

การพัฒนาวิธีตรวจสอบการปลอมปนนมผงในน้ำนมดิบ ทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณ

นิพัทธา พรหมอินทร์ รมิดา เหลืองประเสริฐ เนาวรัตน์ กำภูศิริ

บทคัดย่อ

น้ำนมดิบ (Raw milk) หมายถึง น้ำนมที่รีดจากแม่โคหลังจากคลอดลูกแล้วไม่น้อยกว่า 3 วัน และต้องปราศจากน้ำนมเหลือง (Colostrum) โดยมิได้แยกออกหรือเติมวัตถุอื่นใด และไม่ได้ผ่านกรรมวิธีใดๆ ยกเว้นการทำให้เย็น อย่างไรก็ตาม เพื่อเฝ้าระวังการปลอมปนวัตถุแปลกปลอมลงในน้ำนมดิบ สามารถทำได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการตรวจสอบ ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้จัดทำเข้าเพื่อพัฒนาวิธีการตรวจสอบการปลอมปนนมผงในน้ำนมดิบทั้งเชิงคุณภาพ โดยการวิเคราะห์ปริมาณสาร Deoxyketones และเชิงปริมาณโดยการวิเคราะห์ปริมาณ Formazan (OD) และ Furosine (ppm) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของวิธีทดสอบให้เป็นที่น่าเชื่อถือมากขึ้น จากผลการวิเคราะห์ปริมาณ Formazan และ Furosine ในตัวอย่างน้ำนมที่การปลอมปนนมผง Skim milk ที่ความเข้มข้น 0-5 และ 0-10% สามารถสร้างกราฟของสารมาตรฐาน Formazan โดยแสดงค่า Coefficient of determination (R^2) ที่ 0.9786 และ 0.9714 ตามลำดับ และปริมาณ Furosine โดยแสดงค่า Coefficient of determination (R^2) ที่ 0.9881 และ 0.9992 ตามลำดับ ผลการทดลองสรุปว่า ปริมาณของ Formazan และ Furosine ที่ตรวจวิเคราะห์ได้ มีความสอดคล้องกับปริมาณการปลอมปนนมผง Skim milk ในตัวอย่างน้ำนม ดังนั้น จากความสัมพันธ์ดังกล่าวทำให้สามารถนำกราฟของสารมาตรฐานของทั้ง Formazan และ Furosine ไปใช้เป็นตัวบ่งชี้ปริมาณการปลอมปนนมผงในน้ำนมดิบได้

**Method development for investigation of adulteration of powdered milk in raw milk
both qualitative and quantitative**

Nipattthra Phromma-in, Ramida Luengprasert, Naovarat Kamposiri

Abstract

Raw cow milk means milk from dairy cow not less than 3 days after parturition and shall not contain colostrum. Milk shall not be either addition to it or extraction from it, or subject to any process except cooling. However, in order to monitor the adulteration of foreign substances into raw milk which were various methods to investigate depend on the objective. Therefore, this study was aimed to develop a qualitative method for detecting adulteration of powdered milk in raw milk by Deoxyketones and quantitatively by Formazan (OD) and Furosine (ppm) quantification for increasing the efficiency of methods to reliability. The results shown Formazan and Furosine content in milk samples at 0-5 and 0-10% adulteration of skim milk powder, the Formazan standard curve was shown the Coefficient of determination (R^2) of 0.9786 and 0.9714, respectively and Furosine standard curve was shown the Coefficient of determination (R^2) of 0.9881 and 0.9992, respectively. There was concluded that the Formazan and Furosine were correlated with adulteration of skim milk in the raw milk sample. Therefore, the graphs of both Formazan and Furosine standardized substances can be used as indicators of the adulteration of milk powder in raw milk further.

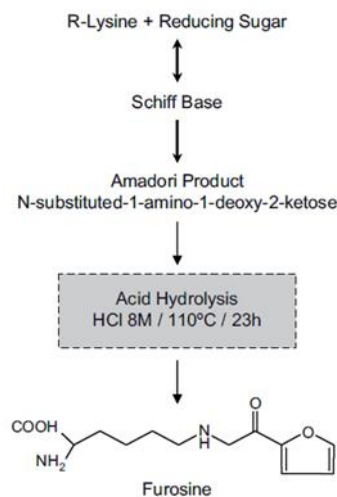
บทนำ

น้ำนมดิบ (Raw milk) หมายถึง น้ำนมที่รีดจากแม่โคหลังจากคลอดลูกแล้วไม่น้อยกว่า 3 วัน และต้องปราศจากน้ำนมเหลือง (Colostrum) โดยมีได้แยกออกหรือเติมวัตถุอื่นใด และไม่ได้ผ่านกรรมวิธีใดๆ ยกเว้นการทำให้เย็น ซึ่งประกอบด้วยคุณภาพ ดังนี้

1. มีสีขาหรือสีขาวนวล กลิ่น รส ตามธรรมชาติ
2. ต้องสะอาด ปราศจากสิ่งแปลกปลอม
3. ไม่มีการตกตะกอนของโปรตีน เมื่อทดสอบขั้นต้น ด้วยการทำให้ปฏิกิริยาของน้ำนมดิบกับเอทิลแอลกอฮอล์ที่เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ (%) ถ้าไม่ผ่านให้ตรวจยืนยันด้วยวิธีทำให้ร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส (°C) เพื่อการจับกันเป็นก้อน (Clot on boiling test)
4. มีค่าความเป็นกรด (Titratable acid) ไม่เกิน 0.16% และมีค่าความเป็นกรด-เบส (pH) อยู่ในช่วง 6.6 ถึง 6.8
5. มีจุดเยือกแข็งไม่สูงกว่า -0.520 °C
6. มีความถ่วงจำเพาะไม่ต่ำกว่า 1.028 ที่อุณหภูมิ 20 °C
7. ใช้เวลาการเปลี่ยนสีของเมทิลีนบลู (Methylene blue) มากกว่าสี่ชั่วโมง หรือมีการเปลี่ยนสีของริซาซูลิน (Resazurin) ที่หนึ่งชั่วโมงไม่น้อยกว่า เกรด 4.5
8. มีจำนวนเซลล์โซมาติกหรือเซลล์ร่างกาย (Somatic cell) ไม่เกิน 500,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (Cells/ml)
9. ปริมาณโปรตีน ไม่ต่ำกว่า 3.00% โดยน้ำหนัก
10. ปริมาณไขมัน ไม่ต่ำกว่า 3.35% โดยน้ำหนัก
11. ปริมาณเนื้อนมไม่รวมไขมันหรือของแข็งไม่รวมไขมันนม (Milk solids not fat) ไม่ต่ำกว่า 8.25% โดยน้ำหนัก (มกษ. 6003-2553)

