

การพัฒนาการตรวจหาปริมาณฟูโรซินในน้ำนมดิบด้วยวิธี
lon-pair reverse-phase high-performance liquid chromatography
เนาวรัตน์ กำภูศิริ รมิตา เหลืองประเสริฐ และ กมลวรรณ ศรีดาวงค์

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณฟูโรซินในน้ำนมดิบ โดยใช้เทคนิค lon-pair reverse-phase high-performance liquid chromatography (IP-RP HPLC) โดยอาศัยหลักการที่ว่า ฟูโรซินเป็นสารประกอบที่เกิดจากการสลายตัวของสาร Amadori (ϵ -deoxy-fructosyllysine) ซึ่งเป็นผลผลิตเริ่มต้นของปฏิกิริยา Maillard ในระหว่างกระบวนการให้ความร้อนแก่น้ำนม ดังนั้นการตรวจพบฟูโรซินจึงสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงการให้ความร้อน (thermal damage) ในผลิตภัณฑ์นม วิธีการพัฒนาเป็นไปตามแนวทางของมาตรฐาน ISO 18329 เรื่อง Milk and milk products—Determination of furosine content—lon-pair reverse-phase high-performance liquid chromatography method ผลการทดลองพบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความแม่นยำสูง โดยกราฟมาตรฐานฟูโรซินมีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (R^2) ที่ 0.9988 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ($R^2 \geq 0.995$) และค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (RSD) ของพื้นที่ใต้พีค และ Retention time สำหรับ System suitability ไม่เกิน 2.5% นอกจากนี้ยังมีการนำวิธีนี้ไปวิเคราะห์ตัวอย่างนมที่สงสัยว่าผ่านการให้ความร้อนหรือมีการปลอมปน พบว่ามีตัวอย่างจำนวนมากที่ตรวจพบฟูโรซินในปริมาณต่าง ๆ ซึ่งยืนยันว่าวิธีนี้สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างจริงได้

Development of a Method for Furosine Quantification in Raw Milk Using Ion-pair Reverse-phase High-Performance Liquid Chromatography

Naovarat Kamposiri, Ramida Luangprasert and Kamolwan Sidawong

Abstract

This research aimed to develop and validate an analytical method for furosine quantification in raw milk using Ion-pair Reverse-phase High-Performance Liquid Chromatography (IP-RP HPLC). The method is based on the principle that furosine is a degradation product of the Amadori compound (ϵ -deoxy-fructosyllsine), which is an initial product of the Maillard reaction during milk heat treatment. Therefore, the detection of furosine can serve as an indicator of the severity of thermal damage in milk products. The developed method followed the guidelines of ISO 18329 (Milk and milk products—Determination of furosine content—Ion-pair reverse-phase high-performance liquid chromatography method). The experimental results showed that the developed method demonstrated high accuracy. The furosine standard curve exhibited a linear correlation (R^2) of 0.9988, which is within the acceptable criterion ($R^2 \geq 0.995$). Furthermore, the Relative Standard Deviation (RSD) of the peak area and retention time for System Suitability did not exceed 2.5%. The method was also applied to the analysis of milk samples suspected of being heat-treated or adulterated. The results revealed that furosine was detected in various quantities in a large number of samples, confirming that this method is applicable for the analysis of real-world samples.

บทนำ

อุตสาหกรรมนมและผลิตภัณฑ์นมมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อเศรษฐกิจและสุขภาพของประชาชน ในกระบวนการผลิตนม การให้ความร้อน (thermal treatment) เป็นขั้นตอนที่จำเป็นเพื่อทำลายจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคและยืดอายุการเก็บรักษา อย่างไรก็ตาม การให้ความร้อนที่มากเกินไปอาจส่งผลเสียต่อคุณภาพทางโภชนาการของนม โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเกิดปฏิกิริยา Maillard ระหว่างน้ำตาลแลคโตสกับกรดอะมิโนไลซีน ซึ่งทำให้คุณค่าทางโภชนาการลดลง และเป็นตัวบ่งชี้ถึงความเสียหายจากความร้อน สารฟูโรซิน (ϵ -furoylmethyl-lysine) เป็นสารประกอบที่ได้จากการสลายตัวด้วยกรดของผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยา Maillard และไม่พบในนํ้านมดิบ ดังนั้น การวิเคราะห์ปริมาณฟูโรซินจึงเป็นวิธีมาตรฐานสากลที่ใช้ในการประเมินความรุนแรงของการให้ความร้อนที่นมได้รับ วิธีมาตรฐานสากลสำหรับการตรวจวิเคราะห์ฟูโรซินในนมและผลิตภัณฑ์นมคือมาตรฐาน ISO 18329:2004 ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้เทคนิค Ion-pair reverse-phase high-performance liquid chromatography (IP-RP HPLC) วิธีนี้มีความแม่นยำสูงและให้ผลลัพธ์ที่น่าเชื่อถือ ซึ่งสอดคล้องกับแนวทางการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ทางเคมีในระดับนานาชาติ งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ฟูโรซินตามแนวทางของมาตรฐาน ISO 18329 เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์คุณภาพของนํ้านมดิบในประเทศไทย

