

บทที่ 3

การดำเนินงานวิจัย

3.1 สารเคมีและอุปกรณ์สำหรับงานวิจัย

3.1.1 สารมาตรฐาน

- อะคริลาไมด์ 99 เปอร์เซนต์ (C₃H₅NO, Electrophoresis grade, Sigma, เยอรมนี)

3.1.2 สารเคมี

- อะซิโตไนไตรท์ (CH₃CN, HPLC grade, Lab scan, ไทย)
- เมทานอล (CH₃OH, HPLC grade, Scharlab, สเปน)
- เฮกเซน (CH₃(CH₂)₄CH₃, AR grade, Lab scan, ไทย)
- โพแทสเซียมเฮกซะไซยาโนเฟอร์เรท (K₄[Fe(CN)₆].3H₂O, AR grade, Merck, เยอรมนี)
- ซิงค์ ซัลเฟต (ZnSO₄, AR grade, Merck, เยอรมนี)
- น้ำปราศจากไอออน (H₂O, HPLC grade, Lab scan, ไทย)

3.1.3 เครื่องมือและอุปกรณ์

- เครื่องบดตัวอย่าง (Moulinex, Model 645, เม็กซิโก)
- เครื่องวัดสี (Minolta, CR 400, ญี่ปุ่น)
- เครื่องชั่งน้ำหนัก ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius, ED 2248, เยอรมนี)
- Autopipett ขนาด 20 – 200, 1,000 และ 5,000 ไมโครลิตร
- เครื่องผสม (Scientific industries, Genie 2, ไทย)
- เครื่องเขย่า (GFL, 3017, เยอรมนี)
- เครื่องหมุนเหวี่ยง (Beckman coulter, Allegra 64R, สหรัฐอเมริกา)
- กระดาษกรอง (Whatman, No.4, อังกฤษ)
- ปิ๊มสุญญากาศ (Sibata, WI-20, ญี่ปุ่น)
- ตู้อบลมร้อน (Mettler, BE 400, เยอรมนี)
- Solid phase extraction (Agela, Cleanert PEP-SEP, 60 mg, 3ml, สหรัฐอเมริกา)
- 12 port SPE vacuum manifold (Mediwax, สหรัฐอเมริกา)
- Syringe filter (Chromex, PVDF, 0.2 µm, 13 mm, อังกฤษ)
- Filter membrane (Munktell, PVDF, 0.2 µm, 47 mm, สวีเดน)
- อัลตราโซนิกบาร์ท (Mettler, 4.6, สหรัฐอเมริกา)

- เครื่อง HPLC (Agilent technologies, HP100, เยอรมนี)
- รีเวิร์สเฟสคอลัมน์ (Phenomenex, C18, 4 μ m, 250 x 4.60 mm, สหรัฐอเมริกา)

3.1.4 ตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่างอาหารไทยที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบสูง และผ่านการให้ความร้อนด้วยวิธีการทอดพร้อมจัดบันทึกลักษณะกายภาพเบื้องต้น จากตลาดต่างๆ ใน 5 เขตของกรุงเทพมหานคร คือ ตลาดกระบัง บางแค ยานนาวา วัฒนา และ คูสิต จำนวน 27 ประเภท รวมทั้งสิ้น 177 ตัวอย่าง ได้แก่ กลัวยทอดกรอบ (ชนิดเค็ม) กลัวยทอดกรอบ (ชนิดหวาน) กลัวยแขก กลัวยตากทอด กลัวยหอมทอดกรอบ กลัวยอบเนย มันเทศทอดกรอบ (ชนิดเค็ม) มันเทศทอดกรอบ (ชนิดหวาน) มันต่อเผือกทอดกรอบ (ชนิดหวาน) มันเทศทอด เผือกทอด เผือกทอดกรอบ (ชนิดเค็ม) เผือกทอดกรอบ (ชนิดหวาน) ทูเรียนทอดกรอบ ขนุนทอดกรอบ ฟักทองทอดกรอบ ข้าวแต่น ข้าวเม่า ถั่วทอด กระจงสารท ขนมน้ำแข็ง หงส์ ขนมน้ำเต้า ซาลาเปาทอด ครองแครงกรอบ ข้าวเกรียบงา ขนมหอกจอก และขนมห้านบัว ตัวอย่างอาหารทอดทั้งหมดจะแบ่งบรรจุในถุงพลาสติกแบบมีปากปิดสนิท (Zip lock) ก่อนเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สำหรับใช้ในการทดลอง