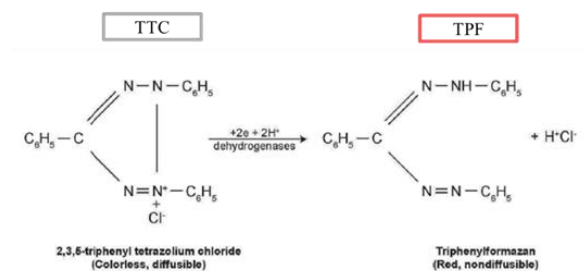
นมผง หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำนมสด ครีม หางนมหรือเวย์มาระเหยน้ำออกจนได้เป็นนมผง (บุญศรี. 2553) ซึ่งวิธีการพื้นฐานสำหรับการผลิตนมผงในระดับอุตสาหกรรมมี 2 วิธี คือ การผลิตนมผงด้วยเครื่องทำแห้งแบบลูกกลิ้ง (Roller drying) และการผลิตนมผงด้วยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย (Spray drying) โดยกระทรวงสาธารณสุข (2547) จำแนกประเภทนมผงตามปริมาณไขมันเนยไว้ 3 ประเภท ดังนี้ 1. นมผงชนิดเต็มไขมันเนย (Whole milk powder) มีไขมันเนยไม่น้อยกว่าร้อยละ 26 ของน้ำหนัก 2. นมผงชนิดพร่องไขมันเนย (Partly skim milk powder) มีไขมันเนยมากกว่าร้อยละ 1.5 ของน้ำหนัก แต่ไม่ถึงร้อยละ 26 ของน้ำหนัก และ 3. นมผงขาดไขมันเนย (Skim milk powder) มีไขมันเนยไม่เกินร้อยละ 1.5 ของน้ำหนัก (ปิยวรรณ. 2556) จะเห็นได้ว่าในกระบวนการแปรรูปน้ำนมดิบให้เป็นนมผงแต่ละประเภคนั้นมีความจำเป็นในการใช้ความร้อนเข้ามาเกี่ยวข้อง ซึ่งจะนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของน้ำนมดิบ ดังนั้น ด้วยหลักการดังกล่าวจึงมีการนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบการปลอมปนนมผงมาในน้ำนมดิบ

ปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Maillard reaction) เป็นปฏิกิริยาที่เกิดจากหมู่คาร์บอนิล (Carbonyl group) ในสารประกอบพวก Sugars, Aldehydes และ Ketones ทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโน (Amino group) ในสารประกอบพวก Amino acids, Peptides, Proteins และ Amine compounds ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารให้สีน้ำตาลเรียกว่า สารประกอบเมลานอยดิน (Melanoidin) โดยเกิดปฏิกิริยาจะขึ้นอยู่กับค่าพีเอช อุณหภูมิ และระยะเวลาการให้ความร้อน และปริมาณน้ำที่มีอยู่ในปฏิกิริยา (จักรพันธ์. 2559) ดังนั้น สารประกอบต่างๆ ที่ได้จากปฏิกิริยาเมลลาร์ด จึงนิยมนำมาเป็นตัวชี้วัดคุณภาพของอาหารอย่างแพร่หลาย เช่น สารฟูโรซินซึ่งเป็นสารประกอบประเภท Deoxyketones ที่เกิดจากปฏิกิริยา Acid hydrolysis ของสาร Lactulosyl-L-lysine o เมื่อน้ำนมโค (นมดิบ) ผ่านกรรมวิธีฆ่าเชื้อด้วยความร้อน ยิ่งใช้อุณหภูมิสูงจะมีการรวมตัวของกรดอะมิโน-ไลซีนและน้ำตาลแลคโตสในนมเกิดเป็นสาร Lactulosyl-L-lysine มากขึ้น ซึ่งทำให้ตรวจวิเคราะห์พบสารฟูโรซินได้สูงขึ้น อย่างไรก็ตาม วิธีวิเคราะห์ฟูโรซินในห้องปฏิบัติการมีหลายวิธี ได้แก่ HPLC-UV-detector , Capillary electrophoresis และ Fluorometry (วันทนิย์ และคณะ. 2551)



รูปที่ 1: การปฏิกิริยาเมลลาร์ด เป็นการรวมตัวระหว่างน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing Sugar) กับกรดอะมิโน (R-Lysine) ได้ผลิตภัณฑ์ที่เรียกว่า Addition compound ซึ่งจะเกิดการสูญเสียอย่างรวดเร็ว เกิดเป็น Schiff's base จากนั้นมีการจัดเรียงตัวใหม่แบบ Amadori rearrangement ได้ 1-amino-1-deoxy-2-ketose และเมื่อทำการ Hydrolysis โครงสร้างของ Amadori ด้วยกรดเข้มข้น จะทำให้เกิด Furosine (ฟูโรซิน) ซึ่งเป็นสารในกลุ่มกรดอะมิโน (Gökmen et al., 2008)

เตตราโซเลียมคลอไรด์ 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) เป็นสีย้อมที่นิยมใช้ในงานวิทยาศาสตร์อย่างกว้างขวาง และหลากหลายด้าน เช่น การแพทย์ เกษตวิทยา ภูมิคุ้มกันวิทยา และพิษศาสตร์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในด้านชีวเคมีและฮิสโตเคมี การทดสอบนี้ใช้หลักการเปลี่ยนสีของ TTC จากของเหลวไม่มีสี เปลี่ยนเป็นสารละลายสีแดง Triphenylformazan (TPF) เมื่อมีการรับโปรตอนจาก Reduction system (Moussa et al., 2013)



รูปที่ 2: ปฏิกิริยา Tetrazolium/formazan เป็นการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ TTC เป็น TPF เมื่อเกิดปฏิกิริยา Reduction ในระบบ ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงจากสารละลายใส ไม่มีสี เป็นสารละลายสีแดง (de Barros et al., 2019)

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาและพัฒนาวิธีการตรวจสอบการปลอมปนนมผงในน้ำนมดิบ ที่สามารถแสดงผลการวิเคราะห์ได้ทั้งในเชิงคุณภาพและปริมาณ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของวิธีทดสอบให้เป็นที่น่าเชื่อถือมากขึ้น

