

บทที่ 3

วิธีดำเนินการศึกษา

การศึกษาเรื่อง การตรวจคัดกรองการปนเปื้อนสารเมลามีนด้วยชุดทดสอบในขนมที่มีนมเป็นส่วนประกอบซึ่งจำหน่ายในบริเวณ โรงเรียนอนุบาลเขตอำเภอเมืองเชียงใหม่ เป็นการศึกษาเชิงสำรวจ และเชิงวิเคราะห์ มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจคัดกรองการปนเปื้อนสารเมลามีนโดยชุดทดสอบสารเมลามีนในขนมที่จำหน่ายในบริเวณ โรงเรียนอนุบาลสังกัดรัฐบาลและเอกชน เขตอำเภอเมืองเชียงใหม่ โดยมีวิธีดำเนินการศึกษา ดังนี้

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

ประชากร คือ ขนมที่มีนมเป็นส่วนประกอบ วางจำหน่ายในร้านค้าในบริเวณ โรงเรียนอนุบาลสังกัดรัฐบาล และเอกชน เขตอำเภอเมืองเชียงใหม่ (ภาคผนวก ก)

กลุ่มตัวอย่าง คือ ชนิดของขนมที่มีนมเป็นส่วนประกอบได้แก่ ขนมเค้ก ขนมเครป ขนมปัง และขนมโตเกียว ตัวอย่างที่สุ่มเก็บเป็นขนมชนิดที่ไม่มีเลขสารบบอาหาร (เลข อย.) ทำการเก็บตัวอย่างละ 3 ครั้ง โดยมีระยะห่างในการเก็บเกินกว่า 1 สัปดาห์ เก็บตัวอย่างช่วงเวลาประมาณ 15.30-17.00 น. ของทุกวันทำการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา

1. สารเคมี

1.1 สารเคมีที่ใช้ในการตรวจคัดกรองสารเมลามีน คือ ชุดทดสอบสารเมลามีน ควบคุมการผลิตและมาตรฐาน โดย รองศาสตราจารย์ ดร. เขวมาลัย คำเจริญ (ภาคผนวก ง) ซึ่งประกอบไปด้วย

1.1.1 น้ำกลั่น

1.1.2 สารละลายมาตรฐานเมลามีนร้อยละ 0.1

1.1.3 สารละลายซี

1.2 สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบชุดทดสอบสารเมลามีน คือ ผงสารเมลามีน ความบริสุทธิ์ร้อยละ 99 (ภาคผนวก ข)

2. เครื่องมือ และวัสดุอุปกรณ์

2.1 เครื่องมือ และวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจคัดกรองสารเมลามีน

2.1.1 แท่งแก้วคน

2.1.2 ช้อนตักสาร

2.1.3 ครอบคอดอาหาร

2.1.4 หลอดหยอด (dropper)

2.1.5 กระดาษกรองยี่ห้อ Whatman No.4

2.1.6 บีกเกอร์ (beaker) ขนาด 100 ml

2.1.7 กระบอกลวด (measuring cylinder) ขนาด 100 ml

2.1.8 สฟือทเพลท หรือจานหลุมสี่ขาว (spot plate)

2.1.9 เครื่องชั่งดิจิทัล ยี่ห้อ OHAUS รุ่น CL201

2.2 เครื่องมือ และวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจสอบคุณภาพชุดทดสอบสารเมลามีน

2.2.1 volumetric flask ขนาด 100 และ 1000 ml

2.2.2 graduated pipette ขนาด 1 และ 10 ml

2.2.3 เครื่องชั่ง OHAUS ทศนิยม 4 ตำแหน่ง

2.2.5 filler pipette

2.2.6 หลอดทดลอง 20 อัน (test tube)

2.2.7 ตะแกรง (test tube rack)