1. อุปกรณ์และสารเคมี

- 1.1. เครื่องโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง HPLC ยี่ห้อ Agilent รุ่น 1200
- 1.2. Vacuum manifold
- 1.3. Ultrasonic bath
- 1.4. ตู้อบลมร้อน
- 1.5. เครื่องชั่ง 5 ตำแหน่ง
- 1.6. ขวดปรับปริมาตร ขนาด 10, 500, 1000 mL
- 1.7. Micropipette ขนาด 1000 μ L
- 1.8. Electronic pipette ขนาด 5000 μ L
- 1.9. หลอดแก้วพร้อมฝาปิด
- 1.10. Vial ขนาด 1.5 mL
- 1.11. ชุดกรอง Mobile phase

- 1.12. Nylon membrane filter 0.45 ไมโครเมตร
- 1.13. Nylon syringe filter ขนาด 0.2 ไมโครเมตร
- 1.14. Disposable syringe ขนาด 3 มิลลิลิตร
- 1.15. Solid Phase Extraction C18 ขนาด 3 ml
- 1.16. กรวยกรอง (Funnels)
- 1.17. กระดาษกรอง เบอร์ 2 (Filter paper)
- 1.18. ก๊าซไนโตรเจน UHP 99.999%

2. สารเคมี

- 2.1. สารมาตรฐาน Furosine Dihydrochloride หรือ e – N – (2-tureyl-methyl) – L – Lysine.2HCl
- 2.2. Hydrochloric acid, AR grade
- 2.3. Acetic acid, HPLC grade
- 2.4. Potassium chloride, AR grade
- 2.5. น้ำปราศจากอิออน (DI water)

3. วิธีทดสอบ

3.1. เตรียมสารละลายมาตรฐาน

3.1.1 สารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 500 ppm

ซึ่งสารมาตรฐาน Furosine dihydrochloride ปริมาณ 5.0000 มิลลิกรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร ละลายด้วย 3 M Hydrochloric acid และปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน จะได้สารละลายมาตรฐาน Furosine dihydrochloride ความเข้มข้น 500 ppm

3.1.2 เตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 30 ppm

ปิเปตสารละลายในข้อ 3.1.1 ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร ละลายด้วย 0.1 M Hydrochloric acid และปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน จะได้สารละลายมาตรฐาน Furosine dihydrochloride ความเข้มข้น 30 ppm

3.1.3 เตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.5, 0.8, 1.5, 2 และ 4 ppm

ปิเปตสารละลายในข้อ 3.4.2 มาปริมาตร 0.17, 0.27, 0.5, 0.67 และ 1.350 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร ละลายด้วย 0.1 M Hydrochloric acid และปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน จะได้สารละลายมาตรฐาน Furosine dihydrochloride ความเข้มข้น 0.5, 0.8, 1.5, 2 และ 4 ppm

3.1.4 เตรียมตัวอย่างที่เติม 10% นมผง ชั่งนมผง 10 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำอุ่น ครบ 100 มิลลิลิตร เป็นความเข้มข้นเริ่มต้นในการเตรียม

ตารางที่ 1 ค่าอัตราส่วนของสารละลายนมผง Skim milk ต่อน้ำนมดิบที่การปลอมนมผงที่ความเข้มข้น 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 ค่าอัตราส่วนของสารละลายนมผง Skim milk ต่อน้ำนมดิบที่การปลอมนมผงที่ความเข้มข้น 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	-

3.2. เตรียมตัวอย่างวิเคราะห์

3.2.1 ปิเปตตัวอย่างน้ำนม 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดแก้วทนความร้อน เติม 9 M HCl ปริมาตร 6 มิลลิลิตร ปิดฝาขวดและเขย่า (เตรียมตัวอย่างในตู้ดูดควัน)

3.2.2 นำตัวอย่างไปผ่านก๊าซไนโตรเจน 2 นาที แล้วปิดฝาขวดให้สนิท

3.2.3 นำตัวอย่างเข้าตู้อบแห้ง ที่อุณหภูมิ $110^{\circ}\text{C} \pm 2$ องศาเซลเซียส เป็นเวลา 23 ชั่วโมง (ครบ 1 ชั่วโมง ให้นำหลอดตัวอย่างออกมาเขย่าเบาๆ) และนำเข้าตู้อบจบครบ 23 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเทใส่ขวดปรับปริมาตร ขนาด 10 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI นำสารละลายตัวอย่างมากรองผ่านกระดาษกรอง เบอร์ 2 นำสารละลายตัวอย่างในข้อ 3.2.3 มาสกัดด้วยวิธี Solid – phase extraction (SPE) ขั้นตอนดังนี้

