

เอกสารผลงานที่เสนอให้ประเมินเพื่อแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่ง
นักวิทยาศาสตร์ 8ว

ของ

นางศรีสุดา ห่มระฤก
นักวิทยาศาสตร์ 7ว

เรื่องที่ 2

การศึกษาวิธีวิเคราะห์น้ำตาลชนิดต่าง ๆ ในตัวอย่างนมและผลิตภัณฑ์นม
โดยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิกวิดโครมาโตกราฟี

ผู้ร่วมดำเนินการ

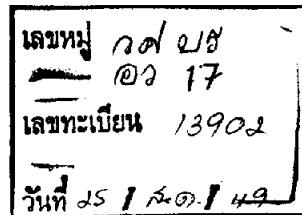
นางบังอร บุญชู
นักวิทยาศาสตร์ 7ว

กลุ่มบริหารจัดการทดสอบความชำนาญ
สำนักบริหารและรับรองห้องปฏิบัติการ
กรมวิทยาศาสตร์บริการ

พ.ศ. 2547

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	i
สารบัญ	ii
สารบัญตาราง	iii
สารบัญภาพ	iv
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ปัญหาและที่มาของการศึกษาทดลอง	1
1.2 วัตถุประสงค์	1
1.3 ประโยชน์ที่ได้รับ	1
1.4 ระยะเวลาดำเนินการ	1
บทที่ 2 วารสารปริทัศน์	2
บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการ	11
3.1 ตัวอย่าง	11
3.2 วัสดุและอุปกรณ์	11
3.3 สารเคมี สารละลายและวิธีเตรียม	12
3.4 การศึกษาทดลอง	15
บทที่ 4 ผลการศึกษาทดลอง	17
4.1 ผลการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิกวิด โครมาโตกราฟ	17
4.2 การตรวจสอบประสิทธิภาพของคอลัมน์	18
4.3 ผลวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานน้ำตาลผสม 5 ชนิด	18
4.4 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์	18
4.5 ผลวิเคราะห์ตัวอย่างนมและผลิตภัณฑ์นม	19
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	21
กิตติกรรมประกาศ	23
เอกสารอ้างอิง	24
ภาคผนวก	25
ภาคผนวกที่ 1 ผลการศึกษาทดลอง	26
ภาคผนวกที่ 2 โครมาโตแกรมและกราฟ	41



สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	สรุปชนิดและรีเทนชันไทม์(R_t)ของสารละลายมาตรฐานน้ำตาล 5 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 %	17
ตารางที่ 2	แสดงค่า capacity factor และ peak asymmetry	18
ตารางที่ 3	แสดงค่า resolution และ selectivity ของ peak แต่ละคู่	18
ตารางที่ 4	แสดงค่า retention time , t_r (นาที) ในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและปริมาณของสารละลายมาตรฐานน้ำตาลผสม 5 ชนิด ที่ความเข้มข้น 0.1 %	27
ตารางที่ 5	แสดงค่า retention time , t_r (นาที) ในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและปริมาณของสารละลายมาตรฐานน้ำตาลผสม 5 ชนิด ที่ความเข้มข้น 0.5 %	28
ตารางที่ 6	แสดงค่า calculation value ในการสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลฟรักโทส ที่ความเข้มข้น 5 ระดับ	29
ตารางที่ 7	แสดงค่า calculation value ในการสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลกลูโคส ที่ความเข้มข้น 5 ระดับ	29
ตารางที่ 8	แสดงค่า calculation value ในการสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลซูโครส ที่ความเข้มข้น 5 ระดับ	29
ตารางที่ 9	แสดงค่า calculation value ในการสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลมอลโทส ที่ความเข้มข้น 5 ระดับ	30
ตารางที่ 10	แสดงค่า calculation value ในการสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลแล็กโทส ที่ความเข้มข้น 5 ระดับ	30
ตารางที่ 11	แสดงค่า Instrument Detection Limit (IDL) ของสารละลายตัวอย่างนมสดที่มีความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดได้(original sample)	31
ตารางที่ 12	แสดงค่า Instrument Detection Limit (IDL) ของสารละลายตัวอย่างโยเกิร์ตผสมสตอเบอรี่ที่มีความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดได้(original sample)	32
ตารางที่ 13	แสดงค่า Instrument Detection Limit (IDL) ของสารละลายตัวอย่างไมโลที่มีความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดได้(original sample)	33
ตารางที่ 14	แสดงค่า % recovery %RSD และ LOQ ของน้ำตาลแล็กโทสในสารละลายตัวอย่างนมสดที่เติมสารละลายน้ำตาลมาตรฐานข้อ 3.3.8.3 (1) ความเข้มข้น 3 ระดับ	34

สารบัญตาราง (ต่อ)

		หน้า
ตารางที่ 15	แสดงค่า % recovery %RSD และ LOQ ของน้ำตาลฟรักโทสในสารละลาย ตัวอย่างโยเกิร์ตผสมสตรอเบอร์รี่ที่เติมสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน ข้อ 3.3.8.3 (2) ความเข้มข้น 3 ระดับ	35
ตารางที่ 16	แสดงค่า % recovery %RSD และ LOQ ของน้ำตาลกลูโคสในสารละลาย ตัวอย่างโยเกิร์ตผสมสตรอเบอร์รี่ที่เติมสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน ข้อ 3.3.8.3 (2) ความเข้มข้น 3 ระดับ	36
ตารางที่ 17	แสดงค่า % recovery %RSD และ LOQ ของน้ำตาลซูโครสในสารละลาย ตัวอย่างโยเกิร์ตผสมสตรอเบอร์รี่ที่เติมสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน ข้อ 3.3.8.3 (2) ความเข้มข้น 3 ระดับ	37
ตารางที่ 18	แสดงค่า % recovery %RSD และ LOQ ของน้ำตาลมอลโทสในสารละลาย ตัวอย่างไมโลที่เติมสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน ข้อ 3.3.8.3 (3) ความเข้มข้น 3 ระดับ	38
ตารางที่ 19	แสดงผลวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลแล็กโทส ซูโครส มอลโทส กลูโคส และ ฟรักโทสในตัวอย่างนมและผลิตภัณฑ์นม	39

สารบัญภาพ

	หน้า	
รูปที่ 1	แสดงสูตรโครงสร้างของน้ำตาล ⁽²⁾ ฟรักโทส กลูโคส ซูโครส มอลโทส แล็กโทส	4
รูปที่ 2	แสดงโครมาโตแกรมสารละลายมาตรฐานฟรักโทส กลูโคส ซูโครส มอลโทส และแล็กโทสที่ระดับความเข้มข้น 0.1%	42
รูปที่ 3	แสดงโครมาโตแกรมสารละลายมาตรฐานฟรักโทส กลูโคส ซูโครส มอลโทส และแล็กโทสที่ระดับความเข้มข้น 0.5%	43
รูปที่ 4	แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานน้ำตาลฟรักโทส ระหว่างความเข้มข้น กับ peak area	44
รูปที่ 5	แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส ระหว่างความเข้มข้น กับ peak area	45
รูปที่ 6	แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานน้ำตาลซูโครส ระหว่างความเข้มข้น กับ peak area	46
รูปที่ 7	แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานน้ำตาลมอลโทส ระหว่างความเข้มข้น กับ peak area	47
รูปที่ 8	แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานน้ำตาลแล็กโทส ระหว่างความเข้มข้น กับ peak area	48
รูปที่ 9	แสดงโครมาโตแกรมตัวอย่างนมสดความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดได้ 1 กรัม ต่อ 100 มิลลิลิตร	49
รูปที่ 10	แสดงโครมาโตแกรมตัวอย่างโยเกิร์ตผสมสตอเบอร์รี่ ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดได้ 1 กรัม ต่อ 100 มิลลิลิตร	50
รูปที่ 11	แสดงโครมาโตแกรมตัวอย่างไมโล ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดได้ 1.6 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร	51
รูปที่ 12	กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลชนิดต่างๆ ในตัวอย่างนมผงคัดแปลงและนมสด	52
รูปที่ 13	กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลชนิดต่างๆ ในตัวอย่างนมช็อคโกแลต	53
รูปที่ 14	กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลชนิดต่างๆ ในตัวอย่างไอศกรีม	54
รูปที่ 15	กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลชนิดต่างๆ ในตัวอย่างนมเปรี้ยวพร้อมดื่ม	55
รูปที่ 16	กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลชนิดต่างๆ ในตัวอย่างโยเกิร์ตผสมผลไม้	56

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ปัญหาและที่มาของการศึกษาทดลอง

เนื่องจากวิธีวิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมดในตัวอย่างนม และผลิตภัณฑ์นม ใช้วิธีวิเคราะห์โดยน้ำหนัก (Gravimetric method) ตามวิธีของมุนสันและวอล์กเกอร์ (Munson & Walk method) ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน แต่ไม่สามารถที่จะจำแนกชนิดของน้ำตาลชนิดต่างๆ ได้ ทำให้ได้ข้อมูลไม่ครบถ้วนเพื่อประกอบการซื้อขาย ตามฉลากขึ้นทะเบียนโภชนาการ ดังนั้นจึงได้นำเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิกวิดโครมาโตกราฟี (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ซึ่งสามารถหาน้ำตาลชนิดต่างๆทั้งในเชิงคุณภาพและปริมาณได้ เพื่อให้สอดคล้องกับความต้องการของลูกค้าในการขอขึ้นทะเบียนตามฉลากโภชนาการดังกล่าว และอาหารที่ส่งออกเพื่อจำหน่ายยังต่างประเทศโดยเฉพาะอย่างยิ่งในตลาดคู่ค้าใหญ่ๆของประเทศไทย เช่น กลุ่มตลาดร่วมยุโรป อเมริกา มีข้อบังคับว่าจะต้องแจ้งส่วนประกอบที่ฉลากให้ชัดเจน โดยเฉพาะสารประเภทคาร์โบไฮเดรต ต้องระบุว่าเป็นชนิดใดและปริมาณเท่าใด ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องพัฒนาวิธีวิเคราะห์ให้เหมาะสมกับสภาวะปัจจุบัน เพื่อประโยชน์ในการส่งสินค้าอาหารไปจำหน่ายยังต่างประเทศ และสามารถแข่งขันในตลาดโลกได้

1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาวิธีวิเคราะห์น้ำตาลชนิดต่างๆในนมและผลิตภัณฑ์นมในเชิงคุณภาพและปริมาณ โดยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิกวิดโครมาโตกราฟี

1.3 ประโยชน์ที่ได้รับ

1.3.1 ได้วิธีวิเคราะห์ที่เหมาะสมในการหาปริมาณน้ำตาลชนิดต่างๆในนมและผลิตภัณฑ์นมในเชิงคุณภาพและปริมาณ โดยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิกวิดโครมาโตกราฟี

1.3.2 เพิ่มขีดความสามารถของกรมวิทยาศาสตร์บริการในการให้บริการตรวจวิเคราะห์น้ำตาลชนิดต่างๆในตัวอย่างนมและผลิตภัณฑ์นมในเชิงคุณภาพและปริมาณ โดยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิกวิดโครมาโตกราฟี

1.3.3 ได้แนวทางในการนำเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิกวิดโครมาโตกราฟีไปประยุกต์ใช้วิเคราะห์หาน้ำตาลชนิดต่างๆในตัวอย่างอื่นๆได้

1.4 ระยะเวลาดำเนินการ

ตุลาคม 2544 - กันยายน 2546

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

2.1 น้ำตาล เป็นคาร์โบไฮเดรตที่มีรสหวานและละลายน้ำได้ดี จึงเรียกได้อีกอย่างว่าคาร์โบไฮเดรตที่ละลายได้ (soluble carbohydrate)^(3,4,6,7) ได้แก่

2.1.1 โมโนแซ็กคาไรด์ (monosaccharide) เป็นหน่วยที่เล็กที่สุดของคาร์โบไฮเดรตไม่สามารถถูกย่อยสลายต่อไปได้อีกหรือเรียกว่า simple sugar มีสูตรโครงสร้างทั่วไปคือ $(CH_2O)_n$ อาจมีจำนวนคาร์บอนอะตอมเป็น 3 4 5 6 หรือ 7 ก็ได้ การเรียกชื่อมักเรียกตามจำนวนคาร์บอนอะตอมเป็น triose tetrose pentose hexose และ heptose ตามลำดับ โมโนแซ็กคาไรด์ที่มีหมู่อัลดีไฮด์ในโมเลกุลจัดเป็นน้ำตาลอัลโดส (aldose) เช่น กลูโคส (glucose) ถ้ามีหมู่คีโตนในโมเลกุลจัดเป็นน้ำตาลคีโตส (ketose) เช่น ฟรุคโทส (fructose)

กลูโคส เป็นพวกลัลโดเฮกโซส (aldohexose) มีชื่อเรียกหลายอย่าง เช่น เดกซ์โทรส (dextrose) น้ำตาลองุ่น (grape sugar) เนื่องจากมีในองุ่นที่สุกเต็มที่แล้ว 20-30% และน้ำตาลในเลือด (blood sugar) เพราะในเลือด 100 ลูกบาศก์เซนติเมตรมีน้ำตาล 70-120 มิลลิกรัม กลูโคสใช้ในอุตสาหกรรมทำน้ำผลไม้ ลูกอม และลูกกวาด นอกจากนี้ยังใช้ผสมในเครื่องดื่มแทนน้ำตาลทรายด้วย จากการที่กลูโคสไม่สามารถถูกย่อยได้อีกจึงใช้ฉีดเข้ากระแสโลหิต เพื่อเป็นอาหารคนไข้ที่ไม่สามารถรับประทานอาหารได้ พบกลูโคสในปัสสาวะคนไข้โรคเบาหวาน การมีกลูโคสในปัสสาวะ เรียกว่า ไกลโคซูเรีย (glycosuria) กลูโคสจะถูกขับออกมาทางปัสสาวะ เมื่อมีอาการตื่นเต้น หรือรับประทานอาหารมาก การตรวจน้ำตาลกลูโคสในปัสสาวะใช้น้ำยาเบนดิคต์ (Benedict's solution) ซึ่งจะให้ตะกอนสีน้ำตาลแดงของคิวปริสออกไซด์ (Cu_2O)

