

Detection of Formalin in Crisp Squid Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

การตรวจหาฟอर्मาลีนในหมึกกรอบโดยใช้ Fourier Transform Infrared สเปกโตรสโกปี (FTIR)

Received	18 May 21
Reviewed	2 Aug 21
Revised	30 Aug 21
Accepted	31 Aug 21

Sasithorn Saikaew

ศศิธร สายแก้ว

Science and Applied Sciences Center Faculty of Science and Technology, Muban Chom Bueng Rajabhat University, Ratchaburi

ศูนย์วิทยาศาสตร์และวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏหมู่บ้านจอมบึง จังหวัดราชบุรี

*Corresponding Author, Tel. +6697-246-7015, E-mail: suntoby19@hotmail.com

*ผู้รับผิดชอบประสานงาน โทรศัพท์. 097-246-7015. อีเมล: suntoby19@hotmail.com

Abstract

The Fourier Transform Infrared (FTIR) technique has been applied to detect formalin in the crispy ink. The objective of this study is to find new analytical techniques that are friendly with environment, avoid using chemicals. FTIR is the simple fast way and accurate which is convenient for the detection of formalin in food. The crispy squid was bought from the local retailers. A preliminary detection of formalin was performed using a formalin test kit from the Department of Medical Sciences Ministry of Public Health and taken to detect formalin by an infrared spectrometer. The results showed that the infrared spectrum of the crispy squid (no formalin) was found the composition of NH and OH stretching at wavenumber 3308 cm^{-1} , and the amide I peak at 1635 cm^{-1} . By comparing the spectrum of formalin pure with spectrum of the crispy squid contaminated with formalin. It was shown that the formalin peak was deference in the crispy squid contaminated with formalin especially at the wavenumber 1520 cm^{-1} indicating the absorption of amide II, it was demonstrated formalin destroying structure of proteins in crispy squid. Therefore, from the all above, spectra in ranges of 2970-2920 cm^{-1} , 1570-1520 cm^{-1} , 1460-1240 cm^{-1} and 1110-1020 cm^{-1} can be used for identifying formalin in the crispy squid. This study indicated that FTIR was a technique that requires only a minimal sample size avoids the use of chemicals. The process of preparing samples for analysis is not complicated and rapid for the detection of formalin in crispy squid.

Keywords: Formalin, Crisp Squid, FTIR Spectroscopy

บทคัดย่อ

เทคนิค FTIR ได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจหาฟอर्मาลีนในหมึกกรอบ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อหาเทคนิคการวิเคราะห์ใหม่ ๆ ที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม หลีกเลี่ยงการใช้สารเคมี เป็นวิธีที่เรียบง่าย รวดเร็วแม่นยำ และสะดวกสำหรับการตรวจหาสารฟอर्मาลีนในอาหารโดยใช้ FTIR สเปกโตรสโกปี ซึ่งทำการสุ่มเก็บตัวอย่างหมึกกรอบจากผู้ค้าปลีกในพื้นที่ทำการตรวจหาฟอर्मาลีนในหมึกกรอบเบื้องต้นโดยใช้ชุดทดสอบฟอर्मาลีนของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข และนำไปตรวจหาฟอर्मาลีนโดยเครื่องอินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ จากผลการตรวจสอบอินฟราเรดสเปกตรัม

ของหมึกกรอบที่ไม่พบฟอร์มาลีนปนเปื้อน แสดงองค์ประกอบของ N-H stretching, O-H stretching ที่เลขคลื่น 3308 cm^{-1} และพบพีคที่เลขคลื่น 1635 cm^{-1} ซึ่งแสดงถึงการดูดกลืนของ เอไมด์ I จากการเปรียบเทียบกับอินฟราเรดสเปกตรัมของฟอร์มาลีนบริสุทธิ์ และอินฟราเรดสเปกตรัมของหมึกกรอบที่ปนเปื้อนฟอร์มาลีน แสดงให้เห็นว่าฟอร์มาลีนเมื่อพบในหมึกกรอบพีคจะเกิดการเปลี่ยนแปลง โดยเฉพาะที่เลขคลื่น 1520 cm^{-1} ซึ่งจะโผล่ขึ้นมาอันแสดงถึงการดูดกลืนของ เอไมด์ II ทั้งนี้เนื่องจากฟอร์มาลีนทำให้โครงสร้างโปรตีนถูกเปลี่ยนรูปไป ดังนั้นอินฟราเรดสเปกตรัมที่เลขคลื่นระหว่าง $2970\text{--}2920$, $1570\text{--}1520$, $1460\text{--}1240$ และ $1110\text{--}1020\text{ cm}^{-1}$ สามารถใช้สำหรับระบุฟอร์มาลีนที่อยู่ในหมึกกรอบได้ จากผลการศึกษาบ่งชี้ได้ว่าเทคนิค FTIR เป็นเทคนิคที่ใช้ตัวอย่างเพียงเล็กน้อยในการวิเคราะห์ ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ไม่มีความยุ่งยากซับซ้อน เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และเป็นเทคนิคการวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพ สะดวกและรวดเร็วสำหรับการตรวจหาฟอร์มาลดีไฮด์ในหมึกกรอบ

