**อภิปรายผลการทดลอง**

จากผลการทดลองจะเห็นว่า เปอร์เซ็นต์ของคาร์บอนมอนอกไซด์ของเนื้อสัตว์แช่แข็งทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ เนื้อปลาทูน่า เนื้อหมู และเนื้อวัวนั้น มีค่าสูงถึง 70-76 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแสดงว่าในบรรจุภัณฑ์ของเนื้อสัตว์ทั้ง 3 ชนิดนั้น ผ่านการดัดแปรบรรยากาศโดยมีคาร์บอนมอนอกไซด์อยู่ด้วยจริง และจากค่า %RSD ของการวิเคราะห์ ที่มีค่า 3.00 , 8.59 , 0.14 บ่งบอกว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความเที่ยงสูง

**2. วิธีเตรียมตัวอย่างและวิธีการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Visible absorption spectrophotometry - double wavelengths**

200 µL น้ำเลือด — ใส่ ในขวดแก้วขนาดเล็ก

↓ เติม 3 mL phosphate buffer pH 7 (deoxygenated)

เติม 10 mL Sodium dithionite solution (20 mg/mL), vortex-mix

↓ นำไปถ่ายลงใน cuvette

↓ ตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 และ 431 nmโดยมี phosphate buffer pH7 เป็นแบลงค์

↓ คำนวณเปอร์เซ็นต์ของ carboxymyoglobin ในน้ำเลือดจากสมการ (1)

สมการ (1) :
$$\chi_{co} = \frac{[A_{(420)} \times 0.78] - [A_{(431)} \times 0.67]}{[A_{(420)} \times 0.32] + [A_{(431)} \times 0.55]}$$

**ผลการวิเคราะห์ มีดังนี้**

| ตัวอย่าง | $\chi_{co}$ (%) | % RSD |
|---|---|---|
| FT** | 39.97 | 5.98 |
| TT* | 56.55 | 8.89 |
| FP** | 62.34 | - |
| TP* | 137.62 | - |
| FB** | 76.52 | - |
| TB* | 91.05 | - |

*TT, TP, TB = treated tuna, treated pork, treated beef ตามลำดับ

**FT, FP, FB = frozen (non-treated) tuna, pork, beef ตามลำดับ

**อภิปรายผลการทดลอง**

1. เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์คาร์บอนมอนอกไซด์ในปลาทูน่า 2 แบบ (FT และ TT) เห็นได้ว่าเมื่อเนื้อปลาทูน่าบรรจุอยู่ในบรรจุภัณฑ์ที่มีการดัดแปรบรรยากาศโดยมีคาร์บอนมอนอกไซด์อยู่ด้วย จะมีค่า $\chi_{co}$ (%) สูงกว่า

จากการสังเกตลักษณะของปลาทูน่าตัวอย่างในเบื้องต้น พบว่าปลาทูน่าสด (FT) นั้นอาจจะไม่สดจริง แต่เป็นการนำปลาทูน่าแช่แข็งในบรรจุภัณฑ์ดัดแปรบรรยากาศมาตัดแบ่งเป็นส่วนๆ แล้วบรรจุใหม่ในบรรจุภัณฑ์พลาสติกธรรมดาเพื่อจำหน่าย โดยสังเกตจากเนื้อปลาที่มีสีแดงผิดปกติและแดงทนนาน ถึงแม้จะเก็บไว้ในตู้เย็นเป็นเวลานาน ซึ่งเนื้อปลาทูน่าสดที่แท้จริงนั้นผู้ทำการทดลองไม่สามารถหาซื้อได้ อาจเป็นเพราะปลาทูน่านั้นต้องนำเข้ามาจากต่างประเทศ ดังนั้นค่า $\chi_{co}$ (%) ที่ได้มีค่าเท่ากับ 39.97 ซึ่งสูงกว่าค่า $\chi_{co}$ (%) ของปลาอินทรีย์สดซึ่งเท่ากับ 17.39 โดยปลาอินทรีย์นั้นเป็นปลาสดที่แท้จริง

2. ค่า $\chi_{co}$ (%) ของเนื้อหมูสด เนื้อวัวสด มีค่าสูงพอประมาณ แต่ยังไม่มีข้อสรุปที่ชัดเจน เพราะวัวและหมูเป็นสัตว์บก ในเลือดอาจมี CO อยู่ได้บ้าง เพราะในอากาศก็มี CO ปนอยู่ด้วยเสมอ จะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับมลพิษในอากาศ

และเมื่อพิจารณาค่า $\chi_{co}$ (%) ของเนื้อวัวและเนื้อหมู ที่บรรจุในบรรจุภัณฑ์ดัดแปรบรรยากาศที่มีค่าสูงมากจนผิดปกติ จึงตั้งเป็นข้อสมมติฐานว่า วิธีวิเคราะห์และสมการการคำนวณที่ใช้ [1] ( สมการ (1)) ไม่เหมาะกับน้ำเลือดของเนื้อวัวและเนื้อหมู โดยมีเหตุผลดังนี้

เมื่อสารละลายของของผสมระหว่าง carboxymyoglobin และ deoxymyoglobin ดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 420 และ 431 nm ตามลำดับ ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance, A) เป็นดังนี้

ที่ 420 nm : $A_{total,420} = A_{CO,420} + A_{deoxy,420}$ ..... (2)

ที่ 431 nm : $A_{total,431} = A_{CO,431} + A_{deoxy,431}$ .....(3)

โดย $A_{total,420}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงรวมของ carboxymyoglobin และ deoxymyoglobin ที่ความยาวคลื่น 420 nm

$A_{total,431}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงรวมของ carboxymyoglobin และ deoxymyoglobin ที่ความยาวคลื่น 431 nm

$A_{CO,420}$ , $A_{CO,431}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ carboxymyoglobin ที่ความยาวคลื่น 420 nm และ 431 nm ตามลำดับ

$A_{deoxy,420}$ , $A_{deoxy,431}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ deoxymyoglobin ที่ความยาวคลื่น 420 nm และ 431 nm ตามลำดับ

จาก Beer's Law $A = \varepsilon bc$

โดย A คือ ค่าการดูกลืนแสง

$\varepsilon$ คือ ค่า absorptivity (ในที่นี้มีหน่วยเป็น $cm^{-1}$ )

b คือ ความกว้างของ cuvette

c คือ ความเข้มข้นของสารละลาย (ในที่นี้มีความเข้มข้นเป็นเศษส่วน (fraction ))

จากสมการที่ (2) เมื่อ b = 1 cm จะได้

$$A_{total,420} = \varepsilon_{CO(420)}c_{CO} + \varepsilon_{deoxy(420)}c_{deoxy} \quad \text{.....(4)}$$

ในทำนองเดียวกับสมการที่ (4) จากสมการที่ (3) จะได้

$$A_{total,431} = \varepsilon_{CO(431)}c_{CO} + \varepsilon_{deoxy(431)}c_{deoxy} \quad \text{.....(5)}$$

ความสัมพันธ์ของปริมาณ carboxymyoglobin [1] สามารถหาได้จาก

$$\chi_{CO} = \frac{c_{co}}{c_{co} + c_{deoxy}}$$

หรือ $\chi_{CO}$ คือ เศษส่วนปริมาณ (fraction) ของ carboxymyoglobin ในปริมาณรวมของ carboxymyoglobin และ deoxymyoglobin

ซึ่งการคำนวณโดยใช้ค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุดของ carboxymyoglobin และ deoxymyoglobin จะได้ความสัมพันธ์ดังสมการ [2]

$$\chi_{CO} = \frac{A_{(420)}A^{r}deoxy(431) - A_{(431)}A^{r}deoxy(420)}{A_{(420)}[A^{r}deoxy(431) - A^{r}co(431)] + A_{(431)}[A^{r}co(420) - A^{r}deoxy(420)]} \quad \text{.....(6)}$$

โดยเมื่อ c = 1 หมายความว่าเป็นสารบริสุทธิ์ ซึ่งค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นหนึ่งของสารบริสุทธิ์ ($A^{r}$) จะเท่ากับ ε ของสารนั้น

จากการแทนค่าการดูดกลืนแสงของสารบริสุทธิ์จะได้ความสัมพันธ์ดังสมการ[2]

$$\chi_{CO} = \frac{[A_{(420)} \times 0.78] - [A_{(431)} \times 0.67]}{[A_{(420)} \times 0.32] + [A_{(431)} \times 0.55]} \quad \text{.....(1)}$$