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เพื่อใช้เป็นวิธีตรวจสอบการปลอมปนนมผงในน้ำนมดิบที่มีการรายงานผลการปลอมปนในเชิงคุณภาพและปริมาณ

เครื่องมือและอุปกรณ์วิทยาศาสตร์

1. Erlenmeyer flask ขนาด 100, 250, 500, 1,000 และ 4000 mL
2. Test tube ขนาด 15 x 100 mm
3. Funnel (กรวยกรอง)
4. Beaker ขนาด 50, 100, 500 และ 1,000 mL
5. Volumetric flask ขนาด 10, 25, 100, 250, 500 และ 1,000 mL
6. Micropipette ขนาด 1 และ 5 mL
7. Pipette tip ขนาด 1 และ 5 mL
8. Round filters paper white band 2 ขนาด 150 mm
9. Glass Stirring rod (แท่งแก้วคนสาร)
10. Spatula (ช้อนตักสาร)
11. Wash bottle (ขวดฉีดน้ำกลั่น)
12. Parafilm (พาราฟิล์ม)
13. Timer (นาฬิกาจับเวลา)
14. ขวดแก้วขนาด 250 – 500 mL ภาชนะสำหรับรองน้ำล้างตะกอน
15. ขวดแก้วฝาเกลียวสีขาว ขนาด 150 mL
16. Litmus Paper (กระดาษลิตมัส)
17. Aluminum foil (อลูมิเนียมฟอยล์)
18. Vortex (เครื่องผสมสาร)
19. Water bath (อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ)
20. Test tube screw cap ขนาด 25 mL
21. Electronic balance (เครื่องชั่ง) ความละเอียด 3 และ 5 ตำแหน่ง
22. เครื่อง HPLC ยี่ห้อ Agilent รุ่น 1200
 - 22.1 เครื่องตรวจวัดสารชนิด Photodiode Array Detector
 - 22.2 Column Furosine dedicated ยี่ห้อ Grace ขนาด 250 x 4.6 มิลลิเมตร
Particle size 5 μ m

23. Hot air oven (ตู้อบลมร้อน)
24. Fume hood (ตู้ดูดไอสาร)
25. Ultrasonic cleaner (เครื่องล้างความถี่สูง)
26. Vacuum Manifold (ชุดกรองสารละลายเคลื่อนที่)
27. Filter paper (กระดาษกรอง)
28. Bottle ขนาด 500, 1,000 และ 2000 mL
29. Nylon syringe filter ขนาด 0.2 μm
30. Nylon Membrane filter ขนาด 0.2 μm
31. Disposable syringe ขนาด 3 mL
32. Vial ขนาด 3 mL
33. Solid Phase Extraction C18
34. Nitrogen (ก๊าซไนโตรเจน)

สารเคมีและสารมาตรฐาน

1. Glacial acetic acid, AR grade
2. Urea, AR grade
3. Sodium hydroxide, AR grade
4. Triphenyltetrazolium chloride (TTC), AR grade
5. Skimmed milk powder
6. 1-Butanol, AR grade
7. Hydrochloric acid, AR grade
8. Acetic acid HPLC grade
9. Potassium chloride, AR grade
10. Furosine Dihydrochloride
11. DI water (น้ำปราศจากอิออน)
12. Reverse osmosis water (น้ำกลั่น)

วิธีดำเนินการ

1. การวิเคราะห์ปริมาณ Deoxyketones ด้วยวิธีที่อ้างอิงจาก Nestle Laboratory Instruction (2001)

1.1 ปิเปตตัวอย่างน้ำมัน 10 mL ใส่ในหลอดแก้วฝาปิด ขนาด 25 mL เติมสารละลาย 10% Acetic acid ปริมาตร 1 mL เขย่าเบาๆ ให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วนำไปอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 40 °C เป็นเวลา 10 นาที ระหว่างที่อุ่นต้องหมั่นเขย่าเบาๆ ให้เข้ากัน

1.2 กรองตะกอนด้วยกระดาษกรองและล้างตะกอนด้วยน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 40 °C เพื่อชะล้าง 10% Acetic acid จนกระทั่งค่า pH เป็นกลาง (ทดสอบโดยใช้กระดาษลิตมัส) จากนั้นตากตะกอนประมาณ 30 นาที

1.3 ชั่งตะกอนที่ได้ประมาณ 0.500 ± 0.05 g ใส่หลอดทดลอง จากนั้นเติม Saturated urea solution ปริมาตร 5 mL เขย่าให้ตะกอนแตกตัวด้วยเครื่อง Vortex นำไปอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 40 °C นาน 5 นาที แล้วเขย่าให้เข้ากัน

1.4 เติม 1 mL TTC alkaline เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex จากนั้นนำไปอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 40 °C นาน 10 นาที แล้วอ่านผลทันทีโดยเปรียบเทียบความเข้มของสีที่เกิดขึ้นกับหลอดตัวอย่างควบคุม Positive และ Negative

2. การสกัดและวิเคราะห์ปริมาณสาร Formazan ด้วยเครื่อง UV Spectrophotometer

2.1 ปิเปตตัวอย่างวิเคราะห์ที่ได้จากการทดลอง 1.4 ใส่หลอด Falcon tube จากนั้นเติมสารละลาย 1-Butanol ในอัตราส่วนที่เหมาะสม แล้วผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex

2.2 แยกส่วนใสด้วยการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifugation

2.3 ปิเปตส่วนใสย้ายใส่หลอดทดลองใหม่ เพื่อรอนำไปวิเคราะห์ค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 480 nm

3. การสร้างกราฟของสารมาตรฐาน Formazan จากการปลอมปนนมผงที่ความเข้มข้น 0-5 และ 0-10 %

3.1 เตรียมนมผง Skim milk ที่ความเข้มข้น 10% โดยการชั่งผง Skim milk ปริมาณ 10g ละลายในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 40 °C ปริมาตร 90 mL ผสมจนกระทั่งผง Skim milk ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

3.2 เตรียมตัวอย่างน้ำมันตามการปลอมปนนมผงที่ความเข้มข้น 0-5 และ 0-10% โดยมีปริมาตรรวมทั้งหมด 10 mL ปิเปตตัวอย่างน้ำมันดิบเติมลงในหลอดแก้วฝาปิด ขนาด 25 ml และเติมสารละลาย Skim milk ที่ความเข้มข้น 10% ตามปริมาตรที่แสดงดังตารางที่ 1-2

