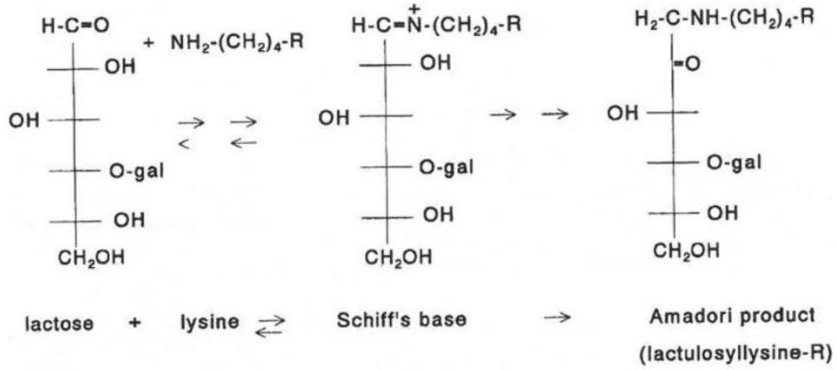
รายงานความก้าวหน้า “การพัฒนาวิธีตรวจหาปริมาณฟูโรซีนในน้ำนม ด้วยเทคนิค UHPLC-DAD”

บทนำ

ปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Maillard Reaction) เกิดจากการรวมตัวกันของ carbonyl groups ของ reducing sugars และ amino groups ของกรดอะมิโน และเกิดปฏิกิริยาหลากหลายขั้นตอนจนได้ผลิตภัณฑ์ต่างๆ โดยเฉพาะ Amadori products ซึ่งเกิดขึ้นในระยะแรกของปฏิกิริยาเมลลาร์ด จึงเป็นดัชนีสำคัญในการบ่งชี้การเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ดและการสูญเสียกรดอะมิโนจากความร้อน สำหรับปฏิกิริยาเมลลาร์ดในอาหารเป็นผลมาจากการให้ความร้อนหรือการเก็บรักษาเป็นเวลานาน ส่งผลให้เกิดอนุพันธ์ของไลซีนซึ่งสามารถนำมาใช้ประเมินคุณค่าทางโภชนาการของอาหารได้



รูปที่ 1 ปฏิกิริยาเมลลาร์ดในผลิตภัณฑ์นม (Kataneh Aalaei, 2018)

ฟูโรซีน (Furosine) หรือ ε-N-(2-furoyl-methyl)-L-lysine เกิดจากการไฮโดรไลซิสด้วยกรดของ Maillard-derived compounds สามารถพบได้ในอาหารหลากหลายชนิดที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อน ยกตัวอย่างเช่น กระบวนการผลิตนมผง มีการใช้อุณหภูมิสูงถึง 150-200 °C ในการระเหยแห้ง สำหรับการตรวจสอบการปลอมปนนมผงในน้ำนมดิบ จึงใช้ปริมาณฟูโรซีนในการจำแนกประเภทตัวอย่างนมที่ผ่านการให้ความร้อนชนิดต่างๆ ได้

การวิเคราะห์ปริมาณฟูโรซีน สามารถทำได้หลายวิธี เช่น Capillary zone electrophoresis, Gas chromatography, High performance liquid chromatography เป็นต้น ปัจจุบันทางกลุ่มตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นม ใช้วิธีทดสอบรวมถึงขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างตามแนวทาง ISO 18329:2004 มีข้อจำกัด คือ ระยะเวลา 23 ชั่วโมงในการย่อยตัวอย่างนมด้วยกรด และ Run time ของการฉีดต่อเข็มใช้เวลา 32 นาที ดังนั้น จึงได้การพัฒนาวิธีทดสอบในครั้งนี้โดยใช้เทคนิค Ultra High performance liquid chromatography – Diode Array Detector พร้อมทั้งวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อทดสอบความใช้ได้ของวิธีต่อไป ทำให้การทดสอบมีความรวดเร็วและมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

ผู้ดำเนินการ

1. นางสาวรมิดา เหลืองประเสริฐ
2. นางสาวเนาวรัตน์ กำภูศิริ
3. นางสาวกมลวรรณ ศรีดาวงษ์

4. นางสาวมังตาน อ๊อสวงษ์
5. นางสาววิสุมน บางเมือง

วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างสำหรับใช้ตรวจหาปริมาณฟูโรซีนในน้ำนม ด้วยเทคนิค Ultra High-Performance Liquid Chromatography – Diode Array Detector ทำให้การทดสอบนี้มีความรวดเร็วและมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

