การวิเคราะห์ปริมาณทอรีนในตัวอย่างน้ำนมแปรรูปโดยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

DETERMINATION OF TAURINE IN PROCESSED MILK SAMPLES BY HIGH PERFORMANCE LIQIUD CHROMATOGRAPHY

รพีพัฒน์ บัวสุวรรณ[1] *พรพิมล ม่วงไทย[2]*

Rapeepat Buasuwan[1]*, *Pornpimol Muangthai[2]*

[1]ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

[1]Department of Chemistry, Faculty of Science, Srinakharinwirot University.

[2]คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

[2]Faculty of Science, Srinakharinwirot University.

****Corresponding author, E-mail:*** *oh.julinze@gmail.com*

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์ที่จะทำการศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนด้วยเทคนิค โครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยเตรียมเป็นสารอนุพันธ์ของทอรีน ทั้งนี้ได้ทำการศึกษาสารที่ใช้เตรียมอนุพันธ์ของทอรีน 2 ชนิด ได้แก่ ออร์โท-ทาลอัลดีไฮด์และฟลูออเรสคามีน พบว่า ออร์โท-พทาลอัลดีไฮด์ มีความเหมาะสมที่จะใช้ในการเตรียมอนุพันธ์ของทอรีนเพื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงมากกว่า ฟลูออเรสคามีน ซึ่งสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนคือ ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.02 โมลาร์ต่ออะซิโตไนไตรล์ ในอัตราส่วน 65 : 35 เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ โดยควบคุมอัตราการไหล 0.8 มิลลิลิตร/นาที ทำการแยกสารด้วยคอลัมน์ชนิดรีเวิร์สเฟส C18 และตรวจวัดปริมาณสารอนุพันธ์ของทอรีนด้วยตัวตรวจวัดชนิดฟลูออเรสเซนส์วัดที่ความยาวคลื่นของการกระตุ้นและความยาวคลื่นของการเปล่งแสงคือ 333 และ 451 นาโนเมตร ตามลำดับ กราฟมาตรฐานอยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.1–1.0 มิลลิกรัม/ลิตร ให้สมการถดถอย y = 816.4x + 17.49 สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) 0.998 ขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดและขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์ปริมาณคือ 0.03 และ 0.10 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ผลการนำวิธีการข้างต้นไปทำการตรวจวัดปริมาณทอรีนในตัวอย่างน้ำนมแปรรูป 9 ชนิด พบว่า สามารถตรวจพบทอรีนได้อยู่ในช่วง < 10 ถึง 16.72 ไมโครกรัม/100 กรัม ทั้งนี้พบว่า น้ำนมแปรรูปที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อนสูงกว่านั้นมีปริมาณทอรีนต่ำกว่าน้ำนมที่ผ่านกระการให้ความร้อนที่น้อยกว่า น้ำนมที่ผ่านกระบวนการแต่งกลิ่นเลียนแบบธรรมชาติมีปริมาณทอรีนต่ำกว่าน้ำนมที่ไม่ผ่านกระบวนการแต่งกลิ่นเลียนแบบธรรมชาติ

คำสำคัญ: ทอรีน ออร์โท-พทาลอัลดีไฮด์ ฟลูออเรสคามีน น้ำนมแปรรูป

Abstract

This objective of this research was to study the method to analyse taurine content by high-performance liquid chromatography by derivatization method. *O*-phathalaldehyde and fluorescamine were used to react with taurine for detected by fluorescence detector. The result presented that

O-phathalaldehyde was the appropriate substance for derivertise with taurine than fluorescamine. The mobile phase system was 0.02 M phosphate buffer pH 5.4: acetonitrile as 65 : 35 and controlled flow rate at 0.8 ml / minutes. The taurine was separated in reversed-phase fortis C-18 5 μm analytical column and detected by fluorescence detector that measure the excitation wavelength and emission wavelength at 333 and 451 nm respectively. The linearity range of standard taurine calibration curve was in the range of 0.1 to 1.0 mg/L. The regression equation of standard curve was y = 816.4x + 17.49 and the correlation coefficient (R^2) was 0.998; limit of detection and limit of quantitation was 0.30 and 0.10 mg/L respectively. Then the method was applied to analyse taurine in 9 types of processed milk. The results showed that all milk samples contained taurine between < 0.10 to 0.16 mg/kg. Taurine in prolong heated processed milk showed the lower amount of taurine content than processed milk through short low heat. Processed flavor milk contained lower the amount of taurine than natural flavor processed milk.