ฟรุคโทส เป็นพวกลีโทเฮกโซส มักเรียกอีกอย่างว่า เลวูโลส หรือน้ำตาลผลไม้ (fruit sugar) ในธรรมชาติมักพบอยู่ร่วมกับกลูโคสเช่นในน้ำผลไม้และน้ำผึ้ง และอาจได้จากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของซูโครส และอินนูลิน (inulin) ซึ่งเป็นน้ำตาลเชิงซ้อนโดยใช้เอนไซม์ ฟรุคโทสเป็นน้ำตาลที่มีรสหวานที่สุดในบรรดาน้ำตาลด้วยกัน

2.1.2 ไดแซ็กคาไรด์ (disaccharide) ประกอบด้วยหน่วยโมโนแซ็กคาไรด์ 2 หน่วยเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic bond) ที่พบมากในธรรมชาติ ได้แก่ เล็กโทส มอลโทส และซูโครส

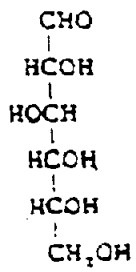
ซูโครส มีชื่อเรียกได้หลายชื่อ เช่น น้ำตาลทราย น้ำตาลอ้อย น้ำตาลหัวบีท (beet sugar) เมื่อแตกตัวหรือถูกย่อยจะให้กลูโคส 1 โมเลกุล และฟรุคโทส 1 โมเลกุล น้ำตาลผสมกลูโคสและฟรุคโทสที่ได้จากการแตกตัวของซูโครสนี้เรียกว่าน้ำตาลอินเวิร์ต (invert sugar) ซึ่งมีรสหวานพบในน้ำผึ้ง น้ำเชื่อม แยม ทอฟฟี่ และขนมหวานต่างๆ ซูโครสมีในสับปะรดและหัวแครอท ในทางอุตสาหกรรมมักผลิตซูโครสจาก

อ้อยและหัวผัก ถ้านำซูโครสไปเผาที่ 210 องศาเซลเซียส น้ำจะระเหยออกไปได้คาร์แอมล ซูโครสใช้ทำ ลูกกวาด ลูกอม และขนมหวาน ตลอดจนใช้ผสมในเครื่องคั้นชนิดต่างๆ ผลไม้เชื่อมและใช้เป็นสารถนอมอาหาร

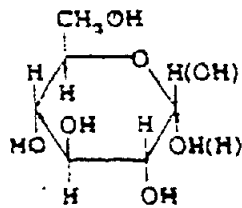
มอลโทสหรือน้ำตาลมอลต์ (malt sugar) เป็นไดแซ็กคาไรด์ที่ได้มาจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของแป้งโดยมีเอนไซม์ชื่อ diastase ซึ่งพบในข้าวบาร์เลย์หรือข้าวมอลต์ที่กำลังงอกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เนื่องจากว่าแป้งประกอบขึ้นจาก D-glucopyranose หลายๆหน่วย มาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก ดังนั้นในอุตสาหกรรมผลิตมอลโทส จึงได้จากนำแป้งมาผ่านกระบวนการไฮโดรไลซ์ ประโยชน์ที่สำคัญของมอลโทสคือ ใช้ทำเบียร์ เครื่องดื่มและอาหารเด็ก

แล็กโทส (lactose) หรือน้ำตาลนม (milk sugar) จะพบแล็กโทสเฉพาะในนมเท่านั้น แล็กโทสเป็นน้ำตาลรีดิวซิง (reducing sugar) เมื่อแล็กโทสถูกไฮโดรไลส์ด้วยเอนไซม์ จะได้น้ำตาล 2 ชนิดคือ กลูโคสและกาแล็กโทส แม้ว่าพบน้ำตาลอื่นในนมเช่นกันแล็กโทส กลูโคส และน้ำตาลชนิดอื่น แต่มีปริมาณน้อยจนไม่มีความสำคัญ (กลูโคสมี 7.5 มิลลิกรัม/นม 100 มิลลิลิตร) ในนมโคมีแล็กโทสระหว่าง 4.7-4.9 % นมของสัตว์บางชนิดมีน้ำตาลอื่นสูงกว่าแล็กโทสในนมโค เคยมีรายงานว่าพบแล็กโทสในพืช (plant kingdom) แต่ปริมาณน้อยมาก ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้น้ำตาลนม คือ แล็กโทส และมีมากที่สุด ในนมแล็กโทสมีความหวานเพียง 1 ใน 6 ของน้ำตาลอ้อยเท่านั้น แล็กโทสเป็นน้ำตาลที่มีส่วนเกี่ยวข้องโดยตรงกับรส กลิ่นและสีของนมและผลิตภัณฑ์นม โดยปกติแล็กโทสในนมจะมีปริมาณเป็นปฏิภาคส่วนกลับ (inversely proportion) กับเถ้าเสมอ ปัจจัยที่ทำให้แล็กโทสผันแปรไปก็คือ นมจากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ (mastitis)

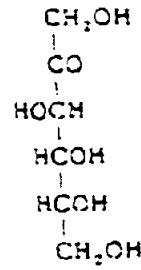
สูตรโครงสร้างของน้ำตาล ฟรักโทส กลูโคส ซูโครส มอลโทส และ แล็กโทส ดังแสดงตามรูปที่ 1



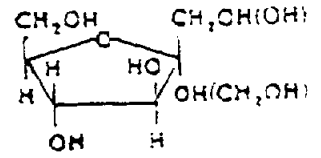
or



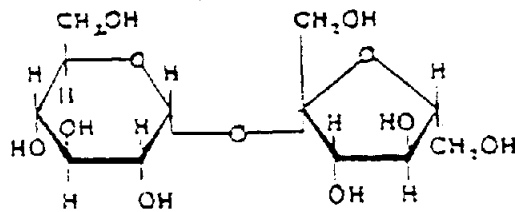
D-glucose α (β)



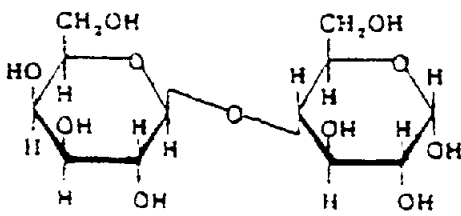
or



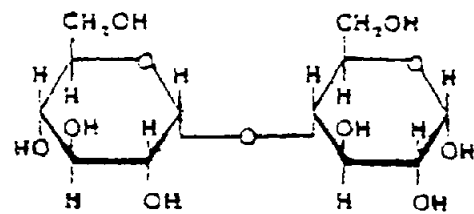
D-fructose α (β)



Sucrose



Lactose



Maltose

รูปที่ 1 แสดงสูตรโครงสร้างของน้ำตาล⁽⁴⁾ ฟรักโทส กลูโคส ซูโครส มอลโทส และแล็กโทส

2.2 การวิเคราะห์หาน้ำตาล มีทั้งในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ ดังนี้

2.2.1 การวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (qualitative method)^(4,6)

เป็นการวิเคราะห์เพื่อให้ทราบชนิดของน้ำตาลที่มีอยู่ในอาหาร มีวิธีวิเคราะห์ดังนี้

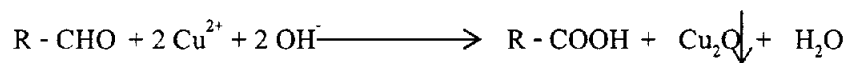
2.2.1.1 การทดสอบโดยวิธีเฟห์ลิง (Fehling's test) สำหรับน้ำตาลรีดิวซ์ เป็นการทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ของน้ำตาลหรือทดสอบหมู่อัลดีไฮด์และคีโตนในน้ำตาล โดยใช้สารละลายเฟห์ลิงซึ่งประกอบด้วยสารละลาย 2 ส่วน คือ

ส่วนที่ 1 คือ สารละลายคอปเปอร์ (II) ซัลเฟต

ส่วนที่ 2 คือ สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ และ โซเดียมโพแทสเซียมคาร์เตรด

($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)

น้ำตาลที่มีความสามารถในการรีดิวซ์ ได้แก่ โมโนแซ็กคาไรด์ แล็กโทส และมอลโทส จะเปลี่ยน CuSO_4 เป็นตะกอนคิวปรัสออกไซด์ (Cu_2O) ซึ่งมีสีน้ำตาลแดง ดังสมการ



2.2.1.2 การทดสอบโดยวิธีบาร์โฟด์ (Barfoed's test) ในกรณีที่พบว่า มีน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหาร การทดสอบของบาร์โฟด์จะใช้ทดสอบแล็กโทสและมอลโทส เนื่องจากโมโนแซ็กคาไรด์จะไม่เกิดปฏิกิริยากับการทดสอบแบบนี้ สารละลายบาร์โฟด์ประกอบด้วยคิวปริกอะซิเตดในกรดอะซิติก ปฏิกิริยาของแล็กโทส และมอลโทสกับสารละลายนี้จะเกิดตะกอนของ Cu_2O

2.2.1.3 ปฏิกิริยาโอซาโซน (Osazone reaction) เป็นการทดสอบน้ำตาลที่มีความสามารถในการรีดิวซ์โดยให้ทำปฏิกิริยากับเฟนิลไฮดราซีนเกิดโอซาโซน ผลึกของโอซาโซนจะมีลักษณะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของน้ำตาล วิธีนี้จึงใช้เป็นวิธีตรวจวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลได้

2.2.1.4 ปฏิกิริยาริซอร์ซินอล (Resorcinol reaction) ใช้ทดสอบน้ำตาลที่มีหมู่คีโตน เช่น ฟรักโทส โดยเติมกรดเกลือ 25% ลงไปในน้ำตาลที่ทดสอบ และเติมริซอร์ซินอลลงไปปริมาณเท่ากัน อุณหภูมิให้ร้อน ถ้ามีฟรักโทสจะได้สีแดง เป็นการทดสอบโดยวิธีเซลิวานอฟ (Seliwanoff's test)

2.2.2 การวิเคราะห์เชิงปริมาณ (quantitative method)

การวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณของน้ำตาลมีหลายเทคนิคด้วยกัน ในที่นี้จะกล่าวถึง 2 เทคนิค มีวิธีวิเคราะห์ดังนี้

2.2.2.1 การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งให้สารละลายตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณ น้ำตาลทำปฏิกิริยากับสารละลายเฟห์ลิง ซึ่งมี 2 วิธี^(4,7) คือ

(1) วิธีวิเคราะห์โดยปริมาตร (volumetric method) โดยการหาปริมาตรของสารละลายน้ำตาลซึ่งทำให้สารละลายเฟห์ลิงที่ทราบปริมาตรแน่นอนแล้ว เกิดการตกตะกอนเป็น Cu_2O จนหมด แล้ว

คำนวณหาปริมาณน้ำตาลเทียบกับสารละลายมาตรฐานน้ำตาล วิเคราะห์โดยปริมาตรนี้มักใช้วิธีของ Lane and Eynon ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานทั่วไป

(2) วิเคราะห์โดยน้ำหนัก (gravimetric method) โดยการหาน้ำหนักของ Cu_2O จากการเติมสารละลายเฟห์ลิงมากเกินพอลงในสารละลายน้ำตาลที่ทราบปริมาตรแล้ว หลังจากนั้นนำตะกอนของ Cu_2O ที่เกิดขึ้นมาชั่งน้ำหนัก เพื่อคำนวณหาปริมาณน้ำตาลจากตารางต่อไป วิเคราะห์โดยน้ำหนักนิยมใช้วิธีของมูนสันและวอล์คเกอร์ (Munson and Walker)

สำหรับการหาปริมาณน้ำตาลเล็กโทส นอกจากจะใช้วิธีดังกล่าวข้างต้นแล้ว อาจใช้วิธีของเนลสัน (Nelson's calorimetric method) ซึ่งอาศัยหลักการวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (visible spectrophotometer)

2.2.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลชนิดต่างๆ โดยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (HPLC) เป็นวิธีที่ใช้สำหรับวิเคราะห์น้ำตาลทั้งในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ สามารถวิเคราะห์น้ำตาลหลายชนิดที่ผสมอยู่ด้วยกันได้ HPLC เป็นเครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่พัฒนาขึ้นจากคอลัมน์โครมาโตกราฟีที่ใช้กันทั่วไป โดยใช้คอลัมน์ขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-5 มม. สารที่บรรจุในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3-10 ไมครอนและใช้เครื่องสูบลูคสารละลายตัวชะเข้าสู่ระบบ สารละลายตัวชะนำสารที่ต้องการวิเคราะห์ผ่านคอลัมน์ เกิดการแยกสารที่คอลัมน์ สารที่แยกแล้วผ่านเข้าสู่ดีเทกเตอร์ (detector) ตามลำดับ ควบคุมการทำงานด้วยคอมพิวเตอร์ แสดงผลทางจอภาพหรือเครื่องพิมพ์ เป็นกราฟความสัมพันธ์ของเวลา (แกนนอน) กับสัญญาณทางไฟฟ้า(แกนตั้ง) เรียกว่าโครมาโตแกรม⁽²⁾

2.3 เทคนิคการวิเคราะห์หาน้ำตาลชนิดต่างๆโดย HPLC

2.3.1 เครื่องมือ การวิเคราะห์หาน้ำตาลชนิดต่างๆต้องเลือกใช้คอลัมน์ สารละลายตัวชะ และดีเทกเตอร์ให้เหมาะสมกับสารแต่ละชนิดที่จะวิเคราะห์ ในการวิเคราะห์สารสามารถหาได้ในปริมาณต่ำระดับไมโครกรัมถึงนาโนกรัมและปริมาณสารตัวอย่างที่ฉีดเข้าเครื่องระดับไมโครลิตร หลักการทำงานของเครื่องโดยการฉีด (inject) สารตัวอย่างที่เป็นของเหลวใส เข้าเครื่อง HPLC สารละลายตัวชะที่ไหลผ่านระบบอยู่ตลอดเวลาจะนำพาสารตัวอย่างเคลื่อนที่เข้าสู่คอลัมน์ สารแต่ละชนิดในตัวอย่างเคลื่อนที่ผ่านเฟสหนึ่งด้วยระยะทางแตกต่างกัน ทำให้สารผสมแยกออกจากกัน เคลื่อนที่เข้าดีเทกเตอร์ตามลำดับ รายงานผลเป็นโครมาโตแกรม ขนาดของสัญญาณแสดงด้วยความสูงหรือพื้นที่พีคซึ่งผันแปรโดยตรงกับปริมาณสาร

