxide-bound myoglobin), metmyoglobin (Fe (III) myoglobin) และ deoxymyoglibin (Fe(II) myoglobin) มีระดับพลังงานภายในโมเลกุลต่างกัน จึงดูดกลืนแสงได้ดีที่สุดที่ความยาวคลื่น (λmax) ต่างกัน สามารถอาศัยสมบัตินี้เพื่อใช้วิเคราะห์ปริมาณด้วยเทคนิค visible absorption spectrophotometry ได้



รูปที่ 2 ไดอะแกรมการเคลื่อนที่แบบต่างๆของอิเล็กตรอนในโมเลกุลเมื่อมีการดูดกลืนแสงในช่วงยูวี-วิสิเบิล

เครื่อง UV-Visible absorption spectrophotometer จะแสดงผลออกมาเป็นค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance, A) ณ ค่าความยาวคลื่น (wavelength, λ) หนึ่งๆ โดยมีความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลายเป็นไปตามกฎของเบียร์ (Beer's law)

Beer's law: $A = \varepsilon bc$

โดย A = absorbance, ε = absorptivity, b = ความกว้างของ cuvet, c = ความเข้มข้นของสารละลาย

ค่าการดูดกลืนแสงของของผสมจะเท่ากับผลรวมของค่าการดูดกลืนแสงขององค์ประกอบของของผสมแต่ละตัว ตัวอย่างเช่น สารละลายผสมระหว่าง carboxymyoglobin และ deoxymyoglobin จะมีค่าการดูดกลืนแสงของของผสมที่ความยาวคลื่นหนึ่งเป็นดังสมการ 1

A(รวม) A จาก carboxymyoglobin + A จาก deoxymyoglobin ...(1)

Gas Chromatography-Mass Spectrometry

เครื่อง Gas chromatograph ที่มีเครื่องตรวจวัดแบบ Mass spectrometer นั้น เป็นเครื่องมือขั้นสูงที่วิเคราะห์ได้แม่นยำและยืนยันเอกลักษณ์ของสารได้พร้อมกัน ประกอบไปด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนของเครื่อง Gas chromatograph (GC) ซึ่งเป็นส่วนที่ทำหน้าที่ในการแยกองค์ประกอบของสารที่มีอยู่ในตัวอย่างให้ออกมาทีละองค์ประกอบก่อนที่จะเข้าสู่ เครื่องตรวจวัด และอีกส่วนคือ เครื่อง Mass spectrometer (MS) ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นเครื่องตรวจวัดในการตรวจสอบดูว่า องค์ประกอบต่างๆ ที่ผ่านออกมาจากเครื่อง GC นั้น มีมวลต่อประจุ (mass/charge, m/z)เป็นเท่าไร เพื่อที่จะได้สามารถบอกได้ว่า เป็นสารชนิดใด และมีปริมาณเท่าใด

สมมติฐานและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

[1]Smulevich และคณะ ได้ใช้เทคนิคสเปคโทรสโคปีเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณไมโอโกลบิน เนื่องจากไมโอโกลบินมีทั้งหมด 4 รูปแบบ คือ deoxymyoglobin, oxymyoglobin, metmyoglobin, carboxymyoglobin ซึ่งสามารถดูดกลืนแสงในช่วงวิสิเบิลได้ โดยจะดูดกลืนแสงได้มากที่สุดที่ความยาวคลื่น 431, 414, 406 และ 420 nm ตามลำดับ การวิเคราะห์สารทั้งสี่ให้ได้ผลพร้อมกันในการวิเคราะห์ครั้งเดียวด้วยเทคนิค visible absorption spectrophotometry นั้นสามารถทำได้โดยใช้เทคนิคการวัดการดูดกลืนแสงของสารละลายผสมที่ความยาวคลื่นหลายค่า โดยผลที่รายงานนั้นแสดงออกมาในรูปของค่าการดูดกลืนแสง โดยในงานวิจัยนี้การคำนวณหาปริมาณคาร์บอนมอนอกไซด์ในเนื้อปลาทูน่าทำได้โดยการแทนค่าในสูตร

$$\lambda_{CO} = \frac{[A_{(420)} \times 0.78] - [A_{(431)} \times 0.67]}{[A_{(420)} \times 0.32] + [A_{(431)} \times 0.55]}$$

โดย λ_{CO} คือ เศษส่วนของคาร์บอกซีไมโอโกลบินในไมโอโกลบินทั้งหมด

A(420) คือ ค่าการดูดกลืนแสงรวมของสารละลายผสมที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร

