บทที่ 3
ระเบียบวิธีการวิจัย

3.1 การเก็บตัวอย่างอาหาร

ทำการเก็บตัวอย่างอาหารที่มีสีสดใสจำนวน 5 ประเภท คือ ตัวอย่างกุ้งแห้งตัวเล็กสีแดง ตัวอย่างเต้าหู้แผ่นสีเหลือง ตัวอย่างเกี๊ยวแผ่นสีเหลือง ตัวอย่างเส้นบะหมี่สีเหลืองและสีเขียว ตัวอย่างลูกชิ้นปลาสีส้ม และตัวอย่างซอสสีแดง จะทำการเก็บตัวอย่างแบบสุ่มอย่างง่าย (Simple Randoms Sampling) จากตลาดสดทั้ง 3 แห่ง คือ ตลาด อ.จิระ ตลาดบางลำภู และตลาดเทศบาล ในอำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น

ตัวอย่างอาหารที่อาจมีการปนเปื้อนของปริมาณโลหะหนักจำพวกตะกั่ว โดยทำการเก็บตัวอย่างแบบสุ่มจากตลาดสด ในเขตอำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น โดยเลือกอาหารประเภทต่างๆ มีจำนวนตัวอย่างดังต่อไปนี้ ตัวอย่างกุ้งแห้งตัวเล็กสีแดง 20 ตัวอย่าง ตัวอย่างเต้าหู้แผ่นสีเหลือง 20 ตัวอย่าง ตัวอย่างเกี๊ยวแผ่นสีเหลือง 20 ตัวอย่าง ตัวอย่างเส้นบะหมี่สีเหลืองและเขียว 20 ตัวอย่าง ตัวอย่างลูกชิ้นปลาสีส้ม 10 ตัวอย่าง ตัวอย่างซอสสีแดง (ที่เป็นซ้อสราคาถูกในการทำอาหารประเภท เย็นตาโฟ และข้าวผัด เป็นต้น) จำนวน 20 ตัวอย่าง

3.2 หลักการของการวิเคราะห์ปริมาณตะกั่วในอาหาร

จะอาศัยวิธีการนำตัวอย่างอาหาร ที่จะทำการวิเคราะห์หาปริมาณโลหะตะกั่วมาทำการย่อยเพื่อเตรียมตัวอย่างจะใช้วิธีดัดแปลงจากวิธีมาตรฐานของ AOAC(1995) โดยใช้สารละลายผสมของ\กรดซัลฟูริค (H_2SO_4) กรดไนตริก (HNO_3) และกรดเปอร์คลอริค ($HClO_4$) เรียกสารละลายผสมนี้ว่า (Ternary Acid Mixture) ทำการย่อยสารตัวอย่างด้วยความร้อนจากเตาความร้อน(Hot Plate) ใช้เวลาในการย่อยสารตัวอย่างประมาณ 3 ชั่วโมง สารตัวอย่างที่ถูกย่อยสมบูรณ์จะได้สารละลายตัวอย่างที่ใสไม่มีตะกอนสีดำเกิดขึ้นนำสารตัวอย่างที่ได้นำมาปรับปริมาตรที่แน่นอน และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูงเพื่อแยกสารละลายใส นำไปวัดค่าดูดกลืนคลื่นแสงด้วยเทคนิคอะตอมมิคแอซอบชั่นสเปคโทรเมตรี โดยการเทียบกับสารละลายมาตรฐานตะกั่วที่ทำการเตรียมในช่วงความเข้มข้นที่สร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานตะกั่ว

เทคนิคอะตอมมิคแอบซอบชั่นสเปคโทรเมตรี (Atomic Absorption Spectrometry) เป็นวิธีที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณธาตุต่างๆ ได้อย่างกว้างขวาง เป็นวิธีที่มีความแม่นยำและถูกต้องสูง โดยจะอาศัยคุณสมบัติการดูดกลืนคลื่นแสงของอะตอมอิสระ ที่เกิดจากการที่สารละลายตัวอย่างถูกส่งผ่านไปโดยการทำให้เกิดเป็นละอองฝอยเล็กๆของสารละลายตัวอย่าง ที่บริเวณส่วนที่เรียกว่า Nebulizer ก่อนจะส่งไปยังบริเวณที่เป็นเปลวไฟ(Flame) จะเกิดการให้ความร้อนบริเวณเตาความร้อน(Burner) ธาตุแต่ละชนิดจะดูดกลืนคลื่นแสง(Absorption) หรือคายคลื่นแสง(Emission)ที่ความยาวคลื่นที่เป็น

คุณสมบัติเฉพาะของแต่ละธาตุ ซึ่งปริมาณการดูดกลืนคลื่นแสงหรือปริมาณการคายคลื่นแสงนี้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับจำนวนอะตอมอิสระ หรือปริมาณของธาตุนั้นๆที่มีอยู่ในสารละลายตัวอย่าง ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณตะกั่วในอาหาร โดยเลือกใช้เทคนิคที่วัดการดูดกลืนคลื่นแสง (Absorption)

