บทที่ 3
วิธีดำเนินการศึกษา

การศึกษาครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลอง โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลการลดปริมาณตกค้างของไนเตรทและไนไตรท์ด้วยการใช้อิริทธอเบทในไส้กรอกเวียนนา โดยมีขั้นตอนการดำเนินการศึกษา ดังนี้

3.1 การตรวจสอบแม่นยำและความถูกต้อง ในการวิเคราะห์ปริมาณไนเตรทและไนไตรท์

3.1.1 วิธีการตรวจสอบความแม่นยำ (Precision) คือ ทำการวิเคราะห์หาปริมาณไนเตรทและไนไตรท์จากตัวอย่างไส้กรอกเวียนนาตัวอย่างเดียวกัน 10 ซ้ำ แล้วนำมาหาค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (CV) โดยจะต้องไม่เกิน 10%

สูตรการคำนวณ

$$\%CV = \frac{SD \times 100}{\overline{X}}$$

$$SD = \sqrt{\frac{\Sigma(X - \overline{X})^2}{N-1}}$$

$\overline{X}$ = ค่าเฉลี่ย

X = ข้อมูลแต่ละตัว

N = จำนวนข้อมูล

3.1.2 การทำRecovery โดยทำการวิเคราะห์ไนเตรทและไนไตรท์ในตัวอย่างที่ไม่ทราบค่าปริมาณไนเตรทและไนไตรท์มาก่อน (ไส้กรอกเวียนนาตัวอย่างเดียวกับตัวอย่างที่ใช้ตรวจสอบความแม่นยำ) โดยเติมสารละลายมาตรฐานไนเตรทและไนไตรท์ (stock standard) 100 ไมโครกรัม ทำ 10 ครั้ง และทำBlank 1 ฟลาสก์ แล้วนำมาคำนวณตามสูตรข้างล่าง โดยจะต้องได้ค่าอยู่ระหว่าง 90-110 %

สูตรการคำนวณ

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{ปริมาณไนเตรทหรือไนไตรท์ที่วิเคราะห์ได้ในแต่ละซ้ำ} \times 100}{\text{ปริมาณไนเตรทหรือไนไตรท์ที่มีอยู่เดิม+ ปริมาณไนเตรทหรือไนไตรท์ที่เติม}}$$

3.2 ทำการวิเคราะห์ปริมาณไนเตรทและไนไตรท์ที่มีอยู่เดิมของเนื้อหมูที่เป็นวัตถุดิบ

ทำโดยสุ่มเนื้อหมู 100 กรัมและมันหมู50 กรัม (จากเนื้อหมู 10 ก.ก และมันหมู 5 ก.ก) นำมาบดผสมรวมกัน (ตามอัตราส่วนในการผลิตเป็นไส้กรอก)

3.2.1 ทำการผลิตไส้กรอกเวียนนาโดยสูตรพื้นฐานเหมือนกัน แต่ใช้ปริมาณอิริทธอเบทต่างกัน ดังนี้

กลุ่มควบคุม (Control) ไม่ใส่อิริทธอเบท

กลุ่มที่ 1 (T_1) ใส่อิริทธอเบท 1 กรัม/เนื้อผสม 1 กิโลกรัม (1000 ppm.)

กลุ่มที่ 2 (T_2) ใส่อิริทธอเบท 2 กรัม/เนื้อผสม 1 กิโลกรัม (2000 ppm.)

กลุ่มที่ 3 (T_3) ใส่อิริทธอเบท 3 กรัม/เนื้อผสม 1 กิโลกรัม (3000 ppm)

โดย ทำการผลิตไส้กรอกทั้ง 4 กลุ่ม จำนวน 3 ซ้ำ ซึ่งจะพัก 1 อาทิตย์หลังทำแต่ละซ้ำ

ก. วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือในการผลิตไส้กรอกเวียนนา

1. เนื้อหมู มันหมู น้ำแข็ง
2. เครื่องเทศ
3. ไส้พลาสติกเบอร์ 16
4. เครื่องบดเนื้อ
5. เครื่องสับผสม
6. เครื่องอัดบรรจุไส้
7. ตู้รมควัน
8. เครื่องปิดผนึก
9. หม้อต้ม

ข. สูตรพื้นฐานสำหรับการทำไส้กรอกเวียนนา

1. เนื้อหมูหรือเนื้อวัว	2.00	กิโลกรัม
2. มันหมู	1.00	กิโลกรัม
3. น้ำแข็ง	1.00	กิโลกรัม
4. ฟอสเฟต	10.00	กรัม