Keywords: Taurine, *O*-phathalaldehyde, Fluorescamine, Processed Milk

บทนำ

ทอรีน (Taurine หรือ 2-aminoethane sulfonic acid) เป็นกรดอะมิโนอิสระที่มีคุณสมบัติเป็นกลางและไม่ใช่หน่วยย่อยของโปรตีน ภายในโครงสร้างของทอรีนมีกำมะถันหรือซัลเฟอร์ (Sulfur) เป็นองค์ประกอบโดยสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมนั้นสามารถสร้างทอรีนได้จากกระบวนการเมตาบอลิซึมโดยมีซิสเตอีน (Cysteine) เป็นสารตั้งต้น และทอรีนจะถูกขับออกทางปัสสาวะ [1] ทอรีนนั้นมีบทบาทสำคัญต่อการเจริญเติบโตของมนุษย์ ดังนั้นเด็กที่มีภาวะขาดทอรีนอาจทำให้เกิดการเจริญเติบโตได้ช้ากว่าปกติและถ้ามีภาวะขาดทอรีนอย่างรุนแรงอาจทำให้เกิดอาการเซื่องซึม ผมเปลี่ยนสี ตับถูกทำลาย สูญเสียกล้ามเนื้อและไขมันได้ เนื่องจากกระบวนการสังเคราะห์ทอรีนภายในร่างกายนั้นจำเป็นต้องมีวิตามินบี 6 ทำหน้าที่เป็นโคแฟคเตอร์ด้วย ดังนั้นหากร่างกายได้รับวิตามินบี 6 น้อยเกินไปก็สามารถทำให้ร่างกายเสี่ยงต่อการเกิดภาวะขาดทอรีนได้เช่นกัน [2] ทอรีนนั้นมีบทบาทในการทำงานของอวัยวะส่วนต่างๆ ของร่างกาย เช่น สมอง หัวใจ ตับ กล้ามเนื้อลาย เรตินาและในเลือด ซึ่งหากอวัยวะเหล่านี้มีการทำงานผิดปกตินั้นจะทำให้ผู้ป่วยมีความเสี่ยงต่อการเป็นโรคหลอดเลือดหัวใจตามมา ดังนั้นทอรีนจึงช่วยในการลดความผิดปกติของอวัยวะเหล่านี้และทำให้ลดความเสี่ยงต่อการเป็นโรคหลอดเลือดหัวใจอีกด้วย [3]

ปัจจุบันนั้นมีการทำทอรีนไปใช้ในทางอุตสาหกรรมอาหารเพื่อประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ โดยการใช้ทอรีนเป็นส่วนผสมในเครื่องดื่มชูกำลังในปริมาณสูงถึง 1000-3000 มิลลิกรัม อีกทั้งยังมีการนำทอรีนไปใช้เป็นส่วนผสมในนมผงสำหรับเด็กอีกด้วย [3] ซึ่งความเป็นจริงแล้วในชีวิตประจำวันของคนเรานั้นมีโอกาสได้รับทอรีนเข้าสู่ร่างกายจากอาหารที่บริโภคได้หลายประเภทเช่น เนื้อหมู เนื้อไก่ (บริเวณหน้าอกและสะโพก) เนื้อวัว ทูน่า กุ้ง หอยนางรม นมวัว โยเกิร์ต หรือแม้แต่ในไอศกรีมวานิลลา โดยอาหารแต่ละประเภทแต่ละชนิดนั้นมีปริมาณทอรีนอยู่มากน้อยแตกต่างกัน [4] หากมีการบริโภคอาหารแบบปกติในชีวิตประจำวันแล้วมนุษย์

มีโอกาสได้รับทอรีนจากอาหารประมาณ 40 – 400 มิลลิกรัม (ไม่นับรวมที่ได้รับจากผัก) [5-6]

เป็นที่ทราบกันดีว่านมมีคุณค่าทางโภชนาการต่อมนุษย์มากมาย ในปัจจุบันผู้คนมีการบริโภคนมมากขึ้น อีกทั้งยังมีผลิตภัณฑ์จากนมหลากหลายชนิดโดยผลิตภัณฑ์เหล่านี้มีการปรุงแต่งเพิ่มรสชาติให้ได้รับความนิยมจากผู้บริโภค และเป็นการเพิ่มทางเลือกให้ผู้บริโภคอีกด้วย นอกจากนี้ในปัจจุบันก็มีรายงานเกี่ยวกับปริมาณทอรีนในนมเช่นกัน [4] โดยงานวิจัยนี้ทำการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนโดยการเตรียมเป็นสารอนุพันธ์ที่แตกต่างกันเพื่อนำไปใช้ในการศึกษาปริมาณทอรีนในตัวอย่างน้ำนมที่ผ่านกระบวนการแปรรูปและการปรุงแต่งรสชาติต่างๆ

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อเลือกใช้สารที่เตรียมเป็นสารอนุพันธ์กับทอรีนที่เหมาะสมเพื่อใช้วิเคราะห์ปริมาณด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

2. เพื่อวิเคราะห์ปริมาณทอรีนในตัวอย่างน้ำนมแปรรูปและน้ำนมแต่งกลิ่น

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

- สารมาตรฐานทอรีน (tarine) จากบริษัท Sigma
- สารออร์โท-พทาลอัลดีไฮด์ (*o*-phathalaldehyde) จากบริษัท Pickering
- สารฟลูออเรสคามีน (fluorescamine) จากบริษัท Sigma
- ตัวอย่างน้ำนมแปรรูปทั้งหมด 9 ชนิด ได้แก่ นมพาสเจอไรส์รสจืด นมพาสเจอไรส์รสช็อคโกแลต นมพาสเจอไรส์รสสตรอเบอร์รี่ นมพาสเจอไรส์รสกล้วย นมยูเอชทีรสจืด นมยูเอชทีรสช็อคโกแลต นมยูเอชที รสสตรอเบอร์รี่ นมยูเอชทีรสหวาน และนมสเตอริไลส์
- เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงที่ใช้ตัวตรวจวัดแบบ fluorescence (รุ่น HP 1100) จากบริษัท Hewlett-Packard โดยใช้คอลัมน์ C18 (5 ไมครอน, 4.6x250 mm) จากบริษัท fortis
- เครื่องฟลูออเรสเซนต์สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น JASCO FP-6200
- เครื่องชั่งอย่างละเอียด 4 ตำแหน่ง (รุ่น AB204s) จากบริษัท METTLER TOLEDO
- เครื่องผลิตน้ำปราศจากไอออน (รุ่น LaboStar) จากบริษัท SIEMENS
- เครื่อง pH meter (รุ่น Cyberscan 500)
- เครื่องเขย่า (รุ่น Vortex-genie 2) จากบริษัท Scientific
- เครื่อง Centrifuge (รุ่น Zentrifugen EBA 8S)