และ A(431) คือ ค่าการดูดกลืนแสงรวมของสารละลายผสมที่ความยาวคลื่น 431 นาโนเมตร

หรือการหาค่าสัดส่วนระหว่าง ค่าการดูดกลืนแสงที่420 นาโนเมตรส่วนด้วยค่าการดูดกลืนแสงที่ 431 นาโนเมตร ถ้าค่าสัดส่วนที่ได้มีค่ามากกว่า 0.88 แสดงว่าเนื้อปลาทูน่านั้นผ่านการเก็บรักษาโดยใช้ก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์

ปัญหาในการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Visible absorption spectrometry คือ สารละลายของน้ำเลือดที่มีไมโอโกลบินนั้นมิได้เป็นสารละลายที่แท้จริง อาจจัดเป็นสารละลายคอลลอยด์ ทำ

ให้มีการกระเจิงของแสงเข้ามารบกวนการดูดกลืนแสง ทำให้เกิดความผิดพลาดในการวัดค่าการดูดกลืนแสง และน้ำเลือดจากเนื้อสัตว์แต่ละชนิดมีความหนาแน่นหรือความเข้มต่างกัน จึงมีความจำเป็นต้องหาค่า absorptivity ของไมโอโกลบินชนิดต่างๆในเลือดแต่ละชนิดที่ได้มาจากเนื้อสัตว์ต่างชนิด

เทคนิค Visible absorption spectrometry เป็นเทคนิคที่ง่าย รวดเร็ว แต่มีความแม่นยำต่ำเนื่องจากการรบกวนจากเมทริกซ์ จึงได้พิสูจน์ความใช้ได้ของเทคนิคนี้โดยเทียบกับเทคนิค Gas Chromatography/Mass Spectrometry – Selected Ion Monitoring (SIM) mode ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความแม่นยำสูง ทั้งปริมาณวิเคราะห์และพิสูจน์เอกลักษณ์

[2]Collin R. และคณะได้ทำการทดลองหาปริมาณคาร์บอนมอนอกไซด์ในเนื้อปลาทูน่าและเนื้อปลา mahi-mahi โดยเทคนิค GC-MS-full scan mode ซึ่งผู้วิจัยได้ใช้กรดซัลฟิวริกเป็นตัวปลดปล่อยก๊าซ ที่ 70 องศาเซลเซียส จะเกิดการปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ออกมา แล้วฉีดก๊าซเข้าเครื่อง GC ด้วยไซรินจ์ปริมาตร 100 μL ซึ่งพบว่าในเนื้อปลาทูน่าและเนื้อปลา mahi-mahi สด มีปริมาณคาร์บอนมอนอกไซด์เท่ากับ 150 และ 100 ng/g ตามลำดับ แต่เนื้อปลาทูน่าที่ผ่านก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ใน vacuum-packed ที่ได้มาจากหลายๆแหล่ง พบว่ามีค่าใกล้เคียงหรือมากกว่า 1 μg/g ในขณะที่เนื้อปลา mahi-mahi ที่ผ่านก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์นั้นมีปริมาณคาร์บอนมอนอกไซด์อยู่ในช่วง 500 ng/g ซึ่งความแตกต่างของปริมาณคาร์บอนมอนอกไซด์ของเนื้อปลาสดและที่ผ่านก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์นั้นเป็นเท่าตัว

3.3 สารเคมีที่ใช้

1. Sodium dithionite ($Na_2S_2O_4$), analytical grade : Sigma – Aldrich
2. Potassium hexacyanoferrate (III) , analytical grade: Merck
3. Phosphate buffer pH 7 , analytical grade, deoxygenated: Merck
4. Conc. Sulfuric acid (H_2SO_4), analar grade : Merck
5. น้ำ reversed osmosis (R.O.) : Millipore system

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้

1. UV- visible absorption spectrophotometer : Hewlett Packard รุ่น HP-8453
2. Gas chromatograph : Agilent รุ่น 6890 N
3. Mass selective detector : Agilent รุ่น 5973
4. Headspace sampler : Agilent รุ่น 7694
5. Solid Phase Extraction (SPE) Manifolds : Supelco

3.4 การทดลอง

3.4.1 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค headspace gas chromatography-mass spectrometry

3.4.1.1 การเตรียมสารละลาย

สารละลาย Potassium hexacyanoferrate (III), $K_3[Fe(CN)_6]$ เข้มข้น 20 % w/v

ชั่ง $K_3[Fe(CN)_6]$ 10 g ละลายในน้ำ R.O. จนมีปริมาตร เป็น 50 mLในขวดวัดปริมาตร เก็บไว้ในขวดแก้วและนำแช่ตู้เย็น (ประมาณ 18 °C)

