

ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย



3.1 สารเคมี

อะคริลาไมด์ (ความบริสุทธิ์ 99%) และอะคริลาไมด์ไอโซโทป ($^{13}\text{C}_3$ -acrylamide; ความเข้มข้น 99%) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ซื้อจากบริษัท Sigma-Aldrich และ Cambridge Isotope Laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา ตามลำดับ สำหรับตัวทำละลายอินทรีย์และสารเคมีอื่นๆที่ใช้ในการสกัดและการวิเคราะห์ อะคริลาไมด์จากตัวอย่างอาหาร รวมทั้งเอนไซม์ทั้งหมดที่ใช้ในระบบย่อยอาหารจำลอง เป็นเกรดวิเคราะห์ (analytical grade) น้ำที่ใช้ตลอดการวิจัยเป็นน้ำบริสุทธิ์ที่ผ่านการกลั่นด้วยระบบ Milli-Q

อะคริลาไมด์และอะคริลาไมด์ไอโซโทป เป็นสารเคมีอันตรายต้องใช้ด้วยความระมัดระวัง สำหรับขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างอาหารสำหรับการวิเคราะห์ที่ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ต้องทำในตู้ดูดควันเท่านั้น

3.2 ตัวอย่างอาหาร

ตัวอย่างอาหารที่ใช้ในการวิเคราะห์ มีทั้งสิ้น 95 ตัวอย่าง จากอาหารทั้งสิ้น 16 ชนิด ซึ่งสุ่มซื้อจากร้านค้าในตลาดหนองมน จังหวัดชลบุรี และร้านค้ารถเข็นในบริเวณรอบตลาด ระหว่างเดือนเมษายน พ.ศ. 2553 ถึง พฤษภาคม 2554 ตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์จะทำการจัดหมวดหมู่ออกเป็น 4 กลุ่มตามวิธีการผลิต ดังนี้

กลุ่มที่ 1 อาหารที่ผ่านการทอดแบบน้ำมันท่วม จำนวน 10 ชนิด ได้แก่

- ก๋วยเตี๋ยวแห้ง ทำจากก๋วยเตี๋ยวห้ำหามที่จุ่มลงในน้ำมันใส ก่อนที่จะนำมาชุบแป้งทอดที่ประกอบด้วย แป้งข้าวเจ้า แป้งสาลี เกลือ ผงฟู น้ำตาล น้ำมันงา เนื้อมะพร้าว และงาดำ นำไปทอดในน้ำมันท่วม ที่อุณหภูมิ 160 – 180 °C เป็นเวลาประมาณ 5-6 นาที จนแป้งมีสีน้ำตาลเข้ม
- เกี๊ยวหมูทอด ประกอบด้วยแผ่นเกี๊ยวที่ห่อไส้หมูหมัก ที่ประกอบด้วยเนื้อหมูบด แป้งมัน กระเทียม น้ำตาล น้ำปลา และพริกไทย นำไปทอดในน้ำมันท่วม ที่อุณหภูมิ 160 – 180 °C เป็นเวลาประมาณ 4-5 นาที จนแผ่นเกี๊ยวมีสีเหลืองทอง
- ขนมไข่หงส์ คือ แป้งทอดที่มีไส้เป็นมันเทศบด ตัวแป้งประกอบด้วย แป้งสาลี น้ำตาล เกลือ น้ำมันงา และงาดำ นำไปทอดในน้ำมันท่วม ที่อุณหภูมิ 160 – 180 °C เป็นเวลาประมาณ 10-12 นาที

จนแป้งมีสีน้ำตาลเข้ม จากนั้นนำมาเคี่ยวต่อในน้ำเชื่อมและนำไปทอดในน้ำมันท่วม ภายใต้สภาวะเดิม อีกครั้งหนึ่ง

- ปาท่องโก๋ คือ แป้งทอด ซึ่งตัวแป้งประกอบด้วย แป้งมัน แป้งสาลี แอมโมเนีย-ไบคาร์บอเนต เบกิ้งโซดา ผงฟู น้ำตาล และเกลือ หมักแป้งให้ฟูและนำไปทอดในน้ำมันท่วม ที่อุณหภูมิ 160 – 180 °ซ เป็นเวลาประมาณ 5-6 นาที จนแป้งมีสีน้ำตาลเข้ม