3.2 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

- 3.2.1 การทดสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์
- 3.2.2 ตรวจสอบค่าสีของตัวอย่างอาหารชนิดต่างๆ
- 3.2.3 วิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนของสารอะคริลาไมด์ในตัวอย่างอาหาร
 - 3.2.3.1 การสกัดสารอะคริลาไมด์ในตัวอย่างอาหาร
 - 3.2.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารอะคริลาไมด์ในตัวอย่างอาหารด้วยเครื่อง HPLC
- 3.2.4 สรุปรวบรวม วิเคราะห์ข้อมูล และประเมินผลการศึกษา

3.3 วิธีดำเนินการ

3.3.1 การเตรียมสารละลายและสารเคมี

- 3.3.1.1 สารละลายอะซิโตนไตรท์ 1 เปอร์เซนต์โดยปริมาตร
 ปิเปตอะซิโตนไตรท์ จำนวน 10 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน
- 3.3.1.2 สารละลายอะคริลาไมด์มาตรฐาน 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (standard stock solution)

ซังสารอะคริลาไมด์มาตรฐาน 99 เปอร์เซ็นต์ 0.100 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยสารละลายอะซิโตนไนไตรท์ 1 เปอร์เซ็นต์ ในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตรเก็บในขวดแก้วสีชาที่มีฝาเป็นโพลีเตตระฟลูออโรไทลีน (PTFE) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.3.1.3 สารละลายอะคริลาไมด์มาตรฐาน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (standard working solution)

ปิเปตสารละลายอะคริลาไมด์มาตรฐาน 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 10 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วยสารละลายอะซิโตนไนไตรท์ 1 เปอร์เซ็นต์

3.3.1.4 สารละลายอะคริลาไมด์มาตรฐานสำหรับสร้างกราฟมาตรฐาน (standard calibration solution)

ทำการเจือจางสารละลายอะคริลาไมด์มาตรฐาน 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยสารละลายอะซิโตนไนไตรท์ 1 เปอร์เซ็นต์ ให้มีความเข้มข้น 500, 250, 125, 62.50, 31.25, 15.63, 7.82, 3.91, 1.96 และ 0.98 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยวิธี 2 flow serial dilution

3.3.1.5 สารละลายเมทานอล 70 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร

ตวงเมทานอล จำนวน 700 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน

3.3.1.6 สารละลาย Carrez I

ซังโพแทสเซียมเฮกซาไซยาโนเฟอเรท จำนวน 15.00 กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดแก้วสีชาที่มีฝาเป็นโพลีเตตระฟลูออโรไทลีน (PTFE) ที่อุณหภูมิห้อง

3.3.1.7 สารละลาย Carrez II

ซังซิงค์ ซัลเฟต จำนวน 30.00 กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดแก้วสีชาที่มีฝาเป็นโพลีเตตระฟลูออโรไทลีน (PTFE) ที่อุณหภูมิห้อง

3.3.2 การทดสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์

3.3.2.1 การสร้างกราฟมาตรฐาน

นำสารละลายอะคริลาไมด์มาตรฐาน 10 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 500, 250, 125, 62.50, 31.25, 15.63, 7.82, 3.91, 1.96 และ 0.98 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ข้อ 3.3.1.4) มาทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยฉีดผ่านรีเวิร์สเฟสคอลัมน์ (C18, 4 ไมโครเมตร, 250 x 4.60 มิลลิเมตร) ในปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใช้สารละลายอะซิโตนไนไตรท์ 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเฟสเคลื่อนที่ ที่อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ควบคู่กับตัวตรวจวัดยูวี (UV detector) ความยาวคลื่น 225 นาโนเมตร เพื่อหาเวลาชะ (retention time) และพื้นที่ใต้พีค (peak area) ของสารอะคริลาไมด์มาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ

จากนั้นสร้างกราฟระหว่างพื้นที่ได้พิกที่่ได้กับความเข้มข้นของสารอะคริลาไมด์ คำนวณหาสมการเชิงเส้นถดถอย (regression line) และสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, R^2)

3.3.2.2 การหาค่าเปอร์เซ็นต์คืนกลับ (% recovery)