5. โปรตีนสกัดจากถั่วเหลือง	50.00	กรัม
6. เกลือไนไตรท์	40.00	กรัม
7. เครื่องเทศ	80.00	กรัม
8. น้ำตาล	20.00	กรัม

ค. ขั้นตอนการทำไส้กรอกเวียนนา (Vienna sausage)

การเตรียมวัตถุดิบ

- เนื้อวัว เนื้อหมู เป็นเนื้อแดงล้วนๆไม่มีเอ็น ไม่มีมัน
- มันหมูเป็นมันที่ได้จากส่วนต่างๆของหมู ยกเว้น มันเปลว

การหมัก

- หมักเนื้อวัว เนื้อหมู ด้วยเกลือไนไตรท์เก็บไว้ที่อุณหภูมิ+2 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 24 ชั่วโมง.

การเตรียมเนื้อ

- บดเนื้อวัว เนื้อหมู และมันหมู ให้ละเอียดด้วยตะแกรงรูขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 mm

วิธีการผลิต

1. ใส่เนื้อวัว เนื้อหมู ที่บดละเอียดแล้วลงในกระทะของเครื่องสับ
2. ปิดฝากระทะและเดินเครื่อง พร้อมเติมน้ำแข็ง ,เครื่องเทศ , เครื่องปรุงต่างๆ
3. ใส่มันหมู สับจนละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน
4. หยุดเครื่อง กวาดเนื้อที่ติดอยู่ภายในฝาครอบกระทะ
5. เดินเครื่องต่อไปจนอุณหภูมิสุดท้ายไม่เกิน 12-15 องศาเซลเซียส
6. บรรจุในไส้พลาสติกเบอร์16 มัดเป็นท่อน ยาว ท่อนละ10 เซนติเมตร
7. แขวนแล้วนำเข้าเตาอบ

- การอบแห้ง 70 องศาเซลเซียส 30 นาที
- การรมควัน 70 องศาเซลเซียส 30 นาที
- การต้ม 75 องศาเซลเซียส 20 นาที
- การแช่น้ำ 10 องศาเซลเซียส 10 นาที
- การเก็บรักษา 2-4 องศาเซลเซียส

3.3 การวิเคราะห์หาปริมาณไนเตรทและไนไตรท์ ที่ตกค้างในไส้กรอกเวียนนาและดำเนินการเก็บรวบรวมข้อมูลที่ตกค้างในไส้กรอกเวียนนาที่ผลิตทั้ง 4 กลุ่ม โดยทำ 3 ซ้ำ แล้วแยกในแต่ละกลุ่มอีกเป็น 2 ซ้ำในขณะทำการวิเคราะห์ โดยสุ่มตัวอย่างแบบโควต้า กลุ่มละ 100 กรัม ซึ่งทำการวิเคราะห์ หลังจากเก็บรักษาเพื่อศึกษาผลกระทบในการเก็บรักษา 3 รูปแบบคือ

- แช่เย็น 1 วัน
- แช่แข็ง 1 วัน 1 สัปดาห์ 2 สัปดาห์ และ 3 สัปดาห์
- แช่แข็งร่วมกับการแช่เย็น ดังนี้คือ แช่แข็ง1สัปดาห์+แช่เย็น1 สัปดาห์ แช่แข็ง 2 สัปดาห์+แช่เย็น1 สัปดาห์ และ แช่แข็ง3 สัปดาห์+แช่เย็น1 สัปดาห์

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณไนเตรทและไนไตรท์ ทำได้ดังนี้