1. การศึกษาสารที่เหมาะสมในการเตรียมเป็นสารอนุพันธ์กับทอรีน

1.1 การศึกษาการใช้สารออร์โท-พทาลอัลดีไฮด์ (OPA) เตรียมเป็นสารอนุพันธ์

สารมาตรฐานทอรีนเข้มข้น 1000 มิลลิกรัม/ลิตร เตรียมโดยชั่งสารทอรีน 0.10 กรัมละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน เก็บใส่ในขวดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สารละลายออร์โท-พทาลอัลดีไฮด์เตรียมโดยการชั่งออร์โท-พทาลอัลดีไฮด์มา 0.25 กรัม ละลายด้วยเมทานอล 1.0 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 2-เมอร์แคปโตเอทานอล 200 ไมโครลิตร ทำการปรับปริมาตรเป็น 5 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.4 M จากนั้นเตรียมเป็นสารอนุพันธ์ของทอรีนกับออร์โท-พทาลอัลดีไฮด์โดยปิเปตต์สารมาตรฐานทอรีน 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองและเติมสารละลายออร์โท-พทาลอัลดีไฮด์ 20 ไมโครลิตร จากนั้นทำให้เข้ากันด้วยเครื่องวอร์เท็กซ์และตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงนำไปหาความยาวคลื่นของการกระตุ้น (λ_{ex}) และความยาวคลื่นของการเปล่งแสง (λ_{em})

ด้วยเครื่องสเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์เพื่อเก็บค่าความยาวคลื่นของการกระตุ้น (λ_{ex}) และความยาวคลื่นของการเปล่งแสง (λ_{em}) เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป จากนั้นทำการสร้างกราฟมาตรฐานด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงโดยใช้สภาวะดังนี้ ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่คือสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 5.4 เข้มข้น 0.02 M : เมทานอลอัตราส่วน 60 : 40 (v/v) [1] ให้เป็นระบบที่ 1 เปรียบเทียบกับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 5.4 เข้มข้น 0.02 M : อะซิโตไนไตรล์อัตราส่วน 65: 35 (v/v) ให้เป็นระบบที่ 2 ; คอลัมน์ C18 เส้นผ่านศูนย์กลางและความยาว 4.6 x 250 มิลลิเมตรขนาดอนุภาค 5 ไมครอน; อัตราการไหล 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที; ปริมาตรต่อหนึ่งตัวอย่างวิเคราะห์ 20 ไมโครลิตร; ตัวตรวจวัดฟลูออเรสเซ็นต์ดีเทคเตอร์ใช้ความยาวคลื่นของการกระตุ้นและการเปล่งแสงเท่ากับ 333 และ 451 นาโนเมตร ตามลำดับ

1.2 การศึกษาการใช้สารฟลูออเรสคามีน (fluorescamine) เตรียมเป็นสารอนุพันธ์

เตรียมสารมาตรฐานทอรีนตามขั้นตอนที่แสดงไว้ดังหัวข้อ 1.1 จากนั้นปิเปตต์สารละลายมาตรฐานทอรีนเข้มข้น 1000 มิลลิกรัม/ลิตร มา 1 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.025 mM pH 9.2 ต่อมาเตรียมสารละลายฟลูออเรสคามีนโดยการชั่งฟลูออเรสคามีน 0.07 กรัม ละลายในอะซิโตไนไตรล์และปรับปริมาตรให้ได้ 25 มิลลิลิตร จากนั้นเก็บใส่ขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเตรียมเป็นสารอนุพันธ์ของทอรีนกับฟลูออเรสคามีนโดยผสมสารละลายมาตรฐานทอรีนในบอเรตบัฟเฟอร์ pH 9.2 กับสารละลายฟลูออเรสคามีน อัตราส่วน 2 : 1 ทำการผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องวอร์เท็กซ์และตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำไปหาความยาวคลื่นของการกระตุ้น (λ_{ex}) และความยาวคลื่นของการเปล่งแสง (λ_{em}) ด้วยเครื่องสเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์เพื่อเก็บค่าความยาวคลื่นของการกระตุ้น (λ_{ex}) และความยาวคลื่นของการเปล่งแสง (λ_{em}) เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป ต่อมาทำการสร้างกราฟมาตรฐานด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงโดยใช้สภาวะดังนี้ ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 2.6 เข้มข้น 0.015 M : อะซิโตไนไตรล์ อัตราส่วน 65 : 35 (V/V) [7] อัตราการไหล 0.6 มิลลิลิตร/นาที ให้เป็นระบบที่ 3 เปรียบเทียบกับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 5.4 เข้มข้น 0.02 M : อะซิโตไนไตรล์อัตราส่วน 65 : 35 (V/V) อัตราการไหล 0.8 มิลลิลิตร/นาที ให้เป็นระบบที่ 4; คอลัมน์ C18 เส้นผ่านศูนย์กลางและความยาว 4.6 x 250 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 5 ไมครอน; ปริมาตรต่อหนึ่งตัวอย่างวิเคราะห์ 20 ไมโครลิตร; ตัวตรวจวัดฟลูออเรสเซ็นต์ดีเทคเตอร์ใช้ความยาวคลื่นของการกระตุ้นและการเปล่งแสงเท่ากับ 393 และ 487 นาโนเมตรตามลำดับ

1.3 ทวนสอบวิธีวิเคราะห์โดยการหาขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัด (LOD) และขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์ปริมาณ (LOQ)