โดยเครื่องอะตอมมิคแอบซอบชั่นสเปคโทรมิเตอร์ (Atomic Absorption Spectrometer) นี้จะต้องมีแหล่งคลื่นพลังงานเฉพาะของแต่ละธาตุ ซึ่งจะต้องใช้ในการวิเคราะห์ธาตุแต่ละตัวเรียกว่าเป็นแหล่งกำเนิดพลังงาน (Light Source) จะเป็นหลอดชนิดที่เรียกว่า Hollow Cathode Lamp(HCL) ในการศึกษาเฉพาะในครั้งนี้ก็ต้องมีแหล่งกำเนิดพลังงานเป็นชนิดที่ทำมาจากโลหะตะกั่วโดยเฉพาะ การจุดเปลวไฟจะใช้ก๊าซอะเซทิลีน(Acetylene) และอากาศ(Air) ผสมกันในอัตราส่วนที่เหมาะสม โดยสังเกตจากลักษณะเปลวไฟที่เหมาะสมซึ่งจะมีลักษณะเป็นเปลวไฟสีน้ำเงินเข้ม (Lean Blue)

3.3 อุปกรณ์-เครื่องมือ และสารเคมี

อุปกรณ์-เครื่องมือ

1. เครื่องอะตอมมิคแอบซอบชั่นสเปคโทรมิเตอร์ (Atomic Absorption Spectrometer) เป็นเครื่องของ Thermo Jarrell Ash รุ่น Smith-Hieftje 12

โดยมีสภาวะการวิเคราะห์ของเครื่องดังนี้

ความยาวคลื่น (Wavelength)	: 283.3 nm
ความกว้างของคลื่น (Spectra Slit Width)	: 0.5 nm
หลอดกำเนิดพลังงาน (Light Source)	: Hollow Cathode Lamp สำหรับโลหะตะกั่ว
กระแสไฟฟ้าที่ใช้ (Lamp Current)	: 5 mA
เชื้อเพลิง (Fuel)	: Air-Acetylene
ลักษณะของเปลวไฟ (Flame)	: Lean-Blue

2. เครื่องปั่นเหวี่ยงแยกสาร (Centrifuge)
3. เตาความร้อน (Hot Plate)
4. ชุดปิเปตอัตโนมัติ (Autopipette)
5. หลอดพลาสติกพร้อมฝาปิดขนาดความจุ 15 ลูกบาศก์เซ็นติเมตร

สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณตะกั่วในอาหารทั้งหมดจะเป็นสารเคมีที่มีความบริสุทธิ์สูง มีเกรดความบริสุทธิ์ระดับ Analytical Grade หรือเทียบเท่า

1. สารละลายมาตรฐานตะกั่วเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร (Stock Standard Lead) ในสารละลายกรดไนตริก ของบริษัท Merck

2. กรดซัลฟูริค (H_2SO_4) ของบริษัท Merck

3. กรดไนตริก (HNO_3) ของบริษัท J.T. Baker

4. กรดเปอร์คลอริค ($HClO_4$) ของบริษัท J.T. Baker

3.4 การวิเคราะห์ปริมาณตะกั่วในอาหาร

1. การศึกษาความถูกต้องของกราฟมาตรฐาน

1.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานตะกั่วจาก Stock Standard Lead ให้มีความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานตะกั่วเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 และ 6.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการโดยใช้น้ำกลั่นแบบ Deionize Water

1.2 ใช้น้ำกลั่นเป็นสารละลาย Blank ทำการวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของสารละลายมาตรฐานตะกั่วในข้อ 1.1 จำนวน 5 ครั้ง (ทำการศึกษาภายในเวลาหนึ่งวัน) เรียกการศึกษาแบบนี้ว่าเป็นการศึกษาแบบ Within Run ทำการคำนวณค่า r:Correlation Coefficient และค่าความชัน(Slope) ของกราฟมาตรฐาน

1.3 ใช้น้ำกลั่นเป็นสารละลาย Blank ทำการวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของสารละลายมาตรฐานตะกั่วในข้อ 1.1 จำนวน 5ครั้ง (ทำการศึกษาภายในเวลาสองวันต่อการวัดหนึ่งครั้ง) เรียกการศึกษาแบบนี้ว่าเป็นการศึกษาแบบ Between Run ทำการคำนวณค่า r:Correlation Coefficient และค่าความชัน(Slope)ของกราฟมาตรฐาน

2. การศึกษาเพื่อหาปริมาณน้ำหนักที่เหมาะสมในการย่อยตัวอย่าง

2.1 ทำการศึกษาการย่อยตัวอย่างในตัวอย่างอาหารทั้ง 6 อย่าง คือ ตัวอย่างกุ้งแห้งตัวเล็กสีแดง ตัวอย่างเต้าหู้แผ่นสีเหลือง ตัวอย่างเกี๊ยวแผ่นสีเหลือง ตัวอย่างเส้นบะหมี่สีเหลืองและเขียว ตัวอย่างลูกชิ้นปลาสีส้ม และตัวอย่างซอสสีแดง โดยชั่งตัวอย่างอาหารทั้ง 6 อย่าง ใส่ในบิกเกอร์ขนาด 250 ลูกบาศก์เซ็นติเมตร ในน้ำหนักเท่ากับ 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15.0, 17.5 และ 20.0 กรัม