- ปอเปี๊ยะทอด ประกอบด้วยแผ่นปอเปี๊ยะที่ห่อด้วยไส้หมูหมัก ที่ประกอบด้วยเนื้อหมูบด ใบมะกรูด กระเทียม ถั่วฟักยาว แครอท เห็ดหูหนู เห็ดชิตาเกะ ซีอิ๊วขาว น้ำมันหอย ซอสถั่วเหลือง และน้ำตาล นำไปทอดในน้ำมันท่วม ที่อุณหภูมิ 160 – 180 °ซ เป็นเวลาประมาณ 5-6 นาที จนแผ่นปอเปี๊ยะมีสีเหลืองทอง

- มันฉาบ ทำจากมันเทศห่าม นำไปทอดในน้ำมันท่วม ที่อุณหภูมิ 160 – 180 °ซ เป็นเวลาประมาณ 4-5 นาที จนมีสีเหลืองทอง จากนั้นนำมาเคี่ยวต่อในน้ำเชื่อม และโรยเกล็ดลงไปเล็กน้อย

- เผือกฉาบ ทำจากเผือกห่าม นำไปทอดในน้ำมันท่วม ที่อุณหภูมิ 160 – 180 °ซ เป็นเวลาประมาณ 7-8 นาที จนมีสีเหลืองทอง จากนั้นนำมาเคี่ยวต่อในน้ำเชื่อม และโรยเกล็ดลงไปเล็กน้อย

- กล้วยฉาบ ทำจากกล้วยน้ำว้าห่ามที่จุ่มลงในน้ำปูนใส นำไปทอดในน้ำมันท่วม ที่อุณหภูมิ 160 – 180 °ซ เป็นเวลาประมาณ 4-5 นาที จนมีสีเหลืองทอง จากนั้นนำมาเคี่ยวต่อในน้ำเชื่อม และโรยเกล็ดลงไปเล็กน้อย

- ข้าวเกรียบกุ้ง ทำจากเนื้อกุ้งบดที่คลุกกับแป้งมันและแป้งสาลี ที่ผสมกับกระเทียม เกลือ และพริกไทย ดาแดดทิ้งไว้ 2-3 วัน จากนั้นนำแผ่นข้าวเกรียบแห้งที่ได้มาทอดในน้ำมันท่วม ที่อุณหภูมิ 160 – 180 °ซ เป็นเวลาประมาณ 2-3 นาที

- ฮ่อยจ๊อ ใช้แผ่นฟองเต้าหู้ห่อเนื้อหมูบด ที่ผสมกับเนื้อปู ไข่ไก่ แป้งสาลี รากผักชี กระเทียม พริกไทย เกลือ น้ำตาล หัวหอม และเหล้าจีน นำมาทอดในน้ำมันท่วม ที่อุณหภูมิ 160 – 180 °ซ เป็นเวลาประมาณ 7-8 นาที

กลุ่มที่ 2 อาหารที่ผ่านการเผาหรือย่าง จำนวน 2 ชนิด คือ

- ขนมหาก มีส่วนประกอบของแป้งข้าวเหนียวดำ แป้งข้าวเจ้า กระทิ เนื้อเผือกต้มสุก น้ำตาลปีบ และเกลือ ผสมให้เข้ากันและนำไปห่อในใบจาก ปิ้งที่อุณหภูมิ 180-200 °ซ เป็นเวลา 10-15 นาที

- ข้าวหลาม มีส่วนประกอบของแป้งข้าวเหนียวดำ แป้งข้าวเจ้า กระทิ เนื้อเผือกต้มสุก เกลือ และน้ำตาล ผสมให้เข้ากันและกรอกใส่กระบอกลูไม้ไผ่ นำไปเผาที่อุณหภูมิมากกว่า 250 °ซ เป็นเวลา 2-3 ชม.

กลุ่มที่ 3 อาหารที่ผ่านการอบ จำนวน 2 ชนิด คือ

- ขนมหม้อแกง มีส่วนประกอบของแป้งข้าวเจ้า ไข่แดง กระทิ เนื้อเผือกต้มสุก ถั่วลิสง ไข่ขาว น้ำตาลปีบ เกลือ และน้ำมันพืช ผสมให้เข้ากันและนำไปอบที่อุณหภูมิ 180 °ซ เป็นเวลา 30-40 นาที
- ปลาเส้น ทำจากเนื้อปลาไร้มันนวดผสมกับแป้งข้าวเจ้า ไข่แดง ซีอิ๊วขาว และน้ำตาล นำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 °ซ เป็นเวลา 3 ชม.