เตรียมสารมาตรฐานทอรีนเข้มข้น 0.1 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร ความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ จากนั้นสร้างกราฟมาตรฐานจากค่าเฉลี่ยของแต่ละความเข้มข้นโดยการเตรียมเป็นสารอนุพันธ์ที่เหมาะสมที่ได้จากขั้นตอนที่ 1.1 และ 1.2 จากนั้นค่าวัดด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแล้วหาค่า LOD และ LOQ โดยใช้การคำนวณ $3\sigma/S$ และ $10\sigma/S$ ตามลำดับ เมื่อ σ คือส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และ S คือค่าความชันที่ได้จากกราฟมาตรฐาน

2. วิเคราะห์ปริมาณทอรีนในผลิตภัณฑ์นมที่ผ่านกระบวนการแปรรูปแตกต่างกัน

เก็บตัวอย่างน้ำนมแปรรูป 9 ชนิด แต่ละชนิดนำมาชั่งด้วยเครื่องชั่งละเอียด

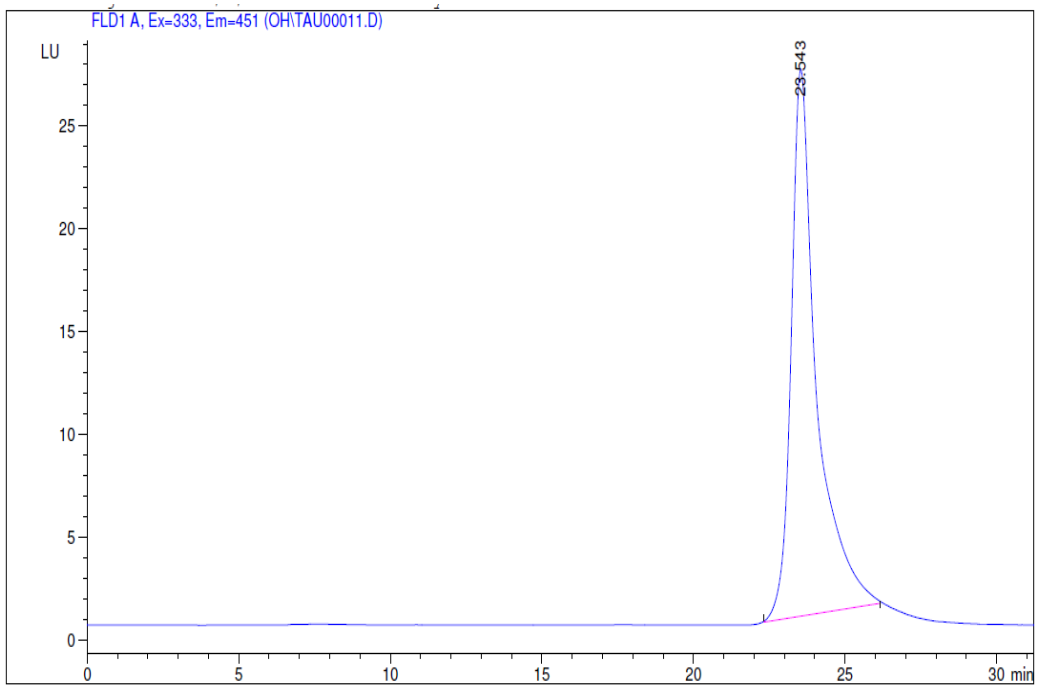
4 ตำแหน่ง ตัวอย่างละ 2.XXXX กรัม นำตัวอย่างน้ำนมมาตกตะกอนโปรตีนในน้ำนมด้วย 5% กรดไตรคลอโรอะซีติกปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4500 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วเก็บส่วนสารละลายใส 1 มิลลิลิตร กรองผ่านไซริงจ์ ด้วยตัวกรองไนลอนขนาด 0.45 ไมครอน จากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณทอรีนด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยทำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ซึ่งตัวอย่างน้ำนมแปรรูปทั้ง 9 ชนิด ได้แก่

- นมพาสเจอไรส์รสจืดที่มีส่วนประกอบของน้ำนมโคสด 100 เปอร์เซ็นต์
- นมพาสเจอไรส์รสช็อคโกแลตที่มีส่วนประกอบของนมพร่องมันเนย น้ำตาล และผงโกโก้
- นมพาสเจอไรส์รสสตรอเบอร์รี่ที่มีส่วนประกอบของนมพร่องมันเนย น้ำตาล สารแต่งสี และกลิ่นสังเคราะห์
- นมพาสเจอไรส์รสกล้วยที่มีส่วนประกอบของน้ำนมโค น้ำตาล นมผงขาดมันเนย สารแต่งสี และกลิ่นสังเคราะห์
- นมยูเอชทีรสจืดที่มีส่วนประกอบของน้ำนมโคสด 100 เปอร์เซ็นต์
- นมยูเอชทีรสช็อคโกแลตที่มีส่วนประกอบของน้ำนมโคสด น้ำตาล ผงโกโก้ และแต่งกลิ่นเลียนแบบธรรมชาติ
- นมยูเอชทีรสสตรอเบอร์รี่ที่มีส่วนประกอบของน้ำนมโคสด น้ำตาล กลิ่นสตรอเบอร์รี่เลียนแบบธรรมชาติ และเจือสีสังเคราะห์
- นมยูเอชทีรสหวานที่มีส่วนประกอบของน้ำนมโคสดและน้ำตาล
- นมสเตอริไลส์ที่มีส่วนประกอบของน้ำนมโค 100 เปอร์เซ็นต์