2.3.2 ตัวอย่างที่วิเคราะห์ โดยทั่วไปตัวอย่างที่วิเคราะห์โดยวิธีนี้จะต้องเตรียมให้เป็นสารละลายใสก่อนที่จะฉีดตัวอย่างเข้าเครื่อง HPLC ในตัวอย่างอาหารที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบหลักเช่น น้ำผึ้ง น้ำหวานเข้มข้น เครื่องดื่ม น้ำผลไม้ และ แยม ซึ่งสามารถละลายน้ำได้ การเตรียมตัวอย่างจะละลายด้วยน้ำกลั่นและกรองผ่านกระดาษกรอง แล้วฉีดเข้าเครื่อง HPLC ได้เลย ส่วนตัวอย่างอาหารที่มีไขมันและโปรตีนอยู่จะต้องสกัดไขมันและโปรตีนออกก่อนจึงจะฉีดเข้าเครื่องได้ สำหรับการศึกษาวิธีวิเคราะห์น้ำตาลชนิดต่างๆของตัวอย่างนมและผลิตภัณฑ์นมในการทดลองครั้งนี้อ้างอิงตามวิธีวิเคราะห์หาปริมาณฟรักโทส

กลูโคส แล็กโทส มอลโทสและซูโครส ในตัวอย่างนมช็อกโกแลต⁽⁸⁾ โดยใช้ HPLC ซึ่งมีขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างก่อนข้างยุ่งยาก ขั้นตอนแรกต้องสกัดไขมันในตัวอย่างด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ แล้วนำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง แยกชั้นของปิโตรเลียมอีเทอร์ออก จากนั้นสกัดซ้ำอีกครั้ง ระเหยปิโตรเลียมอีเทอร์จนหมด แล้วเติมน้ำตั้งในอ่างน้ำ 25 นาที ทิ้งให้เย็น ปรับปริมาตร นำเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง กรองส่วนใสผ่านเมมเบรน 0.45 ไมครอน หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์โดย HPLC ซึ่งประกอบด้วย

Column : μ -Bondapak carbohydrate column, 300x4 (id) mm.

Mobile phase : CH₃CN : H₂O (80:20)

Detector : R401 refractive index

Flow rate : 1.5 - 2.0 ml/min

Injection volume : 50 μ l

จากการเตรียมตัวอย่างที่กล่าวข้างต้นมีขั้นตอนค่อนข้างยุ่งยากและเสียเวลามาก อาจเกิดการผิดพลาดทำให้ผลวิเคราะห์น้อยกว่าความเป็นจริง ในการศึกษาทดลองวิเคราะห์น้ำตาลชนิดต่างๆ ในครั้งนี้ การเตรียมตัวอย่างไม่ยุ่งยากจะใช้อะซิโตนไตรลต์ต่อน้ำในอัตราส่วน 50:50 ในการตกตะกอนโปรตีนและไขมันทำให้ได้สารละลายใส นำเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง กรองส่วนใสผ่านเมมเบรน 0.45 ไมครอน หลังจากนั้นนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยใช้ปริมาตร 20 ไมโครลิตร การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลด้วยวิธีนี้สามารถวิเคราะห์น้ำตาลที่มีในผลิตภัณฑ์นมได้ทุกกลุ่ม เช่น นมผงคัดแปลงสำหรับทารก นมสด นมปรุงแต่งพร้อมดื่ม ไอศกรีม นมเปรี้ยวพร้อมดื่ม โยเกิร์ต เป็นต้น

2.3.3 การตรวจสอบความเหมาะสมของระบบ (system suitability)^(2,5)

เป็นขั้นตอนที่ควรจะทำทุกครั้งก่อนการวิเคราะห์ตัวอย่างโดย HPLC เพื่อให้แน่ใจว่าระบบเครื่องมือทำงานภายใต้ขอบเขตที่ต้องการถูกต้อง หลังจากตรวจสอบความเหมาะสมของระบบได้สภาวะที่เหมาะสมและใช้งานได้ดีแล้ว ต้องทดสอบความเหมาะสมของระบบก่อนนำไปใช้งาน ความเหมาะสมของระบบที่ต้องทำโดยตรวจสอบค่าต่างๆดังนี้

2.3.3.1 ประสิทธิภาพของคอลัมน์แสดงด้วยเพลตตามทฤษฎี (number of theoretical plates, n) ทดสอบได้โดยดูจากค่า plate (plate number) ของคอลัมน์ จากทฤษฎีค่า plate ยิ่งมาก การแยกของพีคจะดีขึ้น ค่า plate คำนวณได้จากสูตร

$$\text{Theoretical plate number} = 16 \left(\frac{t_r}{W} \right)^2$$

เมื่อ

t_r = retention time ของ peak (นาที)

W = ความกว้างของฐาน peak (ซม.)

คอลัมน์ใหม่ๆ จะมีค่า plate number (N) ของผู้ผลิตระบุไว้ด้วย ดังนั้นคอลัมน์ที่ใช้งานมานาน ควรมีการตรวจสอบค่า N ถ้าได้ต่ำกว่าที่กำหนด จะต้องปรับปรุงสถานะต่างๆ ใหม่ เช่น เปลี่ยนอัตราไหล ถ้าแก้ไขไม่ได้ต้องเปลี่ยนคอลัมน์ใหม่ ประสิทธิภาพของคอลัมน์จะลดลงตามอายุการใช้งาน

2.3.3.2 ความสมมาตรของพีค (peak symmetry)

Peak asymmetry (As) หรือ tailing factor (T) เป็นค่าที่บ่งบอกถึงความสมมาตรของ peak

$$\text{Peak asymmetry (As)} = \frac{B}{A}$$

เมื่อ

A = ความกว้างของครึ่ง peak หน้า ที่ระดับความสูง 5% ของ peak

B = ความกว้างของครึ่ง peak หลัง ที่ระดับความสูง 5% ของ peak

2.3.3.3 ค่าการแยก (resolution, R_s)

Resolution (R_s) เป็นค่าที่แสดงความสามารถในการแยกระหว่าง 2 peak ที่อยู่ติดกันได้ อย่างชัดเจน ซึ่งคำนวณได้จากสูตร

$$\text{Resolution (} R_s \text{)} = \frac{t_2 - t_1}{W_1 + W_2}$$

เมื่อ

t_1 และ t_2 = retention time (นาที) ที่จุดยอดของ peak ที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

W_1 และ W_2 = peak width ของ peak (ซม.) ที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

2.3.3.4 Capacity factor (K')

เป็นค่าการวัดตำแหน่ง peak ของสารตัวอย่างในโครมาโตแกรม บ่งบอกถึงการเหนี่ยวรั้ง องค์ประกอบของสารตัวอย่างในคอลัมน์ว่าสารตัวอย่างใช้เวลาอยู่ใน stationary phase นานเป็นกี่เท่าของ เวลาที่อยู่ใน mobile phase

$$\text{Capacity factor (} K' \text{)} = \frac{t_r - t_o}{t_o}$$

เมื่อ

t_r = retention time (นาที)

t_o = เวลาที่โมเลกุลของตัวทำละลายถูกฉีดเข้าไป หรือสำหรับสารที่ไม่ถูกยึด เกาะเดินทางผ่านไปคอลัมน์ (นาที)

2.3.3.5 ความจำเพาะเจาะจง (selectivity, α)

เป็นค่าที่บ่งบอกว่า peak 2 peak แยกออกจากกันได้มากน้อยเพียงใด

$$\text{Selectivity } (\alpha) = \frac{K_2'}{K_1'}$$

เมื่อ

K_1' และ K_2' คือ capacity factor ของ peak 1 และ peak 2

2.3.4 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบ (method validation)

เป็นขั้นตอนที่ทำให้แน่ใจว่าวิธีการวิเคราะห์ที่จะนำมาใช้นั้น มีคุณภาพเพียงพอและมีความสมบูรณ์หรือไม่ ดังนั้นก่อนที่จะนำวิธีนั้นมาใช้จึงควรทำการทดสอบประสิทธิภาพวิธีวิเคราะห์ด้วย ทั้งนี้เพื่อให้แน่ใจว่าวิธีที่จะนำมาใช้มีความถูกต้องและใช้ได้ดีในช่วงความเข้มข้นที่ต้องการ และสามารถใช้ได้ไม่จำกัดเฉพาะห้องปฏิบัติการหรือใช้กับผู้วิเคราะห์คนเดียวเท่านั้น (rugged) การตรวจสอบความถูกต้องของระบบ HPLC จะมีดังต่อไปนี้

2.3.4.1 ทดสอบสอบความเที่ยง (precision) เพื่อตรวจสอบว่าการวัดแต่ละครั้งนั้นให้ค่าเข้าใกล้กันเพียงใดเมื่อฉีดสารตัวอย่างซ้ำๆกัน ภายใต้สภาวะเดียวกัน เช่น ฉีดทุกวันต่างกันเป็นเวลา 3 วัน โดยรายงานเป็นค่า reproducibility แต่ถ้าฉีดในวันเดียวกัน ในเวลาใกล้เคียงกันจะเรียกว่าค่า repeatability ส่วนใหญ่จะรายงานผลเป็น %RSD หรือ %CV จากสูตร

$$\%RSD = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100$$

SD คือค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

\bar{X} คือค่าความเข้มข้นเฉลี่ยที่วัดได้

2.3.4.2 ความแม่นยำ (accuracy) เป็นเครื่องชี้วัดว่าค่าที่วิเคราะห์ได้ห่างไปจากค่าที่เป็นจริงเท่าใด ดังนั้นเราจึงจำเป็นต้องมีสารมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน แล้วนำสารมาตรฐานนั้นมาวิเคราะห์เปรียบเทียบ โดยค่า CV ไม่เกิน 10 เปอร์เซ็นต์ อีกวิธีหนึ่งที่สามารถทำได้คือ การเปรียบเทียบค่าความชันของแคลิเบรชันของกราฟทั้งสองว่าต่างกันอย่างไรอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่

2.3.4.3 ค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด (limit of detection, LOD) หมายถึง ความเข้มข้นต่ำสุดที่เราสามารถวิเคราะห์สารนั้นได้ ฉีดสารที่วิเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ คู่ค่าสัญญาณเปรียบเทียบกับสัญญาณรบกวน (signal noise) โดยมากมักใช้ค่า signal : noise = 2 : 1 ค่า LOD อาจหมายถึงค่าความ

เข้มข้นต่ำสุดของสารที่วิเคราะห์ โดยที่ระดับความเข้มข้นนี้สามารถแยกสัญญาณของสารให้ต่างออกจากสัญญาณรบกวนก็ได้ แต่วิธีนี้จะไม่นิยมใช้ เนื่องจากในการวิเคราะห์จริง จะมีสัญญาณรบกวนเกิดขึ้นเสมอ ค่า LOD ปกติมักบอกเป็นหน่วยความเข้มข้นของสาร

2.3.4.4 ปริมาณต่ำสุดที่วิเคราะห์หาปริมาณได้ (limit of quantitation, LOQ) หมายถึง ระดับความเข้มข้นต่ำสุด ที่เราสามารถวัดสารนั้นได้โดยมีความมั่นใจในระดับหนึ่ง เช่น เมื่อวิเคราะห์สารที่มีปริมาณน้อยๆอนุกรมของการวิเคราะห์เมื่อคำนวณทางสถิติควรมีค่า CV ไม่เกิน 10 เปอร์เซ็นต์.

2.3.4.5 ช่วงของการวัด (range) หมายถึง ช่วงค่าความเข้มข้นต่ำสุดและสูงสุดของสารที่สามารถตรวจวัดได้ โดยบอกเป็นหน่วยของความเข้มข้นของสารที่จะวัด

2.3.4.6 สภาพเชิงเส้น (linearity) เป็นการแสดงให้เห็นว่าช่วงค่าความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์สัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับค่าสัญญาณการตอบสนองจากเครื่องหรือไม่ โดยบอกเป็นค่า variance และค่า correlation coefficient

2.3.4.7 Ruggedness เป็นการรายงานค่า reproducibility ของวิธีการเมื่อเปลี่ยนสภาวะในการวิเคราะห์ไป เช่น เปลี่ยนชนิดของคอลัมน์ อุณหภูมิ สารละลายบัฟเฟอร์ องค์ประกอบของสารตัวพา หรืออาจเป็นการหาค่า reproducibility เมื่อเปลี่ยนเครื่องมือหรือระบบ HPLC ทั้งระบบ เช่น ใช้เครื่องมือคนละชุดกัน วิธีวิเคราะห์ที่ดีเมื่อวิเคราะห์ซ้ำแล้วจะต้องให้ผลที่ใกล้เคียงกันแม้ว่าจะเปลี่ยนเครื่องมือ หรือสภาวะการวิเคราะห์บางอย่างไปก็ตาม ไม่ใช่เมื่อรายงานผลแล้ว ผู้วิเคราะห์เท่านั้นสามารถทำได้ และทำได้ครั้งเดียว ผู้อื่นไม่สามารถทำตามได้ ดังนั้นการทำ ruggedness เพื่อหาขอบเขตของวิธีวิเคราะห์นั้นว่าเมื่อจะนำไปใช้สามารถเปลี่ยนแปลงอะไรได้บ้าง โดยที่ค่า %RSD ยังอยู่ในช่วงที่จะยอมรับได้นั่นเอง