คำสำคัญ: ฟอร์มาลีน หมึกกรอบ FTIR สเปกโทรสโกปี

1. บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ฟอร์มาลดีไฮด์เป็นสารในกลุ่มอัลดีไฮด์ซึ่งโดยปกติจะอยู่ในรูปก๊าซเนื่องจากเป็นสารรีดิคัลที่รุนแรงจึงเตรียมให้อยู่ในรูปของสารละลายฟอร์มาลีน สารนี้ได้ถูกนำไปใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางทั้งด้านการแพทย์ ด้านอุตสาหกรรม ด้านความงาม ด้านการเกษตร และด้านอื่น ๆ [4] แต่ปัจจุบันได้มีการลักลอบใช้สารฟอร์มาลีนในอาหารเพื่อรักษาสภาพอาหารให้คงสภาพ ไม่บูดเน่า แม้ว่าตามพระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ.2522 จะกำหนดให้ฟอร์มาลีนเป็นวัตถุห้ามใช้ในอาหาร เช่น การใช้ฟอร์มาลีนในอาหารทะเลจำพวก กุ้งสด หมึกสด หมึกกรอบ ปลาทะเล หรือผักสดจำพวก เห็ดฟาง ถั่วงอก ถั่วงอก ชิงชอย คื่นช่าย ผักกาดขาว เป็นต้น ซึ่งการได้รับสารฟอร์มาลีนเข้าสู่ร่างกายพบว่ามีสารนี้ทำให้เกิดผลต่ออวัยวะในระบบต่าง ๆ หลายระบบโดยเฉพาะระบบทางเดินหายใจ เช่น แสบจมูก เจ็บคอ ไอ หายใจไม่ออก ปวดอกเสบ ระบบผิวหนัง เช่น ทำให้เกิดผื่นคัน ผื่นหนังไหม้เปลี่ยนเป็นสีขาวหากสัมผัสฟอร์มาลีนโดยตรง [2] และระบบทางเดินอาหาร ซึ่งเมื่อกินอาหารที่ปนเปื้อนฟอร์มาลีน ในปริมาณมากจะมีอาการปวดหัวรุนแรง หัวใจเต้นเร็ว ปวดท้อง ถ่ายท้อง คลื่นไส้ อาเจียน ปัสสาวะไม่ออก มีอาการเพลีย เหนื่อยออก ตัวเย็น คอแข็ง [3] เป็นต้น ปัจจุบันมีการตรวจวัดปริมาณสารฟอร์มาลดีไฮด์อยู่หลายวิธี เช่นการใช้ชุดน้ำยาทดสอบ วิสเปคโตรเมตรี วิธีการตกตะกอน วิธีโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) วิธีฟลูออโรเมตรี หรือวิธีไบโอเซนเซอร์ [6] เพื่อตรวจคัดกรองและการตรวจปริมาณสารในตัวอย่างซึ่งมีประโยชน์ในการป้องกันการใช้สารนี้เข้าสู่ร่างกายได้ แต่อย่างไรก็ตาม

การใช้ชุดทดสอบยังไม่ละเอียดเพียงพอที่จะบอกปริมาณที่ชัดเจนได้เหมือนวิธีการอื่น ๆ เช่น การใช้สเปกโตรเมตรีในการหาปริมาณสารฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหารทะเล หรือการใช้วิธีสเปคโตรเมตรี วิธีการตกตะกอน หรือวิธีโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ต้องใช้เวลานานในการเตรียมตัวอย่าง และประกอบด้วยหลายขั้นตอนซึ่งอาจส่งผลให้เกิดการสูญหายของสารฟอร์มาลีนได้ [7] ปัจจุบันเทคนิค FTIR ได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในงานวิจัยด้านต่าง ๆ อย่างแพร่หลาย [5] เช่น 1) ด้านเกษตรกรรม ได้แก่ การประเมินคุณภาพข้าวเจ้าไทย การประเมินค่าทางเคมีของอาหารกุ้ง การตรวจสอบความชื้นของถั่วเหลือง การตรวจสอบองค์ประกอบของ น้ำมันวูดบี 2) งานนิติวิทยาศาสตร์ทางการแพทย์มีการนำเทคนิค FTIR ไปประยุกต์ใช้เพื่อศึกษาถุงพลาสติกที่ใช้บรรจุยาเสพติด การตรวจหาคราบอสุจิบนกระเบื้องและ ผ้าชนิดต่าง ๆ หรือการตรวจหาอายุคราบโลหิตเพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการประมาณอายุของคราบโลหิตที่เกิดเหตุได้ และ 3) การตรวจด้านอาหาร เช่น การตรวจสอบไข่และหนอนของแมลงวันผลไม้ในเปลือกและเนื้อมะม่วงสด การตรวจสอบคุณภาพของน้ำปลา การวิเคราะห์คุณภาพนมผง ซึ่งการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FTIR สามารถทำการวิเคราะห์ตัวอย่างที่เป็นของแข็ง ของเหลว และก๊าซได้ และเป็นเทคนิคที่ใช้ตัวอย่างเพียงเล็กน้อยในการวิเคราะห์ ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ไม่มีความยุ่งยากซับซ้อน ไม่ทำลายโครงสร้างของสาร (Non-destructive) อีกทั้งยังใช้เวลาในการวิเคราะห์อย่างรวดเร็วและแม่นยำ ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษานี้จึงได้นำเอาเทคนิค FTIR มาประยุกต์ใช้ในการตรวจหาฟอร์มาลีน ในหมึกกรอบเพื่อหาเทคนิคการ

วิเคราะห์ใหม่ ๆ ที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม หลักเลี่ยงการใช้สารเคมี เป็นวิธีที่เรียบง่าย รวดเร็วแม่นยำ และสะดวกสำหรับการตรวจสอบสารฟอร์มาลินในอาหารโดยใช้ FTIR สเปกโทรสโกปี

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาการตรวจสอบสารฟอร์มาลินในหมึกกรอบด้วยเทคนิค FTIR

1.3 สมมติฐานของการวิจัย

เทคนิค FTIR สเปกโทรสโกปี สามารถตรวจพบฟอร์มาลินในหมึกกรอบได้อย่างรวดเร็วและประกอบด้วยขั้นตอนการวิเคราะห์ที่ไม่ยุ่งยาก