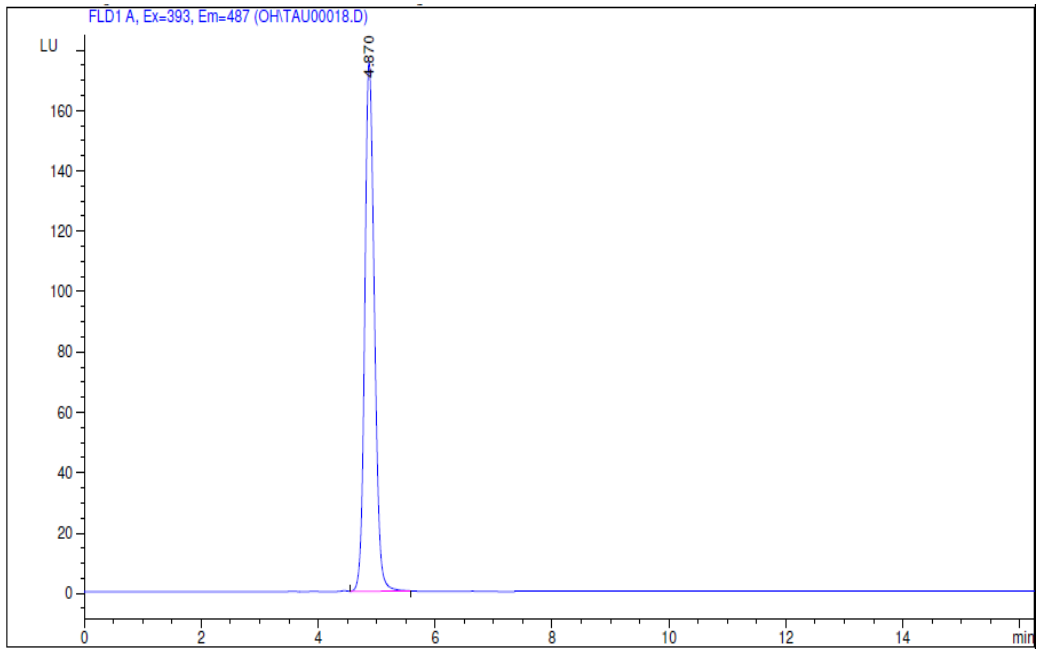
ผลการวิจัย

จากการทดลองสร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้สารที่ทำอนุพันธ์ คือ ออร์โท-พทาลอัลดีไฮด์โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 5.4 เข้มข้น 0.02 M: เมทานอลอัตราส่วน 60 : 40 (v/v) และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 5.4 เข้มข้น 0.02 M: อะซิโตไนไตรล์อัตราส่วน 65 : 35 (v/v) ในช่วงความเข้มข้น 0.1 – 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร ให้สมการถดถอยคือ $y = 1645x - 97.99$ ($R^2 = 0.998$) และ $y = 816.4x + 17.49$ ($R^2 = 0.998$) ตามลำดับ โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานทอรีนที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร แสดงดังภาพที่ 1 และภาพที่ 2

จากการเปรียบเทียบโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานทอรีนโดยเตรียมเป็นสารอนุพันธ์กับออร์โท-พทาลอัลดีไฮด์ที่มีวัฏภาคเคลื่อนที่ที่แตกต่างกันนั้นจะเห็นว่าเมื่อใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 5.4 เข้มข้น 0.02 M: เมทานอลอัตราส่วน 60 : 40 (v/v) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่นั้นพบสัญญาณที่เวลา 23.54 นาที และสัญญาณที่ได้มีลักษณะอ้วนดูได้จากความกว้างของพีคมีค่า 0.83 นาที เมื่อเทียบกับสัญญาณที่ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 5.4 เข้มข้น 0.02 M: อะซิโตไนไตรล์อัตราส่วน 65 : 35 (V/V) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่นั้นพบสัญญาณที่เวลา 4.87 นาทีและสัญญาณที่ได้มีลักษณะผอมและสูงกว่าโดยความกว้างของพีคมีค่า 0.18 นาที

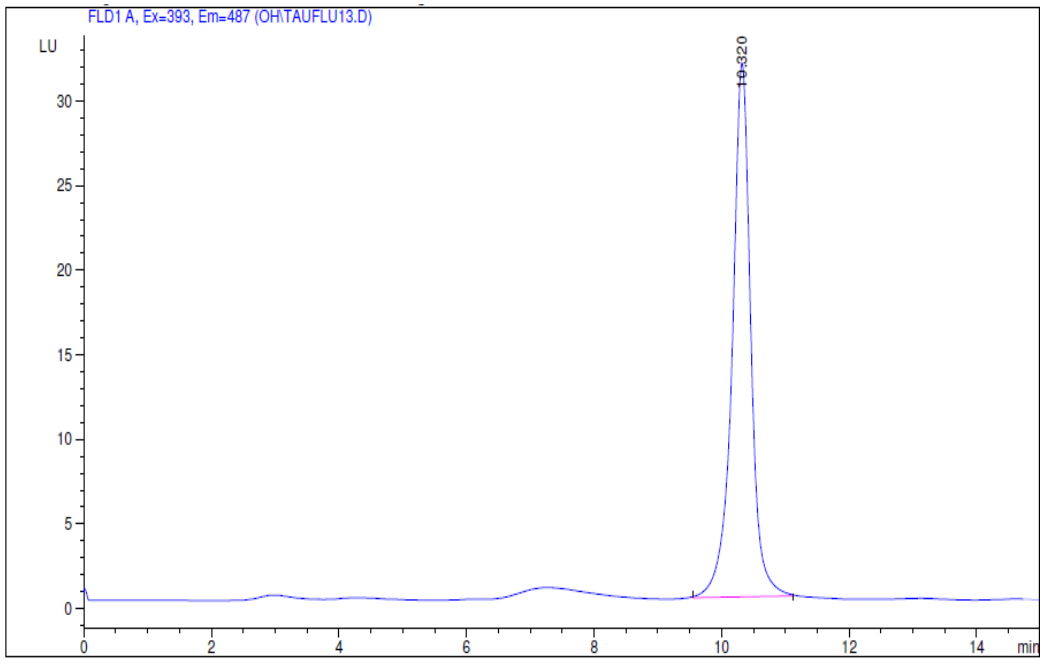


ภาพที่ 1 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานทอรีนเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 5.4 เข้มข้น 0.02 M : เมทานอลอัตราส่วน 60 : 40 (V/V)X