Conditioning : ปิเปต Methanol 5 มิลลิลิตร ลงใน SPE และตามด้วยน้ำ

DI 10 มิลลิลิตร ไม่ให้ cartridge แห้ง

Loading : ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตร ลงใน SPE ปล่อยออกช้าๆ

Elute : ปิเปต 3 M Hydrochloric acid ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงใน SPE ปล่อยออกช้าๆ
นำส่วนใสที่ผ่าน SPE มากรองด้วย filter membrane syringe ชนิด nylon ขนาด 0.2 ไมโครเมตร

3.3. สภาวะของเครื่อง HPLC

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

Mobile phase : Solvent A = 0.4 % acetic acid

: Solvent B = 0.3 % potassium chloride in Solvent

ตารางที่ 3 อัตราส่วน 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

Flow rate : 1.2 ml/min
Detector : UV Detector 280 nm
Column temp : 34 °C
Injection : 50 µl
Run time : 28 min

3.4. วิธีทำกราฟสารมาตรฐานฟูโรซีน

นำสารละลายมาตรฐาน Furosine dihydrochloride ความเข้มข้น 0.5, 0.8, 1.5, 2 และ 4 ppm ฉีดเข้าเครื่อง HPLC ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ คำนวณ % RSD

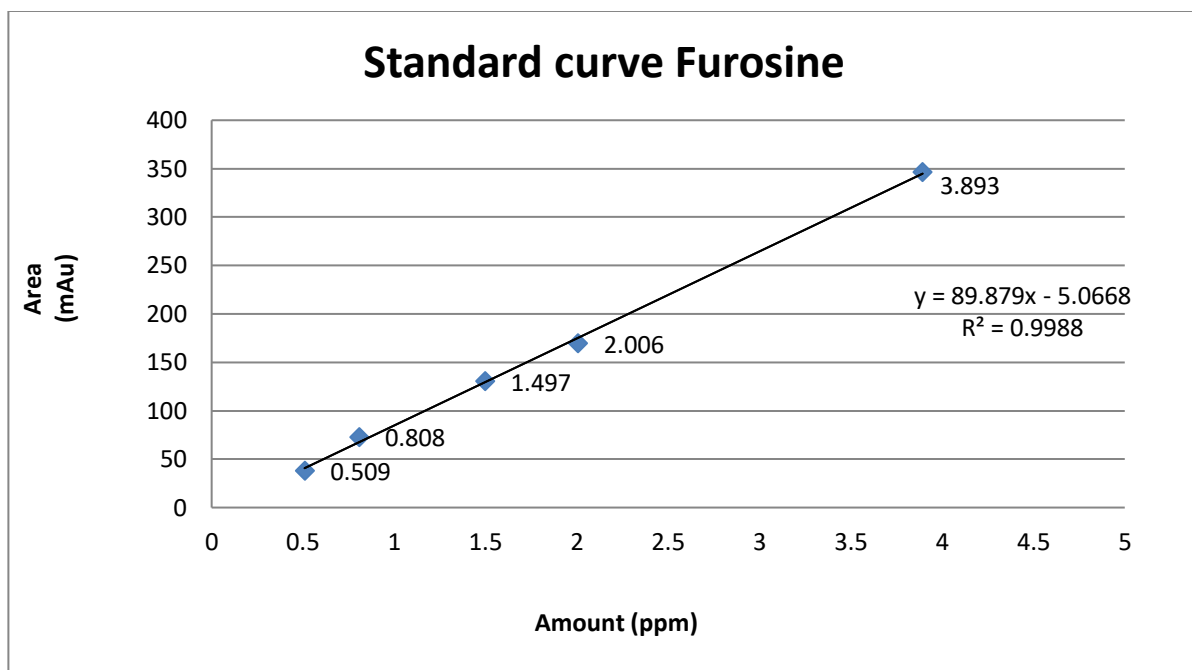
3.5. การทำ System suitability

การทดสอบความเหมาะสมของระบบโครมาโตกราฟี (Chromatographic system suitability) โดยฉีดสารมาตรฐานฟูโรซีนที่ความเข้มข้น 0.8 ppm นำไปฉีด 5 ซ้ำ แล้วคำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน สัมพัทธ์ของพื้นที่ใต้พีคและ Retention time ค่าที่ได้ต้องไม่เกิน 2.5 %