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ แบ่งกระบวนการทดลองทั้งหมดออกเป็น 3 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนที่ 1 การตรวจคัดกรองสารฟอร์มาลินในหมึกกรอบเบื้องต้นด้วยชุดทดสอบฟอร์มาลินของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข โดยตัวอย่างหมึกกรอบที่ใช้เป็นหมึกกรอบที่สุ่มซื้อจากร้านค้าปลีกภายในตลาดสด ขั้นตอนที่ 2 การตรวจสอบสารฟอร์มาลินในหมึกกรอบด้วยเทคนิคฟูรีเออร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี เพื่อวิเคราะห์โครงสร้างของฟอร์มาลินเมื่ออยู่ในหมึกกรอบโดยเปรียบเทียบกับฟอร์มาลินบริสุทธิ์ และขั้นตอนที่ 3 การวิเคราะห์ข้อมูลอินฟราเรดสเปกตรัมจากเครื่อง FTIR สเปกโทรสโกปี

1.5 นิยามศัพท์เฉพาะ

ฟอร์มาลิน (Formalin) เป็นสารเคมีที่ใช้ทำความสะอาดฆ่าเชื้อในโรงพยาบาล ใช้ในอุตสาหกรรมกระดาษ อุตสาหกรรมสิ่งทอหรือการผลิตสี รวมถึงการใช้สำหรับรักษาสภาพร่างกายของสัตว์หรือศพไม่ให้เปื่อยเน่า ฟอร์มาลินที่ใช้กันทั่วไปเป็นสารที่เตรียมได้จากการนำฟอร์มาลดีไฮด์ (Formaldehyde) มาผสมกับน้ำที่ความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์ประมาณ 37-50% โดยน้ำหนัก และมักมีส่วนผสมของเมทานอลประมาณ 10-15%. ฟอร์มาลดีไฮด์ เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีในธรรมชาติมีสูตรเคมี CH_2O หรือ $\text{H}-\text{CHO}$ สถานะเป็นก๊าซที่มีความดัน

ปกติ ไม่มีสี มีกลิ่นฉุน เป็นสารละลายที่ไม่เสถียร ละลายในน้ำ แอซีโตน [6]

FTIR สเปกโทรสโกปี เทคนิค หมายถึง เทคนิคหนึ่งที่สำคัญและนิยมใช้ในการวิเคราะห์ตรวจสอบ พิสูจน์ และศึกษาเกี่ยวกับโครงสร้างของสาร โดยอาศัยหลักการของคุณสมบัติการเกิดอันตรกิริยา (Interaction) ของสารกับพลังงานจากการแผ่รังสีอินฟราเรดซึ่งเป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าหรือเรียกว่ารังสีอินฟราเรด โดยสารโมเลกุลหนึ่งที่แตกต่างกันจะสามารถดูดกลืนรังสีอินฟราเรดในช่วงคลื่นแตกต่างกันและให้สเปกตรัมแตกต่างกันได้ และโดยทั่วไปแล้วจะไม่พบว่าสารคู่ใดที่มีสเปกตรัมเหมือนกันเกือบทุกประการ ยกเว้นกรณีที่เป็นคู่อิโซเมอร์ [1]

IR สเปกตรัม หรือ แถบดูดกลืนรังสี IR หมายถึง การแสดงผลการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของโมเลกุล ซึ่งเมื่อปรากฏบนกระดาษสเปกตรัมจะมีลักษณะเป็นพีก (Peak) หรือ แถบ (Band) ซึ่งเกิดจากการพล็อตระหว่างปริมาณรังสีที่ส่องผ่าน (Transmittance) หรือปริมาณรังสีที่ถูกดูดกลืนแสง (Absorbance) กับความยาวคลื่น (Wavelength) โดยปลายพีกมีลักษณะชี้ลง ในบางช่วงของสเปกตรัมจะมีค่า Transmittance (T) เกือบ 100 % แสดงว่าที่ความถี่นั้น ๆ สารตัวอย่างเกือบจะโปร่งใสต่อรังสีช่วงความถี่นั้น คือไม่มีการดูดกลืนรังสีในช่วงนั้น ดังนั้นจุดต่ำสุดของสเปกตรัม คือจุดที่สารดูดกลืนรังสีมากที่สุด

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถใช้เทคนิค FTIR สเปกโทรสโกปี เพื่อตรวจสอบสารฟอร์มาลินในหมึกกรอบ ซึ่งข้อมูลนี้อาจนำไปใช้เป็นข้อมูลในการช่วยตรวจสอบสารฟอร์มาลินในอาหารชนิดอื่น ๆ ได้

2.วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย

กล่าวถึงรายละเอียดการศึกษา การวิเคราะห์และทดลอง ที่กระชับและชัดเจน

2.1 การตรวจคัดกรองฟอร์มาลินในหมึกกรอบด้วยชุดทดสอบฟอร์มาลินของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ดังนี้

2.1.1 นำหมึกกรอบที่สุ่มซื้อจากตลาดมาแช่น้ำกลั่น จำนวน 200 มิลลิลิตร เทน้ำแช่หมึกกรอบลงในขวดสารทดสอบที่ 1 ให้ได้ความสูงของของเหลว 1 ใน 3 ของขวด ปิดฝาขวดเขย่าจนสารทดสอบในขวดละลายหมด

2.1.2 ถ่ายของเหลวจากขวดสารทดสอบที่ 1 ลงขวดสารทดสอบ 2 ปิดฝาขวดและเขย่าเล็กน้อย

2.1.3 ถ่ายของเหลวจากขวดสารทดสอบที่ 2 ลงขวดสารทดสอบ 3 แล้วรีบปิดฝาขวด แก้วเบา ๆ ให้ของเหลวเข้ากัน สังเกตสีที่เกิดขึ้น แล้วบันทึกผลการตรวจหาฟอร์มาลีนในน้ำแช่หมึกกรอบ