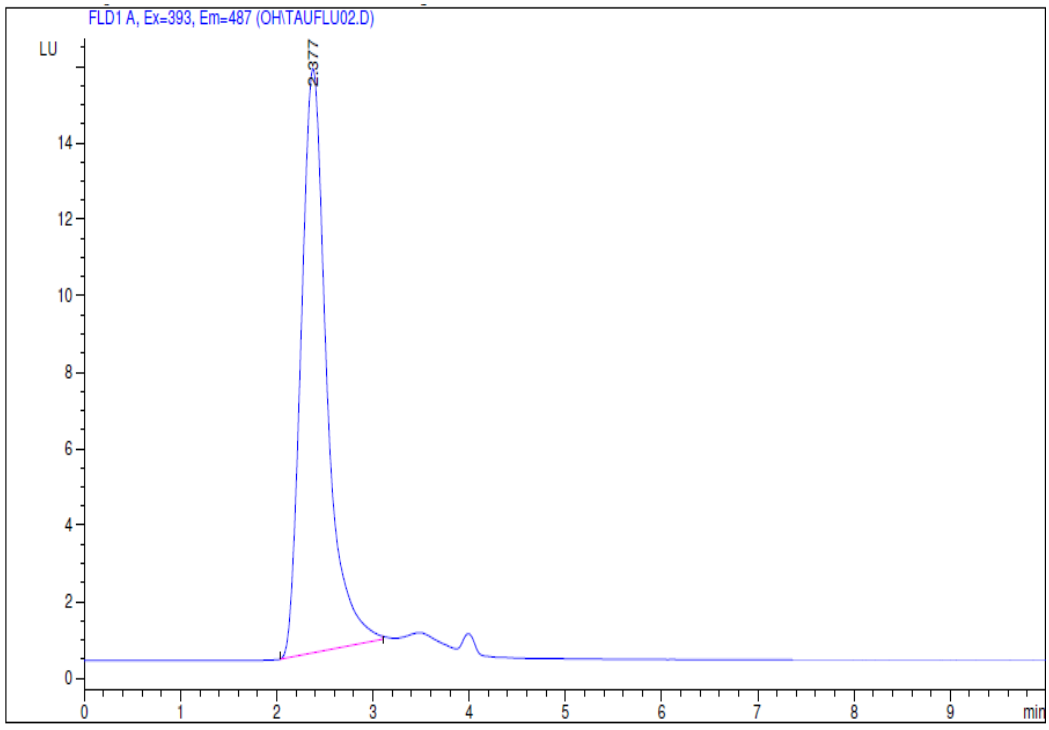


ภาพที่ 2 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานทอรีนเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร วัฏภาคเคลื่อนที่สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 5.4 เข้มข้น 0.02 M: อะซิโตไนไตรล์อัตราส่วน 65 : 35 (V/V)

เมื่อทำการสร้างกราฟมาตรฐานทอรีนโดยใช้สารที่ทำอนุพันธ์คือฟลูออเรสคามีนโดยใช้ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 2.6 เข้มข้น 0.025 M : อะซิโตไนไตรล์ อัตราส่วน 65 : 35 (V/V) อัตราการไหล 0.6 มิลลิลิตรต่อนาทีและสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 5.4 เข้มข้น 0.02 M : อะซิโตไนไตรล์อัตราส่วน 65 : 35 (V/V) อัตราการไหล 0.8 มิลลิลิตรต่อนาทีในช่วงความเข้มข้น 1.0 – 10.0 มิลลิกรัม/ลิตร ให้สมการถดถอยคือ y = 591.9x + 50.62 (R^2 = 0.999) และ y = 245.7x – 33.22 (R^2 = 0.986) ตามลำดับ โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานทอรีนที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร แสดงดัง ภาพที่ 3 และภาพที่ 4



ภาพที่ 3 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานทอรีนความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร วัฏภาคเคลื่อนที่สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 2.6 เข้มข้น 0.015 M : อะซิโตไนไตรล์ อัตราส่วน 65 : 35 (V/V)



ภาพที่ 4 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานทอรีนความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร วัฏภาคเคลื่อนที่สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 5.4 เข้มข้น 0.02 M: อะซิโตไนไตรล์อัตราส่วน 65 : 35 (V/V)

จากภาพที่ 3 จะเห็นได้ว่าโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานทอรีนโดยเตรียมเป็นสารอนุพันธ์กับฟลูออเรสคามีน ที่มีวัฏภาคเคลื่อนที่ที่แตกต่างกันนั้นจะเห็นว่าเมื่อใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 2.6 เข้มข้น 0.015 M: อะซิโตไนไตรล์ อัตราส่วน 65 : 35 (V/V) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่นั้นพบสัญญาณที่เวลา 10.32 นาที และสัญญาณที่ได้มีความกว้างของพีค 0.30 นาที จากภาพที่ 4 เมื่อใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 5.4 เข้มข้น 0.02 M: อะซิโตไนไตรล์ อัตราส่วน 65 : 35 (V/V) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่นั้นพบสัญญาณที่เวลา 2.37 นาที และสัญญาณมีความกว้างของพีค 0.28 นาที