โดย

$A^{r}deoxy(431)$ หรือ $\varepsilon_{deoxy(431)}$ = 0.78

$A^{r}deoxy(420)$ หรือ $\varepsilon_{deoxy(420)}$ = 0.67

$A^{r}co(431)$ หรือ $\varepsilon_{CO(431)}$ = 0.46

$A^{r}co(420)$ หรือ $\varepsilon_{CO(420)}$ = 1.22

จากเอกสารอ้างอิง[2] สารบริสุทธิ์ของ carboxymyoglobin และ deoxymyoglobin เตรียมจาก myoglobin ของปลาทูน่า และนำไปแทนค่าในสมการ (6) ได้ผลลัพธ์เป็นสมการ (1) ที่ใช้ในการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของ carboxymyoglobin ดังนั้นเมื่อนำสมการ (1) นี้ไปใช้กับน้ำเลือดของสัตว์เนื้อแดงอื่นๆ เช่นเนื้อหมู เนื้อวัว ย่อมมีข้อผิดพลาดได้ เนื่องจากปริมาณของ myoglobin ในเนื้อสัตว์แต่ละชนิดนั้นแตกต่างกัน

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 28 พ.ย. 2555
เลขทะเบียน 250374
เลขเรียกหนังสือ

**3. เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ในน้ำเลือดของเนื้อสัตว์ด้วยเทคนิค visible absorption spectrophotometry กับ headspace Gas chromatography-Mass-spectrometry**

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค headspace GC-MS ให้ผลในรูปของเปอร์เซ็นต์ของก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ในก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ที่รวมกับก๊าซออกซิเจน ที่ปลดปล่อยมาจากน้ำเลือด เพื่อบ่งชี้ว่าเนื้อสัตว์แช่แข็งนั้นผ่านการบรรจุในบรรจุภัณฑ์ชนิด carbon monoxide treated-modified atmosphere packaging (CO-MAP) หรือไม่ ซึ่งเทคนิค headspace จะช่วยให้ไม่มีการรบกวนจากเมทริกซ์ของตัวอย่าง การดูดเอาอากาศเหนือตัวอย่างในขวดออกก่อนเป็นการลดการรบกวนจากก๊าซอื่นโดยเฉพาะก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์และก๊าซออกซิเจนในอากาศ ปริมาณของก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์และก๊าซออกซิเจนที่ถูกปลดปล่อยจากน้ำเลือดมีปริมาณไม่มาก และมวลของคาร์บอนมอนอกไซด์ (28) และออกซิเจน (32) ต่างกันไม่มาก การที่จะใช้ full scan mode (m/z 10 ถึง 40) ของ mass spectrometer จึงไม่ไวพอที่จะตรวจวัดได้ แต่การใช้ SIM mode ที่ m/z 32 และ 28 และตั้งโปรแกรมเป็น 2 ช่วง คือ m/z 32 (0-5 min) และ m/z 28 (5.01-10 ) จะทำให้มีเวลาพอที่จะสะสมสัญญาณ วิธีวิเคราะห์นี้จึงไวต่อการตรวจวิเคราะห์ และจากค่าความเที่ยง (%RSD) ที่ได้อยู่ในเกณฑ์ที่ดีมาก

เนื่องจากงานวิจัยนี้ประสบปัญหา ไม่สามารถสั่งซื้อก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ หรือก๊าซผสมมาตรฐานที่ทราบสัดส่วนของก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์มาใช้ได้ จึงไม่สามารถเตรียม carboxymyoglobin บริสุทธิ์เพื่อนำมาสร้างกราฟมาตรฐาน และคำนวณหาปริมาณที่แท้จริง (absolute value) ของ carboxymyoglobin ในน้ำเลือดได้ ด้วยเหตุนี้จึงตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี visible absorption spectrophotometry โดยเปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค headspace GC-MS ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้เครื่องมือวิเคราะห์ขั้นสูง และมีความแม่นยำสูง

ผลเปรียบเทียบการวิเคราะห์จากทั้ง 2 วิธี เป็นดังที่แสดงในตารางต่อไปนี้

**ตารางเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค visible absorption spectrophotometry กับเทคนิค headspace GC-MS**

| ตัวอย่าง | Headspace GC-MS | | Visible absorption spectrophotometry | | RPD |
|---|---|---|---|---|---|
| | % CO | % RSD | $\chi_{co}$ (%) | % RSD | |
| TT | 74.74 | 3.00 | 56.55 | 8.89 | -18.19 |
| TP | 74.31 | 8.59 | 137.62 | - | +63.31 |
| TB | 76.34 | 0.14 | 91.05 | - | +14.71 |

RPD คือ relative percent difference

เนื่องจากว่าเทคนิค headspace GC-MS นี้จัดว่าเป็นเทคนิคขั้นสูง ที่มีความเที่ยงและเฉพาะเจาะจงสูงจึงจัดไว้เป็นเทคนิคมาตรฐานเพื่อนำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค visible absorption spectrophotometry มาเปรียบเทียบด้วย