4. ผลการทดสอบ

ตารางที่ 4 ค่าความเข้มข้นสารมาตรฐานฟูโรซีน 0.5, 0.8, 1.5, 2, 4 ppm

Con. (ppm)	Area (mAu)
0.509	38.18939
0.808	72.95015
1.497	130.54649
2.006	169.52583
3.893	346.5658



จากการฉีดสารมาตรฐานฟูโรซีนที่ความเข้มข้น 0.5, 0.8, 1.5, 2, และ 4 ppm ได้ผลค่าความเข้มข้นและพื้นที่ใต้พีคดังแสดงในตารางที่ 4 ซึ่งสามารถสร้างสมการกราฟเส้นตรงได้ดังนี้: $y=89.879x-5.0668$ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.9988 ซึ่งสูงกว่าเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (≥ 0.995) แสดงให้เห็นว่าวิธีนี้มีความเป็นเชิงเส้นตรงที่ดีและมีความแม่นยำสูง

4.2 ผลวิเคราะห์ตัวอย่างนม ที่ Positive จากวิธี Deoxyketone

ตารางที่ 5 ผลวิเคราะห์หาปริมาณฟูโรซิน ที่ได้จากการคำนวณจากสมการกราฟเส้นตรง $y = 91.171x - 0.8749$

เลขที่ใบ นำส่ง	หมายเลข ตัวอย่าง	ผล Deoxyketone	รหัสแลป	Area			AVG.	ปริมาณฟูโรซิน ppm	SD	RSD	%RSD
				1	2	3					
0027	02096/64	2	1A	27.495	27.269	25.072	26.612	0.301	1.338	0.050	5.03
			1B	****	****	****	-	-	-	-	-
0057	03995/64	1	2A	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	-	-	-	-	-
			2B	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	-	-	-	-	-
0057	03996/64	1	3A	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	-	-	-	-	-
			3B	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	-	-	-	-	-
0097	07888/64	2	4A	29.495	28.636	29.379	29.170	0.330	0.466	0.016	1.60
			4B	27.488	27.663	27.672	27.608	0.312	0.104	0.004	0.38
0097	07889/64	2	5A	34.290	34.913	33.058	34.087	0.383	0.944	0.028	2.77
			5B	32.157	33.844	32.733	32.911	0.371	0.858	0.026	2.61
0144	11414/64	2	6A	65.290	62.630	-	63.960	0.711	1.881	0.029	2.94
			6B	59.650	62.000	-	60.825	0.677	1.662	0.027	2.73

เลขที่ใบ นำส่ง	หมายเลข ตัวอย่าง	ผล Deoxyketon e	รหัสแลป	Area			AVG.	ปริมาณฟูโรซิน ppm	SD	RSD	%RSD
				1	2	3					
0144	11447/64	2	7A	10.530	8.850	-	9.690	0.116	1.188	0.123	12.26
			7B	8.760	11.200	-	9.980	0.119	1.725	0.173	17.29
0191	15119/64	1	8A	10.500	10.890	-	10.695	0.127	0.276	0.026	2.58
			8B	12.790	11.300	-	12.045	0.142	1.054	0.087	8.75
0217	17224/64	2	9A	32.064	33.755	32.258	32.692	0.368	0.925	0.028	2.83
			9B	37.507	38.222	37.150	37.626	0.422	0.546	0.015	1.45
0291	22813/64	1	10A	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	-	-	-	-	-
			10B	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	-	-	-	-	-
0295	23111/64	1	11A	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	-	-	-	-	-
			11B	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	-	-	-	-	-
0304	23583/64	1	12A	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	-	-	-	-	-
			12B	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	-	-	-	-	-
0346	27607/64	2	13A	17.610	17.960	17.960	18.823	0.216	0.202	0.011	1.07
			13B	18.710	18.350	19.410	21.453	0.245	0.539	0.025	2.51
0346	27608/64	2	14A	21.790	21.180	21.390	21.453	0.245	0.310	0.014	1.44
			14B	23.000	23.460	22.570	23.010	0.262	0.445	0.019	1.93

เลขที่ใบ นำส่ง	หมายเลข ตัวอย่าง	ผล Deoxyketone	รหัสแลป	Area			AVG.	ปริมาณฟูโรซิน ppm	SD	RSD	%RSD
				1	2	3					
0564	45824/64	1	15A	28.120	30.110	28.150	28.793	0.325	1.140	0.040	3.96
			15B	27.930	29.360	29.970	29.087	0.329	1.047	0.036	3.60
0565	45860/64	1	16A	30.790	30.470	30.420	30.560	0.345	0.201	0.007	0.66
			16B	31.810	30.580	29.270	30.553	0.345	1.270	0.042	4.16
0565	45882/64	1	17A	18.660	16.600	16.330	17.197	0.198	1.274	0.074	7.41
			17B	17.490	17.340	17.090	17.307	0.199	0.202	0.012	1.17
0728	58481/64	2	18A	20.910	22.460	23.090	22.153	0.253	1.122	0.051	5.06
			18B	22.070	21.880	21.800	21.917	0.250	0.139	0.006	0.63
0729	58490/64	2	19A	30.400	29.480	30.290	30.057	0.339	0.502	0.017	1.67
			19B	30.290	29.320	30.650	30.087	0.340	0.688	0.023	2.29
0729	58491/64	2	20A	35.920	34.910	36.400	35.743	0.402	0.761	0.021	2.13
			20B	35.120	35.710	36.720	35.850	0.403	0.809	0.023	2.26