ประโยชน์ที่ได้รับ

ได้พัฒนาวิธีการตรวจหาปริมาณฟูโรซีนในน้ำนม ด้วยเทคนิค UHPLC-DAD เพื่อใช้วิธีทดสอบสำหรับตรวจหาการปลอมปนนมผงในน้ำนมดิบของกลุ่มตรวจสอบคุณภาพนมฯ ต่อไป

วิธีการดำเนินการ

1. **สารมาตรฐานและสารเคมี**

   สารมาตรฐานฟูโรซีน (Furosine dihydrochloride)

   Hydrochloric acid, AR grade

   Ammonium acetate, AR grade

   Trifluoroacetic acid, HPLC grade

   Ultrapure water

   Methanol, AR grade

2. **การเตรียมตัวอย่าง**

   2.1 วิธีการเตรียมตัวอย่างตามแนวทาง ISO 18329:2004 (วิธีปัจจุบันที่ใช้)

   ปิเปตตัวอย่างน้ำนม 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดแก้วทนความร้อน เติม 9 M HCl ปริมาตร 6 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอดและเขย่า นำตัวอย่างผ่านก๊าซไนโตรเจน 2 นาที แล้วปิดฝาให้สนิท จากนั้นนำเข้าตู้อบแห้ง ที่อุณหภูมิ 110°C ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 23 ชั่วโมง (ครบ 1 ชั่วโมง ให้นำหลอดตัวอย่างออกมาเขย่าเบาๆ) ทิ้งตัวอย่างให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเทใส่ขวดปรับปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI นำสารละลายตัวอย่างมากรองผ่านกระดาษกรอง เบอร์ 2 นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ 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
   - Eluting: ปิเปต 3 M Hydrochloric acid ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงใน SPE ปล่อยออกช้าๆ

จากนั้นนำส่วนใสที่ผ่าน SPE มากรองด้วย filter membrane syringe ชนิด nylon ขนาด 0.2 ไมโครเมตร ใส่ขวดสีชา

2.2 วิธีการเตรียมตัวอย่างโดยใช้เครื่อง Microwave digestion (HCl hydrolysis)

ปิเปตตัวอย่างน้ำนม 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดแก้วทนความร้อน (ถ้ามีการเติมสารให้เติมในขั้นตอนนี้ เขย่าสารและทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที) เติม HCl ตามความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 6 มิลลิลิตร นำตัวอย่างผ่านก๊าซไนโตรเจน 2 นาทีแล้วปิดฝาให้สนิท จากนั้นนำเข้าตู้อบแห้ง ที่อุณหภูมิ 110 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส ตามเวลาดังตาราง

การทดลอง	**ความเข้มข้น HCl (mol/L)**	**ความเข้มข้นฟูโรซีนที่เติม (mg/L)**	**ระยะเวลา (ชั่วโมง)**
1	7	2.5	18
			20
			23
		5	18
			20
			23
2	8	2.5	18
			20
			23
		5	18
			20
			23
3	9	2.5	18
			20
			23
		5	18
			20
			23

ตารางที่ 1 การทดลองขั้นตอน hydrolysis ตัวอย่างด้วยกรดไฮโดรคลอริก

จากนั้นนำตัวอย่างที่ทำการย่อยแล้ว มากรองผ่านกระดาษกรอง เบอร์ 2 ทิ้งไว้ให้เย็น และสกัดด้วยวิธี Solid – phase extraction (SPE) โดยใช้ Waters SepPak® Vac 3cc (500 mg) ตามขั้นตอนดังนี้

- Conditioning: ปิเปต Methanol 5 มิลลิลิตร ลงใน SPE และตามด้วยน้ำ DI 10 มิลลิลิตร ไม่ให้ cartridge แห้ง
- Loading: ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตร ลงใน SPE ปล่อยออกช้าๆ
- Eluting: ปิเปต 3 M Hydrochloric acid ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงใน SPE ปล่อยออกช้าๆ

จากนั้นนำสารละลายที่ได้เจือจางด้วย 6.0 g/L Ammonium acetate ในอัตราส่วน 1:5 และนำมากรองด้วย filter membrane syringe ขนาด 0.2 ไมโครเมตร ใส่ขวดสีชา

3. การทดสอบสภาวะเครื่อง UHPLC-DAD

ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมเพื่อกำหนดรายละเอียด UHPLC Conditions สำหรับตรวจวัดสารฟูโรซีน