สารละลายซัลฟิวริก, H_2SO_4 ความเข้มข้น 5 M

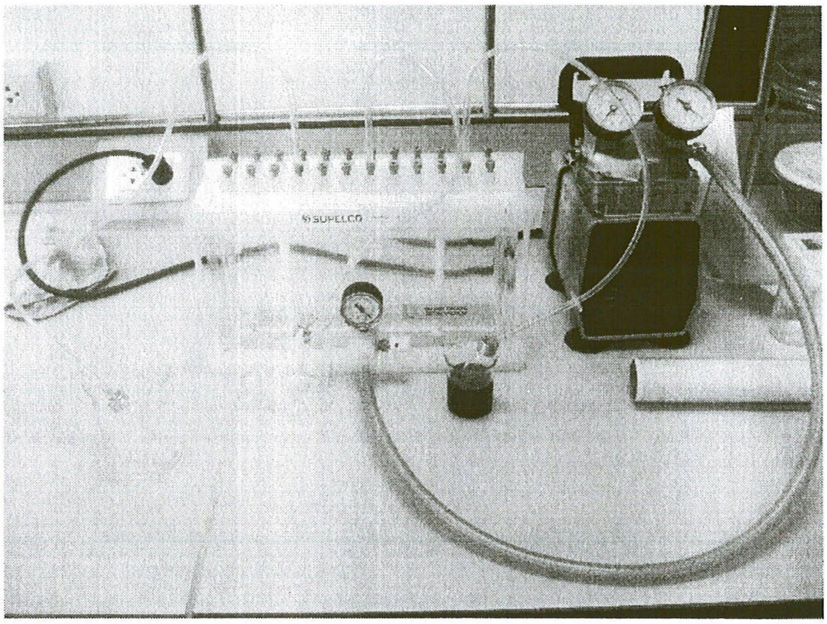
ตวง Conc. H_2SO_4 88 mL เติมลงในน้ำ R.O. 200 mL แล้วจึงปรับปริมาตรด้วยน้ำ R.O. จนมีปริมาตรเป็น 300 mL เก็บไว้ในขวดแก้วที่ปิดสนิท

3.4.1.2 การเตรียมตัวอย่าง

วิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค headspace GC-MS

1. นำปลาทูน่าแช่แข็งมาทิ้งให้ละลายโดยคงอยู่ในบรรจุภัณฑ์พลาสติกเดิมจะมีน้ำเลือดออกมา
2. นำน้ำเลือดปลาทูน่ามา 2.00 mL ใส่ใน headspace vial ขนาด 20 mL ปิดฝาให้สนิท
3. นำไปดูดอากาศในขวดออก โดยอาศัย SPE Manifolds จัดอุปกรณ์ดังรูปที่ 3 จนความดันคงเป็น 15 นิ้วปรอท เป็นเวลาประมาณ 10-15 นาที
4. เติม 5 M H_2SO_4 ปริมาณ 3 mL ลงใน headspace vial โดยการฉีดด้วยไซรินจ์ผ่าน septum จากนั้น vortex mix จนผสมกันดี
5. นำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค headspace GC-MS ทันที

หมายเหตุ ขั้นตอนที่ 4-5 เมื่อทำแล้วต้องนำไปวิเคราะห์ทันที



รูปที่ 3 การจัดอุปกรณ์ SPE Manifolds เพื่อดูดอากาศเหนือสารละลายตัวอย่างออก

3.4.1.3 วิธีการวิเคราะห์

สภาวะของ headspace sampler ที่ใช้ มีดังนี้

Equilibration time: 15 min พร้อมเขย่า

Injection (purging) time: 5 min

Temperature: 70 °C

สภาวะของ GC ที่ใช้ มีดังนี้

Carrier gas, flow rate: helium gas, 1.5 mL/min

Oven temperature: 40 °C

Column: HP PLOT MOLSIEVE capillary column 30 m × 0.322 mm i.d. × 12 μm (J&W Scientific)

Detector: Single quadrupoles mass spectrometer

สภาวะของ MS ที่ใช้ มีดังนี้

Detector mode: SIM (selected ion monitoring), ที่ m/z 32 (0-5 min), m/z 28 (5.01-10 min)

Dwell time: 150 msec

Electron ionization (EI) mode: 70 eV

Solvent delay: 1 min

Transfer line temperature: 280 °C

3.4.1.4 ผลการทดลอง

การศึกษาชนิดตัวปลดปล่อยก๊าซที่เหมาะสมสำหรับเทคนิค headspace GC-MS

นำเนื้อสัตว์แช่แข็งหลายชนิดในบรรจุภัณฑ์แบบต่างๆ โดยมีรายละเอียดดังนี้

ชนิดและลักษณะของตัวอย่าง	รหัสตัวอย่าง
ปลาทูน่าแช่แข็งในบรรจุภัณฑ์พลาสติกดัดแปรบรรยากาศ	TT
เนื้อหมูแช่แข็งในบรรจุภัณฑ์พลาสติกดัดแปรบรรยากาศ	TP
เนื้อวัวแช่แข็งในบรรจุภัณฑ์พลาสติกดัดแปรบรรยากาศ	TB