เมื่อเปรียบเทียบผลจากการใช้สารที่เตรียมเป็นสารอนุพันธ์ที่แตกต่างกันระหว่างออร์โท-พทาลอัลดีไฮด์ และฟลูออเรสคามีนนั้นให้ผลใกล้เคียงกัน แต่สัญญาณของสารอนุพันธ์ของทอรีนกับออร์โท-พทาลอัลดีไฮด์จะดีกว่าในแง่ของความว่องไวในการตรวจวัด (Sensitivity) และในแง่ของประสิทธิภาพในการแยกซึ่งดูได้จากความกว้างของพีคที่มีค่าค่อนข้างน้อย อีกทั้งเมื่อพิจารณาปัจจัยอื่นประกอบด้วย เช่น ราคา ปริมาณสารที่ใช้แล้วนั้นออร์โท-พทาลอัลดีไฮด์เหมาะสมสำหรับใช้ในการเตรียมสารอนุพันธ์ของทอรีนเพื่อการวิเคราะห์ปริมาณด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟี ของเหลวสมรรถนะสูงมากกว่าฟลูออเรสคามีน ดังนั้นในการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนในตัวอย่างน้ำนมแปรรูปจึงเลือกออร์โท-พทาลอัลดีไฮด์ ใช้เป็นสารที่เตรียมเป็นสารอนุพันธ์ของทอรีนโดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 5.4 ความเข้มข้น 0.02 M: อะซิโตไนไตรล์อัตราส่วน 65 : 35 (V/V)

ข้อมูลเปรียบเทียบระหว่างสารที่ใช้เตรียมอนุพันธ์ของทอรีน 2 ชนิดที่สภาวะแตกต่างกันแสดงดังตารางที่ 1

จากตารางที่ 1 แสดงให้เห็นได้ว่าในระบบที่ 2 ซึ่งใช้ออร์โท-พทาลอัลดไฮด์ เป็นสารที่ใช้ทำอนุพันธ์กับทอรีน และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 5.4 เข้มข้น 0.02 M: อะซิโตไนไตรล์ อัตราส่วน 65 : 35 (v/v) สามารถวิเคราะห์ทอรีน ได้ในช่วงความเข้มข้น 0.1 – 1.0 ppm และให้ค่าของพื้นที่ใต้พีคที่ความเข้มข้น 1 ppm สูงที่สุดเมื่อเทียบกับระบบอื่นๆ แสดงถึงความว่องไวในการตรวจวัดที่ดี ในแง่ของความเป็นเส้นตรงของสมการที่ได้จากกราฟมาตรฐานนั้น ระบบที่ 4 แสดงค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ที่ต่ำกว่าระบบอื่น และในแง่ของประสิทธิภาพในการแยกนั้นในระบบที่ 2 มีค่าความกว้างของพีคต่ำที่สุด ส่งผลให้เมื่อใช้ในการวิเคราะห์ในตัวอย่างที่มีสารอื่นรบกวนนั้นจะทำให้มองเห็นการแยกของสัญญาณของทอรีนได้ชัดเจนกว่าอีก 3 ระบบที่เหลือ

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบผลการทดลองภายใต้สภาวะที่แตกต่างกันและสารอนุพันธ์ที่แตกต่างกันดังนี้

ค่าที่ใช้	ระบบที่ 1	ระบบที่ 2	ระบบที่ 3	ระบบที่ 4
1. รีเทนชันไทม์	23.5 min	4.9 min	10.3 min	2.4 min
2. ปริมาตรของสารอนุพันธ์	20 μL	20 μL	100 μL	100 μL
3. ช่วงความเข้มข้นที่วัดได้	0.1 – 1.0 ppm	0.1 – 1.0 ppm	1.0 – 10.0 ppm	1.0 – 10.0 ppm
4. พื้นที่ใต้พีคที่ 1 ppm	1553.50	2021.72	637.58	282.30
5. สมการถดถอย	y = 1654x-97.99	y = 816.4x+17.49	y = 591.9x+50.62	y = 245.7x-33.22
6. ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์	0.998	0.998	0.999	0.986
7. ความกว้างของพีค	0.83	0.18	0.30	0.28

หมายเหตุ สภาวะต่างๆ ของระบบทั้ง 4 ระบบ แสดงดังหัวข้อ 1.1 และ 1.2

จากการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนในตัวอย่างน้ำนมแปรรูปชนิดต่างๆ นั้นปรากฏว่าในน้ำนมแปรรูปแต่ละชนิดและน้ำนมแปรรูปที่แต่งกลิ่นเลียนแบบธรรมชาติแต่ละชนิดนั้นมีปริมาณทอรีนที่แตกต่างกันโดยน้ำนมแปรรูปที่มีปริมาณทอรีนสูงที่สุดคือนมพาสเจอไรส์รสจืดมีปริมาณทอรีนเข้มข้น 16.72 ไมโครกรัม/100 กรัม และน้ำนมแปรรูปที่มีปริมาณทอรีนต่ำที่สุดคือนมยูเอชทีรสช็อคโกแลตซึ่งมีปริมาณทอรีนต่ำกว่า 10 ไมโครกรัม/100 กรัม ปริมาณทอรีนในน้ำนมแปรรูปชนิดต่างๆ นั้นแสดงดังตารางที่ 2 แม้ว่าตอนนี้ยังไม่มีรายงานที่แน่ชัดว่าปัจจัยที่ส่งผลให้ปริมาณทอรีนในน้ำนมแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันได้อย่างไรแต่จากรายงานที่ผ่านมาพบว่าน้ำนมสดและน้ำนมที่แปรรูปนั้นมีปริมาณที่แตกต่างกัน [3] อีกทั้งกระบวนการผลิตนมแปรรูปแต่ละชนิดนั้นมีข้อแตกต่างหลายประการ เช่น ส่วนประกอบของปริมาณน้ำนม ความร้อนที่ใช้ ภาชนะที่ใส่ จุลินทรีย์ที่เหลือหลังกระบวนการผลิตสารเติมแต่งที่ใส่ (สารแต่งกลิ่นเลียนแบบธรรมชาติ) ซึ่งล้วนอาจส่งผลต่อทอรีนในน้ำนมแปรรูปให้มีปริมาณที่แตกต่างกัน