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการ

3.1. ตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาเป็นตัวอย่างนมและผลิตภัณฑ์นมที่ถูกก้ำส่งมาวิเคราะห์และตัวอย่างที่ซื้อจากร้านค้าทั่วไป รวมทั้งสิ้น 32 ตัวอย่าง ได้แก่ นมผงดัดแปลงสำหรับทารก นมสด นมปรุงแต่งพร้อมดื่ม ไอศกรีม นมเปรี้ยวพร้อมดื่ม และโยเกิร์ตผสมผลไม้

3.2. วัสดุ และ อุปกรณ์

3.2.1 เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิด โครมาโตกราฟี (HPLC) พร้อมอุปกรณ์ของบริษัท Millipore Corporation ซึ่งประกอบด้วย

- คอลัมน์ : μ -Bondapak carbohydrate column ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.9 มิลลิเมตร ยาว 30 เซนติเมตร
- การ์ดคอลัมน์ : Guard-Pak INSERT μ -Bondapak NH₂ P/N 26760
- ป้อน : Waters™, Model 600 Controller
- ดีเทกเตอร์ : Waters™, Differential Refractometer, Model 410
- เครื่องฉีดสารอัด โนมัติ : Waters™, Model 717 plus
- ซอฟแวร์ : โปรแกรม Millennium³²

3.2.2 ชุดเครื่องกรองพร้อมเมมเบรน ชนิด HA เป็น เซลลูโลสอะซีเตต ผสมกับ เซลลูโลสไนเตรต ขนาดรูกรอง 0.45 ไมครอน

3.2.3 เครื่องชั่งไฟฟ้า ชั่งได้ละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง

3.2.4 ขวดแก้วปริมาตร ขนาด 50 100 500 และ 1000 มิลลิลิตร

3.2.5 บีเปต ขนาด 1 2 3 5 10 20 25 และ 50 มิลลิลิตร

3.2.6 ขวดแก้วรูปชมพู ขนาด 125 มิลลิลิตร

3.2.7 กระจายกรองวัตต์แมนเบอร์ 41

3.2.8 ขวดใส่ตัวอย่างสำหรับการฉีดแบบอัด โนมัติ (vials) ที่มีฝาเกลียวปิด

3.2.9 เครื่องหมุนเหวี่ยง ขนาดความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที

3.2.10 Sample clarification kit พร้อมเมมเบรน ชนิด HA เป็น เซลลูโลสอะซีเตต ผสมกับ เซลลูโลสไนเตรตเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 มิลลิเมตร ขนาดรูกรอง 0.45 ไมครอน

3.2.11 อุปกรณ์พื้นฐานใช้ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

3.3 สารเคมี สารละลายและวิธีเตรียม

3.3.1 อะซีโตไนไตรล์ HPLC grade

3.3.2 สารมาตรฐานฟรักโทส SIGMA

3.3.3 สารมาตรฐานกลูโคส SIGMA

3.3.4 สารมาตรฐานมอลโทส SIGMA

3.3.5 สารมาตรฐานซูโครส SIGMA

3.3.6 สารมาตรฐานแล็กโทส SIGMA

3.3.7 น้ำที่ปราศจากไอออน

3.3.8 สารละลายมาตรฐานน้ำตาล

3.3.8.1 สารละลายมาตรฐานน้ำตาลผสม 5 ชนิดเก็บไว้ใช้งาน(stock solution) โดยมีความเข้มข้นของฟรักโทส กลูโคส มอลโทส ซูโครส และแล็กโทส เท่ากับ 1.0 1.0 1.2 1.5 และ 1.2 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ตามลำดับ

ซึ่งสารมาตรฐาน (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ฟรักโทส (ข้อ 3.3.2) 1.0 กรัม กลูโคส (ข้อ 3.3.3) 1.0 กรัม มอลโทส (ข้อ 3.3.4) 1.2 กรัม ซูโครส (ข้อ 3.3.5) 1.5 กรัม และแล็กโทส (ข้อ 3.3.6) 1.2 กรัม ละลายผสมกันในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรในขวดแก้วปริมาตร

3.3.8.2 สารละลายมาตรฐานผสม 5 ชนิดๆละ 5 ความเข้มข้น เพื่อใช้งาน(working solution)

- ปิเปิดสารละลายมาตรฐาน (ข้อ 3.3.8.1) จำนวน 1 2 3 4 และ 5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดแก้วปริมาตร 10 มิลลิลิตร จำนวน 5 ขวด ตามลำดับ

- เติมอะซีโตไนไตรล์ (ข้อ 3.3.1) 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้อง

- ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น กรองผ่านเมมเบรน (ข้อ 3.2.10) แล้วเก็บในขวด vial

ได้สารละลายมาตรฐานน้ำตาลผสม 5 ชนิดมีความเข้มข้นดังนี้

◆ ฟรักโทสความเข้มข้น 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

◆ กลูโคสความเข้มข้น 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

◆ ซูโครสความเข้มข้น 0.15 0.30 0.45 0.60 และ 0.75 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

◆ มอลโทสความเข้มข้น 0.12 0.24 0.36 0.48 และ 0.60 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

◆ แล็กโทสความเข้มข้น 0.12 0.24 0.36 0.48 และ 0.60 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

3.3.8.3 สารละลายมาตรฐานน้ำตาล เพื่อใช้ในการทดสอบความถูกต้องของวิธีในตัวอย่างต่างๆกัน

(1) ตัวอย่างนมสด ใช้สารละลายมาตรฐาน ฟรักโทส กลูโคส มอลโทส ซูโครส และ แล็กโทส ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1.0 1.0 1.2 1.5 และ 1.2 กรัม ต่อ 100 มิลลิลิตร ตามลำดับ

ซึ่งสารมาตรฐาน(ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ฟรักโทส 5.0 กรัม กลูโคส 5.0 กรัม มอลโทส 6.0 กรัม ซูโครส 7.5 กรัม และแล็กโทส 6.0 กรัม ละลายผสมกันในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตรในขวดแก้วปริมาตร

(2) ตัวอย่างโยเกิร์ต ใช้สารละลายมาตรฐาน ฟรักโทส กลูโคส มอลโทส ซูโครส และ แล็กโทส ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1.2 1.2 1.5 1.8 และ 1.5 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ตามลำดับ

ซึ่งสารมาตรฐาน(ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ฟรักโทส 6.0 กรัม กลูโคส 6.0 กรัม มอลโทส 7.5 กรัม ซูโครส 9.0 กรัม และแล็กโทส 7.5 กรัม ละลายผสมกันในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตรในขวดแก้วปริมาตร

(3) ตัวอย่างไมโล ใช้สารละลายมาตรฐาน มอลโทส ซูโครส และแล็กโทส ที่ความเข้มข้น เท่ากับ 1.2 0.9 และ 0.75 กรัม ต่อ 100 มิลลิลิตร ตามลำดับ

ซึ่งสารมาตรฐาน(ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) มอลโทส 6.0 กรัม ซูโครส 4.5 กรัม และแล็กโทส 3.75 กรัม ละลายผสมกันในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตรในขวดแก้วปริมาตร

3.3.8.4 สารละลายอะซีโตไนไตรล์ในน้ำ (80:20)

ดวงอะซีโตไนไตรล์ (ข้อ 3.3.1) จำนวน 800 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร กรองผ่านชุดเครื่องกรอง (ข้อ 3.2.2) แล้วถ่ายใส่ขวดสำหรับบรรจุสารละลายตัวชะ นำมาใส่อากาศด้วยอ่างอัลตราโซนิก นาน 3-5 นาที

3.3.9 การเตรียมตัวอย่างนมและผลิตภัณฑ์นมสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลชนิดต่างๆ

3.3.9.1 นมผงคัดแปลงสำหรับทารก

ซึ่งตัวอย่างประมาณ 10 กรัม (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ละลายด้วยน้ำอุ่นจนละลาย แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายที่ได้ 5 มิลลิลิตรใส่ในขวดปริมาตร 50 มิลลิลิตรใส่น้ำไปเล็กน้อย เขย่าให้เข้ากันและใส่อะซีโตไนไตรล์ 25 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ ตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายมีอุณหภูมิเท่าอุณหภูมิห้องและปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น นำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง เทส่วนใส แล้วกรองผ่านเมมเบรน ขนาด 0.45 ไมครอน เก็บในขวด vial

3.3.9.2 นมสด นมปรุงแต่งพร้อมดื่มรสต่างๆ

ซึ่งตัวอย่างประมาณ 2-3 กรัม (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ละลายด้วยน้ำกลั่นเล็กน้อย เขย่าให้เข้ากันและใส่อะซีโตไนไตรล์ 25 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ ตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายมีอุณหภูมิเท่าอุณหภูมิห้อง

และปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น นำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง เทส่วนใสแล้วกรองผ่านเมมเบรน ขนาด 0.45 ไมครอน เก็บในขวด vial

3.3.9.3 ไอศกริมและนมเปรี้ยวพร้อมดื่ม

ชั่งตัวอย่างประมาณ 10 กรัม (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลาย 5 มิลลิลิตรใส่ในขวดปริมาตร 50 มิลลิลิตรใส่น้ำไปเล็กน้อยเขย่าให้เข้ากัน และใส่อะซีโตไนไตรล์ 25 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายมีอุณหภูมิเท่าอุณหภูมิห้อง และปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น นำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง เทส่วนใสแล้วกรองผ่านเมมเบรน ขนาด 0.45 ไมครอน เก็บในขวด Vial

3.3.9.4 โยเกิร์ต

ชั่งตัวอย่างประมาณ 10 กรัม (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ละลายด้วยน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรองวัดต์แมนเบอร์ 41 ปิเปตสารละลายที่ได้ 5 มิลลิลิตรใส่ในขวด ปริมาตร 50 มิลลิลิตรใส่น้ำไปเล็กน้อยเขย่าให้เข้ากัน และใส่อะซีโตไนไตรล์ 25 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆตั้ง ทิ้งไว้ให้สารละลายมีอุณหภูมิเท่าอุณหภูมิห้องและปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น นำไปเข้า เครื่องหมุนเหวี่ยง เทส่วนใสกรองผ่านเมมเบรน ขนาด 0.45 ไมครอน เก็บในขวด Vial

3.3.10 การเตรียมตัวอย่างนมสด โยเกิร์ตและไมโล เพื่อทดสอบความถูกต้องของวิธี โดยการ spiked สารละลายมาตรฐานน้ำตาล ระดับ ต่ำ กลาง และ สูง

(1) ตัวอย่างนมสด

ชั่งตัวอย่างนมสด 50 กรัม (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตร เป็น 500 มิลลิลิตรในขวดแก้วปริมาตร ปิเปตสารละลายตัวอย่างนมสด 5 มิลลิลิตร ลงในขวดแก้ว ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จำนวน 28 ใบ ปิเปตสารละลายมาตรฐาน ตามข้อ 3.3.8.3(1) จำนวน 5 15 20 มิลลิลิตร ลงในขวดปริมาตร จำนวน 3 ชุด ชุดละ 7 ขวด ใส่น้ำกลั่นเล็กน้อยลง เติมาอะซีโตไนไตรล์ 25 มิลลิลิตร ลงในขวดสารละลายตัวอย่างทั้ง 28 ขวด เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้อง ปรับ ปริมาตร ด้วยน้ำกลั่นเป็น 50 มิลลิลิตร นำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง เทส่วนใสแล้วกรองด้วยเมมเบรน ขนาด 0.45 ไมครอน เก็บแต่ละตัวอย่างในขวด vial

(2) ตัวอย่างโยเกิร์ต

ชั่งตัวอย่าง โยเกิร์ตผสมสตรอเบอร์รี่ 50 กรัม (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตรในขวดแก้วปริมาตร ปิเปตสารละลายตัวอย่าง โยเกิร์ต 5 มิลลิลิตร ลง ในขวดแก้วปริมาตร 50 มิลลิลิตร จำนวน 28 ใบ ปิเปตสารละลายมาตรฐาน ตามข้อ 3.3.8.3(2) จำนวน 4 10 20 มิลลิลิตร ลงในขวดปริมาตร จำนวน 3 ชุด ชุดละ 7 ขวด ใส่น้ำกลั่นเล็กน้อยลง เติมาอะซีโตไน ไตรล์ 25 มิลลิลิตร ลงในขวดสารละลายตัวอย่างทั้ง 28 ขวด เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นเท่า

อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตร ด้วยน้ำกลั่นเป็น 50 มิลลิลิตร นำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง เทส่วนใสแล้วกรอง ด้วยเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน เก็บแต่ละตัวอย่างในขวด vial

(3) ตัวอย่าง ไมโล

ชั่งตัวอย่างไมโล 80 กรัม (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตรในขวดแก้วปริมาตร ปิเปตสารละลายตัวอย่างไมโล 5 มิลลิลิตร ลงในขวดแก้วปริมาตร 50 มิลลิลิตร จำนวน 28 ใบ ปิเปตสารละลายมาตรฐาน ตามข้อ 3.3.8.3(3) จำนวน 4 10 20 มิลลิลิตร ลงในขวดปริมาตร จำนวน 3 ชุด ชุดละ 7 ขวด ใส่น้ำกลั่นเล็กน้อยลง เดิมอะซีโตไนไตรล์ 25 มิลลิลิตร ลงในขวดสารละลายตัวอย่างทั้ง 28 ขวด เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตร ด้วยน้ำกลั่นเป็น 50 มิลลิลิตร นำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง เทส่วนใสแล้วกรองด้วยเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน เก็บแต่ละตัวอย่างในขวด vial

3.4 การศึกษาทดลอง

3.4.1 การเตรียมความพร้อมของเครื่องมือก่อนการทดสอบ

3.4.1.1 เตรียมเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิด โครมาโตกราฟี⁽¹³⁾ เปิดเครื่องมือทุกส่วน ซึ่งมี ส่วนประกอบ ดังนี้

- Waters™ 600 Controller และ Pump ทำการ sparge ก๊าซ helium ตั้งปริมาณการฉีด 20 มิลลิลิตรต่อนาที อัตราการไหลของ mobile phase 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที ตั้ง high pressure limit ที่ 3000 psi