2.2.8 pasture pipette

2.2.9 บีกเกอร์ (beaker) ขนาด 100 ml

การตรวจสอบคุณภาพชุดทดสอบ

1. การทดสอบความถูกต้อง (Accuracy) ของชุดทดสอบสารเมลามีน โดยเตรียมสารละลายเมลามีนที่ทราบความเข้มข้น (stock standard solution 1,000 ppm) แล้วนำไปเจือจางเป็นระดับต่างๆ (สารละลายเมลามีนความเข้มข้น 1, 10, 100 และ 1,000 ppm) (ภาคผนวก ข) จากนั้นนำไปทดสอบกับชุดทดสอบสารเมลามีนตามวิธีการที่ระบุไว้ในเอกสารการใช้ชุดทดสอบ (ภาคผนวก ง) ทำการทดสอบความเข้มข้นละ 5 ครั้ง เมื่อชุดทดสอบทำปฏิกิริยากับสารละลายเมลามีนจะแสดงผลเป็นสีเหลือง และสีแดง (สีกุหลาบแดง) ผลที่ได้จากการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายเมลามีนที่ทำปฏิกิริยากับชุดทดสอบ พบว่าสารละลายเมลามีนความเข้มข้น 1 ppm ให้ผลเป็นสีเหลืองทุกครั้ง สารละลายเมลามีนความเข้มข้นมากกว่า 10 ppm เป็นสีแดงทุกครั้งในแต่ละครั้งนำมาคำนวณค่าร้อยละความถูกต้อง การตรวจสอบทุกครั้งในทุกความเข้มข้นสามารถระบุความถูกต้องได้เหมือนเดิมทุกครั้ง แสดงว่ามีความถูกต้องร้อยละ 100 (ตารางที่ 3.1)

ตารางที่ 3.1 ผลการทดสอบความถูกต้องของชุดทดสอบสารเมลามีน

สารละลายเมลามีนที่ทราบ ความเข้มข้น	การเกิดสีของสารละลาย (ครั้ง)		ความถูกต้อง (ครั้ง)	ระดับความถูกต้อง (ร้อยละ)
	สีเหลือง	สีแดง		
สารละลายเมลามีน 1 ppm	5	0	5	100
สารละลายเมลามีน 10 ppm	0	5	5	100
สารละลายเมลามีน 100 ppm	0	5	5	100
สารละลายเมลามีน 1000 ppm	0	5	5	100

2. การทดสอบความไว (Sensitivity) ของชุดทดสอบสารเมลามีน เตรียมสารละลายเมลามีน โดยทำการปรับระดับความเข้มข้นของสารละลายตั้งแต่ 0 ppm ขึ้นไปที่ละ 1 ความเข้มข้น (1 ppm) แล้วนำไปทดสอบกับชุดทดสอบสารเมลามีนเช่นเดียวกับการทดสอบความถูกต้อง เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของสีสารละลาย (ภาคผนวก ก) จนได้ความเข้มข้นที่นำไปทดสอบกับชุดทดสอบแล้วให้ผลเป็นสีทูลาบแดง ผลการทดสอบพบว่าสารละลายเมลามีนความเข้มข้น 0-6 ppm เมื่อทำปฏิกิริยากับชุดทดสอบแล้วได้สีเหลือง ส่วนความเข้มข้นตั้งแต่ 9 ppm ขึ้นไป ให้ผลเป็นสีแดง แต่ในช่วงความเข้มข้นที่ 7-8 ppm ให้ผลเป็นสีส้ม แสดงว่าชุดทดสอบนี้สามารถแยกความแตกต่างได้ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 6 ppm ลงไป และสูงกว่า 9 ppm ขึ้นไป แต่ไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ในความเข้มข้นที่ 7 และ 8 ppm (ตารางที่ 3.2)

ตารางที่ 3.2 ผลการทดสอบความไวของชุดทดสอบสารเมลามีน

สารละลายเมลามีนความเข้มข้นต่างๆ	การเกิดสีของสารละลาย (ครั้ง)		
	สีเหลือง	สีส้ม	สีแดง
สารละลายเมลามีนความเข้มข้น 0 ppm	5	0	0
สารละลายเมลามีนความเข้มข้น 1 ppm	5	0	0
สารละลายเมลามีนความเข้มข้น 2 ppm	5	0	0
สารละลายเมลามีนความเข้มข้น 3 ppm	5	0	0
สารละลายเมลามีนความเข้มข้น 4 ppm	5	0	0
สารละลายเมลามีนความเข้มข้น 5 ppm	5	0	0
สารละลายเมลามีนความเข้มข้น 6 ppm	5	0	0
สารละลายเมลามีนความเข้มข้น 7 ppm	0	5	0
สารละลายเมลามีนความเข้มข้น 8 ppm	0	5	0
สารละลายเมลามีนความเข้มข้น 9 ppm	0	0	5
สารละลายเมลามีนความเข้มข้น 10 ppm	0	0	5