2.1.4 การแปลผล

- ถ้ามีสีเกิดขึ้นตั้งแต่ “สีชมพูจนถึงสีแดง” แสดงว่าตัวอย่างนั้นมีฟอร์มาลีนผสมอยู่
- ถ้าสารละลาย “ไม่เปลี่ยนสี” แสดงว่าไม่มีฟอร์มาลีนผสมอยู่

2.2 การตรวจหาฟอร์มาลีนในหมึกกรอบด้วยเทคนิคฟูรีเออทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี

2.2.1 การเตรียมสารฟอร์มาลีนมาตรฐานที่มีความเข้มข้นต่างๆ

เตรียมสารมาตรฐานที่มีความเข้มข้นของสารฟอร์มาลีน เกรดวิเคราะห์ซึ่งมีปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ 40 % โดยน้ำหนัก ซื้อมาจากบริษัท Sigm (St. Louis, MO) โดยเตรียมเป็นสารละลายเบื้องต้นคิดเป็นฟอร์มาลีน 100% กำหนดช่วงของฟอร์มาลีน 7 ระดับความเข้มข้น คือ 0, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 เปอร์เซ็นต์ (หรือเท่ากับความเข้มข้นของฟอร์มาลีน 0, 2, 4, 8, 12, weight/volume)

2.2.1 เตรียมหมึกกรอบที่มีความเข้มข้นต่างๆ

นำหมึกกรอบที่ตรวจไม่พบสารฟอร์มาลีนโดยชุดทดสอบฟอร์มาลีนของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยชั่งตัวอย่างหมึกกรอบบริเวณส่วนลำตัว 5 กรัม แล้วนำมาแช่ในสารฟอร์มาลีนที่มีความเข้มข้น 0 – 30 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 100 มิลลิลิตร โดยทิ้งไว้ข้ามคืน หลังจากนั้นนำไปผึ่งให้แห้งและทำการวัดหาฟอร์มาลีนด้วยเครื่อง FTIR บันทึกผล

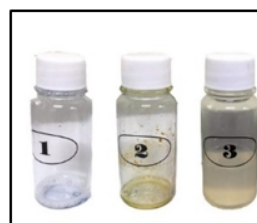
2.2.3 วิเคราะห์ฟอร์มาลีนในหมึกกรอบด้วยเทคนิคฟูรีเออทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี

นำหมึกกรอบที่ตรวจพบฟอร์มาลีนเจือปน หมึกกรอบที่ไม่พบฟอร์มาลีน และสารฟอร์มาลีนบริสุทธิ์ มาวัดโดยใช้เครื่อง FTIR สเปกโทรสโกปี รุ่น IRprestige-21 ช่วงคลื่น $400-4000\text{ cm}^{-1}$ จำนวนครั้งที่สแกน 32 ครั้ง และมี Resolution เท่ากับ 2 cm^{-1} โดยวางตัวอย่างเพียงเล็กน้อยลงบน ART-miracle ของเครื่อง FTIR สเปกโทรสโกปี บันทึกอินฟราเรดสเปกตรัมบนเครื่อง

3.ผลการทดลอง/ผลการวิจัย

3.1 การตรวจคัดกรองฟอร์มาลีนในหมึกกรอบด้วยชุดทดสอบฟอร์มาลีน

เมื่อนำหมึกกรอบมาทดสอบหาฟอร์มาลีนด้วยชุดทดสอบของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ซึ่งมีความไวของชุดทดสอบที่ 0.5 ppm. เพื่อคัดกรองตัวอย่างหมึกกรอบที่ไม่ปนเปื้อนฟอร์มาลีนและหมึกกรอบ ที่ปนเปื้อนฟอร์มาลีนพบว่าหมึกกรอบที่ขายในตลาดสดพบทั้งแบบที่มีฟอร์มาลีนปนเปื้อนและไม่มีฟอร์มาลีนปนเปื้อน โดยหมึกกรอบที่ไม่มีฟอร์มาลีนปนเปื้อน ซึ่งเมื่อทดสอบด้วยชุดทดสอบโดยเทน้ำแช่หมึกกรอบที่สงสัยว่าปนเปื้อนด้วยฟอร์มาลีนลงในขวดทดลองที่ 1 ขวดที่ 2 และขวดที่ 3 สารละลายในขวดที่ 3 ไม่เปลี่ยนสี ซึ่งแสดงว่าหมึกกรอบนั้นไม่มีฟอร์มาลีนปนเปื้อน (รูปที่ 1a) แต่เมื่อนำหมึกกรอบ มาทำการทดสอบหาฟอร์มาลีนโดยเทน้ำแช่หมึกกรอบลงในขวดทดลองที่ 1 ขวดที่ 2 และขวดที่ 3 สารละลายในขวดที่ 3 เป็นเป็นสีชมพูจนถึงสีแดง แสดงว่าตัวอย่างนั้นมีฟอร์มาลีนผสมอยู่ (รูปที่ 1b)



(a)



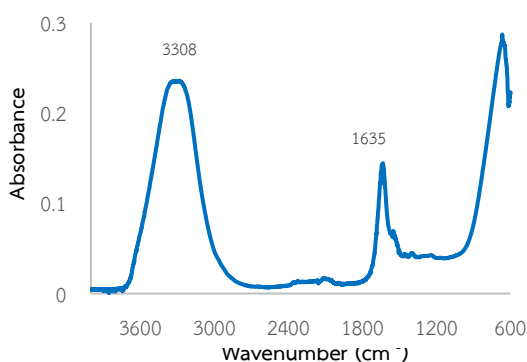
(b)