ตารางที่ 1: แสดงอัตราส่วนของสารละลายนมผง Skim milk ต่อน้ำนมดิบที่การปลอมปนนมผงที่ความเข้มข้น 0-5%

ความเข้มข้นของการปลอมปนนมผง (Skim milk)	สารละลายนมผง (Skim milk) ที่ความเข้มข้น 10% (mL)	น้ำนมดิบ (mL)
0%	-	10
1%	1	9
2%	2	8
3%	3	7
4%	4	6
5%	5	5

ตารางที่ 2: แสดงอัตราส่วนของสารละลายนมผง Skim milk ต่อน้ำนมดิบที่การปลอมปนนมผงที่ความเข้มข้น 0-10%

ความเข้มข้นของการปลอมปนนมผง (Skim milk)	สารละลายนมผง (Skim milk) ที่ความเข้มข้น 10% (mL)	น้ำนมดิบ (mL)
0%	-	10
2%	2	8
4%	4	6
6%	6	4
8%	8	2
10%	10	-

4. การวิเคราะห์หาปริมาณ Furosine (ฟูโรซีน) ในนํ้านมดิบ ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (ISO 18329)

4.1 การเตรียมสารเคมี

4.1.1 9 M Hydrochloric acid

ตวง Hydrochloric acid ปริมาตร 375 mL ลงใน volumetric flask ขนาด 500 mL ที่มีย่น้ำ DI ปริมาตร 125 mL

4.1.2 3 M Hydrochloric acid

ตวง Hydrochloric acid ปริมาตร 125 mL ลงใน volumetric flask ขนาด 500 mL ที่มีย่น้ำ DI ปริมาตร 375 mL

4.1.3 0.1 M Hydrochloric acid

ปิเปต Hydrochloric acid ปริมาตร 4.2 mL ลงใน volumetric flask ขนาด 500 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI ให้ครบ 500 mL

4.1.4 Elute acetic acid

ปิเปต Acetic acid ปริมาตร 4 mL ลงใน volumetric flask ขนาด 1,000 mL ที่มีย่น้ำ DI 100 mL แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 mL

4.1.5 Potassium chloride

ชั่ง Potassium chloride ปริมาณ 3.000 g ละลายด้วยสารละลายในข้อ 3. ปรับปริมาตรให้ครบ 1000 mL

4.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Furosine dihydrochloride

4.2.1 ชั่งสารมาตรฐาน Furosine dihydrochloride ปริมาณ 5.000 mg ลงใน volumetric flask ขนาด 10 mL ละลายด้วย 3 M Hydrochloric acid และปรับปริมาตรให้ครบ 10 mL เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน จะได้สารละลายมาตรฐาน Furosine dihydrochloride ความเข้มข้น 500 ppm

4.2.2 ปิเปตสารละลายในข้อ 8.4.2.1 มาปริมาตร 0.6 mL ลงใน volumetric flask ขนาด 10 mL ละลายด้วย 0.1 M Hydrochloric acid และปรับปริมาตรให้ครบ 10 mL เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน จะได้สารละลายมาตรฐาน Furosine dihydrochloride ความเข้มข้น 30 ppm

4.2.3 ปิเปตสารละลายในข้อ 8.4.2.2 มาปริมาตร 0.17, 0.27, 0.5, 0.67 และ 1.350 mL ลงใน volumetric flask ขนาด 10 mL ละลายด้วย 0.1 M Hydrochloric acid และปรับปริมาตรให้ครบ 10 mL เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน จะได้สารละลายมาตรฐาน Furosine dihydrochloride ความเข้มข้น 0.5, 0.8, 1.5, 2 และ 4 ppm

4.3 เตรียมตัวอย่างวิเคราะห์

4.3.1 ปิเปตตัวอย่างนํ้านม 2 mL ใส่ในหลอดแก้วทนความร้อน เติม 9 M HCl ปริมาตร 6 mL ปิดฝาขวดและเขย่า (เตรียมตัวอย่างในตู้ดูดควัน)

4.3.2 นำตัวอย่างไปผ่านก๊าซไนโตรเจน 2 นาที แล้วปิดฝาขวดให้สนิท

4.3.3 นำตัวอย่างเข้าตู้อบแห้ง ที่อุณหภูมิ 110 ± 2 °C เป็นเวลา 23 ชั่วโมง (ครบ 1 ชั่วโมง ให้นำหลอดตัวอย่างออกมาเขย่าเบาๆ) และนำเข้าตู้อบจนครบ 23 ชั่วโมง

4.3.4 เมื่อครบ 23 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเทใส่ขวดปรับปริมาตร ขนาด 10 mL และปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI

4.3.5 นำสารละลายตัวอย่างมากรองผ่านกระดาษกรอง เบอร์ 1

4.3.6 นำสารละลายตัวอย่างในข้อ 4.3.5 มาสกัดด้วยวิธี Solid – phase extraction (SPE) ขั้นตอนดังนี้

1. Conditioning : ปิเปต Methanol 5 mL ลงใน Seppak และตามด้วยน้ำ DI 10 mL ไม่ให้ cartridge แห้ง
2. Loading : ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 5 mL ลงใน Seppak ปล่อยออกช้าๆ
3. Elute : ปิเปต 3 M Hydrochlorine acid ปริมาตร 3 mL ลงใน Seppak ปล่อยออกช้าๆ

4.3.7 นำส่วนใสที่ผ่าน seppak มากรองด้วย filter membrane syringe ชนิด nylon ขนาด 0.2 μ m

4.3.8 นำตัวอย่างไปฉีด HPLC ตามสภาวะเครื่องมือดังนี้

Column : Furosine dedicated Column ยี่ห้อ Grace ขนาด 250 X 4.6 mm

Mobile phase : Solvent A = 0.4 % Acetic acid

Solvent B = 0.3 % Potassium chloride in Solvent A

Flow rate : 1.2 mL/min

Detector : UV Detector 280 nm

Column temp : 34 °C

Injection : 50 μ l

Run time : 28 min

ตารางที่ 3 :แสดงอัตราส่วน Mobile phase

Time (min)	Solvent A %	Solvent B %
0	100	0
12.5	100	0
19.5	50	50
22.0	50	50
24.0	100	0
28.0	100	0

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การวิเคราะห์ปริมาณ Deoxyketones ด้วยวิธีที่อ้างอิงจาก Nestle Laboratory Instruction (2001)