นำเนื้อสัตว์แช่แข็งและยังคงอยู่ในบรรจุภัณฑ์ดั้งเดิม มาตั้งทิ้งไว้ให้ละลาย ซึ่งจะมีน้ำเลือดออกมา ใช้ไซรินจ์เจาะผ่านบรรจุภัณฑ์พลาสติกเพื่อดูดน้ำเลือดออกมาเก็บไว้ในขวดที่มีฝาปิดสนิท เพื่อแบ่งใช้ต่อไป ปิเปตน้ำเลือดที่ได้มา 2.00 มิลลิลิตร ใส่ใน headspace vial นำไป vacuum เพื่อดูดอากาศในขวดออกโดยอาศัย SPE Manifolds จากนั้นเติมตัวปลดปล่อยก๊าซ ผ่าน septum โดยใช้ไซรินจ์ vortex-mix จนสารผสมเข้ากันดี ตัวปลดปล่อยก๊าซที่พิจารณาเอามาทดลองใช้คือ 5 M H_2SO_4 [2] และ 20%w/v $K_3[Fe(CN)_6]$ [7] นำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค headspace GC-MS ทันที ผลการวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 1

ก่อนการวิเคราะห์ตัวอย่าง ได้ทดสอบระบบการเตรียมตัวอย่างว่าได้ดูดอากาศที่มีอยู่ในขวดออกหมดหรือไม่ ถ้าหากไม่หมดอาจมีผลต่อความถูกต้องของการวิเคราะห์ โดยนำน้ำเลือดมาเตรียมเป็นแบลงค์ โดยเตรียมเช่นเดียวกับตัวอย่างวิเคราะห์ แต่ไม่เติมตัวปลดปล่อยก๊าซ ทำให้ไม่มีก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์และออกซิเจนปลดปล่อยออกมาจากเลือด นำแบลงค์ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค headspace GC-MS ปรากฏว่าไม่พบทั้งคาร์บอนมอนอกไซด์และออกซิเจน ซึ่งยืนยันได้ว่าการดูดอากาศในขวดออกก่อนที่จะปลดปล่อยก๊าซออกมาจากเลือด ทำให้ผลการวิเคราะห์ถูกต้อง ซึ่งไม่มีการรบกวนจากอากาศที่มีอยู่เดิมในขวด

ตารางที่ 1 แสดงการเปรียบเทียบ % CO ที่ใช้ Sulfuric acid และ Potassium hexacyanoferrate(III) เป็นตัวปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์

สารตัวอย่าง	% CO	
	Sulfuric acid	Potassium hexacyanoferrate(III)
TT	67.45	74.74
TP	63.52	74.31
TB	66.32	76.34

หมายเหตุ % CO คือ $\frac{\text{พื้นที่พีคของ CO}}{\text{พื้นที่พีคของ CO} + \text{พื้นที่พีคของ } O_2} \times 100$

จากการศึกษาชนิดตัวปลดปล่อยก๊าซที่เหมาะสมที่สุดในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค headspace GC-MS พบว่า %CO ที่วิเคราะห์ได้เมื่อใช้ potassium hexacyanoferrate (III) สูงกว่าเมื่อใช้ sulfuric acid แสดงว่า potassium hexacyanoferrate (III) เป็นตัวปลดปล่อยก๊าซที่ดีกว่ากรดซัลฟิวริก

การวิเคราะห์เนื้อสัตว์แช่แข็งด้วยเทคนิค headspace GC-MS โดยใช้ potassium hexacyanoferrate (III) เป็นตัวปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์

ทำการเตรียมตัวอย่างเช่นเดียวกับข้างต้น แต่ตัวปลดปล่อยก๊าซที่เลือกใช้ คือ potassium hexacyanoferrate (III)