รูปที่ 1 ผลการตรวจฟอร์มาลีนของหมึกกรอบที่ไม่พบฟอร์มาลีนปนเปื้อน (a) และหมึกกรอบที่พบฟอร์มาลีนปนเปื้อน (b)

3.2 การตรวจหาฟอร์มาลีนในหมึกกรอบด้วยเทคนิคฟูรีเออทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี

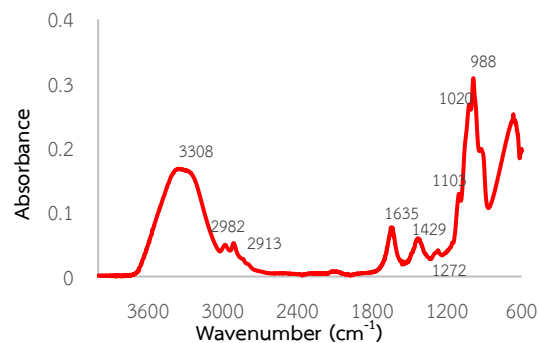
นำหมึกกรอบที่ตรวจสอบเบื้องต้นด้วยชุดทดสอบของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์มาทำการตรวจหาฟอร์มาลีนด้วยเทคนิคฟูรีเออทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี โดยแบ่งเป็นหมึกกรอบที่ตรวจไม่พบฟอร์มาลีน หมึกกรอบที่ตรวจพบฟอร์มาลีน และทำการวิเคราะห์ฟอร์มาลีนบริสุทธิ์ อินฟราเรดสเปกตรัมของหมึกกรอบที่ไม่ปนเปื้อนด้วยฟอร์มาลีน (รูปที่ 2) แสดงองค์ประกอบของ N-H stretching ที่เลขคลื่น 3308 cm^{-1} ซึ่งพีคที่เกิดขึ้นมี

ลักษณะกว้าง เนื่องจากเกิดการซ้อนทับกันกับพีคของ O-H stretching ซึ่งพบในช่วงนี้ [9] และพบพีค Amide I ที่เลขคลื่น 1635 cm^{-1} ซึ่งแสดงถึงการดุดกลืน B-sheet และ random coil ใน เอไมด์ I ของโครงสร้างโปรตีน [10] ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Phanat et al., 2015 พบการดุดกลืนแสงของเอไมด์ A ที่เลขคลื่น 3296 cm^{-1} และ เอไมด์ I ที่เลขคลื่น 1643 cm^{-1} ของโครงสร้างคอลลาเจนในผิวหนังของหมึกกล้วย



รูปที่ 2 อินฟราเรดสเปกตรัมของหมึกกรอบที่ไม่ปนเปื้อนด้วยฟอร์มาลีน

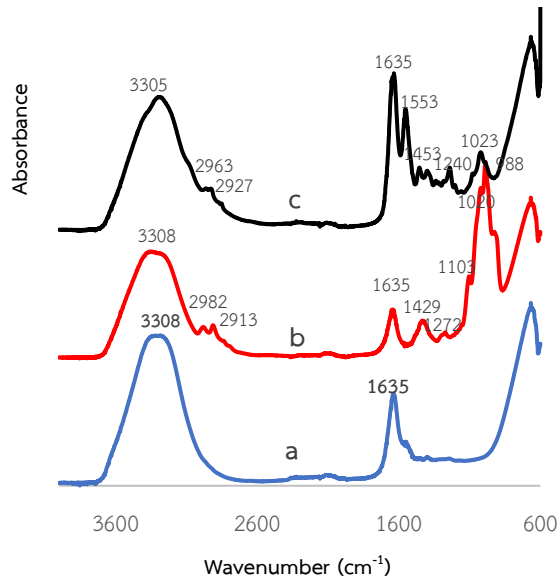
จากรูปที่ 3 อินฟราเรดสเปกตรัมของฟอร์มาลีนบิสซูทรีแสดงแถบการดูดกลืนแสงที่เลขคลื่น 3308 cm^{-1} , 2982 cm^{-1} และ 2913 cm^{-1} ซึ่งแสดงถึงการยืดของพันธะ -CH และพีคที่เลขคลื่น 1635 cm^{-1} สำหรับหมู่ฟังก์ชัน -C=O ของหมู่แอลดีไฮด์ และแถบการดูดกลืนที่เลขคลื่น 1429 cm^{-1} , 1272 cm^{-1} , สำหรับ C-O และ C-O ของฟีนอลิก OH และ 1103 cm^{-1} สำหรับพันธะ -CH ซึ่งอาจอยู่ในแนวระนาบและอาจเป็นการยืดแบบสมมาตรและที่เลขคลื่น 1020 cm^{-1} และ 989 cm^{-1} สำหรับการยืดแบบสมมาตรของ =C-O-C [7]