วิเคราะห์ตัวอย่างอาหารที่ไม่มีสารอะคริลาไมด์ (Blank sample) และตัวอย่างอาหารที่มีการเติมสารละลายอะคริลาไมด์มาตรฐานเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 500 ไมโครลิตร ตามขั้นตอนการสกัดและวิเคราะห์ตัวอย่าง (ข้อ 3.3.4) นำผลที่ได้มาคำนวณหาการคืนกลับ (ภาคผนวก ก.) ซึ่งเกณฑ์มาตรฐานที่ยอมรับในการทดสอบค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับจะอยู่ในช่วงระหว่าง 70 ถึง 110 เปอร์เซ็นต์

3.3.2.3 ขีดจำกัดการตรวจพบ (limit of detection, LOD) และปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ในเชิงปริมาณ (limit of quantification, LOQ)

วิเคราะห์ตัวอย่างอาหารที่ไม่มีสารอะคริลาไมด์ ได้แก่ ข้าวเหนียว ก๊วยตัม พักทอง ต้ม ข้าวโพดต้ม มันเทศต้ม เผือกต้ม ที่มีการเติมสารละลายอะคริลาไมด์มาตรฐานเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 500 ไมโครลิตร ลงไปก่อนนำไปสกัดและวิเคราะห์ตัวอย่างตามขั้นตอน (ข้อ 3.3.4) หาค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของความเข้มข้นตัวอย่าง โดย LOD และ LOQ คำนวณได้จากสมการในภาคผนวก ข.

3.3.3 การวัดสี

นำตัวอย่างอาหารทอดที่สุ่มมาจากแหล่งจาก มาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดตัวอย่าง (645, Moulinex, เม็กซิโก) จากนั้นนำตัวอย่างที่บดได้บรรจุลงในถุงพลาสติกใส วัดค่าสีด้วยเครื่องวัดสี (CD 400, Minolta, ญี่ปุ่น) บันทึกค่าที่วัดได้ในรูปของค่า L^* , a^* , b^* และนำค่าที่ได้มาแปลผลเป็นพารามิเตอร์สีของตัวอย่าง (ภาคผนวก ค.) ดังนี้

- hue angle เป็นค่าที่ใช้บอกถึงช่วงสีของวัตถุ โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 0-360
- chroma บอกถึงความชัดเจนของวัตถุ มีค่าระหว่าง 0-90 ถ้ามีค่าเข้าใกล้ 0 แสดงว่าวัตถุมีสีซีดหรือสีเทา ถ้ามีค่าเข้าใกล้ 90 แสดงว่าวัตถุมีสีเข้ม
- browning index ค่าบ่งชี้การเกิดสีน้ำตาลที่มีโปรตีนเป็นสารตั้งต้นในปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลโดยไม่ใช้เอนไซม์ หรือปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Maillard's reaction)



ตารางที่ 3.1 ค่าสีของ hue angle

| ค่าจากการคำนวณ | สี |
|----------------|----------------------------|
| 0-45 | สีม่วงแดง – สีส้มแดง |
| 45-90 | สีส้มแดง – สีเหลือง |
| 90-135 | สีเหลือง – สีเหลืองเขียว |
| 135-180 | สีเหลืองเขียว – สีเขียว |
| 180-225 | สีเขียว – สีน้ำเงินเขียว |
| 225-270 | สีน้ำเงินเขียว – สีน้ำเงิน |
| 270-315 | สีน้ำเงิน-สีม่วง |
| 315-360 | สีม่วง-สีม่วงแดง |

ที่มา: Rungtip (2551)

3.3.4 การวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนของสารอะคริลาไมด์ในตัวอย่างอาหาร

3.3.4.1 การสกัดสารอะคริลาไมด์ในตัวอย่างอาหาร (Nitchapansri, 2007)

ชั่งน้ำหนักตัวอย่างอาหารที่บดละเอียด (ข้อ 3.3.3) จำนวน 2.0000 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมสารละลายเมทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันบนเครื่องผสม นาน 1 นาที จากนั้นนำไปตั้งบนเครื่องเขย่า ที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 นาที เติสารละลายที่ได้ลงในหลอดสำหรับเครื่องหมุนเหวี่ยง ขนาด 50 มิลลิลิตร ก่อนนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง ที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที กรองส่วนใสที่ได้ผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4