สำหรับการวิเคราะห์ปลาทูน่า (TT) เทคนิค visible absorption spectrophotometry ให้ผลการวิเคราะห์ต่ำกว่าเทคนิค headspace GC-MS โดยมีค่า RPD เท่ากับ -18.19 ซึ่งน้อยกว่า 20 จึงยอมรับได้ และมีข้อสังเกตอื่นๆ เพิ่มเติมดังนี้

1. สมการ (1) ที่ใช้ในการคำนวณ เป็นสมการที่เหมาะสม เพราะเป็นสมการที่คำนวณมาจากค่า absorptivity ของ myoglobin ของปลาทูน่า แต่ในทางกลับกัน ถ้าคำนึงถึงปลาทูน่าชนิดต่างๆ ที่มีสีเนื้อต่างๆกัน เช่น สีแดงมาก สีส้มออกเหลือง หรือสีเหลืองออกน้ำตาลเป็นต้น จะสามารถใช้สมการ (1) ในการคำนวณโดยไม่เกิดความคลาดเคลื่อนอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่
2. การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค headspace GC-MS เป็นเทคนิคที่มีการแยก จึงให้ผลการวิเคราะห์ที่แม่นยำปราศจากการรบกวน แต่เทคนิค visible absorption spectrophotometry เป็นการวิเคราะห์ใน bulk solution จึงมีโอกาสสูงที่จะเกิดการรบกวนและเกิด false determination

สำหรับผลการวิเคราะห์เนื้อหมูและเนื้อวัวนั้นยอมรับไม่ได้ โดยมีค่า RPD ที่ค่อนข้างสูงในกรณีของเนื้อวัว (TB) และสูงเกินไปในกรณีของเนื้อหมู (TP) และผลการวิเคราะห์ของเทคนิค visible absorption spectrophotometry แตกต่างจากผลการวิเคราะห์ของเทคนิค headspace GC-MS ในเชิงบวก (สูงกว่า) จึงสรุปเป็นสาเหตุได้ดังนี้

ก. สมการ (1) ไม่เหมาะกับการคำนวณเปอร์เซ็นต์คาร์บอนมอนอกไซด์ในน้ำเลือดของเนื้อวัว(ที่มีสีแดงมาก) และเนื้อหมู (ที่มีสีแดงเรื่อๆ)

ข. ผลการวิเคราะห์ที่สูงเกินไป บ่งบอกว่ามีการรบกวนในลักษณะแทรกเสริม เพราะเป็นการวิเคราะห์ใน bulk solution

แต่อย่างไรก็ดีการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Visible absorption spectrophotometry เป็นเทคนิคที่ใช้เครื่องมือที่มักมีอยู่ในห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ทั่วๆไป และเทคนิค double wavelengths ที่ใช้ก็สามารถปฏิบัติได้ในเครื่อง UV- Visible spectrophotometry ทุกชนิดทุกรุ่น จึงเหมาะที่ใช้วิธีนี้เพื่อตรวจวิเคราะห์ร่องรอยของ carboxymyoglobin ในน้ำเลือด เพื่อบ่งชี้การมีบรรจุภัณฑ์แบบ CO-MAP ซึ่งส่วนใหญ่จะไม่มีการระบุให้ผู้บริโภคทราบ แต่เนื่องจากว่าเทคนิคนี้เป็นการวิเคราะห์ใน bulk solution จึงมีสิ่งรบกวนต่างๆมากมาย เช่น การเป็นคอลลอยด์ของสารละลาย การตกตะกอนของโปรตีน ความหนาแน่นของไมโอโกลบิน รวมถึงสีของน้ำเลือดในสัตว์แต่ละชนิดจะแตกต่างกัน และผลการวิเคราะห์ที่แตกต่างจากผลวิเคราะห์ของวิธี headspace GC-MS ยืนยันว่าเทคนิคนี้มีความคลาดเคลื่อนสูง จึงอาจใช้เป็นเพียงวิธีวิเคราะห์เบื้องต้นเท่านั้น แต่อย่างไรก็ดีการวิเคราะห์ร่องรอยของ CO-MAP ก็ไม่มีความจำเป็นที่ต้องวิเคราะห์อย่างละเอียด จึงสามารถใช้วิธีวิเคราะห์นี้ในห้องปฏิบัติการทดสอบอาหารภาคสนาม (at site analysis) ณ สถานจำหน่ายเนื้อสัตว์ หรือด่านตรวจสอบอาหารนำเข้าได้