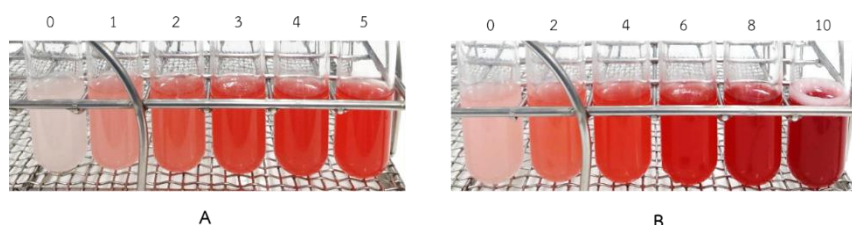
วิเคราะห์สีที่เกิดขึ้นในแต่ละหลอดตัวอย่างน้ำนมดิบหลังการวิเคราะห์ปริมาณ Deoxyketones เปรียบเทียบกับหลอดทดสอบควบคุม (Control) หลอดที่ 1 คือ Strongly positive (5% Skim milk powder) หลอดที่ 2 คือ Positive control (1% Skim milk powder) หลอดที่ 3 คือ Negative control (ตัวอย่างที่แน่ใจว่าไม่มีการเติมนมผง) ในกรณีที่ตัวอย่างที่วิเคราะห์แสดงสีเข้มเท่ากับหรือมากกว่าหลอด Positive control จะรายงานผลตัวอย่างดังกล่าวเป็นตัวอย่าง Positive จากนั้นนำตัวอย่างดังกล่าวไปยืนยันผลปริมาณของฟูโรซินด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) เป็นลำดับต่อไป



รูปที่ 3: ตัวอย่างผลการวิเคราะห์ปริมาณ Deoxyketones ด้วยวิธีที่อ้างอิงจาก Nestle Laboratory Instruction (2001)

2. การสร้างกราฟสารมาตรฐาน Formazan จากการปลอมปนนมผงที่ความเข้มข้น 0-5 และ 0-10%

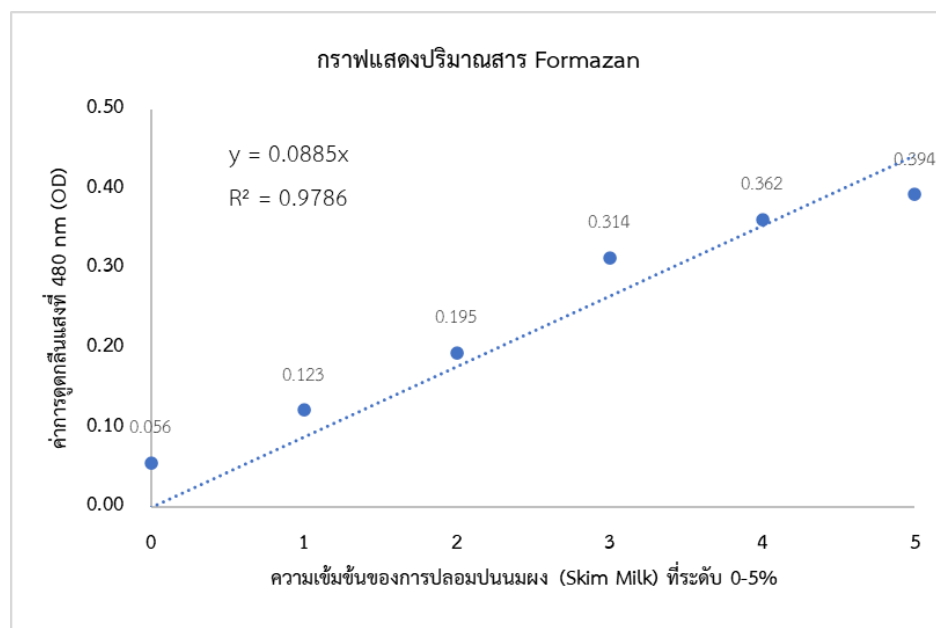
จากการวิเคราะห์เชิงคุณภาพของ Deoxyketones ด้วยวิธีที่อ้างอิงจาก Nestle Laboratory Instruction (2001) โดยใช้หลักการการเกิดสีจากปฏิกิริยา Tetrazolium/formazan เป็นการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ TTC เป็น TPF เมื่อเกิดปฏิกิริยา Reduction ในระบบ ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงจากสารละลายใส ไม่มีสี เป็นสารละลายสีแดง (de Barros et al., 2019) เมื่อมีการเตรียมตัวอย่างน้ำนมที่มีการปลอมปนนมผงที่ความเข้มข้น 0-5 และ 0-10% และนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีอ้างอิง ผลการทดลองพบว่า ลักษณะการเกิดสีของตัวอย่างวิเคราะห์มีความสัมพันธ์กับระดับความเข้มข้นของการปลอมปนนมผงที่กำหนด คือเมื่อมีการปลอมปนนมผงในปริมาณที่มากขึ้นทำให้เกิดสีที่เข้มมากขึ้นตามลำดับ ดังแสดงในรูป 4 แต่อย่างไรก็ตาม ในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพไม่สามารถระบุปริมาณที่แตกต่างกันอย่างแน่นอนได้



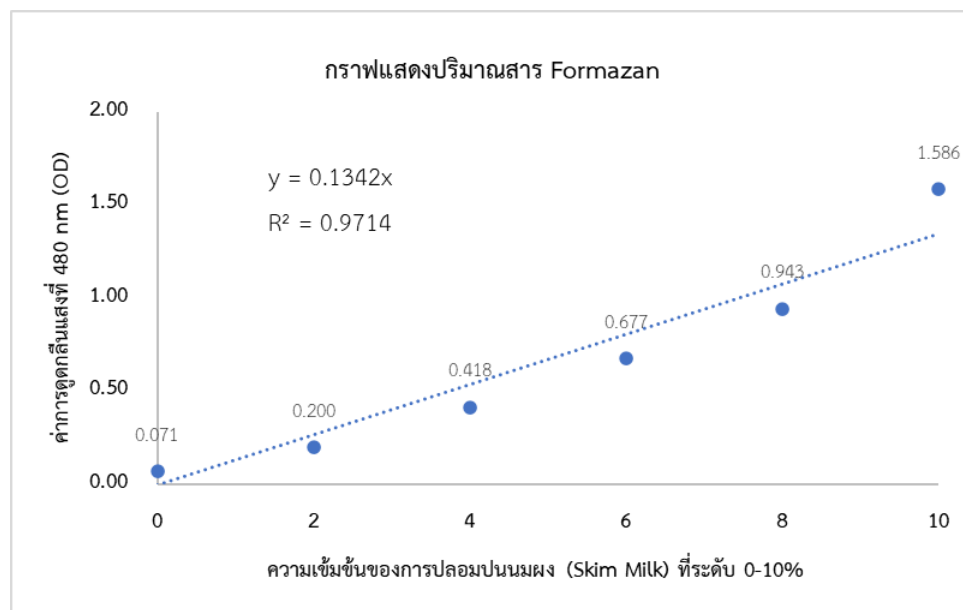
รูปที่ 4: แสดงสีของตัวอย่างน้ำนมที่มีการปลอมปนนมผงที่ความเข้มข้น 0-5% (A) และ 0-10% (B) หลังจากการวิเคราะห์ Deoxyketones ด้วยวิธีที่อ้างอิงจาก Nestle Laboratory Instruction (2001)