รูปที่ 3 อินฟราเรดสเปกตรัมของฟอร์มาลีนบิสซูทรี

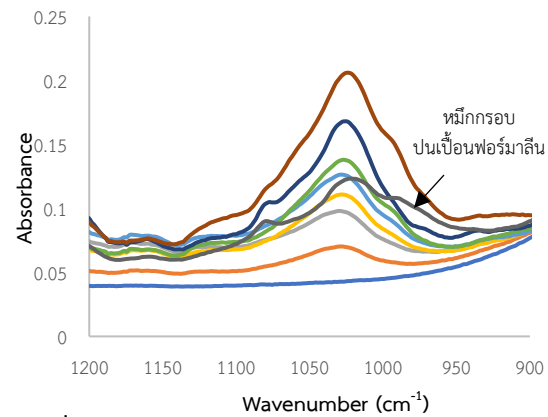
จากการเปรียบเทียบอินฟราเรดสเปกตรัมของหมึกกรอบที่ไม่ปนเปื้อนฟอร์มาลีนกับหมึกกรอบที่ปนเปื้อนด้วยฟอร์มาลีน (รูปที่ 4a และรูปที่ 4c) พบการดูดกลืนที่แตกต่างกัน เช่น การดูดกลืนแสงที่เลขคลื่น 2963 cm^{-1} , 2927 cm^{-1} , 1553 cm^{-1} , 1453 cm^{-1} , 1240 cm^{-1} และ 1023 cm^{-1} ซึ่งพบเฉพาะในหมึกกรอบที่ปนเปื้อนฟอร์มาลีน จากการเปรียบเทียบอินฟราเรดสเปกตรัมของฟอร์มาลีน บิสซูทรี และอินฟราเรดสเปกตรัมของหมึกกรอบที่ปนเปื้อนด้วยฟอร์มาลีน พบว่าอินฟราเรดสเปกตรัมของฟอร์มาลีนบิสซูทรีและอินฟราเรดสเปกตรัมของหมึกกรอบที่ปนเปื้อนด้วยฟอร์มาลีนมีบางพีคที่ซ้อนทับกัน และก็มีบางพีคที่แตกต่างกันและไม่พบในอินฟราเรดสเปกตรัมของหมึกกรอบที่ไม่ปนเปื้อนด้วยฟอร์มาลีน (รูปที่ 4) เช่น สังเกตเห็นว่าหมึกกรอบที่ปนเปื้อนด้วยฟอร์มาลีนจะพบพีคที่เลขคลื่น 1553 cm^{-1} ซึ่งแสดงถึงการดูดกลืนของ เอไมด์ II (การสั่นแบบงอของพันธะ N-H) [9] และพบการดูดกลืนของ เอไมด์ III ที่เลขคลื่น 1240 cm^{-1} แสดงถึงพันธะ C-N และ N-H deformation (Avtar Singh & Soottawat Benjakul, 2019) ซึ่งโดยปกติ เอไมด์ I, เอไมด์ II และ เอไมด์ III ของ peptide linkage จะพบที่ตำแหน่ง $1600\text{--}1690\text{ cm}^{-1}$, $1480\text{--}1575\text{ cm}^{-1}$ และ $1229\text{--}1301\text{ cm}^{-1}$ ตามลำดับ (Phanat et al., 2015) อย่างไรก็ตามการเกิดพีค ณ ตำแหน่งเลขคลื่น 1553 cm^{-1} และ 1240 cm^{-1} ภายในโครงสร้างของหมึกกรอบที่พบฟอร์มาลีนอาจเนื่องมาจากฟอร์มาลีนทำให้โครงสร้างโปรตีนภายในหมึกกรอบเปลี่ยนรูปไป [13] ซึ่งสอดคล้องกับการดูดกลืนแสงที่ลดลง ณ ตำแหน่ง 1635 cm^{-1} ดังนั้นอินฟราเรดสเปกตรัมที่เลขคลื่นระหว่าง $2970\text{--}2920\text{ cm}^{-1}$, $1570\text{--}1520\text{ cm}^{-1}$,

1460-1240 cm^{-1} และ 1110-1020 cm^{-1} สามารถใช้
สำหรับระบุฟอร์มามีนที่อยู่ในหมึกกรอบได้ [10]



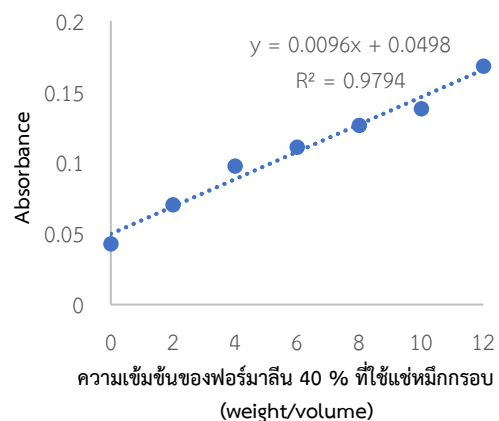
รูปที่ 4 เปรียบเทียบอินฟราเรดสเปกตรัมของหมึกกรอบที่ไม่ปนเปื้อนฟอร์มาลีน (a) อินฟราเรดสเปกตรัมของฟอร์มาลีนบริสุทธิ์ (b) และ อินฟราเรดสเปกตรัมของหมึกกรอบปนเปื้อนด้วยฟอร์มาลีน (c)

อย่างไรก็ตามหมีกรอบหลังจากแช่สารฟอร์มาลินที่ความเข้มข้น 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 เปอร์เซ็นต์หรือความเข้มข้นของฟอร์มาลิน 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 % weight/volume โดยแช่ที่ไว้ข้ามคืนพบการดูดกลืนแสงที่ตำแหน่งต่าง ๆ เช่นเดียวกับหมีกรอบที่ปนเปื้อนด้วยฟอร์มาลิน โดยเมื่อนำมาสร้างกราฟ พบการดูดกลืนแสง ณ ตำแหน่งเลขคลื่นอื่น ๆ มีความแปรปรวน ซึ่งพบเฉพาะการดูดกลืนแสงที่เลขคลื่น 1027 cm^{-1} ($=\text{C-O-C}$) เท่านั้นที่เห็นเด่นชัดว่ามีส่วนเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของฟอร์มาลินเพิ่มขึ้น (รูปที่ 5)