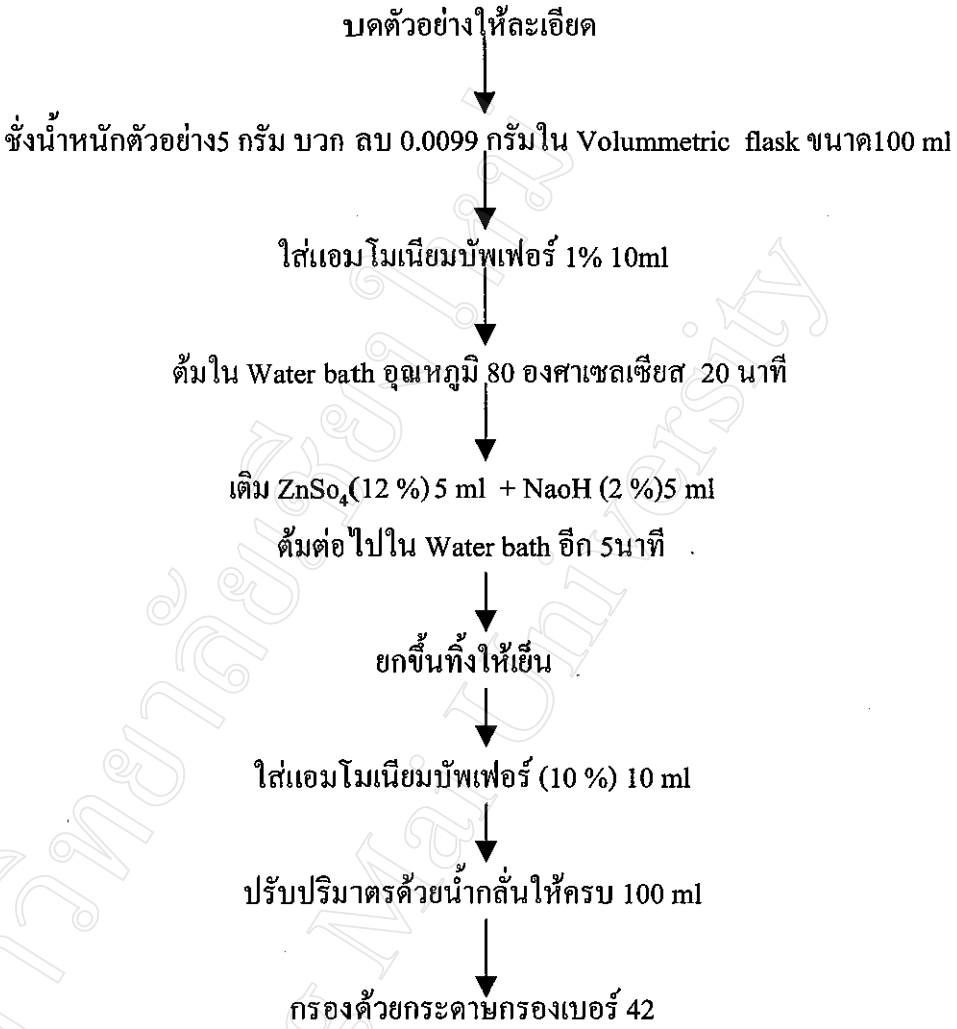
3.3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณไนเตรทและไนไตรท์ มีรายการดังนี้

- คอลัมน์แคดเมี่ยม
- Spectrophotometer
- Water bath
- เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
- อุปกรณ์เครื่องแก้วต่างๆ
- เครื่องบดเนื้อตัวอย่าง
- สารเคมีต่างๆ

3.3.2 วิธีการวิเคราะห์ดำเนินตามขั้นตอนดังนี้

1. การเตรียมตัวอย่าง

หลักการ คือ ทำการสกัดไนโตรเจนในไนเตรทและไนไตรท์จากตัวอย่างหลังตกตะกอนโปรตีนในตัวอย่างออกแล้วด้วยซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4$) และโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) วิธีการตามแผนผังต่อไปนี้



