

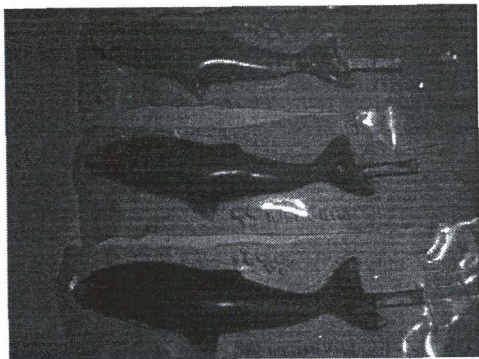
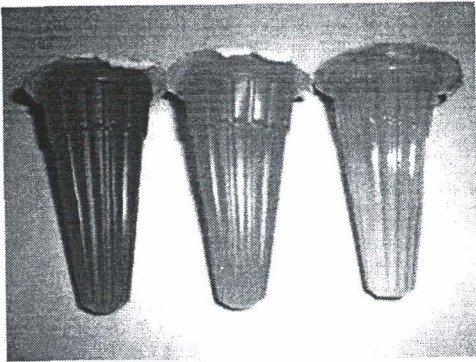
บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุดิบ

3.1.1 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ขนมเยลลี่

สุ่มเก็บตัวอย่างขนมเยลลี่อ่อนและเยลลี่เหลว กลุ่มสีแดง ส้ม และเหลือง จากตลาด กรุงเทพมหานครและปริมณฑล จำนวนรวมทั้งสิ้น 58 ตัวอย่าง ดังตัวอย่างภาพที่ 3.1 และตัวอย่างมีข้อมูลของฉลาก และเครื่องหมาย อย. ตามตารางที่ 3.1



ภาพที่ 3.1 ตัวอย่างขนมเยลลี่

ตารางที่ 3.1 ข้อมูลตัวอย่างขนมเยลลี่จากตลาดกรุงเทพมหานครและปริมาณพลที่ได้จากการสุ่มตัวอย่าง

ลำดับ	รหัสตัวอย่าง	สี	สถานที่เก็บตัวอย่าง	สถานที่ผลิต
1	A ₁	แดง	ตลาดรังสิต	กรุงเทพ
2		ส้ม		
3	B ₁	แดง	ตลาดหัวตะเข้	ปราจีนบุรี
4		ส้ม		
5	B ₂	แดง	แม่โครังสิต	ปราจีนบุรี
6		ส้ม		
7	C ₁	แดง	อนุสาวรีย์ชัยสมรภูมิ	สงขลา
8		เหลือง		
9	A ₂	ส้ม	เมืองทองธานี	กรุงเทพ
10		เหลือง		
11	D ₁	แดง	ตลาดคูบอน (รามอินทรา)	ชลบุรี
12		ส้ม		
13	D ₂	แดง	ตลาดสี่มุมเมือง	ชลบุรี
14		ส้ม		
15	E ₁	แดง	ตลาดหัวตะเข้	ราชบุรี
16	F ₁	แดง	ตลาดปากเกร็ด	ฉะเชิงเทรา
17		ส้ม		
18		เหลือง		
19	G ₁	แดง	ตลาดสี่มุมเมือง	สมุทรปราการ
20		ส้ม		
21	H ₁	แดง	แม่โค บางกะปิ	สมุทรสาคร
22		ส้ม		
23	H ₂	แดง	ตลาดสดกิ่งแก้ว (สมุทรปราการ)	สมุทรสาคร
24		ส้ม		
25		ส้ม		
26	H ₃	แดง	ตลาดบางกะปิ	สมุทรสาคร
27		ส้ม		
28		เหลือง		
29	I ₁	แดง	ตลาดสี่มุมเมือง	กรุงเทพฯ
30		เหลือง		
31		ส้ม		

ตารางที่ 3.1 (ต่อ)

ลำดับ	รหัสตัวอย่าง	สี	สถานที่เก็บตัวอย่าง	สถานที่ผลิต
32	I ₂	แดง	ตลาดสี่มุมเมือง	กรุงเทพฯ
33		ส้ม		
34		เหลือง		
35	J ₁	แดง	ตลาดไท	กรุงเทพฯ
36		ส้ม		
37		เหลือง		
38	J ₂	แดง	ตลาดนัดรามคำแหง	กรุงเทพฯ
39		ส้ม		
40		เหลือง		
41	I ₃	แดง	ตลาดสี่มุมเมือง	-
42		ส้ม		
		เหลือง		
44	I ₄	แดง	ตลาดสี่มุมเมือง	กรุงเทพฯ
45		ส้ม		
46		เหลือง		
47	I ₅	แดง	ตลาดสี่มุมเมือง	กรุงเทพฯ
48		ส้ม		
49		เหลือง		
50	I ₆	แดง	ตลาดสี่มุมเมือง	กรุงเทพฯ
51		ส้ม		
52		เหลือง		
53	I ₇	แดง	ตลาดสี่มุมเมือง	กรุงเทพฯ
54		ส้ม		
55		เหลือง		
56	K ₁	แดง	ตลาดหัวตะเข้	-
57		เหลือง		
58		ส้ม		