ดังนั้น เพื่อให้สามารถระบุปริมาณสีที่เกิดขึ้นในเชิงปริมาณ จึงนำตัวอย่างน้ำมันหลังการวิเคราะห์ Deoxyketones ไปสกัด Formazan ด้วยสารละลาย 1-Butanol ด้วยวิธีในข้อ 2 แล้วนำไปวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 480 nm ทำการทดลองจำนวน 2 ครั้ง แล้วนำค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ได้ไปสร้างกราฟของสารมาตรฐาน Formazan ผลการทดลองพบว่า ในตัวอย่างน้ำมันที่การปลอมปนนมผง Skim milk ที่ความเข้มข้น 0, 1, 2, 3, 4 และ 5% (0-5%) สามารถวัดปริมาณ Formazan เท่ากับ 0.056, 0.123, 0.195, 0.314, 0.362 และ 0.394 OD ตามลำดับ แสดงค่า Coefficient of determination (R^2) ที่ 0.9786 (กราฟที่ 1) และที่ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8 และ 10% (0-10%) เท่ากับ 0.071, 0.200, 0.418, 0.677, 0.943 และ 1.586 OD ตามลำดับ แสดงค่า Coefficient of determination (R^2) ที่ 0.9714 ดังนั้น ผลการทดลองแสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณการปลอมปนนมผง Skim milk และปริมาณของ Formazan ที่เกิดขึ้นว่ามีความสอดคล้องกัน คือ เมื่อมีการปลอมปนนมผง Skim milk ในปริมาณที่มากขึ้น จะส่งผลต่อปริมาณของ Formazan ที่เพิ่มสูงขึ้น ตามลำดับ จากการศึกษาของ ญัฐพล และคณะ. 2548 พบว่าปริมาณของเนื้อมันไม่รวมมันเนยหรือของแข็งไม่รวมไขมันนม (solids not fat) และโปรตีน (Protein) ในน้ำมันดิบ มีความสัมพันธ์ในทิศทางเดียวกันกับปริมาณของการเกิด Deoxyketones โดยผลการวิเคราะห์ดังกล่าวแสดงเป็นค่าการดูดกลืนแสงที่ 480 นาโนเมตร (OD) เช่นเดียวกัน

กราฟที่ 1: กราฟของสารมาตรฐาน Formazan ของตัวอย่างน้ำมันที่มีการปลอมปนนมผง Skim milk ที่ความเข้มข้น 0-5%



กราฟที่ 2: กราฟของสารมาตรฐาน Formazan ของตัวอย่างน้ำนมที่มีการปลอมปนนมผง Skim milk ที่ความเข้มข้น 0-10%

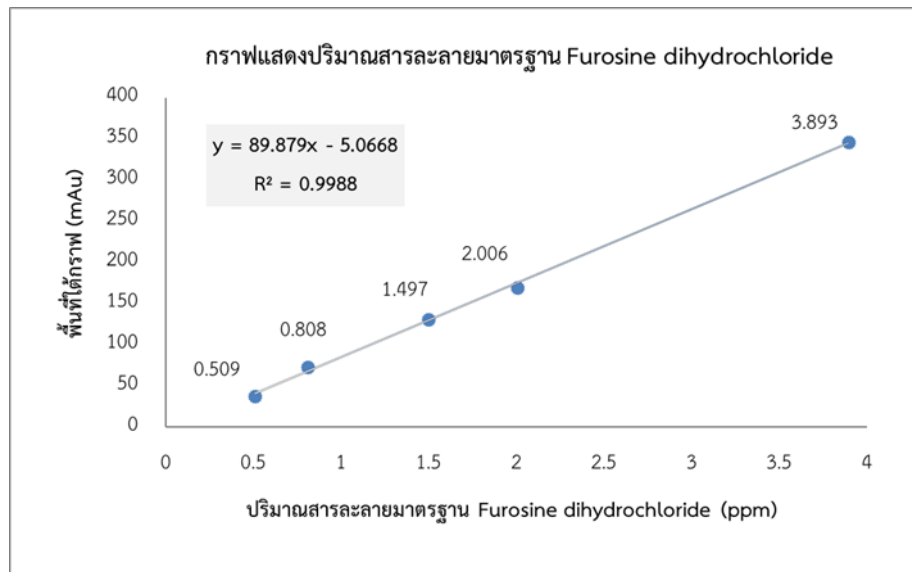


4. การวิเคราะห์หาปริมาณ Furosine (ฟูโรซีน) ในน้ำนมดิบ ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Furosine เป็นสารประกอบประเภท Deoxyketones ที่เกิดจากปฏิกิริยา Acid hydrolysis ของสาร Lactulosyl-L-lysine เมื่อผ่านความร้อน (นมดิบ) ผ่านกรรมวิธีฆ่าเชื้อด้วยความร้อน อย่างไรก็ตาม วิธีวิเคราะห์ฟูโรซีนในห้องปฏิบัติการมีหลายวิธี ได้แก่ HPLC-UV-detector, Capillary electrophoresis และ Fluorometry (วันทนี และคณะ, 2551). นมผง หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำนมสด ครีม หางนมหรือเวย์มาระเหยน้ำออกจนได้เป็นนมผง (บุญศรี, 2553) ซึ่งวิธีการพื้นฐานสำหรับการผลิตนมผงในระดับอุตสาหกรรมมี 2 วิธี คือ การผลิตนมผงด้วยเครื่องทำแห้งแบบลูกกลิ้ง (roller drying) และการผลิตนมผงด้วยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray drying) (ปิยวรรณ, 2556) จะเห็นได้ว่าในกระบวนการแปรรูปน้ำนมดิบให้เป็นนมผงนั้นมีความจำเป็นในการใช้ความร้อนเข้ามาเกี่ยวข้อง ซึ่งจะนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของน้ำนมดิบ ดังนั้น ด้วยหลักการดังกล่าวจึงมีการนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบการปลอมปนนมผงมาในน้ำนมดิบ