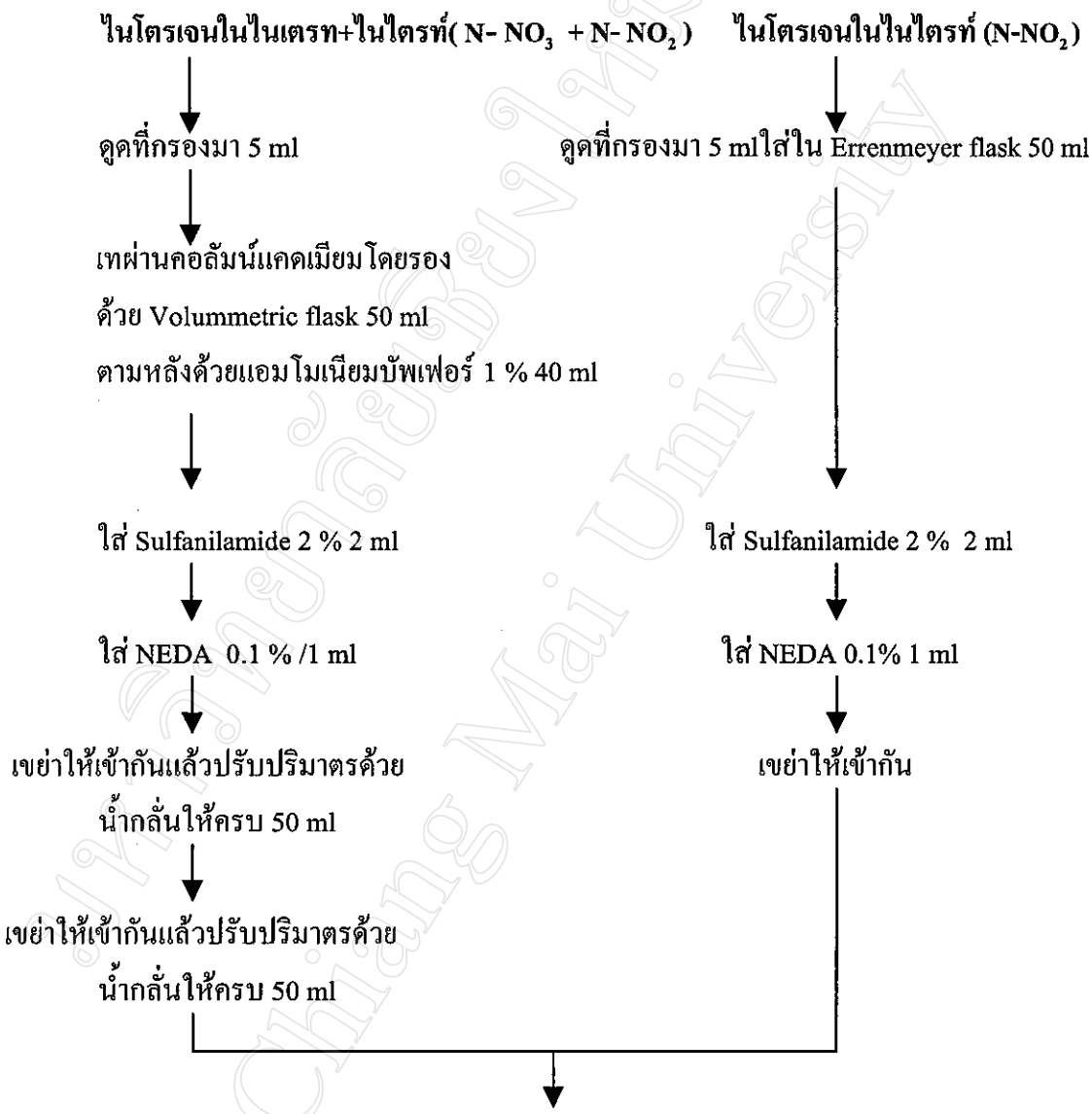
2. การทำให้เกิดสีเพื่อใช้วัดค่า absorbance ทำตามแผนผังดังนี้

ก. หลักการ

หลังจากสกัดไนโตรเจนในไนเตรทและไนไตรท์ (N- NO_3และ N- NO_2)ออกมาจากขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างได้แล้ว นำไปทำให้เกิดสี โดยการทำปฏิกริยา diazo-coupling กับ N-1 naphthylethylenediamine dihydrochloride และ sulfanilamind แล้วอ่านความเข้มของสี แปลงออกมาเป็นปริมาณ N- NO_3และ N- NO_2 มีหน่วยเป็นไมโครกรัม (μ) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 nm.

N- NO_2 สามารถทำปฏิกริยา diazo-coupling ได้เลย แต่ N- NO_3 ต้องถูกเปลี่ยนเป็น N- NO_2 ก่อนโดยการเทผ่านคอลัมน์แคดเมี่ยม หลังจากนั้น จึงทำปฏิกริยาดังกล่าวได้ ค่าไนโตรเจนที่ได้จะเป็นค่าที่ได้จากค่าไนโตรเจนทั้งจากไนเตรทและไนไตรท์ (N- NO_3และ N- NO_2) ดังนั้นก่อน

การคำนวณค่าโซเดียมไนเตรท ต้องนำค่าปริมาณ N- NO_3 + N-NO_2 ลบด้วยค่าปริมาณ N-NO_2 ก่อน ค่าที่เหลือจึงเป็นค่าปริมาณ N- NO_3 ที่แท้จริง ซึ่งขั้นตอนเป็นดังแผนผังข้างล่างนี้



นำเข้าเครื่อง Spectrophotometer วัดค่า absorbanceที่ความยาวคลื่น 540 nm เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน N- NO_3 หรือ N- NO_2

ข. การเตรียมกราฟมาตรฐาน

1) การเตรียมกราฟมาตรฐานไนโตรเจนในไนไตรท์(N- NO_2)