หมายเหตุ: - หมายถึง ไม่ระบุสถานที่ผลิต

การแสดงผลากเทียบกับ ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 100 (พ.ศ. 2529) เรื่อง การแสดง
ฉลากของวันสำเร็จรูปและขนมเยลลี่

3.1.2 สารมาตรฐาน

- กรดเบนโซอิก
 - สีปองโซ 4 อาร์
 - สี คาร์โมอิซิน
 - สีเออร์โรซิน
- (BDI AnalaR, ประเทศอังกฤษ)

(Sensient Technology, ประเทศไทย)

(Sensient Technology, ประเทศไทย)

(Sensient Technology, ประเทศไทย)

- สีสตาร์ตราซีน
- สีซันเช็ต เยลโล เอ็ฟ ซี เอ็ฟ

(Sensient Technology, ประเทศไทย)
(Sensient Technology, ประเทศไทย)

3.1.3 สารเคมี

- อะซิโตนไตรท์
- เมทานอล
- แอมโมเนียมอะซิเตต
- น้ำปราศจากไอออน
- โพแทสเซียมเพอร์ไซยาเนต
- ซิงค์อะซิเตต
- กรดอะซิติก

(HPLC grade, Lab scan, ประเทศไอร์แลนด์)
(HPLC grade, Lab scan, ประเทศไอร์แลนด์)
(Merck, ประเทศเยอรมนี)
(HPLC grade, Lab scan, ประเทศไอร์แลนด์)
(Merck, ประเทศเยอรมนี)
(Merck, ประเทศเยอรมนี)
(Lab scan, ประเทศไอร์แลนด์)

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

- เครื่องชั่ง (4 ตำแหน่ง)
- เครื่องโฮโมจีไนซ์เซอร์
- เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง
- อัลตราโซนิกบาร์
- เครื่องเขย่า
- เครื่องหมุนเหวี่ยง

(Satorious TE214S, ประเทศเยอรมนี)
(X120, ประเทศเยอรมนี)
(Sartorius PB-10, ประเทศเยอรมนี)
(Crest CP1100D, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
(Cerhardt LS500, ประเทศเยอรมนี)
(Beckman coulter, Allegra X12 ประเทศสหรัฐอเมริกา)

- กระดาษกรอง
- เยื่อกรอง PTFE
- เยื่อกรองไนลอน

(No.1, Whatman, ประเทศอังกฤษ)
(0.2 μ m, 47 mm, Munktell, ประเทศสวีเดน)
(0.2 μ m, 47 mm, Chomtech, ประเทศสหรัฐอเมริกา)

- เยื่อกรอง เซลลูโลสอะซิเตต
- Syringe filter PTFE
- Syringe filter เซลลูโลสอะซิเตต
- บั้มสุญญากาศ

(0.2 μ m, 47 mm, Munktell, ประเทศสวีเดน)
(0.2 μ m, Chromex, ประเทศอังกฤษ)
(0.2 mm, Munktell, ประเทศสวีเดน)
(WI-20, Sibata, ประเทศญี่ปุ่น)

- คอลัมน์ Mightysil
- และ การ์ดคอลัมน์

(C18, 5 μ m, 150 x 4.6 mm)
(C18, 5 μ m, 5x4.6 mm) (Mightysil, ประเทศญี่ปุ่น)

- เครื่อง HPLC รุ่น HP1100
- เครื่องตรวจวัดสัญญาณ

(Agilent, ประเทศสหรัฐอเมริกา)

ประเภท UV-DAD

(Agilent, ประเทศสหรัฐอเมริกา)

3.3 สถานที่ดำเนินงาน

คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การวิเคราะห์ปริมาณกรดเบนโซอิก