4. การหาค่า Instrument Detection Limit (IDL)

ฉีดสารมาตรฐานฟูโรซีนความเข้มข้น 0.05 mg/L จำนวน 10 ซ้ำ และค่าสัญญาณของสารเทียบกับสัญญาณรบกวน (signal to noise ratio, S/N) โดยใช้โปรแกรมประมวลผล กำหนดเกณฑ์ยอมรับให้ S/N ≥ 3

5. การสร้างกราฟมาตรฐาน

เตรียมสารละลายมาตรฐานฟูโรซีน 7 ระดับความเข้มข้น ดังนี้ 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 mg/L กำหนดให้ แกน X คือ ระดับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานฟูโรซีน (mg/L) แกน Y คือ สัญญาณที่วัดได้จาก DAD แสดงในรูปแบบค่าพื้นที่ใต้พีค (mAU*S) ซึ่งกราฟที่ได้ควรมีค่า Correlation coefficient (r) โดยมีเกณฑ์การยอมรับ r > 0.995

6. การประมาณค่า LOD (Limit of Detection), LOQ (Limit of Quantification) ของวิธีทดสอบ

วิเคราะห์หาความเข้มข้นตัวอย่างไม่มีสารฟูโรซีน จำนวน 10 ตัวอย่าง หาค่า mean, S_0 และ S_0' จากนั้นนำค่า S_0' ไปคำนวณหาค่า LOD และ LOQ โดย

$$LOD = 3S_0'$$

$$LOQ = 10S_0' \qquad \text{เมื่อ } S_0' = \frac{S_0}{\sqrt{n}}$$

เมื่อ S_0 = standard deviation ที่ใช้ในการคำนวณค่า LOD และ LOQ

S_0 = standard deviation ของความเข้มข้นที่วัดได้

n = จำนวนการทำซ้ำของตัวอย่างตามวิธีทดสอบ, n=2

7. การยืนยันค่า LOD (Limit of Detection), LOQ (Limit of Quantification) ของวิธีทดสอบ

- เตรียม spiked sample ที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า LOD ที่คำนวณได้ ทำตามวิธีทดสอบจำนวน 10 ซ้ำ ผลการทดสอบให้ดูระดับสัญญาณพีค โดยต้องมีค่า S/N ≥ 3

- เตรียม spiked sample ที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า LOQ ที่คำนวณได้ ทำตามวิธีทดสอบจำนวน 10 ซ้ำ คำนวณหาค่า X-bar, SD, %recovery, $\%RSD_r$ และ $\%PRSD_r$ โดยพิจารณาความ

แม่นจากค่า %mean Recovery ต้องอยู่ในเกณฑ์การยอมรับของ AOAC (2025) ตามตารางที่ 1 และพิจารณาความเที่ยงแบบ repeatability จากค่า $\%RSD_r$ ต้องมีค่าน้อยกว่า $\%PRSD_r$ ที่คำนวณจากสมการ Horwitz

Concentration	%recovery
10 g/100 g	98-102
1 g/100 g	97-103
0.1 g/100 g	95-105
100 mg/kg	90-107
10 mg/kg	80-110
1 mg/kg	80-110
100 µg/kg	80-110
10 µg/kg	60-115
1 µg/kg	40-120

ตารางที่ 2 เกณฑ์การยอมรับ % recovery ของ AOAC (2025)

ผลการทดลอง

1. จากการทดสอบสภาวะเครื่อง UHPLC-DAD แสดงผลได้ดังนี้

Instrument: UHPLC Agilent model 1290 Infinity II LC

Stationary phase: Acquity UPLC™ HSS T3 Column (100 mm x 2.1 mm, 1.8 µm)