กลุ่มที่ 4 อาหารที่มีการให้ความร้อนโดยตรงจากแผ่นให้ความร้อน จำนวน 2 ชนิด คือ

- เกรปซ็อกโกแลต แป้งเกรปมีส่วนผสมของแป้งสาลี ไข่แดง นม แป้งเค้ก เนย และน้ำตาล กวนผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปทำให้เป็นแผ่นบนแผ่นให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงกว่า 110 °ซ เป็นเวลา 5-6 นาที จากนั้นราดด้วยซ็อกโกแลต และให้ความร้อนต่อเป็นเวลา 2-3 นาที
- ขนมทองม้วน ผสมแป้งสาลี แป้งบัวแดง เนื้อมะพร้าว ไข่ไก่ น้ำตาล งาขาว และงาดำ ให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไปให้ความร้อนโดยตรงบนแผ่นให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงกว่า 110 °ซ เป็นเวลา 2-3 นาที

3.3 การเตรียมและการสกัดอะคริลาไมด์ออกจากตัวอย่างอาหาร

นำตัวอย่างอาหารมาแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 °ซ เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นนำมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ และบดด้วยเครื่องบดอาหารจนเป็นผง ชั่งตัวอย่างอาหารหนัก 10 กรัมลงในบีกเกอร์ขนาด 250 มล. ทำการละลายไขมัน (defatting) ออกจากตัวอย่างอาหารโดยการเติมสารผสมระหว่างไอโซเฮกเซน (isohexane) และบิวทิลเมทิลอีเทอร์ (*t*-butyl methyl ether) ในอัตราส่วน 95 ต่อ 5 ปริมาตร 100 มล. ลงในบีกเกอร์ ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที เพื่อให้ตัวทำละลายอินทรีย์แทรกซึมไปทั่วตัวอย่างอาหาร จากนั้นเขย่าเบาๆ อย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 5 นาที นำส่วนสกัดที่ได้ไปกรองเอาตัวทำละลายออกด้วยกระดาษกรอง และทำซ้ำอีกครั้ง นำกระดาษกรองที่มีตัวอย่างอาหารมาทำให้แห้งโดยการตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชม. จากนั้นตัดกระดาษกรองเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 1 × 1 ซม. ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 250 มล. เติมอะคริลาไมด์ไอโซโทปที่ใช้เป็นสารมาตรฐาน (ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในตัวอย่างอาหารและตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้อะคริลาไมด์ไอโซโทปซึมผ่านตัวอย่างอาหารได้อย่างสมบูรณ์ ต่อมาเติมน้ำกลั่นบริสุทธิ์ปริมาตร 100 มล.ลงในบีกเกอร์ที่มีกระดาษกรองตัวอย่างอาหารอยู่ นำไปให้ความร้อนด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงที่อุณหภูมิ 40 °ซ เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลายคาร์เรซที่ 1 (Carrez solution I; 0.35 M $K_4[Fe(CN)_6]$) และสารละลายคาร์เรซที่ 2 (Carrez solution II; 1 M $ZnSO_4$) ปริมาตรอย่างละ 1 มล. ลงไปในสารละลายสกัดทันทีและเขย่าอย่างต่อเนื่อง นำสารละลายสกัดที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000