จากตารางที่ 5 ตัวอย่างที่นำมาตรวจเป็นตัวอย่างที่ผ่านการตรวจหาการปลอมปนนมผงด้วยวิธี Deoxyketone เป็น Positive อยู่ในระดับ 1 และ 2 เมื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณฟูโรซิน มีการตรวจเจอพีคโครมาแกรม และนำพื้นที่ใต้สรูปลผลการทดลองได้ว่า ปริมาณฟูโรซินที่ตรวจวิเคราะห์ได้นั้น อยู่ในช่วง 0.116 – 0.711 ppm

4.3 ผลวิเคราะห์ตัวอย่างนม ที่ Positive จากวิธี Deoxyketone

ตารางที่ 6 ผลวิเคราะห์หาปริมาณฟูโรซีน ที่ได้จากการคำนวณจากสมการกราฟเส้นตรง $y = 89.879x - 5.0668$

เลขที่ใบนำส่ง	หมายเลข ตัวอย่าง	ผล Deoxyketone	รหัสแลป	Area			AVG.	Furosine ความเข้มข้น ppm	SD	RSD	%RSD
				1	2	3					
0016	01125/65	2	1A	17.910	19.550	18.570	18.677	0.264	0.825	0.044	4.42
			1B	17.380	17.490	17.950	17.607	0.252	0.302	0.017	1.72
0016	01126/65	1	2A	10.510	10.800	10.810	10.707	0.175	0.170	0.016	1.59
			2B	10.360	10.890	9.480	10.243	0.170	0.712	0.070	6.95
0028	02831/65	1	3A	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	-	-	-	-	-
			3B	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	-	-	-	-	-
0036	03036/65	1	4A	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	-	-	-	-	-
			4B	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	-	-	-	-	-
0038	03311/65	1	5A	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	-	-	-	-	-
			5B	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	-	-	-	-	-
0040	03314/65	1	6A	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	-	-	-	-	-
			6B	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	-	-	-	-	-
0029	02835/65	1	7A	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	-	-	-	-	-
			7B	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	-	-	-	-	-

เลขที่ใบนำส่ง	หมายเลข ตัวอย่าง	ผล Deoxyketone	รหัสแลป	Area			AVG.	Furosine ความเข้มข้น ppm	SD	RSD	%RSD
				1	2	3					
0055	04684/65	2	8A	29.290	29.510	30.820	29.873	0.389	0.827	0.028	2.77
			8B	28.540	26.070	27.990	27.533	0.363	1.297	0.047	4.71
0055	04685/65	2	9A	30.490	36.820	36.050	34.453	0.440	3.454	0.100	10.02
			9B	37.340	36.300	37.390	37.010	0.468	0.615	0.017	1.66
0073	05885/65	2	10A	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
			10B	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
0073	05886/65	2	11A	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
			11B	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
0094	08396/65	2	12A	14.310	13.990	14.670	14.323	0.216	0.340	0.024	2.38
			12B	15.880	16.490	16.520	20.923	0.289	0.361	0.017	1.73
0094	08397/65	2	13A	21.450	20.460	20.860	23.040	0.313	0.498	0.022	2.16
			13B	22.990	23.240	22.890	19.245	0.270	0.180	0.009	0.94
0095	08437/65	2	14A	43.020	43.320	43.560	43.300	0.538	0.271	0.006	0.62
			14B	45.110	45.110	47.590	45.937	0.567	1.432	0.031	3.12
0095	08438/65	2	15A	47.030	44.510	46.550	46.030	0.569	1.338	0.029	2.91
			15B	43.380	43.360	43.300	43.347	0.539	0.042	0.001	0.10