ปิเปตสารละลายมาตรฐาน N- NO_2 (working solotion N- NO_2) ที่มีความเข้มข้น 0.8 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรจำนวน 0, 1, 5 มิลลิลิตร (0, 0.8, 4 ไมโครกรัม) แล้วเติมแอมโมเนี่ยมอซิเตทบัฟเฟอร์

1% ให้ครบ 5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำมาทำให้เกิดสีตามแผนผังข้างต้นแล้ว นำค่า absorbance มาสร้างกราฟเทียบกับความเข้มข้น หน่วยเป็นไมโครกรัม (μ)

2) การเตรียมกราฟมาตรฐานไนโตรเจนในไนเตรท(N- NO_3)

ปิเปตสารละลายมาตรฐาน N- NO_3 (working solotion N- NO_2) ที่มีความเข้มข้น 4 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตรจำนวน 0 , 1, 5 มิลลิลิตร (0, 4, 20 ไมโครกรัม) แล้วเติมแอมโมเนี่ยมอซิเตท บัฟเฟอร์ 1% ให้ครบ 5 มิลลิลิตรหลังจากนั้นนำมาทำให้เกิดสีโดยผ่านคอลั่มน์แคดเมี่ยมตามแผนผังข้างต้นแล้ว นำค่า absorbance มาสร้างกราฟเพื่อใช้เทียบหาปริมาณ N- NO_3 หน่วยเป็นไมโครกรัม (μ) โดยการป้อนข้อมูลลงในเครื่อง spectrophotometerให้เครื่องสร้างกราฟ เทียบค่า absorbance มาเป็นปริมาณ N- NO_3 หน่วยเป็นไมโครกรัม (μ)

วิธีการเตรียมสารละลายมาตรฐาน N- NO_2 และ N- NO_3 แสดงไว้ในภาคผนวก

ค. การคำนวณ

1. การคำนวณหาปริมาณโซเดียมไนไตรท์

หลักการ

นำค่า absorbanceเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาปริมาณ N- NO_2 ในตัวอย่าง แล้วนำเข้าสูตรคำนวณ หาปริมาณโซเดียมไนไตรท์ โดยสูตรเป็นดังนี้

$$\text{ppm. } NaNO_2 = \frac{\mu g.\ N\text{-}NO_2 \times 4.93 \times \text{factor}}{w\ (gm)}$$

μg. N- NO_2 = ปริมาณไนโตรเจนในไนไตรท์ที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐาน หน่วยเป็นไมโครกรัม

4.93 = ค่าคงที่ของ $NaNO_2$ เทียบเท่ากับ N- NO_2 1 ส่วน

factor = ค่าที่ใช้คูณเพื่อกลับสู่ปริมาณตัวอย่างจริงหลังมีการเจือจางตัวอย่าง (dilution)

w = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

2. การคำนวณ หาปริมาณโซเดียมไนเตรท

หลักการ

นำค่าปริมาณไนโตรเจนของทั้งไนเตรทและไนไตรท์ที่อ่านได้จากการเทียบกราฟมาตรฐาน $NaNO_3$ มาลบด้วยปริมาณไนโตรเจนของไนไตรท์ที่กล่าวข้างต้น แล้วนำค่าที่เหลือมาเข้าสูตรคำนวณหาปริมาณโซเดียมไนเตรท โดยสูตรเป็นดังนี้

$$\text{ppm. } NaNO_3 = \frac{\mu g.\ N\text{-}NO_2\ \&\ NO_3 - N\text{-}NO_2) \times 6.07 \times \text{factor}}{w\ (gm)}$$

$\mu g.\ N\text{-}NO_2\ \&\ NO_3$ = ปริมาณไนโตรเจนในไนเตรทและไนไตรท์ที่อ่านได้จากกราฟ มาตรฐาน $N\text{-}NO_3$ มีหน่วยเป็นไมโครกรัม

$\mu g.\ N\text{-}NO_2$ = ปริมาณไนโตรเจนในไนไตรท์ที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐาน $N\text{-}NO_2$ มีหน่วยเป็นไมโครกรัม

6.07 = ค่าคงที่ของ $NaNO_3$ เทียบเท่ากับ $N\text{-}NO_3$ 1 ส่วน

factor = ค่าที่ใช้คูณเพื่อกลับสู่ปริมาณตัวอย่างจริงหลังมี การเจือจางตัวอย่าง (dilution)

w = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

3.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์เชิงสถิติ โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณโซเดียมไนเตรทและโซเดียมไนไตรท์ ที่ตกค้างในไส้กรอกเวียนนา โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน จำแนกแบบทางเดียว (One-Way Analysis of variance) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยการใช้โปรแกรม SPSS For windows version 98