การเก็บรวบรวมข้อมูล

1. การสำรวจ ร้านค้าในบริเวณโรงเรียนอนุบาลสังกัดรัฐบาล และเอกชน เขตอำเภอเมือง เชียงใหม่ ซึ่งขึ้นทะเบียนกับสำนักงานเขตพื้นที่การศึกษาเชียงใหม่ เขต 1 (ภาคผนวก ก) จากการสำรวจโรงเรียนทั้ง 71 โรงเรียน แบ่งออกเป็น สังกัดรัฐบาล 28 โรงเรียน และสังกัดเอกชน 43 โรงเรียน พบว่าร้านค้าในบริเวณโรงเรียนอนุบาลทั้งสองสังกัดมีการจำหน่ายขนมที่มีนมเป็นส่วนประกอบ และไม่มีเลขสารบบอาหาร คล้ายคลึงกันอยู่ 4 ชนิด คือ ขนมเค้ก ขนมเครป ขนมปัง และขนมโตเกียว จำหน่ายในร้านค้าในบริเวณโรงเรียนทั้งหมด 49 โรงเรียน โดยมีสังกัดรัฐบาล 26 โรงเรียน และสังกัดเอกชน 23 โรงเรียน ทำการสำรวจเฉพาะสังกัดรัฐบาล พบว่ามีร้านค้าจำหน่ายขนมเค้ก 9 โรงเรียน ขนมเครป 1 โรงเรียน ขนมปัง 22 โรงเรียน และขนมโตเกียว 1 โรงเรียน สำรวจเฉพาะสังกัดเอกชน พบว่ามีการจำหน่ายขนมเค้ก 17 โรงเรียน ขนมเครป 10 โรงเรียน ขนมปัง 15 โรงเรียน และขนมโตเกียว 9 โรงเรียน

2. การสุ่มตัวอย่าง และการตรวจคัดกรองการปนเปื้อนสารเมลามีนในขนมที่มีนมเป็นส่วนประกอบ จากร้านค้าในบริเวณแต่ละโรงเรียนที่คัดเลือกมาจากข้อ 1 สุ่มร้านค้าแบบบังเอิญ สุ่มซื้อขนมที่มีนมเป็นส่วนประกอบแบบเจาะจง เก็บตัวอย่างขนมแต่ละชนิดตามสภาพของการขายจริง เก็บชนิดของขนมละ 1 ตัวอย่าง ต่อการสุ่ม 1 ครั้ง ทำการสุ่มซ้ำ 3 ครั้ง จากร้านค้าเดิม และชนิดขนมเดิม โดยเก็บตัวอย่างช่วงเวลาประมาณ 15.30-17.00 น. ของทุกวันทำการ มีระยะห่างในการเก็บตัวอย่างห่างกันเกินกว่า 1 สัปดาห์ เพื่อให้ได้สินค้าจากการผลิตครั้งใหม่ จากนั้นนำตัวอย่างขนมที่เก็บได้ตรวจคัดกรองหาสารเมลามีนด้วยชุดทดสอบสารเมลามีน 3 ซ้ำ (ภาคผนวก ค) ประกอบไปด้วยขั้นตอน ดังนี้

2.1 การเตรียมสารควบคุมมาตรฐานลบและบวก หยคน้ำกลั่นจำนวน 10 หยด ลงในหลุมที่ 1 ของจานหลุมสีขาวซึ่งจะเป็นตัวอย่างสีของสารควบคุมมาตรฐานลบ (-) และหยดสารละลายมาตรฐานเมลามีนร้อยละ 0.1 ที่มีอยู่ในชุดทดสอบลงให้หลุมที่ 2 ซึ่งเป็นสารควบคุมมาตรฐานบวก (+) ในแต่ละหลุมหยดน้ำยาทดสอบสารละลายซีทีมีในชุดทดสอบเมลามีนลงไป 1-2 หยดต่อหลุม ขยับภาชนะเบาๆ ให้น้ำยาผสมเข้ากันรอจนเกิดการเปลี่ยนแปลงสี โดยหลุมควบคุมที่ให้ผลเป็นลบจะมีสีเหลือง ส่วนหลุมควบคุมที่ให้ผลเป็นบวกจะมีสีกุหลาบแดง

2.2 การเตรียมตัวอย่างขนมก่อนการวิเคราะห์ โดยใช้กรรบดตัวอย่างให้ละเอียดแล้วชั่งตัวอย่างที่บดแล้ว 8 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร คนส่วนประกอบให้เข้ากัน ตั้งไว้ทิ้งให้ตกตะกอน แล้วกรองเฉพาะส่วนบนด้วยกระดาษกรอง Whatman No.4 ได้สารละลายส่วนใส ดูดเอาน้ำส่วนใสมาทดสอบจำนวน 10 หยด ลงให้หลุมที่ 3

2.3 การประเมินผล ในตัวอย่างถั่วลันเตา 3 ซึ่งเป็นหลุมของตัวอย่าง หยอดน้ำยาทดสอบสารละลายซีที่มีในชุดทดสอบสารเมลามีนลงไป 1-2 หยดต่อหลุม ขยับภาชนะเบาๆ ให้น้ำยาผสมเข้ากัน รอจนเกิดการเปลี่ยนแปลงสี หากตัวอย่างเกิดสีเหลือง ให้หยุดการทดสอบขั้นตอนต่อไป แต่หากตัวอย่างเกิดเป็นสีทึบราบแดง แสดงว่ามีการปนเปื้อนของสารเมลามีนในตัวอย่างอาหารนั้น ซึ่งต้องมีการทดสอบซ้ำอีกครั้ง