3.4.1.1 การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างเยลลี่จำนวนประมาณ 75 กรัม มาปั่นด้วยเครื่องโฮมจีไนเซอร์ นาน 10 นาที แล้วสุ่มชั่งตัวอย่าง 5 กรัม ใส่ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำสกัดผสมระหว่าง เมทธานอล และสารละลายบัฟเฟอร์ของแอมโมเนียมอะซิเตต/กรดอะซิติก (ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ พีเอช 4.5-4.6) ในอัตราส่วน 40:60 ปริมาณ 60 มิลลิลิตร จากนั้นเติม Carrez I และ Carrez II อย่างละ 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วถ่ายลงขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วจึงปรับปริมาตรด้วยสารสกัดผสมระหว่างเมทธานอล และสารละลายบัฟเฟอร์ของแอมโมเนียมอะซิเตต/กรดอะซิติก (ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ พีเอช 4.5-4.6) จนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที แล้วนำสารสกัดกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 นำส่วนใสไปกรองผ่านเยื่อกรองpolytetrafluoroethylene (PTFE) 0.2 ไมโครเมตรอีกครั้งหนึ่ง จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดเบนโซอิกด้วยเครื่องลิควิดโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography, HPLC)

3.4.1.2 ปริมาณกรดเบนโซอิก ตามวิธีของ วันทนีย์ ข้าเลิศ (2535)

นำสารสกัดที่กรองผ่านเยื่อกรองPTFE ขนาด 0.2 ไมโครเมตร ใส่ลงในขวดเก็บตัวอย่าง (vial) สีชา ขนาด 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ยี่ห้อ Agilent รุ่น 1100 Series โดยใช้คอลัมน์ Mightysil RP-18 GP (150 x 4.6 มิลลิเมตร, อนุภาค C18 ขนาด 5 ไมครอน) และ การ์ดคอลัมน์ RP-18 GP (5 x 4.6 มิลลิเมตร, อนุภาค C18 ขนาด 5 ไมครอน) ทำการควบคุมสภาวะที่ 25 องศาเซลเซียส ตรวจวัดสัญญาณด้วยเครื่องตรวจวัดสัญญาณแบบ diode array detector (DAD) ที่ความยาวคลื่น 235 นาโนเมตร และปริมาตรที่ใช้ในการฉีดตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์เป็นแบบไอโซเครติก (isocratic elution) มีอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ของแอมโมเนียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.01 โมลาร์ พีเอช 4.5-4.6 (A): เมทธานอล (B) อัตราส่วน 80:20 และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่กำหนดดังนี้ เวลาที่ 0-3 นาทีอัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที เวลาที่ 3.5-12 นาที อัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที และ เวลาที่ 12.5 นาที อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที รวมระยะเวลาทั้งสิ้น 15 นาที

จากนั้นคำนวณหาปริมาณกรดเบนโซอิก ในหน่วยไมโครกรัมต่อกรัม ($\mu\text{g/g}$) โดยใช้กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกรดเบนโซอิกและซัคคาริน ($\mu\text{g/g}$) กับพื้นที่ใต้พีค (mAU*s)

3.4.2 การวิเคราะห์ปริมาณสีผสมอาหาร ปองโซ 4 อาร์, คาร์โมอีซิน, เออร์โรซิน, ตาร์ตราซี, และ ซันเซตเยลโลว์ เอ็ฟ ซี เอ็ฟ

3.4.2.1 การเตรียมตัวอย่างวิเคราะห์สีผสมอาหาร

นำตัวอย่างเยลลี่จำนวนประมาณ 75 กรัม ปั่นด้วยเครื่องโฮมจีในเซอร์ นาน 10 นาที แล้วสุ่มซังตัวอย่าง 2.5 กรัม ใส่ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ทำการสกัดเช่นเดียวกันกับข้อ 3.4.1.1 แต่มีความแตกต่างกันดังนี้ เติมสารสกัดผสมระหว่างเมทานอล และสารละลายบัฟเฟอร์ของแอมโมเนียมอะซิเตด/ กรดอะซิติก (ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ พีเอช 4.5-4.6) ในอัตราส่วน 40:60 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร แล้วเติม Carrez I และ Carrez II อย่างละ 0.5 มิลลิลิตร ถ่ายลงขวดปรับปริมาตรและปรับปริมาตรด้วยสารสกัดเมทานอล และสารละลายบัฟเฟอร์ของแอมโมเนียม- อะซิเตด/ กรดอะซิติก (ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ พีเอช 4.5-4.6) จนมีปริมาตร 50 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 นำส่วนที่กรองได้กรองผ่านเยื่อกรอง PTFE 0.2 ไมโครเมตร แล้วนำสารที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณสีผสมอาหารด้วยเครื่อง HPLC

3.4.2.2 ปริมาณสีผสมอาหาร (ปองโซ 4 อาร์, คาร์โมอีซิน, เออร์โรซิน, ตาร์ตราซีน และซันเซตเยลโลว์ เอ็ฟ ซี เอ็ฟ) ตามวิธีของ Minioti และคณะ (2007)