รอบต่อมาที่เป็นเวลา 15 นาที กรองด้วยกระดาษกรองเพื่อให้ได้สารละลายใส นำส่วนใสที่ได้ไปกำจัดสารปนเปื้อนอื่นออกโดยวิธี solid-phase extraction ด้วยการผ่านคอลัมน์ Chromabond ABC18 cartridges (500 mg polypropylene, 6 ml) ที่ซื้อมาจาก Macherey-Nagel ประเทศเยอรมันนี ซึ่งถูกกระตุ้นให้ทำงานได้ด้วยการผ่านเมทานอลและน้ำ นำส่วนสกัดที่ผ่านคอลัมน์ไปทำให้เย็นโดยการแช่บนน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที ทำการโบรมิเนชัน (bromination) ด้วยการเติมสารอนุพันธ์ตั้งต้น (derivatization reactants) ที่ประกอบด้วย KBr 15.2 กรัม HBr 0.8 มล. สารละลายโบรมีน 5 มล. และน้ำกลั่นบริสุทธิ์ 60 มล. (Castle *et al.*, 1991) ทิ้งสารละลายให้ทำปฏิกิริยาบนน้ำแข็งในสภาวะที่ปราศจากแสง เป็นเวลา 3 ชม. จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมสารละลาย 1 mM sodium thiosulfate ปริมาตรประมาณ 100 ไมโครลิตรหรือจนสีของโบรมีนจางหายไปหมด จากนั้นเติมเอทิลอะซิเตท ปริมาตร 20 มล. ลงในส่วนสกัด นำส่วนสกัดที่ได้มาระเหยให้เกือบแห้งในสภาวะที่ปราศจากน้ำ (มีโซเดียมซัลเฟต) จนเหลือปริมาตรประมาณ 1 มล. นำส่วนสกัดสุดท้ายที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS ต่อไป

3.4 การวิเคราะห์อะคริลาไมด์โดยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี

นำส่วนสกัดสุดท้ายที่ได้จากข้อ 3.3 มาฉีดเข้าเครื่อง GC-MS ด้วยวิธี splitless injection ด้วยเวลากระตุ้นเริ่มต้น 1 นาที ที่อุณหภูมิในการฉีด 280 °C เครื่อง GC-MS ที่ใช้คือ Agilent 6890N gas chromatography ร่วมกับ Agilent 5973N quadrupole mass selective detector (MSD) ซึ่งมีระบบคัดเลือกไอออน (selected ion monitoring mode; SIM mode) ซึ่งใช้กำลังไฟฟ้าในการแตกตัวของไอออนที่ 70 อิเล็กโทรวด์ การวิเคราะห์อะคริลาไมด์ทำโดยใช้คอลัมน์ HP5-MS capillary (polysiloxane polymers, 30 m × Ø 0.25 mm, 0.25 µm) ของบริษัท Agilent ประเทศสหรัฐอเมริกา และใช้แก๊สฮีเลียมเป็นแก๊สนำพา (Carrier gas) ที่อัตราการไหล 1 มล.ต่อนาที หลังจากฉีดตัวอย่างจะปรับอุณหภูมิคอลัมน์ลงที่ 60 °C เป็นเวลา 2 นาที และตั้งโปรแกรมเครื่องเป็น การเพิ่มอุณหภูมิ 10 °C ต่อ นาที จนถึง 200 °C และตั้งโปรแกรมทิ้งไว้ที่ 200 °C เป็นเวลา 5 นาที (เวลาในการทำงานทั้งหมด 21 นาที) ภายใต้สภาวะดังกล่าวสารอนุพันธ์ของอะคริลาไมด์และอะคริลาไมด์ไอโซโทป จะออกมาที่เวลา 6.9 นาที ติดตามไอออนดังนี้ ที่ค่า m/z 151 เป็นการติดตาม 2-bromopropenamide (สารอนุพันธ์ของอะคริลาไมด์) และที่ค่า m/z 154 เป็นการติดตาม 2-bromo ($^{13}\text{C}_3$)-propenamide (สารอนุพันธ์ของอะคริลาไมด์ไอโซโทป) การคำนวณปริมาณอะคริลาไมด์ในอาหารตัวอย่างประมาณจากอัตราส่วนของพื้นที่ใต้ผิวของ 2-bromopropenamide กับ 2-bromo ($^{13}\text{C}_3$)-propenamide (ภาคผนวกที่ 1) การวิเคราะห์ที่ให้ค่า s/n (signal-to-noise) มากกว่า 3 ถือว่าตรวจพบปริมาณของสารอะคริลาไมด์ในอาหาร

3.5 การวิเคราะห์พฤติกรรมของผู้บริโภค

พฤติกรรมของผู้บริโภคได้จากการข้อมูลผลการตอบแบบสอบถามของนักท่องเที่ยว จำนวน 400 คน ที่มาหาดบางแสนและตลาดหนองมน และให้ความร่วมมือในการตอบแบบสอบถาม (เลือก