2.2 เตรียมสารละลาย Ternary Acid Mixture โดยใช้อัตราส่วน สารละลายกรดซัลฟูริคเข้มข้น 20 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร เติมกรดไนตริกเข้มข้น 100 มิลลิลิตร และเติมกรดเปอร์คลอริคเข้นข้น 40 มิลลิลิตร

2.3 นำตัวอย่างในข้อ 2.1 เติมสารละลาย Ternary Acid Mixture 20 มิลลิลิตร นำไปย่อยบนเตาความร้อนประมาณ 30 นาที เติมสารละลาย Ternary Acid Mixture อีก 20 มิลลิลิตรทำการย่อยต่อไปจนสารละลายตัวอย่างเหลือปริมาตรน้อยกว่า 10 มิลลิลิตร สังเกตว่ากระบวนการย่อยสารละลายตัวอย่างว่าสมบูรณ์หรือไม่ ซึ่งการย่อยสารละลายตัวอย่างที่สมบูรณ์จะสังเกตสารละลายมีสีใสไม่

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เกิดตะกอนสีดำเกิดขึ้น ทำการทดลองตัวอย่างละ 2 ซ้ำ

2.4 เปรียบเทียบผลการศึกษาที่ได้ จะได้น้ำหนักของสารตัวอย่างแต่ละชนิดที่เหมาะสมสำหรับการนำมาย่อยตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณตะกั่วในตัวอย่างอาหารดังกล่าว

3. การวิเคราะห์หาปริมาณตะกั่วในตัวอย่างอาหาร

3.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานตะกั่วจากสารละลายมาตรฐานตะกั่วให้มีความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานตะกั่วเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 และ 6.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการโดยใช้น้ำกลั่นแบบ Deionize Water

3.2 เตรียมสารละลาย Blank โดยทำการปิเปตสารละลาย Ternary Acid Mixture ปริมาณ 20 มิลลิลิตร ใส่ในบิกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปิดบิกเกอร์ด้วยกระจกนาฬิกา ทำการย่อยสารละลายด้วยความร้อนบนเตาความร้อนเป็นเวลาประมาณ 30 นาที ทำการเติมสารละลาย Ternary Acid Mixture อีก 20 มิลลิลิตร ทำการย่อยสารละลายตัวอย่างต่อจนปริมาตรสารละลายเหลือน้อยกว่า 10 ลูกบาศก์เซ็นติเมตร ถ่ายสารละลายลงขวดปริมาตรขนาด 10 ลูกบาศก์เซ็นติเมตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นแบบ Deionize Water

3.3 เตรียมสารละลายตัวอย่าง โดยชั่งสารละลายตัวอย่างด้วยน้ำหนักที่เหมาะสมสำหรับการย่อยตัวอย่างซึ่งได้ทำการทดลองแล้วในการทดลองในข้อ 2 โดยทำการชั่งตัวอย่างใส่ในบิกเกอร์ขนาด 250 ลูกบาศก์เซ็นติเมตร บันทึกน้ำหนักตัวอย่าง ปิเปตสารละลายTernary Acid Mixture ปริมาณ 20 มิลลิลิตร ใส่ในบิกเกอร์ตัวอย่าง ปิดบิกเกอร์ด้วยกระจกนาฬิกา ทำการย่อยสารละลายด้วยความร้อนบนเตาความร้อนเป็นเวลาประมาณ 30 นาที ทำการเติมสารละลาย Ternary Acid Mixture อีก 20 มิลลิลิตร ทำการย่อยสารละลายตัวอย่างต่อจนปริมาตรสารละลายเหลือน้อยกว่า 10 ลูกบาศก์เซ็นติเมตร ถ่ายสารละลายลงขวดปริมาตรขนาด 10 ลูกบาศก์เซ็นติเมตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นแบบ Deionize Water ทำการศึกษาตัวอย่างละ 2 ซ้ำ

3.4 นำสารละลายในข้อ 3.1, 3.2 และ 3.3 ไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง ด้วยเครื่องอะตอมมิคแอบซอบชั่นที่ความยาวคลื่น 283.3 nm เพื่อหาปริมาณโลหะตะกั่วต่อไป

3.5 การแปรผลการศึกษา

ทำการสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานตะกั่ว ทำการเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ได้ในสารละลายตัวอย่าง เพื่อนำไปคำนวณหาปริมาณตะกั่วที่ปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างอาหาร การคำนวณปริมาณตะกั่วจะใช้สมการถดถอยเชิงเส้น (Linear Regression Equation) ในการคำนวณ เปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมที่กำหนดปริมาณตะกั่วที่ยอมให้มีการปนเปื้อนได้ว่าอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานหรือไม่อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานอย่างไร