- Waters™ 717 Autosampler purge autosampler และล้างเข็มทำ compression check เพื่อตรวจสอบฟองอากาศใน mobile phase และการรั่วของวาล์ว

- Waters™ 410 Differential Refractometer ตั้งอุณหภูมิของ ดีเทคเตอร์ RI 30 องศาเซลเซียส ตั้งอุณหภูมิของกล่องควบคุมอุณหภูมิคอลัมน์ (external column heater) 30 องศาเซลเซียส ทำการ ตั้ง Auto Zero

- ประมวลผลข้อมูลด้วยโปรแกรม Millennium⁽¹²⁾

3.4.1.2 ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของการวิเคราะห์น้ำตาล 5 ชนิด โดย

- ผิดสารละลายมาตรฐานของน้ำตาลทั้ง 5 ชนิดในข้อ 3.3.8.2 จำนวน 20 ไมโครลิตรที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และ 0.5 เข้าเครื่อง HPLC ซ้ำ 7 ครั้ง จะได้คาร์เท็นชันไทม์ ของน้ำตาลทั้ง 5 ชนิด บันทึกโครมาโตแกรม

- คำนวณหาค่า capacity factor resolution selectivity และ peak symmetry^(2,5)

3.4.2 สร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้สภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 3.4.1.2 ในการฉีดสารละลายมาตรฐานของน้ำตาลทั้ง 5 ชนิด ข้อ 3.2.8.2 จำนวน 20 ไมโครลิตร เข้าเครื่อง HPLC ซ้ำ 3 ครั้ง บันทึกโครมาโตแกรม จากโครมาโตแกรมจะได้ข้อมูลความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลแต่ละชนิดที่วัดได้กับพื้นที่ใต้พีคของน้ำตาลแต่ละชนิด และค่า linearity โดยแสดงเป็นค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (coefficient of determination, R^2)⁽¹⁾ รายละเอียดแสดงในภาคผนวก 2 รูปที่ 4 –รูปที่ 8

3.4.3 การทดสอบประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์

3.4.3.1 หาคความเที่ยงโดยการหา %recovery จากการเติมสารที่รู้ค่าในตัวอย่างทำได้โดยฉีดสารละลายในข้อ 3.3.10 (1) (2) (3) จำนวน 20 ไมโครลิตร เข้าเครื่อง HPLC บันทึกโครมาโตแกรม คำนวณหาค่า %recovery

$$\% Recovery = \frac{(\text{ปริมาณน้ำตาลที่วิเคราะห์ได้} - \text{ปริมาณน้ำตาลที่มีในตัวอย่าง}) \times 100}{\text{ปริมาณน้ำตาลที่เติม}}$$

3.4.3.2 หาคความแม่นยำ (precision) โดยนำข้อมูลที่ได้ในข้อ 3.4.3.1 คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของสารละลายน้ำตาลผสม 5 ชนิด

3.4.3.3 หาค่า Instrument Detection Limit (IDL) โดยคำนวณจากค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานคูณด้วย 3 ที่ความเข้มข้นระดับต่ำสุด (original sample)

3.4.4.4 หาค่า Limit of Quantitation (LOQ) โดยคำนวณจากค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานคูณด้วย 10 ที่ความเข้มข้นระดับต่ำ

3.4.4 การวิเคราะห์ตัวอย่าง

3.4.4.1 ฉีดสารละลายตัวอย่าง ที่เตรียมจากข้อ 3.3.9 จำนวน 20 ไมโครลิตร เข้าเครื่อง HPLC ซ้ำ 2 ครั้ง บันทึกโครมาโตแกรม

3.4.4.2 การคำนวณ

$$\text{ปริมาณน้ำตาลแต่ละชนิด (กรัมต่อ 100 กรัม)} = \frac{A \times V \times D}{W}$$

A = ปริมาณน้ำตาลที่วัดได้ในสารละลายตัวอย่าง เป็นกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

V = ปริมาตรทั้งหมดของสารละลายตัวอย่างที่เตรียม เป็นมิลลิลิตร

W = น้ำหนักตัวอย่างเป็นกรัม

D = สัมประสิทธิ์การเจือจาง

บทที่ 4

ผลการศึกษาทดลอง

4.1 ผลการศึกษาทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิกวิดโครมาโตกราฟี

ในการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานน้ำตาลผสม 5 ชนิด จากการฉีดสารละลายมาตรฐานน้ำตาลผสม 5 ชนิด คือ ฟรักโทส กลูโคส ซูโครส มอลโทส และ แล็กโทส เข้าเครื่อง HPLC โดยมีสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง ดังนี้

คอลัมน์	: μ -Bondapak carbohydrate column
การ์ดคอลัมน์	: Guard-Pak INSERT μ -Bondapak NH ₂ P/N 26760
อุณหภูมิของคอลัมน์	: 30 องศาเซลเซียส
ดีเทคเตอร์	: RI อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส sensitivity 16
อัตราการไหล	: 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที
สารละลายเคลื่อนที่	: อะซีโตไนไตรล์ ต่อ น้ำ (80:20)
ปริมาณในการฉีด	: 20 ไมโครลิตร

ตารางที่ 1 สรุปชนิดและรีเทนชันไทม์ (R_t) ของสารละลายมาตรฐานน้ำตาล 5 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 0.5%

ชนิดของสารละลายมาตรฐานน้ำตาล	รีเทนชันไทม์ (นาที)
ฟรักโทส	4.669
กลูโคส	5.182
ซูโครส	7.074
มอลโทส	8.081
แล็กโทส	9.089

รายละเอียดผลวิเคราะห์ชนิดและรีเทนชันไทม์ (R_t) ของสารละลายมาตรฐานน้ำตาล 5 ชนิดอยู่ในภาคผนวกที่ 1 ตารางที่ 4-5 และภาคผนวกที่ 2 รูปที่ 2-3

4.2 การตรวจสอบประสิทธิภาพของคอลัมน์

จากการวิเคราะห์ได้ค่าจำนวนเพลตตามทฤษฎี [Theoretical plate number (N)] เท่ากับ 2116 ค่า capacity factor และ peak asymmetry ดังแสดงในตารางที่ 2 และค่า resolution และ selectivity ของ peak แต่ละคู่ แสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 2 แสดงค่า capacity factor และ peak asymmetry

	ฟรักโทส	กลูโคส	ซูโครส	มอลโทส	แล็กโทส
capacity factor (K')	0.84	1.04	1.78	2.18	2.58
peak asymmetry (A_s)	1.0	1.17	1.14	1.25	1.22

ตารางที่ 3 แสดงค่า resolution และ selectivity ของ peak แต่ละคู่

	ฟรักโทส และ กลูโคส	กลูโคส และ ซูโครส	ซูโครส และ มอลโทส	มอลโทส และ แล็กโทส
resolution (R_s)	1.20	4.14	1.72	0.71
selectivity (α)	1.2	1.71	1.22	1.18

4.3 ผลวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานน้ำตาลผสม 5 ชนิด

จากการฉีดสารละลายมาตรฐานน้ำตาลผสมของ ฟรักโทส กลูโคส ซูโครส มอลโทส และแล็กโทส 5 ความเข้มข้น เข้าเครื่อง HPLC ได้ผลการวิเคราะห์เชิงปริมาณดังแสดงในภาคผนวก 1 ตารางที่ 6-10 และกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานน้ำตาลผสม 5 ชนิด ทั้ง 5 ความเข้มข้นอยู่ในภาคผนวก 2 รูปที่ 4-รูปที่ 8 และค่า linearity ของกราฟมาตรฐานแสดงเป็นค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (coefficient of determination, R^2) ของน้ำตาลฟรักโทส กลูโคส ซูโครส มอลโทสและแล็กโทส เท่ากับ 0.9999, 0.9998, 0.9998, 0.9997 และ 0.9994 ตามลำดับซึ่งมีค่าใกล้ 1

4.4 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์

การทดสอบประสิทธิภาพของวิธีได้เดิมสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 3 ระดับคือ ต่ำ กลาง และสูง ลงในตัวอย่างที่มีปริมาณน้ำตาลระดับต่ำสุดซึ่งเครื่อง HPLC ยังสามารถตรวจวัดได้ โดยแบ่งตัวอย่างเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ใช้ตัวอย่างนมสดเพื่อหาน้ำตาลแล็กโทส กลุ่มที่ 2 ใช้ตัวอย่างโยเกิร์ตผสมสตอเบอร์รี่เพื่อหาน้ำตาลฟรักโทส กลูโคส และซูโครส กลุ่มที่ 3 ใช้ตัวอย่างไมโลเพื่อหาน้ำตาลมอลโทส มาเดิมสารละลายน้ำตาลมาตรฐานความเข้มข้น 3 ระดับ คือ ระดับต่ำ ระดับกลาง และระดับสูง ผลการวิเคราะห์แสดงไว้ในภาคผนวกที่ 1 ตารางที่ 11-18 สรุปได้ดังนี้

4.4.1 Limit of Quantitation

4.4.1.1 แล็กโทสร้อยละ 0.0127

4.4.1.2 ฟรักโทสร้อยละ 0.0138

4.4.1.3 กลูโคสร้อยละ 0.0095

4.4.1.4 ซูโครสร้อยละ 0.0140

4.4.1.5 มอลโทสร้อยละ 0.0304

4.4.2 %recovery ที่ความเข้มข้น ต่ำ กลางและสูงตามลำดับ

4.4.2.1 แล็กโทส 100.33 99.44 และ 99.29

4.4.2.2 ฟรักโทส 97.0 97.56 และ 97.56

4.4.2.3 กลูโคส 101.29 100.57 และ 100.25

4.4.2.4 ซูโครส 98.20 98.59 และ 98.60

4.4.2.5 มอลโทส 106.99 102.64 และ 101.68

4.4.3 % RSD ที่ความเข้มข้น ต่ำ กลางและสูงตามลำดับ

4.4.3.1 แล็กโทส 0.8333 1.2118 และ 0.2973

4.4.3.2 ฟรักโทส 1.1220 0.4982 และ 0.7193

4.4.3.3 กลูโคส 0.7463 0.5043 และ 0.5967

4.4.3.4 ซูโครส 0.6640 0.2667 และ 0.6350

4.4.3.5 มอลโทส 1.8876 1.3678 และ 0.8103

4.5 ผลวิเคราะห์ตัวอย่างนมและผลิตภัณฑ์นม

จากการหาปริมาณและชนิดของน้ำตาลในตัวอย่างนมและผลิตภัณฑ์นมทั้งหมด 32 ตัวอย่าง พบว่าในตัวอย่างที่มีน้ำตาลแล็กโทสชนิดเดียวได้แก่ นมผงคัดแปลงสำหรับทารกและนมสด ตัวอย่างที่มีน้ำตาลแล็กโทสและซูโครสได้แก่ นมช็อกโกแลต ตัวอย่างที่มีน้ำตาลแล็กโทส ซูโครสและกลูโคสได้แก่ ไอศกรีม ตัวอย่างที่มีน้ำตาลแล็กโทส ซูโครสและมอลโทสได้แก่ นมคีนรูปพร้อมดื่มรสช็อกโกแลต

มอลต์ ตัวอย่างที่มีน้ำตาลแล็กโทส ซูโครสและกลูโคสได้แก่นมเปรี้ยวพร้อมดื่ม และตัวอย่างที่มีน้ำตาลแล็กโทส ซูโครส ฟรักโทสและกลูโคสได้แก่ โยเกิร์ตผสมผลไม้ รายละเอียดผลวิเคราะห์อยู่ในภาคผนวก 1 ตารางที่ 19 และภาคผนวก 2 กราฟรูปที่ 12-16

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาล 5 ชนิด ได้แก่ ฟรักโทส กลูโคส ซูโครส มอลโทส และแล็กโทส ในตัวอย่างนมและผลิตภัณฑ์นม โดยใช้เทคนิคไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิกวิดโครมาโตกราฟี (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ได้ค่ารีเทนชันไทม์ของฟรักโทส กลูโคส ซูโครส มอลโทส และแล็กโทส เท่ากับ 4.67 5.18 7.07 8.08 และ 9.09 นาที ตามลำดับ ส่วนประสิทธิภาพของคอลัมน์พบว่าประสิทธิภาพดีเนื่องจาก จำนวนเพลตที่คำนวณได้เท่ากับ 2116 (ข้อกำหนดสำหรับคอลัมน์ดังกล่าวค่า plate number (N) ของผู้ผลิตระบุไว้ว่าจะต้องมีจำนวนเพลตมากกว่า 2000) และอัตราส่วนของอะซีโตไนไตรล์กับน้ำ ต้องเป็นสัดส่วนที่แน่นอนคือ 80 ต่อ 20 พอดี เนื่องจากหากเพิ่มพอลาริตี (ปริมาณน้ำ) ของเฟสเคลื่อนที่ จะทำให้ค่ารีเทนชันไทม์ของน้ำตาลสูงขึ้น แต่ถ้าลดพอลาริตี (ปริมาณอะซีโตไนไตรล์) ของเฟสเคลื่อนที่ จะเร่งให้ค่ารีเทนชันไทม์ของน้ำตาลต่ำลง การศึกษาทดลองครั้งนี้เลือกใช้คอลัมน์ μ -Bondapak carbohydrate ซึ่งเป็นชนิด Amino-bonded silica สามารถแยกพีคของ ฟรักโทส กลูโคส ซูโครส มอลโทส และแล็กโทส ออกจากกันได้ ซึ่งถ้าเลือกใช้คอลัมน์ชนิดอื่น เช่น คอลัมน์ Sugar Pak I อาจเกิดปัญหากับตัวอย่างนมและผลิตภัณฑ์นมเพราะไม่สามารถแยก peak ของ ซูโครส มอลโทส และ แล็กโทส ออกจากกันได้ ดังนั้นจึงควรใช้คอลัมน์ Sugar Pak I สำหรับวิเคราะห์น้ำตาลในอาหารและเครื่องดื่มทั่วไปเท่านั้น

การศึกษาคำใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์โดยการหาค่า % recovery และ %RSD ของวิธี ในตัวอย่างต่างๆ ได้แก่