ตารางที่ 2 แสดงปริมาณทอรีนในน้ำนมแปรรูปชนิดต่างๆ

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นทอรีน (μg/100g) n = 3
นมพาสเจอไรส์รสจืด	16.72 ± 0.67
นมพาสเจอไรส์รสช็อคโกแลต	11.80 ± 0.39
นมพาสเจอไรส์รสสตรอเบอร์รี่	13.77 ± 0.13
นมพาสเจอไรส์รสกล้วย	12.71 ± 0.17
นมยูเอชทีรสจืด	12.83 ± 0.34
นมยูเอชทีรสช็อคโกแลต	9.91 ± 0.50
นมยูเอชทีรสสตรอเบอร์รี่	10.67 ± 0.40
นมยูเอชทีรสหวาน	10.92 ± 0.54
นมสเตอริไลส์	11.42 ± 0.37

สรุปและอภิปรายผล

จากการเปรียบเทียบสารที่ใช้ทำอนุพันธ์กับทอรีนเพื่อวิเคราะห์ปริมาณทอรีนในตัวอย่างน้ำนมแปรรูปด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงนั้นการใช้ออร์โท-พทาลอัลดีไฮด์มีข้อดีกว่าฟลูออเรสคามีนคือมีราคาที่ถูกกว่าสัญญาณที่ได้นั้นให้ความว่องไวในการตรวจวัดมากกว่าซึ่งสามารถตรวจวัดได้ในระดับความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร อีกทั้งยังใช้ปริมาณสารในการทำปฏิกิริยาที่น้อยกว่า ดังนั้นออร์โท-พทาลอัลดีไฮด์จึงมีความเหมาะสมในการใช้เตรียมสารอนุพันธ์ของทอรีนเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนในน้ำนมแปรรูป จากการสร้างกราฟมาตรฐานทอรีนโดยการเตรียมเป็นสารอนุพันธ์กับออร์โท-พทาลอัลดีไฮด์แล้วให้สมการถดถอยคือ $y = 816.4x + 17.49$ ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) เท่ากับ 0.998 มีขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัด เท่ากับ 0.03 มิลลิกรัม/ลิตร และขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์ปริมาณ เท่ากับ 0.10 มิลลิกรัม/ลิตร

จากการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนในตัวอย่างน้ำนมแปรรูปแต่ละชนิดนั้นจะเห็นได้ว่าน้ำนมแปรรูปที่ผ่านการแต่งกลิ่นชนิดเดียวกันแต่ผ่านกระบวนการให้ความร้อนที่แตกต่างกันนั้นจะมีปริมาณทอรีนที่แตกต่างกันโดยน้ำนมแปรรูปที่ผ่านการให้ความร้อนน้อยกว่าจะมีปริมาณทอรีนที่สูงกว่าน้ำนมแปรรูปทีผ่านการให้ความร้อนสูงกว่า และเมื่อเปรียบเทียบน้ำนมที่ผ่านการให้ความร้อนแบบเดียวกันแต่มีการแต่งกลิ่นต่างชนิดกันนั้นจะเห็นได้ว่าน้ำนมที่ผ่านการแต่งกลิ่นเลียนแบบธรรมชาตินั้นจะมีปริมาณทอรีนที่ต่ำกว่าน้ำนมที่ไม่มีการแต่งกลิ่นเลียนแบบธรรมชาติ

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการทำปริญญานิพนธ์สำหรับนิสิตในระดับบัณฑิตศึกษา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

เอกสารอ้างอิง

[1] Shifen M., Xiaojing Ding.; and Yongjian Liu. (2002). Separation method for taurine analysis in biological samples. *Journal of Chromatography B.* 781: 251-267.

[2] ประสงค์ เทียนบุญ. (2547). ทอรีน. *วารสารโภชนะบำบัด*. 15(1): 23-32.

[3] Oktawia P. Wojcik., Karen L.; Koenig.; et al. (2010). The potential protective effect of taurine on coronary heart disease. *Artherosclerosis*. 208: 19-25.

[4] Laidlaw S., Grosvenor M.; and Kopple JD. (1990). The taurine content of common foodstuffs. *Journal of parenteral and enteral nutrition*. 14: 183-188.

[5] Stpleton P.P., R.P. Charles, H.P. Redmond; and D.J. Bouchier-hayes. (1997). Taurine and human nutrition. *Clinical Nutrition* 16: 103-108.

[6] Finnegan D. (2003). The health effect of stimulant drink. *British nutrition foundation nutrition bulletin*. 28: 147-55.

[7] Gillian P. McMahon, Richard O'Kennedy.; and Mary T. Kelly. (1996). High-performance liquid chromatographic determination of taurine in human plasma using pre-column extraction and derivatization. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 14: 1287-1294.