จำนวนผู้ตอบแบบสอบถามจากการประเมินความถูกต้องในการสำรวจข้อมูลตามโปรแกรม evaluating cooperative extension (Isaac & William, 1981; Smith, 1983) และวิเคราะห์ข้อมูลตามหลักการวิเคราะห์ความถี่ในการบริโภคอาหาร (Food-frequency method; Petersen & Barraji, 1996) โดยใช้แบบสอบถามที่ออกแบบมาอย่างระวัง เพื่อลดข้อมูลที่อาจส่งผลโน้มน้ำหนักต่อการตัดสินใจและทัศนคติในการบริโภคของผู้บริโภค (ภาคผนวกที่ 2) ผู้ตอบแบบสอบถามที่ไม่ได้ซื้อสินค้าในตลาดหนองมนจะไม่นับเป็นผู้บริโภค และแบ่งกลุ่มของผู้บริโภคเป็น 2 กลุ่ม ตามความถี่ในการบริโภคอาหารในตลาดหนองมน (ผู้ตอบแบบสอบถามว่าแน่นอน จัดเป็นความถี่ 95% และผู้ตอบแบบสอบถามว่าไม่แน่ใจ จัดเป็นความถี่ 50%)

3.6 การประมาณการได้รับอะคริลาไมด์ของผู้บริโภคต่อวัน

การประมาณการได้รับอะคริลาไมด์ของผู้บริโภคต่อวัน (estimated daily intake; EDI) จะมุ่งเป้าไปที่ตัวอย่างอาหารที่มีโอกาสสูงที่จะเกิดการก่อตัวของอะคริลาไมด์ โดยอาศัยข้อมูลของกลไกการก่อตัวของอะคริลาไมด์ในอาหาร (Mottram *et al.*, 2002; Stadler *et al.*, 2002) นั่นคือ อาหารที่มีน้ำตาลและกรดอะมิโนเป็นองค์ประกอบ และ/หรือผ่านการปรุงด้วยการให้ความร้อน เช่น การทอด ย่าง หรืออบ ตัวอย่างอาหารที่มุ่งเป้ามาวิเคราะห์ได้แก่ ข้าวหลาม ขนมจาก ขนมไข่หงส์ ปาท่องโก๋ ขนมหม้อแกง มันฉาบ เผือกฉาบ และกล้วยฉาบ

การคำนวณค่าการได้รับอะคริลาไมด์ของผู้บริโภคต่อวัน (EDI) คำนวณจากค่าเฉลี่ยของปริมาณอะคริลาไมด์ที่พบในอาหารแต่ละชนิดและข้อมูลพฤติกรรมของผู้บริโภค โดยค่า EDI (นาโนกรัมต่อน้ำหนักเป็นกก.ของผู้บริโภคต่อวัน) ได้มาจากการนำความเข้มข้นของอะคริลาไมด์ (ไมโครกรัมต่อกก.) คูณกับปริมาณอาหารที่ผู้บริโภคได้รับต่อวัน (กรัม) และหารด้วยค่าเฉลี่ยน้ำหนักผู้บริโภคแต่ละคน (50 กก. สำหรับผู้หญิงและ 60 กก. สำหรับผู้ชาย) (Dybing & Sanner, 2003; Daniali *et al.*, 2010)

3.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของข้อมูลการปนเปื้อนของอะคริลาไมด์ที่ตรวจพบในอาหารและการประมาณการได้รับอะคริลาไมด์ของผู้บริโภคต่อวันทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS ที่ระดับความแม่นยำ $p > 0.05$

3.8 การติดตามความคงตัวของสารอะคริลาไมด์ในปาท่องโก๋ด้วยระบบย่อยจำลอง

3.8.1 การเตรียมตัวอย่างปาท่องโก๋

นำตัวอย่างปาท่องโก๋ที่ซื้อจากตลาดนัดชุมชนข้างมหาวิทยาลัยบูรพา มาฉีกให้ละเอียดและชั่งประมาณ 3 กรัม จากนั้นทุบเบาๆ ด้วยไม้ขนาดกว้าง 1.5 ซม. และหนา 1 ซม. เป็นจังหวะตามเวลาเฉลี่ยใน