- นมสด (เป็นตัวแทนของกลุ่มตัวอย่างนมสดและนมผงคัดแปลงสำหรับทารก)
 - ในการหาปริมาณแล็กโทส : % recovery = 99.3 - 100.3
 - % RSD = 0.30 - 1.21
- โยเกิร์ตผสมสตอเบอร์รี่ (เป็นตัวแทนของกลุ่มตัวอย่างโยเกิร์ตผสมผลไม้และนมเปรี้ยว)
 - ในการหาปริมาณฟรักโทส : % recovery = 97.0 - 97.6
 - % RSD = 0.50 - 1.12
 - ปริมาณกลูโคส : % recovery = 100.3 - 100.6
 - % RSD = 0.50 - 0.75
 - ปริมาณซูโครส : % recovery = 98.2 - 98.6
 - % RSD = 0.27 - 0.66

- ไมโล (เป็นตัวแทนของกลุ่มตัวอย่างนมช็อกโกแลตและผลิตภัณฑ์ช็อกโกแลต)

ในการหาปริมาณมอลโทส : % recovery = 101.7-106.9

% RSD = 0.81-1.89

ซึ่งค่า % recovery และ % RSD ดังกล่าว เป็นค่าที่ยอมรับได้⁽⁹⁾

การศึกษาวิธีวิเคราะห์น้ำตาลชนิดต่างๆในตัวอย่างนมและผลิตภัณฑ์ จำนวน 32 ตัวอย่าง ได้แก่ นมผงตัดแปลงสำหรับทารก นมสด นมปรุงแต่งพร้อมดื่ม ไอศกรีม นมเปรี้ยวพร้อมดื่ม และโยเกิร์ตผสมผลไม้ พบว่าในตัวอย่างนมผงตัดแปลงสำหรับทารกและนมสดมีน้ำตาลแล็กโทสอย่างเดียว ไม่พบน้ำตาลชนิดอื่น ส่วนในตัวอย่างนมเปรี้ยวพร้อมดื่มพบกลูโคส ซูโครส และแล็กโทส ตัวอย่างโยเกิร์ตผสมผลไม้จะพบ กลูโคส ฟรักโทส ซูโครส และแล็กโทส ส่วนตัวอย่างนมช็อกโกแลตที่มีส่วนผสมของข้าวมอลต์จะพบ มอลโทส ซูโครสและแล็กโทส และตัวอย่างไอศกรีมพบกลูโคส ซูโครส และ แล็กโทส

การวิเคราะห์หาน้ำตาลชนิดต่างๆตามวิธีใน AOAC ส่วนใหญ่การเตรียมตัวอย่างให้ใสจะใช้ตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์หรือไดเอทิลอีเทอร์ในการสกัดเอาไขมันออก และใช้แอลกอฮอล์หรือคาร์บอนเรซิ่นและคาร์บอนทูกตะกอนโปรตีน ซึ่งขั้นตอนดังกล่าวยุ่งยากและเสียเวลามาก อาจเกิดการผิดพลาดทำให้ผลวิเคราะห์น้อยกว่าความเป็นจริง แต่การเตรียมตัวอย่างนมและผลิตภัณฑ์นมในการศึกษาทดลองครั้งนี้จะใช้อะซิโตนในไตรล์ต่อน้ำ ในอัตราส่วน 50:50 ซึ่งสามารถตกตะกอนโปรตีนได้ดีกว่าใช้อัตราส่วนน้อยกว่านี้และสามารถลดปริมาณความสูงของพีกของตัวทำละลาย(solvent peak) ลงได้ แต่ถ้าใช้อัตราส่วนของอะซิโตนในไตรล์ต่อน้ำมากกว่า 60:40 การละลายของน้ำตาลลดลง ผลการวิเคราะห์ไม่ถูกต้อง แต่ในการเตรียมตัวอย่างโดยวิธีนี้มีข้อดีคือ เตรียมตัวอย่างได้ง่ายไม่ยุ่งยาก ลดขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างในการสกัดไขมันและโปรตีน น้ำตาลแต่ละชนิดคาร์โบไฮเดรตที่ ความสามารถในการวัดซ้ำของพื้นที่พีก ความสูงของพีก ได้ผลดี ลดการใช้ตัวทำละลายอีเทอร์และไดเอทิลอีเทอร์ แต่มีข้อควรระวังคือ เมื่อเตรียมตัวอย่างเสร็จควรฉีควิเคราะห์โดย HPLC ทันที ถ้าปล่อยทิ้งไว้นานและฉีดซ้ำใหม่จะทำให้ผลวิเคราะห์คลาดเคลื่อน ปริมาตรเปลี่ยนไปเพราะตัวทำละลายเป็นสารระเหยง่าย

ในการศึกษาวิธีวิเคราะห์น้ำตาลชนิดต่างๆในตัวอย่างนมและผลิตภัณฑ์นม ด้วยเทคนิค HPLC ที่พัฒนาปรับปรุงใหม่โดยเปลี่ยนสถานะที่ใช้ในการวิเคราะห์ให้เหมาะสมกับตัวอย่าง ซึ่งเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง สามารถวิเคราะห์ได้ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ เป็นวิธีการที่ง่ายและเหมาะสมสามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์หาน้ำตาลชนิดต่างๆในตัวอย่างนมและผลิตภัณฑ์นม และตัวอย่างอาหารอื่นได้อีกด้วย

กิตติกรรมประกาศ

ผู้รายงานขอขอบพระคุณ นางสุจินต์ ศรีคงศรี ผู้อำนวยการสำนักบริหารและรับรองห้องปฏิบัติการและนางวิวรรณ อาจสำอาง หัวหน้ากลุ่มบริหารจัดการทดสอบความชำนาญ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและแก้ไขข้อบกพร่องในการเขียนรายงานฉบับนี้และขอขอบคุณ นางสาวสุกัลยา พลเดช และนางสาวจันทร์คน์ จินคาร์สมิ ที่ให้ข้อเสนอแนะ ตลอดจนข้อมูลที่เป็นประโยชน์ จนทำให้รายงานฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้

เอกสารอ้างอิง

1. กัลยา วานิชย์บัญชา. หลักสถิติ. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพมหานคร : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2540. หน้า 325-330.
2. แม่้น อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสม. หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร : ชวนพิมพ์, 2535. หน้า 714-728.
3. มนตรี จุฬาวัฒนทล และคนอื่น ๆ. ชีวเคมี. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร : ศ.ส., 2530. หน้า 39-55.
4. ศศิเกษม ทองขงค์ และ พรรณี เดชกำแหง. เคมีอาหารเบื้องต้น. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร : โอ.เอส.พรินต์ติ้ง เฮ้าส์, 2530. หน้า 59-89.
5. ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. คู่มือหลักสูตรเข้มข้นการวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatography. 2534. หน้า 1-16.
6. สุนันทา ภิญญาวัธน์. ชีวเคมี 1. พิมพ์ครั้งที่ 6. กรุงเทพมหานคร : ชวนพิมพ์, 2539. หน้า 1-13.
7. AOAC International. Methods of Analysis for Nutrition Labeling. Chapter 4 : Carbohydrates/Dietary Fiber Analysis for Nutrition Labeling. 1993.
8. AOAC International. Methods of Analysis for Nutrition Labeling. Chapter 33. : Fructose, Glucose, Lactose, Maltose and Sucrose in Milk Chocolate Liquid Chromatographic Method: 980.13. 1993.
9. Christopher Burgess. Valid Analytical Methods & Procedures. UK : The Royal Society Chemistry, 2000, p.57-58
10. Fraser W. Scott. HPLC Determination of Carbohydrates in Foods. 259-273.
11. National Association of Testing Authorities, Australia (NATA). Format and Content of Test Methods and Procedures for Validation and Verification of Chemical Test Methods. Technical Note 17. 1997.
12. Millipore Corporation. Waters Sugar-Pak I Column Care and Use Manual. 1987.
13. Waters Corporation. Millennium³² Software Getting Started Guide. Revision 0. 1997.
14. Waters Corporation. Waters Sourcebook for Analytical HPLC Columns. 1989.

ภาคผนวก

ภาคผนวกที่ 1
ผลการศึกษาทดลอง

ตารางที่ 4 แสดงค่า Retention time, t_r (นาที) ในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ และปริมาณของสารละลายมาตรฐานน้ำตาผสม 5 ชนิด ที่ความเข้มข้น 0.1 %

สารละลายมาตรฐาน น้ำตาผสม 0.1%	แก๊กโทส		มอลโทส		ซูโครส		กลูโคส		ฟรักโทส	
	t_r (นาที)	Peak area	t_r (นาที)	Peak area	t_r (นาที)	Peak area	t_r (นาที)	Peak area	t_r (นาที)	Peak area
1	8.615	375474	7.704	382394	6.771	533004	5.022	360006	4.536	344930
2	8.664	366779	7.742	382171	6.801	527612	5.042	357542	4.553	340810
3	8.705	372210	7.772	384920	6.829	531510	5.059	360212	4.570	343980
4	8.743	366007	7.804	383118	6.852	531949	5.072	361101	4.583	346760
5	8.769	374455	7.822	387900	6.869	533318	5.083	362700	4.592	342938
6	8.087	366306	7.855	380468	6.890	530644	5.101	365246	4.607	345216
7	8.20	378255	7.864	391248	6.899	540321	5.102	359654	4.609	347408
ค่าเฉลี่ย	8.540	371355	7.795	384603	6.844	532623	5.069	360923	4.579	344577
SD	0.27769399	4999.17	0.05886	3768.83	0.04696	3886.02	0.02987593	2458.51	0.02731	2256.32
%RSD	3.251522897	1.346198	0.755171	0.979928	0.686112	0.729601	0.589418386	0.681173	0.596387	0.654809

ตารางที่ 5 แสดงค่า Retention time, t_r (นาที) ในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและปริมาณของสารละลายมาตรฐานน้ำตาลผสม 5 ชนิด ที่ความเข้มข้น 0.5 %

สารละลายมาตรฐาน น้ำตาลผสม 0.5%	เด็กโทส		มอลโทส		ซูโครส		กลูโคส		ฟรักโทส	
	t_r (นาที)	Peak area	t_r (นาที)	Peak area	t_r (นาที)	Peak area	t_r (นาที)	Peak area	t_r (นาที)	Peak area
1	9.076	1982540	8.071	2007991	7.065	2676601	5.175	1811464	4.662	1733922
2	9.079	1984416	8.073	2012970	7.064	268610	5.174	1814902	4.662	1730861
3	9.092	1987935	8.082	2007796	7.075	2673904	5.182	1822925	4.670	1725986
4	9.092	1992274	8.085	2008248	7.078	2675117	5.186	1811404	4.673	1737706
5	9.090	1965737	8.081	1993876	7.074	2663677	5.181	1816676	4.669	1725511
6	9.096	1993455	8.086	2014447	7.079	2675976	5.186	1828143	4.673	1726470
7	9.100	1995289	8.091	2000690	7.082	2677726	5.188	1819420	4.674	1742747
ค่าเฉลี่ย	9.089	1985949	8.081	2006574	7.074	2330230	5.182	1817848	4.669	1731886
SD	0.008731	10083.17	0.007135	7130.417	0.006914	909101.2	0.005498918	6145.015	0.005099	6605.721
%RSD	0.096063	0.507725	0.088287	0.355353	0.097746	39.01336	0.106121591	0.338038	0.10921	0.381418

ตารางที่ 6 แสดงค่า calculation value ในการสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานน้ำตาลฟรักโทส ที่ความเข้มข้น 5 ระดับ

Concentration g/100 ml	Calculation value
0.100060	0.098618
0.200120	0.200675
0.300180	0.298293
0.400240	0.401597
0.500300	0.500416
Coefficient of Determination, R^2	0.999864

ตารางที่ 7 แสดงค่า calculation value ในการสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส ที่ความเข้มข้น 5 ระดับ

Concentration g/100 ml	Calculation value
0.100090	0.098450
0.200180	0.200805
0.300270	0.298342
0.400360	0.403567
0.500450	0.499119
Coefficient of Determination, R^2	0.999760

ตารางที่ 8 แสดงค่า calculation value ในการสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานน้ำตาลซูโครส ที่ความเข้มข้น 5 ระดับ

Concentration g/100 ml	Calculation value
0.150020	0.147967
0.300040	0.302199
0.450060	0.446995
0.60080	0.603562
0.750100	0.749274
Coefficient of Determination, R^2	0.999797

ตารางที่ 9 แสดงค่า calculation value ในการสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานน้ำตาลมอลโทส ที่ความเข้มข้น 5 ระดับ

Concentration g/100 ml	Calculation value
0.120010	0.116007
0.240020	0.240024
0.360030	0.357566
0.480040	0.482936
0.600050	0.600010
Coefficient of Determination, R^2	0.999665

ตารางที่ 10 แสดงค่า calculation value ในการสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานน้ำตาลแล็กโทส ที่ความเข้มข้น 5 ระดับ

Concentration g/100 ml	Calculation value
0.120030	0.113334
0.240060	0.237738
0.360090	0.356482
0.480120	0.482871
0.600150	0.602382
Coefficient of Determination, R^2	0.999379

ตารางที่ 11 แสดงค่า Instrument Detection Limit (IDL) ของสารละลายตัวอย่างนมสด
ที่มีความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดได้ (original sample)

Replicate	1 % นมสด		
	Concentration (%)		
(n)	Sucrose	Maltose	Lactose
1	-	-	0.030
2	-	-	0.031
3	-	-	0.031
4	-	-	0.032
5	-	-	0.033
6	-	-	0.033
7	-	-	0.032
Mean			0.032
Standard Deviation			0.00111
IDL = 3 x SD			0.00333

ตารางที่ 12 แสดงค่า Instrument Detection Limit (IDL) ของสารละลายตัวอย่าง โยเกิร์ตที่มีความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดได้ (original sample)