Mobile phase: 0.6%Ammonium acetate in 0.1%TFA

Elution mode: Isocratic elution

Injection volume: 2.0 µL

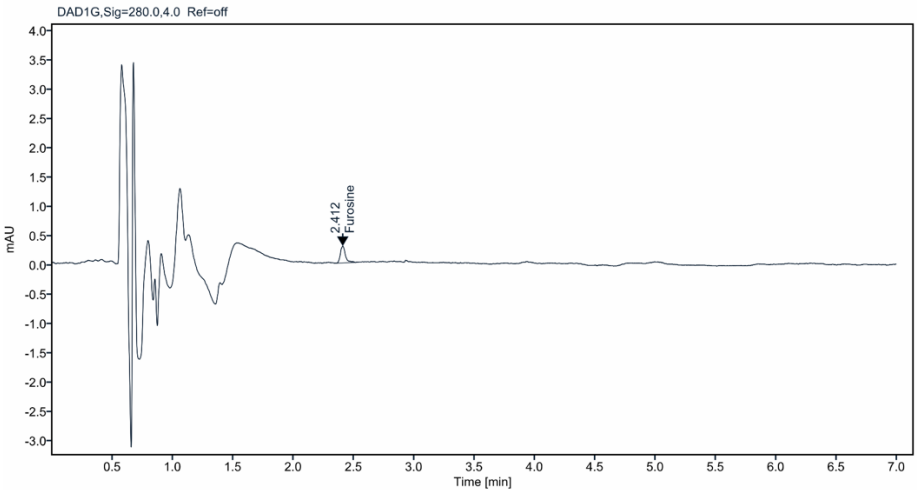
Flow rate: 0.4 mL/min

Column temperature: 35 °C

Run time: 6 min

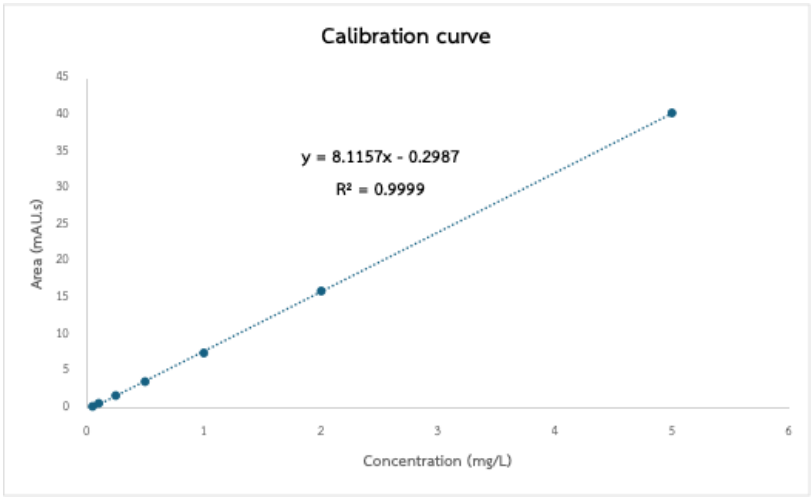
Retention time: 2.41 min

Wavelength (UV): 280 nm



รูปที่ 2 Chromatogram ของสารมาตรฐานฟูโรซีน ความเข้มข้น 0.05 ppm

2. จากผลของการทดสอบการตรวจวัดสารละลายมาตรฐานฟูโรซีน และสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน (Calibration curve) ที่ 7 ระดับความเข้มข้น เพื่อทดสอบความเป็นเส้นตรง โดยพิจารณาจากค่า correlation coefficient (r) โดยเกณฑ์การยอมรับ r > 0.995 พบว่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ (AOAC , 2023) แสดงว่า สามารถวัดสารฟูโรซีน ในช่วงความเข้มข้น 0.05 ถึง 5.0 mg/L แล้วให้กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรง แสดงดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Area ของพีค กับความเข้มข้นของสารฟูโรซีน

ปัญหาและอุปสรรค

ไม่สามารถดำเนินการพัฒนาวิธีตรวจหาปริมาณฟูโรซีนในน้ำนม ด้วยเทคนิค UHPLC-DAD ให้แล้วเสร็จได้ในปีงบประมาณ 2569 เนื่องจาก Hot air oven ที่ใช้สำหรับอบตัวอย่างเสียระหว่างการดำเนินการพัฒนาวิธีและอยู่ในขั้นตอนขอจัดซื้อครุภัณฑ์ทดแทนต่อไป

เอกสารอ้างอิง

Anatol Schmidt, Lisa I. Boitz, Helmut K. Mayer, 2017. A new UHPLC method for the quantitation of furosine as heat load indicator in commercial liquid milk. Journal of Food Composition and Analysis 56, 104-109.

Fengen Wang, Yandong Zhang, Fang Wen, Nan Zheng, and Jiaqi Wang, 2020. Rapid determination of furosine in milk using microwave-assisted HCl hydrolysis and ultra-performance liquid chromatography. J. Dairy Sci. 103, 11086-11093

Meixia Chen, Chongchong Chen, Fengen Wang, Fang Wen, Ming Li, Nan Zheng, Jiaqi Wang, 2020. A Rapid UPLC Method with Optimized Sample Preparation Procedures for Determination of Furosine in Milk. Journal of Food Composition and Analysis. doi: https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103571