การบดเคี้ยวอาหาร (ข้อ 3.8.2) ปาท้องโกที่ได้อาจมีลักษณะละเอียดบางส่วนคล้ายอาหารที่ถูกบดเคี้ยวภายในปาก นำไปใช้เป็นตัวอย่างในการทดลองการสร้างระบบย่อยอาหารจำลองต่อไป

3.8.2 การหาค่าเฉลี่ยเวลาในการบดเคี้ยวอาหาร

หาค่าเฉลี่ยเวลาในการบดเคี้ยวอาหารของชาย-หญิง 5 ช่วงอายุ คือ ช่วงอายุน้อยกว่า 20 ปี, 21-30 ปี, 31-40 ปี, 41-50 ปี และมากกว่า 50 ปี (ภาคผนวกที่ 3) จำนวน 100 คน แบ่งเป็นชาย 50 คนและหญิง 50 คน โดยทำการสุ่มบุคคลที่สามารถให้ความร่วมมือในการสำรวจได้ และเมื่อสอบถามประวัติอาสาสมัครทุกคน ไม่พบปัญหาทางด้านสุขภาพของช่องปากและฟัน จากนั้นให้อาสาสมัครรับประทานข้าว 1 คำ (ประมาณ 7 กรัม) ใช้นาฬิกาจับเวลาในการบดเคี้ยวอาหารจนกว่าจะกลืนอาหาร ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง โดยกำหนดปริมาณข้าวทุกครั้งให้มีปริมาณที่ใกล้เคียงกัน หาค่าเฉลี่ยการบดเคี้ยวอาหารของบุคคลนั้นๆ ทำการทดลองเช่นนี้จนสำรวจครบ 100 คน ทำการหาค่าเฉลี่ยรวม ซึ่งค่าที่ได้ออกมาจะนำไปใช้ในการจำลองการบดเคี้ยว โดยการหุบไม้ตามวิธีที่ได้อธิบายมาแล้วในหัวข้อ 3.8.1 ก่อนนำไปเข้าระบบย่อยอาหารจำลองต่อไป

3.8.3 การสร้างระบบย่อยอาหารจำลอง

ออกแบบระบบย่อยอาหารจำลองภายในหลอดทดลอง โดยการเลียนแบบการย่อยอาหารของปาก กระเพาะและลำไส้เล็ก ตามวิธีที่ประยุกต์มาจากงานวิจัยของ Alexandropoulou และคณะ (2006) นำตัวอย่างปาท้องโกมาบดเป็นเวลาประมาณ 4 ชม. 46 นาที ที่อุณหภูมิ 37 °C และมีการปรับค่าพีเอชเป็นลำดับให้เหมาะสมกับการย่อยด้วยเอนไซม์ต่างๆ คือ เปปซิน (pepsin) และสารผสมน้ำดีตับอ่อน (pancreatin-bile salt mixture) ควบคุมอุณหภูมิโดยใช้ตู้บ่มแบบแช่ที่ 37 °C ด้วยอัตราเร็วในการเขย่า 100 รอบต่อนาที เมื่อครบเวลาในการย่อยจะแยกส่วนที่อยู่ด้านนอกถุงไดอะไลซิส (dialysis bag) และส่วนที่อยู่ด้านในถุงไดอะไลซิสออกจากกัน รายละเอียดการทดลองคือ นำตัวอย่างปาท้องโกที่ได้จากข้อ 3.8.1 มาเติม 0.08M potassium phosphate buffer (KPB) ปริมาตร 50 มล. จากนั้นเติมเอนไซม์อะไมเลส (amylase) (ความเข้มข้น 12.5 หน่วยเอนไซม์ต่อมล.) ปริมาตร 0.1 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 20 วินาที เมื่อครบกำหนดเวลา นำส่วนที่เป็นสารละลายของอาหารมาปริมาตร 20 มล. ปรับค่าพีเอชเป็น 2.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก นำไปใส่ในภาชนะที่มีฝาปิดขนาดปริมาตร 100 มล. เติมเปปซิน (ความเข้มข้น 3,200-4,500 หน่วยเอนไซม์ต่อมล. โปรตีนต่อมล.) ปริมาตร 1 มล. ลงไปในแต่ละตัวอย่าง จากนั้นนำไปบ่มต่อเป็นเวลา 2 ชม. เมื่อครบกำหนดเวลาแล้วเติม 0.15M HEPES buffer ปริมาตร 20 มล. ในขั้นตอนนี้จะเป็นการปรับค่าพีเอชของตัวอย่างจาก 2.8 เป็น 6.0 หลังจากนั้น 45 นาที เติมสารผสมน้ำดีตับอ่อน ปริมาตร 5 มล. และเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส (amylglucosidase) (ความเข้มข้น 300 หน่วยเอนไซม์ต่อมล.) ปริมาตร 0.1 มล. ลงในตัวอย่างพร้อมนำถุงไดอะไลซิสที่บรรจุ 0.15M HEPES buffer ปริมาตร 40 มล. ใส่ลงในภาชนะของสารตัวอย่าง บ่มต่ออีก 2 ชม. เมื่อครบกำหนดเวลาการบ่มจะแยกถุงไดอะไล