Replicate	1 % โยเกิร์ตผสมสตรอปเบอร์รี่			
	Concentration (%)			
(n)	Fructose	Glucose	Sucrose	Lactose
1	0.025	0.025	0.061	0.033
2	0.026	0.026	0.064	0.031
3	0.026	0.025	0.063	0.032
4	0.026	0.026	0.061	0.033
5	0.026	0.026	0.062	0.036
6	0.026	0.026	0.063	0.032
7	0.026	0.026	0.064	0.034
Mean	0.026	0.026	0.063	0.033
Standard Deviation	0.00049	0.00049	0.00122	0.00163
IDL = 3 x SD	0.00147	0.00147	0.00366	0.00489

ตารางที่ 13 แสดงค่า Instrument Detection Limit (IDL) ของสารละลายตัวอย่างไมโลที่มีความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดได้ (original sample)

Replicate	1.6 % ไมโล		
	Concentration (%)		
(n)	Sucrose	Maltose	Lactose
1	0.446	0.057	0.256
2	0.445	0.055	0.251
3	0.441	0.058	0.249
4	0.443	0.055	0.248
5	0.447	0.060	0.255
6	0.438	0.056	0.247
7	0.471	0.063	0.267
Mean	0.447	0.058	0.253
Standard Deviation	0.0109	0.0029	0.0069
IDL = 3 x SD	0.0327	0.0087	0.0207

ตารางที่ 14 แสดงค่า %recovery %RSD และ LOQ (เฉพาะในระดับต่ำ) ของน้ำตาลแล็กโทส ใน
สารละลายตัวอย่างนมสดที่เติมสารละลายน้ำตาลมาตรฐานข้อ 3.3.8.3 (1) ความเข้มข้น
3 ระดับ

Concentration Level	ระดับต่ำ		ระดับกลาง		ระดับสูง	
Actual Conc.	0.120 %		0.360 %		0.480 %	
Replicate (n)	Instrument Response	Calculated Conc.	Instrument Response	Calculated Conc.	Instrument Response	Calculated Conc.
1	502343	0.152	1312881	0.398	1684686	0.510
2	497215	0.151	1270998	0.385	1681527	0.509
3	509764	0.154	1268666	0.384	1670103	0.506
4	499225	0.151	1292276	0.392	1682122	0.510
5	501918	0.152	1285886	0.390	1678934	0.509
6	507869	0.154	1285364	0.389	1675035	0.507
7	504058	0.153	1293219	0.392	1680741	0.509
Mean		0.1524		0.390		0.5086
Standard Deviation		0.0013		0.0047		0.0015
%RSD		0.8333		1.2118		0.2973
%Recovery		100.33		99.44		99.29
LOQ = 10 x SD		0.0127				

ตารางที่ 15 แสดงค่า %recovery %RSD และ LOQ(เฉพาะในระดับต่ำ) ของน้ำตาลฟรักโทส ในสารละลายตัวอย่างโยเกิร์ตผสมสตรอเบอร์รี่ที่เติมสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน ข้อ 3.3.8.3 (2) ความเข้มข้น 3 ระดับ

Concentration Level	ระดับต่ำ		ระดับกลาง		ระดับสูง	
Actual Conc.	0.100 %		0.2501 %		0.500 %	
Replicate (n)	Instrument Response	Calculated Conc.	Instrument Response	Calculated Conc.	Instrument Response	Calculated Conc.
1	421121	0.121	946383	0.272	1772342	0.510
2	427219	0.123	931345	0.268	1809866	0.521
3	435157	0.125	940044	0.271	1791491	0.516
4	426388	0.123	939544	0.270	1778777	0.512
5	434796	0.125	937288	0.270	1779787	0.512
6	426897	0.123	940307	0.271	1787853	0.515
7	427817	0.123	935303	0.269	1780364	0.512
Mean		0.123		0.270		0.514
Standard Deviation		0.00138		0.001345		0.003697
%RSD		1.1220		0.4982		0.7193
%Recovery		97.00		97.56		97.60
LOQ = 10 x SD		0.0138				

ตารางที่ 16 แสดงค่า %recovery, %RSD และ LOQ (เฉพาะในระดับต่ำ) ของน้ำตาล กลูโคส ใน
 สารละลายตัวอย่าง โยเกิร์ตผสมสตรอเบอร์รี่ที่เติมสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน ข้อ 3.3.8.3 (2)
 ความเข้มข้น 3 ระดับ

Concentration Level	ระดับต่ำ		ระดับกลาง		ระดับสูง	
Actual Conc.	0.100%		0.250 %		0.500 %	
Replicate (n)	Instrument Response	Calculated Conc.	Instrument Response	Calculated Conc.	Instrument Response	Calculated Conc.
1	459357	0.126	1014542	0.279	1900605	0.523
2	467010	0.129	999510	0.275	1936136	0.533
3	460959	0.127	1012062	0.279	1923855	0.529
4	462618	0.127	1010096	0.278	1912584	0.526
5	460632	0.127	1006714	0.277	1913119	0.526
6	461227	0.127	1006234	0.277	1917974	0.528
7	465573	0.128	1006887	0.277	1911622	0.526
Mean		0.1273		0.277		0.5273
Standard Deviation		0.00095		0.001397		0.003147
%RSD		0.7463		0.5043		0.5968
%Recovery		101.29		100.57		100.25
LOQ = 10 x SD		0.0095				

ตารางที่ 17 แสดงค่า %recovery %RSD และ LOQ (เฉพาะในระดับต่ำ) ของน้ำตาล ซูโครส ใน
 สารละลายตัวอย่าง โยเกิร์ตผสมสตอเบอร์รี่ที่เติมสารละลายน้ำตาลมาตรฐานข้อ 3.3.8.3 (2)
 ความเข้มข้น 3 ระดับ

Concentration Level	ระดับต่ำ		ระดับกลาง		ระดับสูง	
Actual Conc.	0.1501 %		0.3753 %		0.7505 %	
Replicate (n)	Instrument Response	Calculated Conc.	Instrument Response	Calculated Conc.	Instrument Response	Calculated Conc.
1	745281	0.209	1549796	0.434	2837946	0.795
2	752462	0.211	1539307	0.431	2895654	0.812
3	750225	0.210	1545296	0.433	2870956	0.805
4	752254	0.211	1547352	0.434	2862687	0.802
5	747835	0.210	1540257	0.432	2860513	0.802
6	747512	0.209	1548335	0.434	2868900	0.804
7	758646	0.213	1545828	0.433	2857892	0.801
Mean		0.2104		0.433		0.803
Standard Deviation		0.001397		0.001155		0.005099
%RSD		0.6640		0.2667		0.6350
%Recovery		98.20		98.59		98.60
LOQ = 10 x SD		0.0139				

ตารางที่ 18 แสดงค่า %recovery, %RSD และ LOQ (เฉพาะในระดับต่ำ) ของน้ำตาล มอลโทส ในสารละลายตัวอย่างไมโลที่เติมสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน ข้อ 3.3.8.3 (3) ความเข้มข้น 3 ระดับ

Concentration Level	ระดับต่ำ		ระดับกลาง		ระดับสูง	
Actual Conc.	0.0960 %		0.2401 %		0.4802 %	
Replicate (n)	Instrument Response	Calculated Conc.	Instrument Response	Calculated Conc.	Instrument Response	Calculated Conc.
1	541340	0.162	1027839	0.308	1815333	0.544
2	543916	0.163	1031427	0.309	1843527	0.552
3	521048	0.156	1007981	0.302	1805073	0.541
4	529080	0.158	999972	0.299	1813308	0.543
5	542580	0.163	1031460	0.309	1814961	0.544
6	529658	0.159	1013320	0.303	1830084	0.548
7	548636	0.164	1003548	0.301	1844116	0.552
Mean		0.161		0.304		0.546
Standard Deviation		0.003039		0.004158		0.004424
%RSD		1.8876		1.3678		0.8103
%Recovery		106.99		102.64		101.68
LOQ = 10 x SD		0.03039				

ตารางที่ 19 แสดงผลวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลเด็ก โทส ซูโครส มอลโทส และ ฟรักโทสในตัวอย่างนมและผลิตภัณฑ์นม

ลำดับที่	Lab. No.	ชื่อตัวอย่าง	ปริมาณน้ำตาล (กรัม/100 กรัม)				
			แล็กโทส	ซูโครส	มอลโทส	กลูโคส	ฟรักโทส
1.		เอนฟาแลค เอพลาส (นมผง 1)	47.79	-	-	-	-
2.		นมผงดีแบปเลงสำหรับทารก (นมผง 2)	50.66	-	-	-	-
3.		นมผงดีแบปเลงสำหรับทารกและเด็กเล็ก 6เดือน-3ปี(นมผง 3))	42.30	-	-	-	-
4.		นมผงดีแบปเลงสำหรับทารก (นมผง 4)	50.48	-	-	-	-
5.		นมผงดีแบปเลงสำหรับทารก (นมผง 5)	42.98	-	-	-	-
6.		นมผงดีแบปเลงสำหรับทารก (นมผง 6)	42.86	-	-	-	-
7		NZMP Alaco Milk Powder (นมผง 7)	36.32	-	-	-	-
8.		นมผงปรุงแต่งรสน้ำผึ้ง (นมผง 8)	28.9	11.9	-	-	1.83
9		นมสด ยูเอชที (นมสด 1)	4.40	-	-	-	-
10		นมสดพาสเจอร์ไรส์ รสธรรมชาติ (นมสด 2)	4.13	-	-	-	-
11.		นมคั้นรูปพร้อมดื่ม รสช็อกโกแลตมอลด์ (นมช็อกโกแลต 1)	4.16	7.15	0.91	-	-
12.		นมช็อกโกแลต (นมช็อกโกแลต 2)	4.85	4.47	-	-	-
13		นมช็อกโกแลต (นมช็อกโกแลต 3)	5.00	5.14	-	-	-
14.		ไอศกรีม ไซอามิสที (ไอศกรีม 1)	4.23	9.43	-	2.85	-
15.		ไอศกรีม พิศาจไอเอ็กส์ต้า(ไอศกรีม 2))	4.28	8.68	-	4.98	-
16.		นมเปรี้ยวพร้อมดื่มพาสเจอร์ไรส์ รสส้ม (นมเปรี้ยว 1)	1.30	11.89	-	0.44	-
17.		นมเปรี้ยวพร้อมดื่ม รสผลไม้รวม (นมเปรี้ยว 2)	1.07	13.33	-	0.25	-

ตารางที่ 19 แสดงผลวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลเล็ก โทส ซูโครส มอลโทส กลูโคส และ ฟรักโทสในตัวอย่างนมและผลิตภัณฑ์นม (ต่อ)

ลำดับที่	Lab. No.	ชื่อตัวอย่าง	ปริมาณน้ำตาล (กรัม/100 กรัม)				
			แล็กโทส	ซูโครส	มอลโทส	กลูโคส	ฟรักโทส
18.		นมเปรี้ยวพร้อมดื่ม รสบลูเบอร์รี่ (นมเปรี้ยว 3)	0.89	13.68	-	0.24	-
19.		นมเปรี้ยวพร้อมดื่ม รสสตอเบอร์รี่ (นมเปรี้ยว 4)	0.65	13.56	-	0.41	-
20.		นมเปรี้ยวพร้อมดื่ม รสส้ม (นมเปรี้ยว 5)	0.96	13.67	-	0.23	-
21.		นมเปรี้ยว สูตรนมสด (นมเปรี้ยว 6)	0.47	11.23	-	4.03	-
22.		นมเปรี้ยว รสอุ่นสูตรนมสด (นมเปรี้ยว 7)	0.61	12.30	-	0.52	-
23.		นมเปรี้ยว รสสับปะรด (นมเปรี้ยว 8)	0.60	12.97	-	0.56	-
24.		นมเปรี้ยว รสสตอเบอร์รี่ สูตรนมสด (นมเปรี้ยว 9)	0.56	12.86	-	0.55	-
25.		นมเปรี้ยว รสส้ม สูตรนมสด (นมเปรี้ยว 10)	0.52	13.51	-	0.52	-
26.		นมเปรี้ยวพร้อมดื่ม รสผลไม้มixed (นมเปรี้ยว 11)	1.07	13.33	-	0.25	-
27.		ยาดูแล	1.70	15.30	-	-	-
28.		โยเกิร์ตผสมลินีจี่ (โยเกิร์ต 1)	3.76	5.77	-	3.20	2.83
29.		โยเกิร์ตผสมสตอเบอร์รี่ (โยเกิร์ต 2)	3.44	6.80	-	3.01	2.68
30.		โยเกิร์ตผสมไม้มixed (โยเกิร์ต 3)	2.55	8.26	-	1.73	1.33
31.		โยเกิร์ตผสมวุ้นมะพร้าว (โยเกิร์ต 4)	3.43	12.76	-	0.51	0.06
32.		โยเกิร์ตผสมธัญหาร ถั่วและเม็ดบัว (โยเกิร์ต 5)	3.11	11.55	-	1.02	0.55