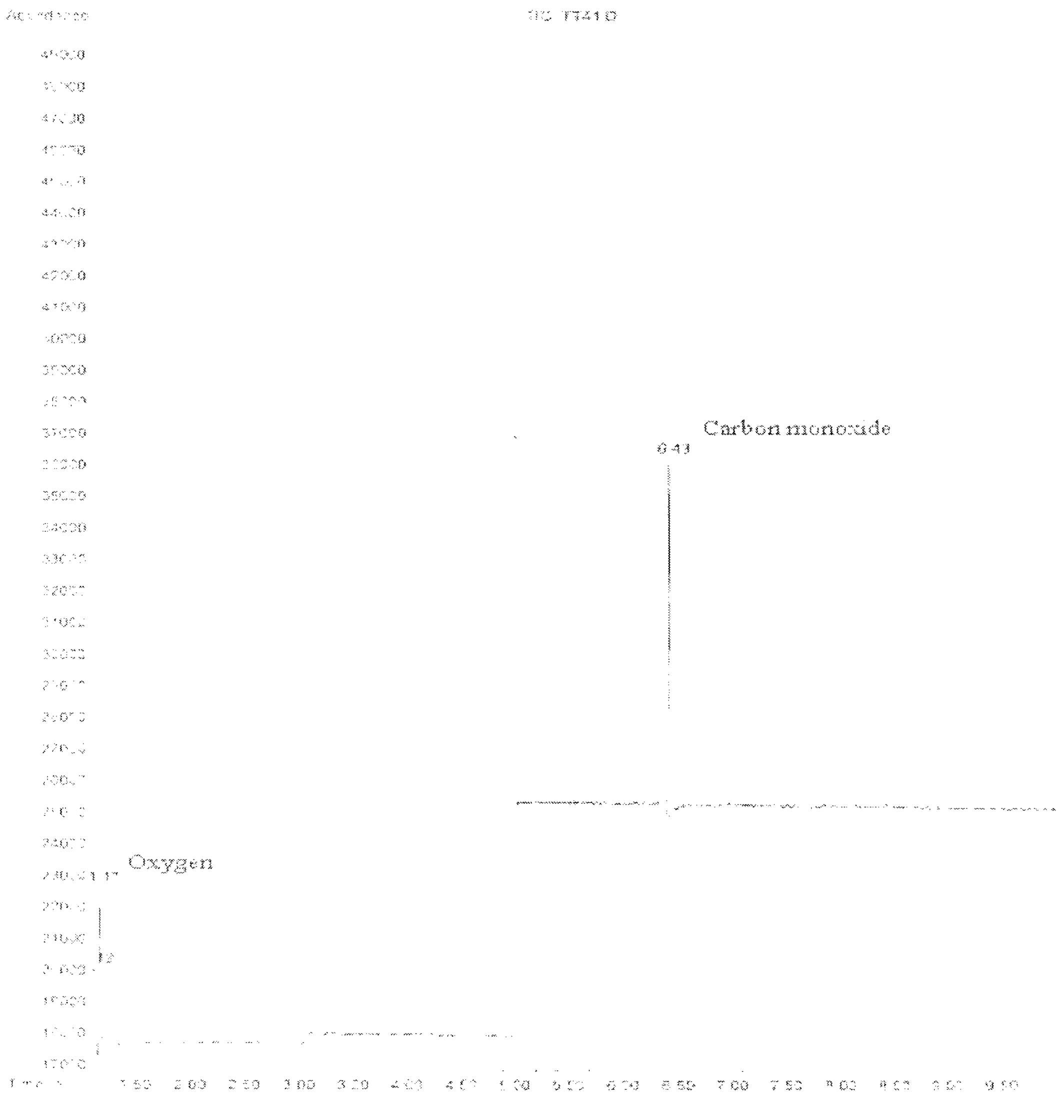
ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ ด้วยเทคนิค headspace GC/MS โดยใช้ potassium hexacyanoferrate (III)

ชนิดตัวอย่าง	% CO	%CO เฉลี่ย	% RSD
TT	76.28	74.74	3.00
	75.78	(N=5)	
	75.88		
	74.92		
	70.82		
TP	71.66	74.31	8.59
	76.05	(N=3)	