เลขที่ใบนำส่ง	หมายเลข ตัวอย่าง	ผล Deoxyketone	รหัสแลป	Area1	Area2	Area3	AVG.	Furosine ความเข้มข้น ppm	SD	RSD	%RSD
0135	11421/65	2	16A	24.360	22.270	22.410	23.013	0.312	1.168	0.051	5.08
			16B	25.300	24.050	24.810	24.720	0.331	0.630	0.025	2.55
0135	11422/65	2	17A	25.510	25.840	26.380	25.910	0.345	0.439	0.017	1.70
			17B	25.890	25.630	26.250	25.923	0.345	0.311	0.012	1.20
0135	11456/65	2	18A	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
			18B	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
0136	11465/65	2	19A	32.590	31.470	31.120	31.727	0.409	0.768	0.024	2.42
			19B	30.630	30.640	31.060	30.777	0.399	0.245	0.008	0.80
0136	11466/65	2	20A	32.340	31.800	30.700	31.613	0.408	0.836	0.026	2.64
			20B	29.670	31.830	29.580	30.360	0.394	1.274	0.042	4.20
0196	16494/65	2	21A	26.310	25.590	27.030	26.310	0.349	0.720	0.027	2.74
			21B	23.270	23.410	24.350	23.677	0.320	0.587	0.025	2.48
0208	17269/65	3	22A	14.320	13.820	13.980	14.040	0.213	0.255	0.018	1.82
			22B	16.49	15.02	15.74	15.750	0.232	0.735	0.047	4.67
0216	18604/65	3	23A	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
			23B	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

เลขที่ใบนำส่ง	หมายเลข ตัวอย่าง	ผล Deoxyketone	รหัสแลป	Area1	Area2	Area3	AVG.	Furosine ความเข้มข้น ppm	SD	RSD	%RSD
0251	21184/65	3	24A	34.19	32.69	32.86	33.247	0.426	0.821	0.025	2.47
			24B	34.81	33.94	34.7	34.483	0.440	0.474	0.014	1.37
0251	21185/65	3	25A	36.14	34.68	35.1	35.307	0.449	0.752	0.021	2.13
			25B	32.93	33.34	32.23	32.833	0.422	0.561	0.017	1.71
0262	21978/65	2	26A	11.84	12.17	11.64	11.883	0.189	0.268	0.023	2.25
			26B	10.31	9.85	11.89	10.683	0.175	1.070	0.100	10.02
0265	21984/65	2	27A	11.43	11.42	11.76	11.537	0.185	0.193	0.017	1.68
			27B	12.86	11.32	12.15	12.110	0.191	0.771	0.064	6.36
0387	31063/65	2	28A	27.43	26.42	27.58	27.143	0.358	0.631	0.023	2.32
			28B	29.6	29.06	28.73	29.130	0.380	0.439	0.015	1.51
0387	31064/65	2	29A	16.24	17.45	16.74	16.810	0.243	0.608	0.036	3.62
			29B	16.48	16.11	16	16.197	0.237	0.251	0.016	1.55
0428	35417/65	3	30A	34.94	34.81	33.49	34.413	0.439	0.802	0.023	2.33
			30B	35.49	36.04	35.75	35.760	0.454	0.275	0.008	0.77
0428	35418/65	3	31A	36.71	36.33	37.12	36.720	0.465	0.395	0.011	1.08
			31B	35.23	35.56	35.77	35.520	0.452	0.272	0.008	0.77

เลขที่ใบนำส่ง	หมายเลข ตัวอย่าง	ผล Deoxyketone	รหัสแลป	Area1	Area2	Area3	AVG.	Furosine ความเข้มข้น ppm	SD	RSD	%RSD
0428	35419/65	2	32A	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	-	-	-	-	-
			32B	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	-	-	-	-	-
0428	35420/65	2	33A	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	-	-	-	-	-
			33B	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	-	-	-	-	-
0469	38431/65	2	34A	30.9	30.29	30.17	30.453	0.395	0.391	0.013	1.29
			34B	31.36	31.02	31.41	31.263	0.404	0.212	0.007	0.68
0474	38992/65	2	35A	27.02	26.82	28.94	27.593	0.363	1.171	0.042	4.24
			35B	24.97	23.69	23.95	24.203	0.326	0.677	0.028	2.80
0474	38993/65	2	36A	22.38	22.89	21.68	22.317	0.305	0.607	0.027	2.72
			36B	23.45	21.85	21.45	22.250	0.304	1.058	0.048	4.76
0474	39002/65	2	37A	60.96	63.61	61.1	61.890	0.745	1.491	0.024	2.41
			37B	62.47	62.93	61.94	62.447	0.751	0.495	0.008	0.79
0474	39003/65	2	38A	66.78	69.09	65.92	67.263	0.805	1.639	0.024	2.44
			38B	68.66	70.78	69.81	69.750	0.832	1.061	0.015	1.52
0475	39048/65	2	39A	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	-	-	-	-	-
			39B	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	-	-	-	-	-