2.4 การทดสอบซ้ำในตัวอย่างที่ให้ผลเป็นบวก หยดตัวอย่างสารละลายซีที่ได้จากตัวอย่าง 1 หยดในหลุมที่ 4 แล้วหยดน้ำกลั่นจำนวน 9 หยด เพื่อเจือจางให้ลดลง 10 เท่า แล้วหยดน้ำยาทดสอบสารละลายซี 1-2 หยด เขย่าเบาๆ ให้เข้ากัน ถ้าสารละลายที่ได้ยังคงมีสีทึบราบแดงอยู่ แสดงว่าตัวอย่างนั้นมีการปนเปื้อนสารเมลามีนเกินพิกัด ในกรณีที่ตัวอย่างซ้ำใดซ้ำหนึ่งในตรวจด้วยชุดทดสอบสารเมลามีน พบว่ามีการปนเปื้อนเกินพิกัด ให้นำตัวอย่างขนมดังกล่าวไปตรวจสอบในห้องปฏิบัติการของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์เขต 10 เชียงใหม่ เพื่อหาปริมาณสารเมลามีนที่ปนเปื้อน ด้วยวิธีมาตรฐานซึ่งเป็นการวิเคราะห์โดยใช้วิธี LC/MS-MS

3. การประเมินความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของสารเมลามีนในขนม จากข้อมูลที่ได้ในข้อ 2 นำผลที่ได้ของการสุ่มทั้ง 3 ซ้ำ ของขนมแต่ละชนิดในแต่ละสังกัดโรงเรียน นำมาประเมินโดยใช้เกณฑ์ในการประเมินระดับความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนเมลามีน ซึ่งเกณฑ์ในการประเมินระดับความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนเมลามีนนี้กำหนดขึ้นเพื่อให้สอดคล้องกับผลของการทดสอบความไวของชุดทดสอบ และเกณฑ์มาตรฐานที่กฎหมายอนุญาตให้มีสารเมลามีนในอาหาร ดังนี้

ตารางที่ 3.3 เกณฑ์ในการประเมินระดับความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนเมลามีน

ระดับความเสี่ยง	ความเสี่ยง	ผลการตรวจ	ความหมาย
1	ความเสี่ยงต่ำ	สารละลายที่ทำปฏิกิริยากับชุดทดสอบก่อนการเจือจางแล้วมีสีเหลือง	อาจมีการปนเปื้อนสารเมลามีน ตั้งแต่ 0-6 ppm
2	ความเสี่ยงปานกลาง	สารละลายที่ทำปฏิกิริยากับชุดทดสอบก่อนการเจือจางแล้วมีสีทึบแต่หลังการเจือจางแล้วมีสีเหลือง	อาจมีการปนเปื้อนสารเมลามีน ในช่วง 9-60 ppm
3	ความเสี่ยงมาก	สารละลายที่ทำปฏิกิริยากับชุดทดสอบก่อนการเจือจางแล้วมีสีทึบแต่หลังการเจือจางแล้วมีสีส้ม	อาจมีการปนเปื้อนสารเมลามีน ในช่วง 70-80 ppm
4	ความเสี่ยงสูง	สารละลายที่ทำปฏิกิริยากับชุดทดสอบแล้วมีสีทึบแต่ทั้งก่อนและหลังการเจือจาง	อาจมีการปนเปื้อนเกินสารเมลามีนเกินพิกัด (มากกว่า 90 ppm ขึ้นไป)

หมายเหตุ : จากทุกตัวอย่างที่มีการตรวจ 3 ซ้ำ ถ้ามีเพียง 1 ซ้ำ หรือ 2 ซ้ำ ที่แสดงค่าระดับความเสี่ยงอยู่ในระดับความเสี่ยงที่มีตัวเลขมาก ให้ถือว่าตัวอย่างนั้นมีระดับความเสี่ยงตามตัวเลขมากนั้น

ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้นำมาวิเคราะห์ข้อมูลในแต่ละกลุ่มโรงเรียนเพื่อหาระดับความเสี่ยง คิดเป็นร้อยละเพื่อเปรียบเทียบกัน

การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้

ผู้ศึกษาวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ค่าสถิติ คือ ค่าร้อยละ

สถานที่ดำเนินการศึกษา

สถานที่ดำเนินการตรวจคัดกรองสารเมลามีนคือ สาขาโภชนศาสตร์ศึกษา และห้องปฏิบัติการ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่