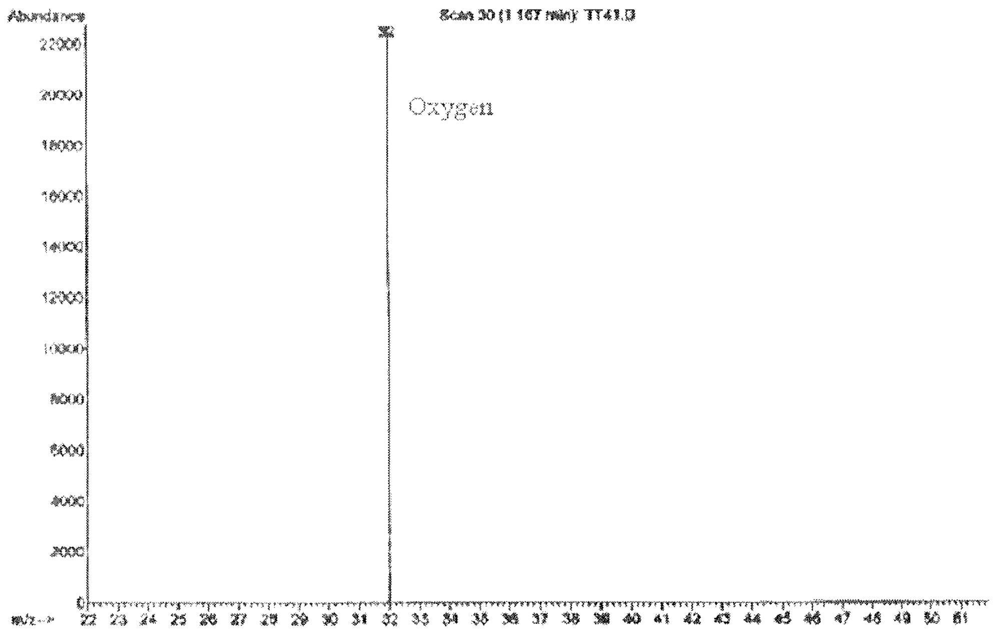
248163

	75.22		
TB	76.31	76.34	0.14
	76.46	(N=3)	
	76.25		

ตัวอย่างโครมาโทแกรม และข้อมูลต่างๆ แสดงในรูปที่ 4, 5, 6, และตารางที่ 3



รูปที่ 4 ตัวอย่างโครมาโทแกรมของ treated tuna



รูปที่ 5 ตัวอย่างแมสสเปกตรัมของ **oxygen** จาก **treated tuna**

รูปที่ 6 ตัวอย่างแมสสเปกตรัมของ **carbon monoxide** จาก **treated tuna**

ตารางที่ 3 ข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเนื้อสัตว์แช่แข็งในบรรจุภัณฑ์ดัดแปรบรรยากาศ ด้วยเทคนิค headspace GC-MS

ชนิดตัวอย่าง	Retention time	Peak area	% of total
TT ครั้งที่ 1	1.170	35297	23.72
	6.430	113514	76.28
TT ครั้งที่ 2	1.170	35668	24.22
	6.430	111595	75.78
TT ครั้งที่ 3	1.170	34560	24.12
	6.430	108726	75.88
TT ครั้งที่ 4	1.170	35379	25.07
	6.430	105738	74.92
TT ครั้งที่ 5	1.169	39449	29.18
	6.430	95763	70.82
TP ครั้งที่ 1	1.169	40047	28.34
	6.430	101273	71.66
TP ครั้งที่ 2	1.169	30508	23.95
	6.430	96886	76.05
TP ครั้งที่ 3	1.170	30855	24.78
	6.430	93667	75.22
TB ครั้งที่ 1	1.170	28640	23.69
	6.430	92230	76.31
TB ครั้งที่ 2	1.170	29155	23.54
	6.430	94693	76.46
TB ครั้งที่ 3	1.170	29733	23.75
	6.430	95441	76.25

3.4.2 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Visible absorption spectrophotometry

3.4.2.1 การเตรียมสารละลาย

สารละลาย Sodium dithionite, $Na_2S_2O_4$ เข้มข้น 20 mg/mL

ชั่ง $Na_2S_2O_4$ 0.4002 g ละลายในน้ำ R.O. 20 mLและเตรียมใหม่ทุกครั้ง เมื่อต้องการใช้

3.4.2.2 การเตรียมตัวอย่าง

วิธีการเตรียมตัวอย่าง เพื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Visible absorption spectrophotometry

1. นำน้ำเลือดปลาทูน่าที่ละลายออกมา 200 μL ใส่ในหลอดทดลอง
2. เติมสารละลาย $Na_2S_2O_4$ 10 μL
3. เติม phosphate buffer pH 7 ปริมาตร 3.00 mLแล้ว vortex mix เพื่อให้เป็นสารละลายเนื้อเดียว
4. เทสารละลายใส่ลงใน cuvette แล้วนำไปวิเคราะห์ ด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer

3.4.2.3 วิธีวิเคราะห์

1. นำตัวอย่างที่เตรียมไปวิเคราะห์ ด้วยเครื่อง UV-visible absorption spectrophotometer ใช้เทคนิควิเคราะห์แบบ double wavelengths ที่ 420 nm และ 431 nm โดย blank ที่ใช้คือ phosphate buffer pH 7.0 ที่ผ่านการพ่นด้วยก๊าซไนโตรเจน เพื่อไล่ก๊าซออกซิเจนออก
2. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 nm และ 431 nm
3. คำนวณหา ค่า χ_{co} โดยใช้สูตร $\chi_{co} = \dfrac{[A_{(420)} \times 0.78] - [A_{(431)} \times 0.67]}{[A_{(420)} \times 0.32] + [A_{(431)} \times 0.55]}$

$$\chi_{co}\ (\%) = \chi_{co} \times 100$$

การหาปริมาณของตัวรีดิวซ์โซเดียมไดไทโอไนต์ที่เหมาะสม

งานในส่วนนี้ต้องการหาปริมาณสารละลายโซเดียมไดไทโอไนต์ที่เหมาะสม เพื่อรีดิวซ์น้ำเลือดตัวอย่าง โดยโซเดียมไดไทโอไนต์ทำหน้าที่รีดิวซ์ oxymyoglobin และ metmyoglobin ให้เป็น deoxymyoglobin ซึ่งดูดกลืนแสงได้ดีที่ 431 nm ในการทดลองใช้โซเดียมไดไทโอไนต์เข้มข้น 20 mg/mL ปริมาตร 10, 20, 30 μL ต่อน้ำเลือด 200 μL และเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ที่ได้ แสดงดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 χ_{co} ที่วิเคราะห์ได้เมื่อใช้ตัวรีดิวซ์ปริมาณต่างๆ

น้ำเลือด (μL)	บัฟเฟอร์ (μL)	โซเดียมไดไทโอไนต์ (μL)	ค่าการดูดกลืนแสง		χ_{co} (%)
			420 nm	431 nm	
200	3	10	0.99800	0.89947	21.59
200	3	20	1.01420	0.91497	21.51
200	3	30	1.32300	1.22240	19.43

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ปริมาณของคาร์บอนมอนอกไซด์ (χ_{co}) ไม่ได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อปรับปริมาณของสารละลายโซเดียมไดไทโอไนต์ที่ใช้ จึงสรุปได้ว่าปริมาณสารละลายโซเดียมไดไทโอไนต์ (20 mg/mL) ปริมาตร 10 μL เพียงพอที่จะรีดิวซ์น้ำเลือดได้อย่างงสมบูรณ์ จึงเลือกเป็นปริมาณที่ใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Visible absorption spectrophotometry

นำเนื้อสัตว์แช่แข็งหลายชนิดในบรรจุภัณฑ์แบบต่างๆ โดยมีรายละเอียดดังนี้

ชนิดและลักษณะของตัวอย่าง	รหัสตัวอย่าง
ปลาทูน่าสด	FT
ปลาอินทรีย์สด	FF
ปลาทูน่าแช่แข็งในบรรจุภัณฑ์พลาสติกดัดแปรบรรยากาศ	TT
เนื้อหมูสด	FP
เนื้อหมูแช่แข็งในบรรจุภัณฑ์พลาสติกดัดแปรบรรยากาศ	TP
เนื้อวัวสด	FB
เนื้อวัวแช่แข็งในบรรจุภัณฑ์พลาสติกดัดแปรบรรยากาศ	TB

นำเนื้อสัตว์แช่แข็งและยังคงอยู่ในบรรจุภัณฑ์ดั้งเดิม มาตั้งทิ้งไว้ให้ละลาย ซึ่งจะมีน้ำเลือดออกมา ใช้ไซรินจ์เจาะผ่านบรรจุภัณฑ์พลาสติก เพื่อดูดน้ำเลือดออกมาเก็บไว้ในขวดที่มีฝาปิดสนิท เพื่อแบ่งใช้ต่อไป ปิเปตน้ำเลือดที่ได้มา 200 μL ใส่ในหลอดทดลองหรือขวดแก้วรูปทรงกระบอกขนาดเล็ก ปิเปตสารละลายบัฟเฟอร์ pH 7 ที่ผ่านการไล่ก๊าซออกซิเจนออกหมดแล้ว ปริมาตร 3.00 mL เขย่าให้ผสมกัน ปิเปตสารละลายโซเดียมไดไทโอไนต์ 10 μL นำไป vortex-mix ให้เข้ากันดี ถ่ายเทสารละลายที่ได้สู่ cuvette สำหรับการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 nm และ 431

nm ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลการวิเคราะห์ปริมาณก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ด้วยเทคนิค Visible absorption spectrophotometer

ตัวอย่าง	Absorbance		χ_{CO} (%)	χ_{CO} เฉลี่ย(%)	% RSD
	420 nm	431 nm			
FT	1.34260	0.95809	42.37	39.97 (N=3)	5.98
	1.78090	1.34720	37.59		
	1.61620	1.18460	39.95		
TT	3.97540	2.20250	65.43	56.55 (N=5)	8.89
	3.89390	2.45760	53.53		
	3.45610	2.17890	53.63		
	3.77230	2.33060	55.48		
	3.25140	2.02600	54.70		
FP	0.36480	0.20907	62.34		
TP	1.4083×10^{-2}	7.9780×10^{-3}	137.62		
FB	1.47150	0.72187	76.52		
TB	1.86080	0.77661	91.05		
FF	2.27480	2.15220	17.39		

เอกสารอ้างอิง

1. Smulevich, G., Droghetti , E., Focardi, C., Coletta, M., Ciaccio, C. and Nocentini, M., "A rapid spectroscopic method to detect the fraudulent treatment of tuna fish with carbon monoxide" *Food Chemistry* 101,(2007) :1071-1077.