เลขที่ใบนำส่ง	หมายเลข ตัวอย่าง	ผล Deoxyketone	รหัสแลป	Area1	Area2	Area3	AVG.	Furosine ความเข้มข้น ppm	SD	RSD	%RSD
0511	41293/65	2	40A	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	-	-	-	-	-
			40B	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	-	-	-	-	-
0511	41294/65	2	41A	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	-	-	-	-	-
			41B	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	-	-	-	-	-
0532	43452/65	2	42A	24.83	23.54	25.05	24.473	0.329	0.816	0.033	3.33
			42B	25.13	25.07	25.99	25.397	0.339	0.515	0.020	2.03
0543	44588/65	2	43A	22.89	23.26	22.84	22.997	0.312	0.229	0.010	1.00
			43B	23.58	24.27	24.09	23.980	0.323	0.358	0.015	1.49
0544	44617/65	2	44A	26.96	26.32	26.45	26.577	0.352	0.338	0.013	1.27
			44B	25.66	25.62	26.67	25.983	0.345	0.595	0.023	2.29
0544	44618/65	2	45A	26.33	27.82	25.32	26.490	0.351	1.258	0.047	4.75
			45B	23.78	22.95	22.32	23.017	0.312	0.732	0.032	3.18
0554	44759/65	2	46A	23.32	23.74	23.3	23.453	0.317	0.248	0.011	1.06
			46B	21.6	19.61	20.26	20.490	0.284	1.015	0.050	4.95
0564	45385/65	1	47A	8.58	9.94	9.75	9.423	0.161	0.737	0.078	7.82
			47B	10.35	9.99	10.88	10.407	0.172	0.448	0.043	4.30

เลขที่ใบนำส่ง	หมายเลข ตัวอย่าง	ผล Deoxyketone	รหัสแลป	Area1	Area2	Area3	AVG.	Furosine ความเข้มข้น ppm	SD	RSD	%RSD
0627	49414/65	2	48A	79.23	79.88	79.38	79.497	0.941	0.340	0.004	0.43
			48B	89.42	89.34	88.81	89.190	1.049	0.332	0.004	0.37
0627	49415/65	2	49A	100.15	100.61	100.64	100.467	1.174	0.275	0.003	0.27
			49B	71.31	71.45	72	71.587	0.853	0.365	0.005	0.51
0674	52397/65	2	50A	5.66	4.75	5.42	5.277	0.115	0.472	0.089	8.94
			50B	6.48	5.72	6.01	6.070	0.124	0.384	0.063	6.32
0674	52398/65	2	51A	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	-	-	-	-	-
			51B	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	-	-	-	-	-
0679	52554/65	3	52A	39.98	43.16	40.11	41.083	0.513	1.800	0.044	4.38
			52B	50.95	50.84	50.42	50.737	0.621	0.280	0.006	0.55
0713	54673/65	2	53A	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	-	-	-	-	-
			53B	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	-	-	-	-	-
0714	54674/65	2	54A	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	-	-	-	-	-
			54B	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	-	-	-	-	-
0714	54675/65	2	55A	3.91	3.5	3.49	3.633	0.097	0.240	0.066	6.60
			55B	3.65	4.09	4.23	3.990	0.101	0.303	0.076	7.59

เลขที่ใบนำส่ง	หมายเลข ตัวอย่าง	ผล Deoxyketone	รหัสแลป	Area1	Area2	Area3	AVG.	Furosine ความเข้มข้น ppm	SD	RSD	%RSD
0719	55544/65	2	56A	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	-	-	-	-	-
			56B	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	-	-	-	-	-

จากตารางที่ 6 ตัวอย่างที่นำมาตรวจเป็นตัวอย่างที่ผ่านการตรวจหาการปลอมปนนมผงด้วยวิธี Deoxyketone เป็น Positive อยู่ในระดับ 1 และ 2 เมื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณฟูโรซิน มีการตรวจเจอพีคโครมาโทแกรม และนำพื้นที่ใต้สรุปลผลการทดลองได้ว่า ปริมาณฟูโรซินที่ตรวจวิเคราะห์ได้นั้น ความเข้มข้น อยู่ในช่วง 0.085 – 1.174 ppm

4.4 ผลการวิเคราะห์การเติมนมผงตามเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8 และ 10%

ตารางที่ 7 แสดงผลวิเคราะห์หาปริมาณฟูโรซิน ที่ได้จากการคำนวณจากสมการกราฟเส้นตรง $y = 89.879x - 5.0668$

ความเข้มข้นของการ ปลอมปนนมผง (skim milk)	Area 1	Area 2	Area 2	ค่าเฉลี่ย	ปริมาณความเข้มข้นฟูโร ซิน (ppm)	SD	%RSD
0%	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	-	-
2%	16.440	16.230	16.260	16.310	0.238	0.114	0.70
4%	33.510	32.760	32.130	32.800	0.421	0.691	2.11
6%	51.570	51.220	51.640	51.480	0.629	0.225	0.44
8%	72.040	71.000	69.850	70.960	0.846	1.095	1.54
10%	85.610	86.050	86.260	85.970	1.013	0.332	0.39