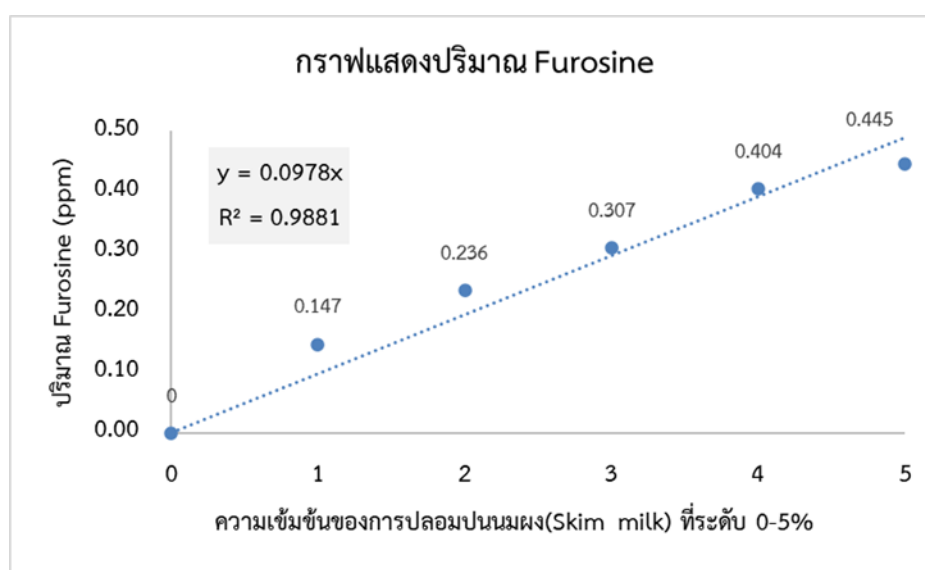
เทคนิค HPLC ถูกนำมาใช้วิเคราะห์ตัวอย่างน้ำนมที่มีการปลอมปนนมผง Skim milk ที่ความเข้มข้น 0-5% และ 0-10% เพื่อหาปริมาณ Furosine ที่ระดับความเข้มข้นในหน่วย ppm โดยอ้างอิงความเข้มข้นของ Furosine จากจากกราฟแสดงสารละลายมาตรฐาน Furosine dihydrochloride ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5, 0.8, 1.5, 2.0 และ 4.0 ppm ซึ่งผลการทดลองแสดงค่า Coefficient of determination (R^2) เท่ากับ 0.9988 (กราฟที่ 3)

กราฟที่ 3: กราฟแสดงปริมาณสารละลายมาตรฐาน Furosine dihydrochloride ที่ความเข้มข้นตั้งต้น 0.5, 0.8, 1.5, 2.0 และ 4.0 ppm

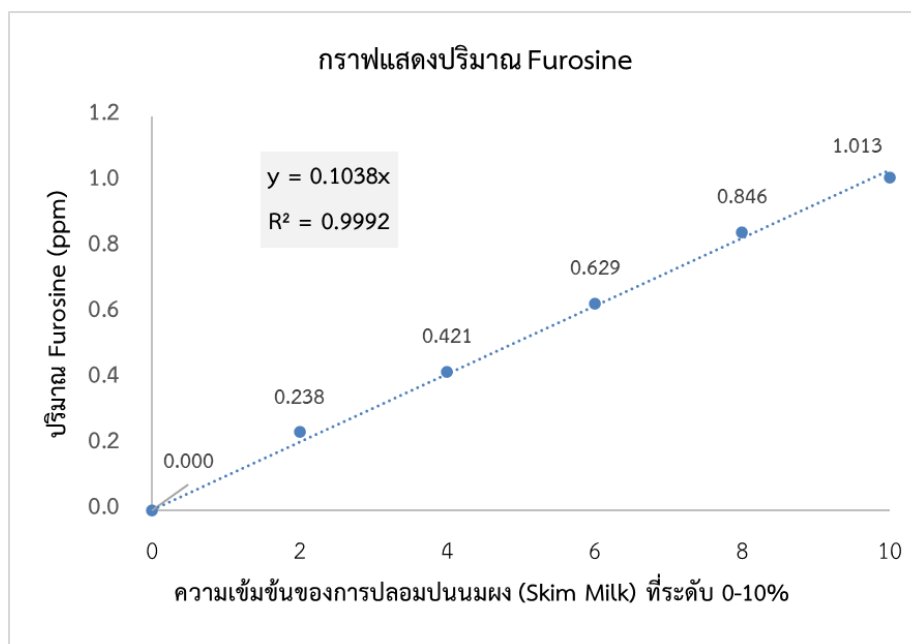


จากการทดลองสามารถตรวจสอบปริมาณของ Furosine ในตัวอย่างน้ำนมที่การปลอมปนนมผง Skim milk ที่ความเข้มข้น 0, 1, 2, 3, 4 และ 5% (0-5%) เท่ากับ 0, 0.147, 0.236, 0.307, 0.404 และ 0.445 ppm ตามลำดับ แสดงค่า Coefficient of determination เท่ากับ 0.9881 (กราฟที่ 4) และที่ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8 และ 10% (0-10%) เท่ากับ 0, 0.24, 0.42, 0.63, 0.85 และ 1.01 ppm ตามลำดับ แสดงค่า Coefficient of determination (R^2) เท่ากับ 0.9992 (กราฟที่ 5) ดังนั้น ผลการทดลองแสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณการปลอมปนนมผง Skim milk และปริมาณของ Furosine ที่เกิดขึ้นว่ามีความสอดคล้องกัน คือ เมื่อมีการปลอมปนนมผง Skim milk ในปริมาณที่มากขึ้น จะส่งผลต่อปริมาณของ Furosine ที่เพิ่มสูงขึ้น ตามลำดับ