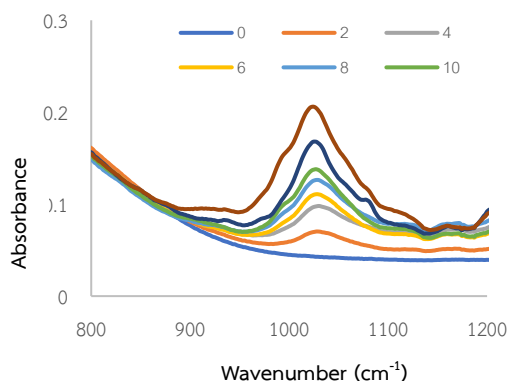
รูปที่ 5 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของหมึกกรอบหลังแช่ฟอร์มาลิน 0, 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 เปอร์เซ็นต์ ณ w/v ที่เลขคลื่นช่วง $800 - 1200\text{ cm}^{-1}$

เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสง ณ ตำแหน่งเลขคลื่น 1027 cm^{-1} มาสร้างกราฟ (รูปที่ 6) พบว่าได้กราฟที่มีความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของสารฟอร์มาลิน และค่าการดูดกลืนแสงสูงแบบแปรผันตรงกัน ($R=0.9794$) และได้สมการเส้นตรงคือ $Y=0.0039X + 0.0498$ โดยที่ Y คือค่าการดูดแสง และ X คือความเข้มข้นของสาร โดยมี การทดสอบสมการแบบ full cross validation และดูค่า Root mean square error of cross validation (RMSECV) ได้ค่าที่ยอมรับได้ ซึ่ง RMSECV มีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 0.00409514 ซึ่งหมายความว่าโดยเฉลี่ยทำนายค่า Y โดยใช้สมการนี้มีค่าผิดไปเพียง ± 0.00409514



รูปที่ 6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของพอร์มาลินที่แช่หมักกรอบที่ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 เปอร์เซ็นต์ w/v

ดังนั้นเมื่อลองคำนวณหาปริมาณฟอร์มาลีนในหมึกกรอบที่ปนเปื้อนด้วยฟอร์มาลีนจากตลาดสดในพื้นที่ซึ่งวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ตำแหน่งเลขคลื่น 1023 cm^{-1} ได้ 0.123188 ซึ่งอยู่ในช่วงของสมการ (รูปที่ 7) เมื่อนำไปแทนค่าในสมการที่ได้จากรูปที่ 6 จะได้ค่าความเข้มข้นของฟอร์มาลีน เท่ากับ 18.817 เปอร์เซ็นต์ (7.64 %w/v)



รูปที่ 7 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของหมึกกรอบหลังแช่ฟอร์มาลีน 0, 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 เปอร์เซ็นต์ w/v และหมึกกรอบที่พบฟอร์มาลีนปนเปื้อนที่ซื้อมาจากตลาด

4.อภิปรายผลและสรุปผลการศึกษา

4.1. สรุปผล

เทคนิค FTIR สเปกโทรสโกปีเป็นเทคนิคที่มีความสำคัญในงานด้านต่าง ๆ เนื่องจากเทคนิคอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี เป็นเทคนิคที่ให้ข้อมูลเชิงโครงสร้างทางองค์ประกอบของสารจึงสามารถจำแนกความแตกต่างของสารได้โดยอาศัยความแตกต่างของการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดของสารที่เป็นองค์ประกอบภายใน จากตัวอย่างงานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้น แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของเทคนิค FTIR สเปกโทรสโกปี ในการประยุกต์ใช้กับงานด้านความปลอดภัยในอาหาร เพื่อให้ผู้บริโภคได้ทราบถึงการปนเปื้อน และหลีกเลี่ยงการรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนฟอร์มาลีน โดยการศึกษาการปนเปื้อนของฟอร์มาลีนในหมึกกรอบสามารถทำได้ถูกต้อง และรวดเร็ว ใช้ตัวอย่างเพียงเล็กน้อยในการวิเคราะห์ ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ไม่มีความยุ่งยากซับซ้อน ไม่ทำลายโครงสร้างของสาร และสามารถศึกษาองค์ประกอบของสารฟอร์มาลีนที่อยู่ในหมึกกรอบได้โดยตรง ไม่ต้องใช้สารเคมีและน้ำยาเพื่อทดสอบ ยิ่งไปกว่า

นั้นข้อมูลอินฟราเรดสเปกตรัมที่ได้สามารถนำมาสร้างเป็นฐานข้อมูลที่เปรียบเสมือนอัตลักษณ์ (finger print) ของฟอร์มาลีนเมื่ออยู่ในหมึกกรอบเพื่อเป็นประโยชน์ต่อการตรวจหาสิ่งปนเปื้อนในอาหารได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

4.2. ข้อเสนอแนะ

อย่างไรก็ตามสำหรับการศึกษาวิจัยครั้งต่อไปควรวัดฟอร์มาลีนในหมึกกรอบในเชิงปริมาณด้วยเครื่อง HPLC หรือเครื่องยูวีสเปกโตรโฟโตมิเตอร์เพื่อหาปริมาณเทียบ เพื่อยืนยันผลเนื่องจากเทคนิค FTIR สเปกโทรสโกปีไม่สามารถยืนยันความถูกต้องของโครงสร้างของสารเคมีได้ และสำหรับการศึกษารั้งนี้สมการมาตรฐานที่ใช้ในการทำนายปริมาณฟอร์มาลีนในหมึกกรอบที่ต้องการทราบเป็นเพียงแบบ Simple Linear Regression (SLR) ซึ่งเป็นการเลือกพิจารณาความสัมพันธ์เชิงปริมาณของตัวอย่างเพียงความยาวคลื่นเดียว (Single Wavelength) สำหรับการศึกษารั้งต่อไปควรสร้างสมการแบบ Full Spectrum Method ด้วยซึ่งเป็นการเลือกช่วงความยาวคลื่นที่เหมาะสมจากความยาวคลื่นทั้งหมดในสเปกตรัมมาสร้างแบบโดยทำการลดจำนวนตัวแปรอิสระ และสร้างเป็นตัวแปรใหม่ขึ้นมา เช่น วิธี Partial Least Square Regression (PLSR) และวิธี Principle Component Regression (PCR) เป็นต้น