4.5 ผลการวิเคราะห์การเติมนมผงตามเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้น 0, 1, 2, 3, 4, และ 5%

ตารางที่ 8 แสดงผลวิเคราะห์หาปริมาณฟูโรซิน ที่ได้จากการคำนวณจากสมการกราฟเส้นตรง $y = 89.879x - 5.0668$

ความเข้มข้นของการ ปloomปนนมผง (skim milk)	Area 1	Area 2	Area 2	ค่าเฉลี่ย	ปริมาณความเข้มข้นฟูโร ซิน (ppm)	SD	%RSD
0%	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	-	-
1%	8.810	8.850	8.590	8.750	0.154	0.140	1.60
2%	16.240	15.550	16.350	16.047	0.235	0.434	2.70
3%	23.430	22.160	22.120	22.570	0.307	0.745	3.30
4%	34.150	34.560	33.960	34.223	0.437	0.307	0.89
5%	40.890	41.680	40.350	40.973	0.512	0.669	1.63

จากการทดลองเติมนมผง (skim milk) ตามอัตราส่วนดังตารางที่ 1 และ 2 พบว่าที่ความเข้มข้นของการปloomปนนมผง 2% - 10% มีปริมาณความเข้มข้นฟูโรซิน 0.238 – 1.013 ppm และที่ความเข้มข้นของการปloomปนนมผง 1% - 5% มีปริมาณความเข้มข้นฟูโรซิน 0.154 – 0.512 ppm

สรุปผลการวิเคราะห์

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณฟูโรซินในนํ้านมดิบตามแนวทางของมาตรฐาน ISO 18329 โดยใช้เทคนิค IP-RP HPLC ประสบความสำเร็จและสามารถนำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างได้อย่างมีประสิทธิภาพ จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่า ความใช้ได้ของวิธี (Method Validation): กราฟมาตรฐานฟูโรซินมีความเป็นเชิงเส้นตรงสูง ($R^2 = 0.9988$) ซึ่งยืนยันว่าวิธีนี้มีความน่าเชื่อถือสำหรับการหาปริมาณในตัวอย่าง ค่า RSD ที่ต่ำของพื้นที่ใต้พีคและ Retention time ยืนยันว่าระบบ HPLC มีความเสถียรและเหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์

ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างนมจริงแสดงให้เห็นว่าวิธีนี้สามารถนำไปใช้ในการประเมินคุณภาพของนม โดยเฉพาะอย่างยิ่งการตรวจสอบการให้ความร้อนที่รุนแรง ซึ่งฟูโรซินเป็นตัวบ่งชี้ที่มีความจำเพาะเจาะจงสูง

เพื่อเพิ่มความน่าเชื่อถือของผลการวิเคราะห์ และจะมีการตรวจสอบความถูกต้องของผล (accuracy) และขีดจำกัดของการตรวจวัด (limit of detection, LOD) และขีดจำกัดของการหาปริมาณ (limit of quantitation, LOQ) เพิ่มเติมในอนาคต โดยสรุปแล้ว วิธีวิเคราะห์นี้เป็นเครื่องมือที่สำคัญสำหรับห้องปฏิบัติการในการตรวจสอบคุณภาพของผลิตภัณฑ์นมให้เป็นไปตามมาตรฐานสากล และช่วยในการควบคุมกระบวนการผลิตเพื่อรักษาคุณค่าทางโภชนาการของนม

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ นายสัตวแพทย์อุดม เจือจันทร์ ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ เป็นอย่างสูง สำหรับคำปรึกษาข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ และการสนับสนุนงบประมาณ เพื่อใช้ในการปฏิบัติงาน และดำเนินการตรวจวิเคราะห์ของเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการนํ้านมเป็นไปอย่างราบรื่นและมีประสิทธิภาพ

เอกสารอ้างอิง (References)

1. ISO 18329:2004. Milk and milk products — Determination of furosine content — Ion-pair reverse-phase high-performance liquid chromatography method.
2. Dionysius, L. A., and J. W. K. G. L. (2019). RP-HPLC determination of Furosine in fermented milk of different brands retailed in China. *Int J Agric Sc Food Technol*.
3. Gong, T. (2020). RP-HPLC determination of Furosine in fermented milk of different brands retailed in China. *International Journal of Agricultural Science and Food Technology*.
4. กรมปศุสัตว์. (2559). *คู่มือการดำเนินงานวิจัยและงานวิชาการ*. สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์.
5. Schmidt, A., et al. (2017). A new UHPLC method for the quantitation of furosine as heat load indicator in commercial liquid milk. *Journal of Food Composition and Analysis*.