กราฟที่ 4: กราฟแสดงปริมาณ Furosine ในตัวอย่างน้ำนมที่การปลอมปนนมผง Skim milk ที่ความเข้มข้น 0-5%



กราฟที่ 5: กราฟแสดงปริมาณ Furosine ในตัวอย่างน้ำนมที่มีการปลอมปนนมผง Skim milk ที่ความเข้มข้น 0-10%



สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาการปลอมปนนมผงในน้ำนมดิบ โดยการวิเคราะห์ปริมาณสาร Deoxyketones ด้วยวิธีที่อ้างอิงจาก Nestle Laboratory Instruction (2001) นั้น เป็นวิธีการตรวจสอบเชิงคุณภาพที่สามารถใช้ในการตรวจสอบการปลอมปนนมผงในน้ำนมดิบแบบเบื้องต้นได้ ดังนั้น เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของวิธีทดสอบจึงมีการพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชิงปริมาณขึ้น ทั้งการวิเคราะห์ปริมาณ Formazan (OD) โดยใช้หลักการของการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 480 nm ทำให้สามารถสร้างกราฟของสารมาตรฐาน Formazan ในตัวอย่างน้ำนมที่มีการปลอมปนนมผง Skim milk ที่ความเข้มข้น 0-5% และ 0-10% โดยแสดงค่า Coefficient of determination (R^2) ที่ 0.9786 และ 0.9714 ตามลำดับ และการวิเคราะห์ปริมาณ Furosine เทคนิค HPLC ที่ระดับความเข้มข้นในหน่วย ppm โดยอ้างอิงจากกราฟแสดงสารละลายมาตรฐาน Furosine dihydrochloride ที่ความเข้มข้นตั้งต้น 0.5, 0.8, 1.5, 2.0 และ 4.0 ppm ที่แสดงค่า Coefficient of determination (R^2) เท่ากับ 0.9988 จากการทดลองสามารถตรวจสอบปริมาณของ Furosine ในตัวอย่างน้ำนมที่มีการปลอมปนนมผง Skim milk ที่ความเข้มข้น 0, 1, 2, 3, 4 และ 5% (0-5%) เท่ากับ 0, 0.147, 0.236, 0.307, 0.404 และ 0.445 ppm ตามลำดับ แสดงค่า Coefficient of determination (R^2) เท่ากับ 0.9881 และที่ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8 และ 10% (0-10%) เท่ากับ 0, 0.24, 0.42, 0.63, 0.85 และ 1.01 ppm ตามลำดับ แสดงค่า Coefficient of determination (R^2) เท่ากับ 0.9992 ดังนั้น จากผลการทดลองสรุปว่า ปริมาณของ Formazan และ Furosine ที่ตรวจวิเคราะห์ได้ มีความสอดคล้องกับปริมาณการปลอมปนนมผง Skim milk ในตัวอย่างน้ำนม ดังนั้น จากความสัมพันธ์ดังกล่าวทำให้สามารถนำกราฟของสารมาตรฐานของทั้ง Formazan และ Furosine ไปใช้เป็นตัวบ่งชี้ปริมาณการปลอมปนนมผงในน้ำนมดิบต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ นายเลิศชัย จินตพิทักษ์สกุล ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ที่สนับสนุนการศึกษาครั้งนี้ นางสาวเนาวรัตน์ กำภูศิริ หัวหน้ากลุ่มตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นม ที่อนุมัติหัวข้อ การพัฒนาวิธีตรวจสอบการปลอมปนนมผงในน้ำนมดิบทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณ อีกทั้งคอยให้คำปรึกษาและติดตามการดำเนินงานตลอดจนเสร็จสิ้น นางสาวมิตา เหลืองประเสริฐ นางสาวกมลวรรณ ศรีดาวงษ์ นางสาวมิ่งตาน อ้อสงษ์ นางสาววิสุมน บางเมือง ที่สนับสนุนด้านการทดลอง และการวิเคราะห์ตัวอย่าง รวมถึงบุคลากรทุกท่านในกลุ่มตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นมที่ช่วยให้การศึกษาในครั้งนี้ประสบความสำเร็จ ครบถ้วนตรงตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้

เอกสารอ้างอิง

- จักรพันธ์ ต้นสุวรรณ. (2559) คุณลักษณะทางเคมีกายภาพของน้ำตาลไอและปัจจัยการผลิตที่ส่งผลต่อคุณสมบัติทางกายภาพของผลิตภัณฑ์น้ำตาลมะพร้าว. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยศิลปากร. นครปฐม: 65 หน้า
- บุญศรี จงเสรีจิตต์. (2553). จุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์นม. นครปฐม: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- ปิยวรรณ ศุภวิทย์พัฒนา. (2556). เอกสารประกอบการสอนรายวิชา เทคโนโลยีนมและผลิตภัณฑ์. มหาวิทยาลัยราชภัฏวิบูลสงคราม.
- วันทนีย์ ขำเลิศ, กิติมา โสนะมิตร และนิภาภรณ์ ลักษณะสมยา. (2551). พูโรซิน : ดัชนีชี้บ่งคุณลักษณะของนมพาสเจอร์ไรส์. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. ปีที่ 50 ฉบับที่ 2 ; 124-132
- ณัฐพล บำรุงเกียรติ, ประวีร์ วิชชุดา, พรศรี ชัยรัตนยุทธ์ และ สมจิต สุรพัฒน์. (2548). อิทธิพลของความร้อนต่อปริมาณ Deoxyketones ในน้ำนม. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. น้ำนมดิบ. (2553).
- de Barros França-Neto, J., & Krzyzanowski, F. C. (2019). Tetrazolium: an important test for physiological seed quality evaluation1. *Journal of Seed Science*, 41(3), 359-366.
- Gökmen, V., Serpen, A., Açar, Ö. Ç., & Morales, F. J. (2008). Significance of furosine as heat-induced marker in cookies. *Journal of Cereal Science*, 48(3), 843-847.
- ISO 18329 / IDF 193: Milk and Milk products-determination of Furosine content-Ion-pair reverse phase high-performance liquid chromatography method. Geneva: International Organization for Standardization.
- Moussa, S. H., Tayel, A. A., Al-Hassan, A. A., & Farouk, A. (2013). Tetrazolium/formazan test as an efficient method to determine fungal chitosan antimicrobial activity. *Journal of Mycology*, 2013.
- Nestle Laboratory Instruction 2001. Fresh milk Detection of added milk powder. Nestle.Ltd.