ชีสออกมา โดยกำหนดให้ของเหลวที่อยู่ภายในถุงไคอะไลซิสคือ ตัวอย่างที่ผ่านการย่อยและมีขนาดโมเลกุลต่ำกว่า 6000-8000 ดาลตัน (ดูดซึมเข้าเส้นเลือดฝอยของลำไส้เล็ก) และของเหลวที่อยู่ด้านนอกถุงไคอะไลซิส คือตัวอย่างที่ไม่สามารถแพร่ผ่านถุงไคอะไลซิสได้ (ไม่ดูดซึม) นำตัวอย่างทั้งสองส่วนมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และทำเข้มข้นตัวอย่างทั้งสองส่วนที่ได้ ด้วยการกรองขั้นสูง (ultrafiltration) ขนาดคัดกรอง 3 กิโลดาลตัน เก็บส่วนใสที่อยู่ด้านล่างของหลอดมาทำการวิเคราะห์ต่อไป ในส่วนการทดลองที่มีการผสมอะครีลาไมด์และผงชาเขียว นั้น จะทำการเติมอะครีลาไมด์ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม หรือผงชาเขียว (มัทชา โออิชิ) 2 กรัมคลุกลงในปาท้องโกเป็นอันดับแรกก่อนทำการทดลองขั้นต่อไป

3.8.4 การวิเคราะห์การดูดซึมของสารอะครีลาไมด์ในระบบย่อยอาหารจำลองโดยเทคนิค HPLC

นำตัวอย่างอาหารที่เตรียมได้จากข้อ 3.8.3 มาตัวอย่างละ 1 มล. ผสมกับเบนซาไมด์ (benzamide) ความเข้มข้น 2.5 ไมโครกรัมต่อมล. ที่ใช้เป็นสารมาตรฐานภายในเพื่อเปรียบเทียบผลการดูดซึมของสารอะครีลาไมด์ในระบบย่อยอาหารจำลอง จากนั้นกรองสารผสมตัวอย่างด้วยแผ่นกรองไนลอนเมมเบรนแบบบีด (syringe membrane filter) ที่มีขนาดคัดกรอง 0.4 ไมโครเมตรและเส้นผ่านศูนย์กลาง 25 มม. เพื่อวิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC คือการใช้คอลัมน์ MicroBondapak C₁₈ ขนาด 3.9 × 300 มม. ที่บรรจุเรซินขนาด 10 ไมโครเมตรเป็นเฟสคงที่ ตรวจสอบด้วยยูวี (UV detector) ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และใช้อะซิโตไนไตรล์ (acetonitrile) ความเข้มข้นร้อยละ 50 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นเฟสเคลื่อนที่ โดยกำหนดอัตราไหลที่ 0.5 มล.ต่อนาที นำโครมาโทแกรมที่ได้มาวิเคราะห์การดูดซึมของสารอะครีลาไมด์ จากการเปรียบเทียบปริมาณของสารอะครีลาไมด์ที่เหลือในระบบกับปริมาณของสารละลายมาตรฐาน (ภาคผนวกที่ 4) คำนวณร้อยละการดูดซึมของสารอะครีลาไมด์จากผลการวิเคราะห์ที่ได้