5.องค์ความรู้ใหม่ที่ได้จากงานวิจัย

สำหรับองค์ความรู้ใหม่ที่เกิดขึ้นจากการทำงานวิจัยครั้งนี้ เทคนิค FTIR Spectroscopy เป็นเทคนิคใหม่ที่น่าสนใจเพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของฟอร์มาลีนในอาหารได้ซึ่งตอบโจทย์เรื่องความรวดเร็ว นอกจากลดเวลาแล้วยังลดการใช้น้ำยาหรือสารเคมีในการตรวจวิเคราะห์ ซึ่งหากในอนาคตมีการเพิ่มขึ้นของฐานข้อมูล (Database) ของอินฟราเรดสเปกตรัมของสิ่งปนเปื้อนในอาหารมากขึ้น รวมทั้งการแปลผลที่อยู่ในรูปแบบที่เข้าใจง่าย ซึ่งน่าจะเป็นปัจจัยเสริมให้มีการประยุกต์ใช้ FTIR สเปกโทรสโกปีในวงการอาหารกว้างขึ้น

6.เอกสารอ้างอิง

[1] ธีรยุทธ์ วิไลวัลย์ และวรวรรณ พันธุมนาวัน. อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี. เอกสารประกอบการสอนภาควิชาเคมี.

- คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2548; 1-2.
- [2] นิชา ประสงค์จันทร์, ผกากรอง นามเสน. การวิเคราะห์หาปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ในน้ำทะเลบริเวณแพปลาและรอบทะเลสาบสงขลา. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย สงขลา.[อินเทอร์เน็ต]. 2554 [เข้าถึงเมื่อ 2564 กุมภาพันธ์ 2564]; 1(1). เข้าถึงได้จาก <https://www.repository.rmutsv.ac.th/handle/123456789/2051>.
- [3] อธิกร ไผ่เพชร. การตรวจสอบสารฟอร์มาลินในอาหารทะเลบริเวณพื้นที่ตลาดอำเภออุ้มอ่อง จังหวัดสุพรรณบุรี. วารสารสภาการสาธารณสุขชุมชน 2563; 2:28-29.
- [4] บังอร ฉางทรัพย์. ฟอร์มาลดีไฮด์/ฟอร์มาลิน ภัยร้ายใกล้ตัว. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี หัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ 97; 1:97. [อินเทอร์เน็ต]. 2558 [เข้าถึงเมื่อ 2564 มกราคม 23]; 1(1). เข้าถึงได้จาก <http://scijournal.hcu.ac.th/data/The%20near%20dangers.pdf>
- [5] ศิริณิตย์ ธารธาดา และปฐมพร อำนาจนันต์. เทคโนโลยี Fourier Transform Infrared Spectroscopy: ทฤษฎีและการประยุกต์ใช้. วารสารวิทยาศาสตร์สุขภาพสัตว์และเทคโนโลยี 2561; 2:32.
- [6] สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. ฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหาร. กรุงเทพมหานคร: บริษัทศูนย์การพิมพ์แก่นจันทร์ จำกัด. [อินเทอร์เน็ต]. 2561 [เข้าถึงเมื่อ 2564 มกราคม 30]; 1(1). เข้าถึงได้จาก <http://bqsf.dmsc.moph.go.th/bqsfWeb/wp-content/uploads/2017/Publish/e-book/formaldehyde.pdf>
- [7] Alkhalf Maha I และ Mirghani M.E.S (2017). Detection of formaldehyde in cheese using FTIR spectroscopy. International food research journal 2017; S496-S500.
- [8] Avtar S and Soottawat B. Effect of Partial Enzymatic Hydrolysis on Physicochemical and Foaming Properties of Ovary from Squid *Loligo formosana*. Waste and Biomass Valorization 2019; 10: 3351-3361.
- [9] Gustavo C.B., Cristian G., Aleksandra N., Kelly P.M., Oscar G., Cédric D., Oscar V., Heng Y., Gaston B. and Juan C. Utilization of Marine Waste to Obtain β -chitin Nanofibers and Films from Giant Humboldt Squid *Dosidicus gigas*. Marine drugs 2021; 19,184.
- [10] Gu, D.C., Zou, M.J., Guo, X.X., Yu, P., Lin, Z.W., Hu, T., Wu Y.F., Liu, Y., Gan, J.H., Sun. S.Q., Wang, X.C. & Xu, C.H. A rapid analytical and quantitative evaluation of formaldehyde in squid based on Tri-step IR and partial least squares (PLS). Food Chemistry 2017; 229(458-463).
- [11] Li, M., Zhu, K.X., Peng, J., Guo, X.N., Amza, T. Peng, W. & Zhou, H.M. 2014. Delineating the protein changes in Asian noodles induced by vacuum mixing. Food Chemistry (2014); 143 (9-16).
- [12] Phanat Kittiphattanabawon Sitthipong Nalinanon, Soottawat Benjakul and Hideki Kishimura. Characteristics of Pepsin-Solubilised Collagen from the Skin of Splendid Squid (*Loligo formosana* Chemistry journal (2015); (8).
- [13] Sinthusamran, S., Benjakul, S., Hemar, Y. & Kishimura, H. Characteristics and Properties of Gelatin from Seabass (*Lateolabrax japonicus*) Swim Bladder: Impact of Extraction Temperature. Waste Biomass 2018; 9:315-325.