นำตัวอย่างสารสกัดที่กรองผ่านเยื่อกรอง PTFE ขนาด 0.2 ไมโครเมตร ใส่ลงในขวดไวโอล (vial) สีชา ขนาด 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสีผสมอาหารด้วยเครื่อง HPLC ยี่ห้อ Agilent รุ่น 1100 Series ด้วยคอลัมน์ Mightysil RP-18 GP (150 x 4.6 มิลลิเมตร, อนุภาค C18 ขนาด 5 ไมครอน) และใช้การดัดคอลัมน์ RP-18 GP (5 x 4.6 มิลลิเมตร, อนุภาค C18 ขนาด 5 ไมครอน) ทำการควบคุมสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ที่ 25 องศาเซลเซียส ตรวจวัดสัญญาณด้วยเครื่องตรวจวัดสัญญาณแบบ DAD ที่ความยาวคลื่น 482 นาโนเมตร และปริมาตรที่ใช้ในการฉีดตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร

สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์เป็นแบบเกรเดียนท์อีลูชัน (gradient elution) มีอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ของอะซิโตนไทรต์ (A) : เมทานอล (B) : แอมโมเนียมอะซิเตดบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 7.5 (C) และอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ที่กำหนดดังนี้ เวลาที่ 0.0 นาที อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ เท่ากับ 0.0 : 0.0 : 100 เวลาที่ 10 นาที อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ 10.5 : 42.0 : 47.5 เวลาที่ 19.0 นาที อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ 20.0 : 80.0 : 0.0 เวลาที่ 19.5 นาที อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ 0.0 : 0.0 : 100 และที่เวลา 23.0 นาที อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ 0.0 : 0.0 : 100 และกำหนดอัตราการไหลที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที โดยใช้ระยะเวลาทั้งสิ้น 23.0 นาที

คำนวณหาปริมาณสีผสมอาหาร ในหน่วยไมโครกรัมต่อกรัม ($\mu\text{g/g}$) โดยใช้กราฟมาตรฐาน แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นสีผสมอาหาร ($\mu\text{g/g}$) กับพื้นที่ใต้พีค (mAU*s)

3.4.3 การประเมินความเสี่ยง

นำข้อมูลปริมาณสูงสุด ปริมาณเฉลี่ย และปริมาณเฉลี่ยที่เกินมาตรฐานของกรดเบนโซอิก ซัคคาริน และสีผสมอาหาร ในผลิตภัณฑ์ขนมเยลลี่จากผลการทดลองในข้อ 3.4.1 ถึง 3.4.3 มาประเมินการได้รับสัมผัสทางการบริโภค (exposure assessment) ของสารเติมแต่งอาหาร (กรดเบนโซอิก ซัคคาริน สีผสมอาหาร) และน้ำตาล โดยใช้ฐานข้อมูลการบริโภคอาหารของคนไทย (สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2549) ในทุกช่วงกลุ่มอายุของผู้บริโภค (8 ช่วงอายุ ตามตารางที่ 2.2) ดังสมการ คือ

$$\text{การได้รับสัมผัสทางการบริโภค (dietary exposure)} = \frac{\text{ระดับการปนเปื้อนสิ่งอันตราย} \times \text{ปริมาณการบริโภค}}{\text{น้ำหนักตัวผู้บริโภค}}$$

จากนั้นวิเคราะห์ลักษณะความเสี่ยง (risk characterization) ของสารเติมแต่งอาหาร (กรดเบนโซอิก ซัคคาริน และ สีผสมอาหาร) และน้ำตาล ด้วยการคำนวณหาปริมาณการได้รับสัมผัสเปรียบเทียบกับค่า ADI โดยการศึกษาทำการประเมินความเสี่ยงโดยแปลงปริมาณการได้รับสัมผัสสารนั้นๆ เป็นร้อยละของค่า ADI ดังนั้นถ้ามีค่าเกินร้อยละ 100 ของค่า ADI แสดงว่ามีความเสี่ยงที่จะก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภค ใช้สมการดังนี้

$$\text{ความเสี่ยง (Risk)} = \frac{\text{การได้รับสัมผัสทางการบริโภค} \times 100}{\text{ADI}}$$

ความเสี่ยง (Risk) > ร้อยละ 100 = มีโอกาสที่จะเกิดอันตรายต่อสุขภาพผู้บริโภค

ความเสี่ยง (Risk) ≤ ร้อยละ 100 = ไม่มีโอกาสที่จะเกิดอันตรายต่อสุขภาพผู้บริโภค