3.9 การพัฒนาวิธีการผลิตมันเทศทอดที่สามารถลดสีน้ำตาลของผลิตภัณฑ์

3.9.1 การเตรียมตัวอย่างมันเทศ

ปอกเปลือกมันเทศพันธุ์ไข่ (10 กก.) แช่น้ำเพื่อขจัดยางที่ผิวออก ผ่านมันเทศเป็นแว่นตามขวาง ให้มีความหนา 2 มม. ด้วยเครื่องตัดแต่งผลไม้ (HALLED RG-350, Thailand) จากนั้นตัดแต่งด้วยมีดให้แต่ละแผ่น มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5-6 ซม. แบ่งแผ่นมันเทศออกเป็น 10 กลุ่ม นำแผ่นมันเทศแต่ละกลุ่มมาแช่น้ำ หรือสารละลายชนิดต่าง ๆ ได้แก่

- สารละลายกรดซิตริก (1% น้ำหนักต่อปริมาตร)
- โซลชีน (0.4% น้ำหนักต่อปริมาตร)
- แคลเซียมคลอไรด์ (1% น้ำหนักต่อปริมาตร)

- สารละลายผสมของกรดซิตริก (1% น้ำหนักต่อปริมาตร)และไกลซีน (0.4% น้ำหนักต่อปริมาตร)
 - สารละลายผสมของกรดซิตริก (1% น้ำหนักต่อปริมาตร)และแคลเซียมคลอไรด์ (1% น้ำหนักต่อปริมาตร)
 - สารละลายผสมของกรดซิตริก (0.4% น้ำหนักต่อปริมาตร)และแคลเซียมคลอไรด์ (1% น้ำหนักต่อปริมาตร)
 - สารละลายผสมของกรดซิตริก (1% น้ำหนักต่อปริมาตร) ไกลซีน (0.4% น้ำหนักต่อปริมาตร) และแคลเซียมคลอไรด์ (1% น้ำหนักต่อปริมาตร)
- ทำการแช่ที่อุณหภูมิห้อง (30 °ซ) เป็นเวลา 75 นาที หรือ ลวกแผ่นมันเทศในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 70 °ซ เป็นเวลา 10 นาที (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ)

3.9.2 การทอดแผ่นมันเทศ

นำแผ่นมันเทศที่เตรียมได้ในข้อ 3.9.1 มาทอดแบบน้ำมันท่วมที่อุณหภูมิ 150 ± 3 °ซ เป็นเวลา 6 นาที ด้วยเครื่องทอดควบคุมอุณหภูมิ (FR1375 Fritel, Belgium) สะเด็ดน้ำมันโดยวางบนกระดาษซับน้ำมัน (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ)

3.9.3 การวิเคราะห์คุณภาพของแผ่นมันเทศทอดกรอบ

วิเคราะห์คุณภาพของแผ่นมันเทศทอดกรอบที่เตรียมได้จากค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ดังนี้

- การวัดค่าสี (L^* , a^* และ b^*) ด้วยเครื่องวัดสี Handy Colorimeter คำนวณค่าเฉดสี [Hue angle = $\tan^{-1}(b^*/a^*)$] และความแตกต่างของสี [$\Delta E = (\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2})^{1/2}$]
- การวัดค่าความแข็ง (Hardness) ด้วยเครื่องวัดเนื้อสัมผัส (Stable Micro System Texture analyzer TA-XT2, England) โดยใช้หัววัดทรงกลมชนิด Spherical probe: 1P/0.25S (10 ซีน/ สูตร)
- การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน ด้วยวิธี Soxhlet Extraction Method (AOAC Method 920.39, 1990)
- การวิเคราะห์ค่าความชื้น ด้วยวิธีการอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 °ซ เป็นเวลา 3 ชม.
- การประเมินความชอบของมันเทศแผ่นกรอบด้วยวิธี 9-point hedonic scale โดยผู้ทดสอบจำนวน 30 คนซึ่งไม่ผ่านการฝึกฝน ประเมินความชอบด้านสี กลิ่นรส รสชาติ ความกรอบ และความชอบรวม ทำการประเมินโดยให้ผู้ทดสอบชิมตัวอย่างและให้คะแนนตามความชอบ โดย 1 คะแนน คือ ไม่ชอบมากที่สุด และ 9 คะแนน คือ ชอบมากที่สุด

3.9.4 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ข้อมูลด้านเคมี และด้านกายภาพของแผ่นมันเทศแผ่นกรอบแบบ CRD ส่วนข้อมูลการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส วิเคราะห์แบบ Randomized

Complete Block Design (RCBD) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05