2. Anderson, C.R. and Wu, W., "Analysis of carbon monoxide in commercially treated tuna (*Thunnus spp.*) and mahi-mahi (*Coryphaena hippurus*) by gas chromatography/mass spectroscopy" *J. Agric. Food Chem.* 53, (2005):7019-7023.

3. Martinez, L., Djenane, D., Cilla, I., Beltran, J.A. and Roncales, P., "Effect of different concentrations of carbon dioxide and low concentration of carbon monoxide on the shelf-life of fresh pork sausages packaged in modified atmosphere" *Meat Science* 71,(2005):563-570.

4. Wilkinson, B.H.P., Janz, J.A.M., Morel, P.C.H., Purchas, R.W. and Hendriks, W.H. "The effect of modified atmosphere packaging with carbon monoxide on the storage quality of master-packaged fresh pork" *Meat Science* 73,(2006):605-610.

5. Wicklund, R.A., Paulson, D.D., Tucker, E.M., Stetzer, A.J., DeSantos, F., Rojas, M., MacFarlane, B.J. and Brewer, M.S. "Effect of carbon monoxide and high oxygen modified atmosphere packaging and phosphate enhanced, cased-ready pork chops" *Meat Science* 74,(2006):704-709.

6. Seyfert, M., Mancini, R.A., Hunt, M.C., Tang, J., and Faustman, C., "Influence of carbon monoxide in package atmospheres containing oxygen on colour, reducing activity, and oxygen consumption of five bovine muscles" *Meat Science* 75,(2007):432-442.

7. Czogala, J., Wardas, W. and Goniewicz, M.L., "Determination of low carboxyhemoglobin blood levels by gas chromatography" *Analytica Chimica Acta* 556,(2006):295-300.

4. งานตามโครงการที่จะทำในงวดระยะเวลาต่อไป

ดังแสดงในตารางในหัวข้อที่ 2

5. คำชี้แจงเกี่ยวกับอุปสรรคหรือปัญหา

1. ก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์เป็นก๊าซที่ประเทศไทยจัดว่าเป็นยุทธปัจจัย การสั่งซื้อต้องเสนอขออนุมัติจากกระทรวงกลาโหม

2. การเตรียมก๊าซมาตรฐานที่มีสัดส่วนต่างๆ ทำได้ยากเนื่องจากการเตรียมที่เกี่ยวข้องกับก๊าซต้องมีอุปกรณ์พิเศษ เพราะก๊าซแพร่ได้ง่ายและรวดเร็ว และไม่มีบริษัทตัวแทนจำหน่ายสารเคมีมาตรฐานใดในประเทศไทยที่สั่งเข้ามาจำหน่าย เนื่องจากการขนส่งทางอากาศไม่อนุญาตให้ขนส่งก๊าซ

3. ตัวอย่างเนื้อสัตว์แช่แข็งที่บรรจุในบรรจุภัณฑ์ดัดแปรบรรยากาศที่มีขายภายในประเทศ จะไม่มีการให้ข้อมูลใดบนภาชนะบรรจุ ต้องอาศัยการสังเกตและคาดคะเนจากลักษณะภายนอกของเนื้อสัตว์ เช่นมีสีแดงมากผิดปกติ

6. งบประมาณที่ได้ใช้จ่ายไปแล้วนับตั้งแต่เริ่มโครงการ

รายการ	**งบประมาณที่ได้รับ (บาท)**	**ค่าใช้จ่ายที่เกิดขึ้นในปี 52 (บาท)**	**งบประมาณคงเหลือ (บาท)**
ก. หมวดค่าจ้าง - ค่าจ้างผู้ช่วยวิจัยระดับปริญญาตรี 2 คน	91,560	91,560	----
ข. หมวดค่าวัสดุ	85,000	----	85,000
ค. หมวดค่าใช้สอย	3,440	----	3,440
ง. หมวดค่าครุภัณฑ์	----	----	----
ค่าบริหารโครงการ	----	----	----
รวมทั้งสิ้น	180,000	91,560	88,440