นำสารสกัดจากตัวอย่าง ใส่ลงในกรวยแยก ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมเฮกเซน 20 มิลลิลิตร เขย่าเพื่อแยกไขมันออกจากสารสกัดจากตัวอย่าง ตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เกิดการแยกชั้น ถ่ายสารละลายชั้นล่างลงสู่บีกเกอร์ ขนาด 50 มิลลิลิตร ปิเปิดสารละลายจากตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Carrez I และสารละลาย Carrez II อย่างละ 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันบนเครื่องผสม นาน 1 นาที นำไปตั้งบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เติสารละลายที่ได้ลงในหลอดสำหรับเครื่องหมุนเหวี่ยง ขนาด 50 มิลลิลิตร ก่อนนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสไว้สำหรับกรองผ่าน SPE ต่อไป

ปรับสภาพ (precondition) SPE ด้วยเมทานอล 3 มิลลิลิตร และน้ำปราศจากไอออน 3 มิลลิลิตร ตามลำดับ ทิ้งส่วนที่ถูกชะออกมา ปิเปิดสารละลายส่วนที่ใสที่ได้จากการหมุนเหวี่ยง 3 มิลลิลิตร กรองผ่าน SPE ทิ้งสารละลายที่กรองได้ 10 หยดแรก จากนั้นเก็บสารละลายส่วนที่ผ่าน SPE ออกมา ใส่ในขวดสีชาขนาด 4 มิลลิลิตร นำไประเหยแห้งในตู้อบลมร้อน ที่ 65 องศาเซลเซียส เติม

สารละลายอะซิโตนไตรที่ 1 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 1 มิลลิลิตร กลับลงไป ผสมให้เข้ากันบนเครื่องผสม นาน 1 นาที จากนั้นนำมากรองผ่าน syring filter ชนิด PVDF ขนาด 0.2 ไมโครเมตร ลงในขวดสีชา ขนาด 1 มิลลิลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สำหรับวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ต่อไป

3.3.4.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารอะคริลาไมด์ในตัวอย่างอาหารด้วยเครื่อง HPLC

ฉีดสารตัวอย่างปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผ่านเข้าไปในคอลัมน์ (C18) ขนาด 250 x 4.6 มิลลิเมตร อนุภาคขนาด 4 ไมโครเมตร (Phenomenex, USA) โดยใช้ควบคู่กับตัวตรวจวัดยูวี ที่ ความยาวคลื่น 225 นาโนเมตร ใช้สารละลายอะซิโตนไตรที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเฟส เคลื่อนที่ ควบคุมอัตราการไหลที่ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ผลที่วิเคราะห์ได้นำมาคำนวณหาปริมาณสาร อะคริลาไมด์ในตัวอย่างจากสมการระหว่างพื้นที่ใต้พีคกับความเข้มข้นของสารอะคริลาไมด์มาตรฐาน (ข้อ 3.3.2.1)

3.3.5 การควบคุมคุณภาพและการรายงานผล

ในการควบคุมคุณภาพของการวิเคราะห์ จะทำการทดสอบซ้ำ (duplicate) 3 ครั้งในทุก ตัวอย่าง และทำการฉีดสารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อตรวจสอบ สภาวะของเครื่อง HPLC และเวลาชะสารตัวอย่าง ในทุก 5 ตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์ ส่วนการรายงาน ผลวิเคราะห์ ในกรณีค่าที่วิเคราะห์ได้น้อยกว่า ขีดจำกัดการตรวจพบ (limit of detection, LOD) ให้ รายงาน “ไม่พบ” หรือในกรณีค่าที่ได้มากกว่าหรือเท่ากับขีดจำกัดการตรวจพบ (limit of detection, LOD) ให้รายงานตามค่าจริง

3.3.6 การรวบรวม วิเคราะห์ข้อมูล และประเมินผลการศึกษา

ในการศึกษาในครั้งนี้ ได้ทำการวิเคราะห์ค่าดัชนีสี และปริมาณอะคริลาไมด์ในตัวอย่าง อาหารชนิดต่างๆ จึงนำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน รวมทั้งนำข้อมูลมาหา ความสัมพันธ์ (correlate) ระหว่างค่าสีกับปริมาณอะคริลาไมด์ โดยโปรแกรม SPSS (11.5) ด้วยเครื่อง คอมพิวเตอร์