ภาคผนวกที่ 2

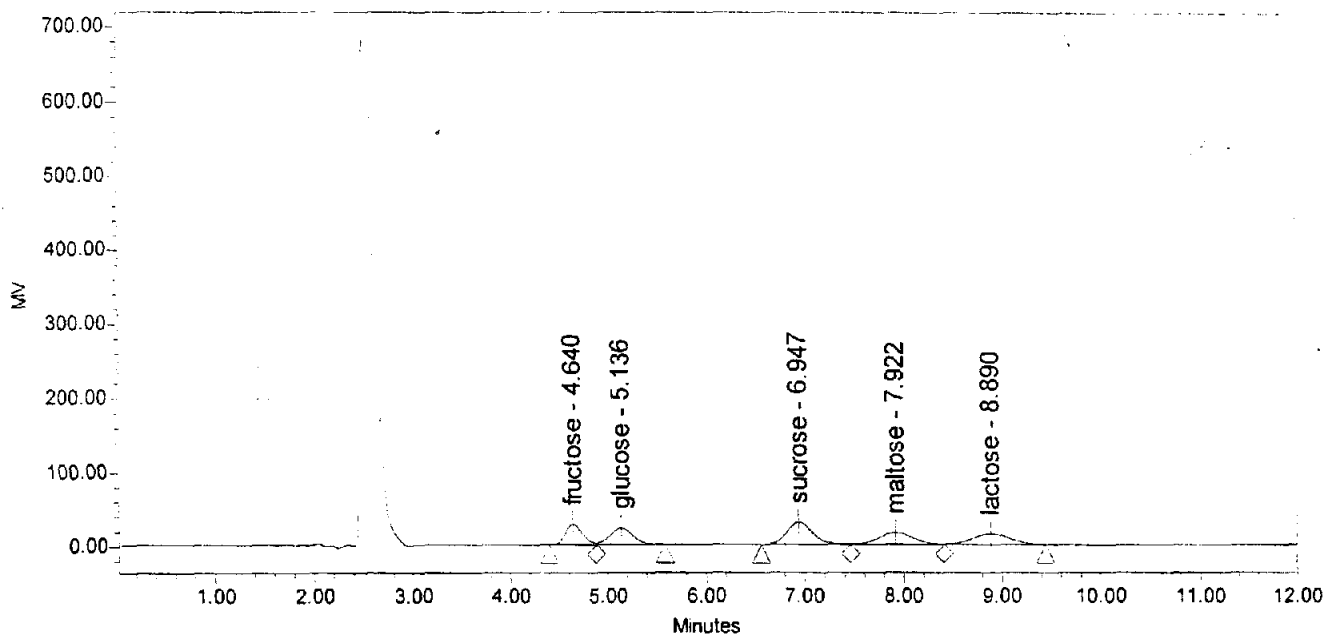
โครมาโตแกรมและกราฟ

Sample Information

SampleName sugar sgfml 0.1%
 Vial 1
 Injection 11
 Injection Volume 20.00 ul
 Channel 410
 Run Time 12.0 Minutes

Sample Type Unknown
 Date Acquired 08/Jul/2003 2:37:58 PM
 Acq Method Set Sugar 1st
 Processing Method sugar 1st
 Date Processed 08/Jul/2003 2:50:10 PM

Auto-Scaled Chromatogram



Peak Results

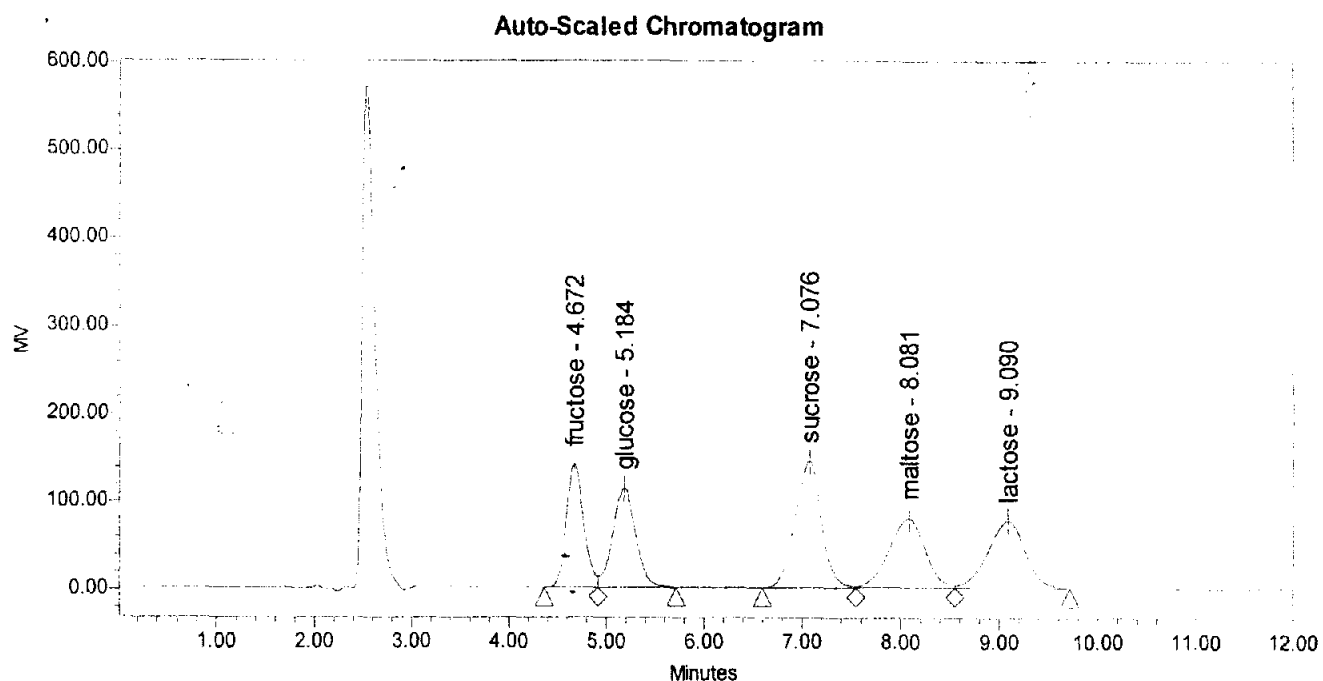
	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	fructose	4.640	345089	28450	0.099	%
2	glucose	5.136	366129	22668	0.101	%
3	sucrose	6.947	535419	30127	0.150	%
4	maltose	7.922	391394	16089	0.117	%
5	lactose	8.890	379579	14916	0.115	%

รูปที่ 2 โครมาโตแกรมสารละลายมาตรฐานน้ำตาลฟรักโทส กลูโคส ซูโครส มอลโทส และแล็กโทส
 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1%

Sample Information

SampleName sugar sgfml 0.5%
 Vial 2
 Injection 11
 Injection Volume 20.00 ul
 Channel 410
 Run Time 12.0 Minutes

Sample Type Unknown
 Date Acquired 08/Jul/2003 5:15:15 PM
 Acq Method Set Sugar 1st
 Processing Method sugar 1st
 Date Processed 08/Jul/2003 5:27:27 PM



Peak Results

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	fructose	4.672	1735392	141051	0.499	%
2	glucose	5.184	1835844	113292	0.505	%
3	sucrose	7.076	2677132	145336	0.750	%
4	maltose	8.081	2005208	79740	0.601	%
5	lactose	9.090	1989679	76751	0.603	%

รูปที่ 3 โครมาโตแกรมสารละลายมาตรฐานน้ำตาลฟรักโทส กลูโคส ซูโครส มอลโทส และแล็กโทส
 ที่ระดับความเข้มข้น 0.5%

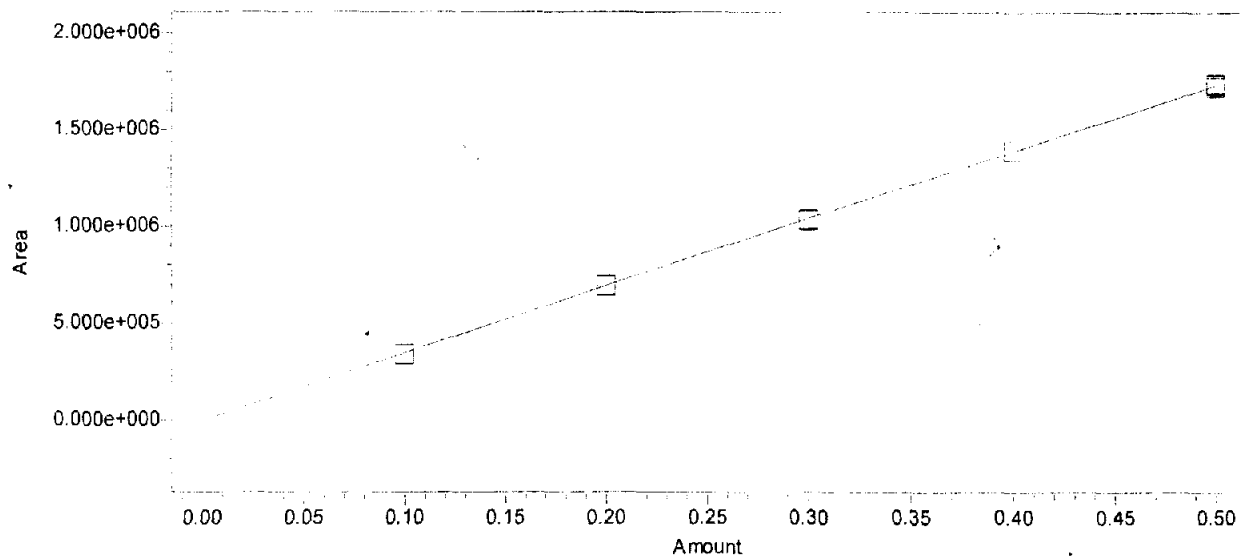
Calibration Information

Name fructose
System 600_717_410
Channel 410
Fit Type Linear thru Zero

A 0.000000e+000
B 3.474284e+006
C 0.000000e+000
D 0.000000e+000
R^2 0.999864

Calibration Id 4908
Date Calibrated 07/Jul/2003 5:32:41 PM
Time 4.602
Processing Method sugar 1st

Calibration Plot



Peak: fructose

	Name	Level	X Value	Response	Calc. Value	% Deviation	Manual	Ignore
1	fructose		0.100060	343082.926763	0.098749	-1.310	No	No
2	fructose		0.100060	343819.022176	0.098961	-1.098	No	No
3	fructose		0.100060	340975.340312	0.098143	-1.916	No	No
4	fructose		0.200120	694168.157082	0.199802	-0.159	No	No
5	fructose		0.200120	698728.960226	0.201115	0.497	No	No
6	fructose		0.200120	698641.812698	0.201089	0.484	No	No
7	fructose		0.300180	1030434.019189	0.296589	-1.196	No	No
8	fructose		0.300180	1038168.562226	0.298815	-0.455	No	No
9	fructose		0.300180	1040465.497183	0.299476	-0.234	No	No
10	fructose		0.400240	1395331.106134	0.401617	0.344	No	No
11	fructose		0.400240	1395098.087531	0.401550	0.327	No	No
12	fructose		0.400240	1395352.575564	0.401623	0.346	No	No
13	fructose		0.500300	1729286.961342	0.497739	-0.512	No	No
14	fructose		0.500300	1740679.684071	0.501018	0.144	No	No
15	fructose		0.500300	1745792.733413	0.502490	0.438	No	No

รูปที่ 4 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานน้ำตาลฟรุกโทส ระหว่างความเข้มข้น กับ peak area

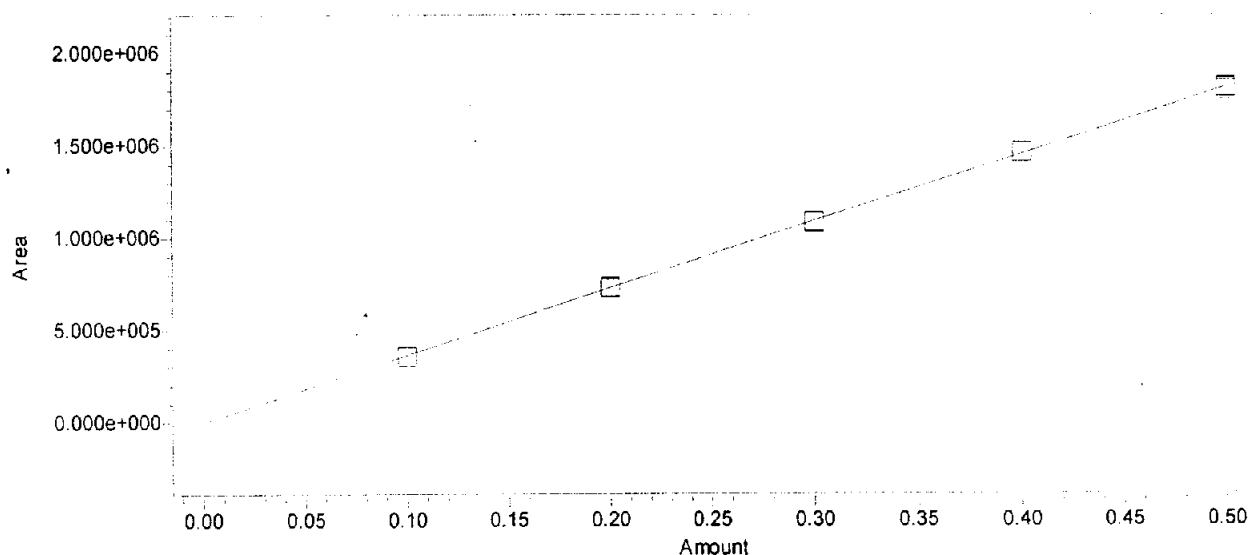
Calibration Information

Name glucose
System 600_717_410
Channel 410
Fit Type Linear thru Zero

A 0.000000e+000
B 3.633880e+006
C 0.000000e+000
D 0.000000e+000
R² 0.999760

Calibration Id 4908
Date Calibrated 07/Jul/2003 5:32:41 PM
Time 5.097
Processing Method sugar 1st

Calibration Plot



Peak: glucose

	Name	Level	X Value	Response	Calc. Value	% Deviation	Manual	Ignore
1	glucose		0.100090	357034.265787	0.098252	-1.837	No	No
2	glucose		0.100090	359668.382939	0.098976	-1.113	No	No
3	glucose		0.100090	356560.363029	0.098121	-1.967	No	No
4	glucose		0.200180	725487.077930	0.199645	-0.267	No	No
5	glucose		0.200180	730458.827412	0.201013	0.416	No	No
6	glucose		0.200180	733164.910956	0.201758	0.788	No	No
7	glucose		0.300270	1086607.131938	0.299021	-0.416	No	No
8	glucose		0.300270	1079743.227147	0.297132	-1.045	No	No
9	glucose		0.300270	1086068.419339	0.298873	-0.465	No	No
10	glucose		0.400360	1465064.256257	0.403168	0.701	No	No
11	glucose		0.400360	1467171.955600	0.403748	0.846	No	No
12	glucose		0.400360	1467310.659033	0.403786	0.856	No	No
13	glucose		0.500450	1804078.999462	0.496461	-0.797	No	No
14	glucose		0.500450	1817047.764651	0.500030	-0.084	No	No
15	glucose		0.500450	1820084.076528	0.500865	0.083	No	No

รูปที่ 5 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส ระหว่างความเข้มข้น กับ peak area

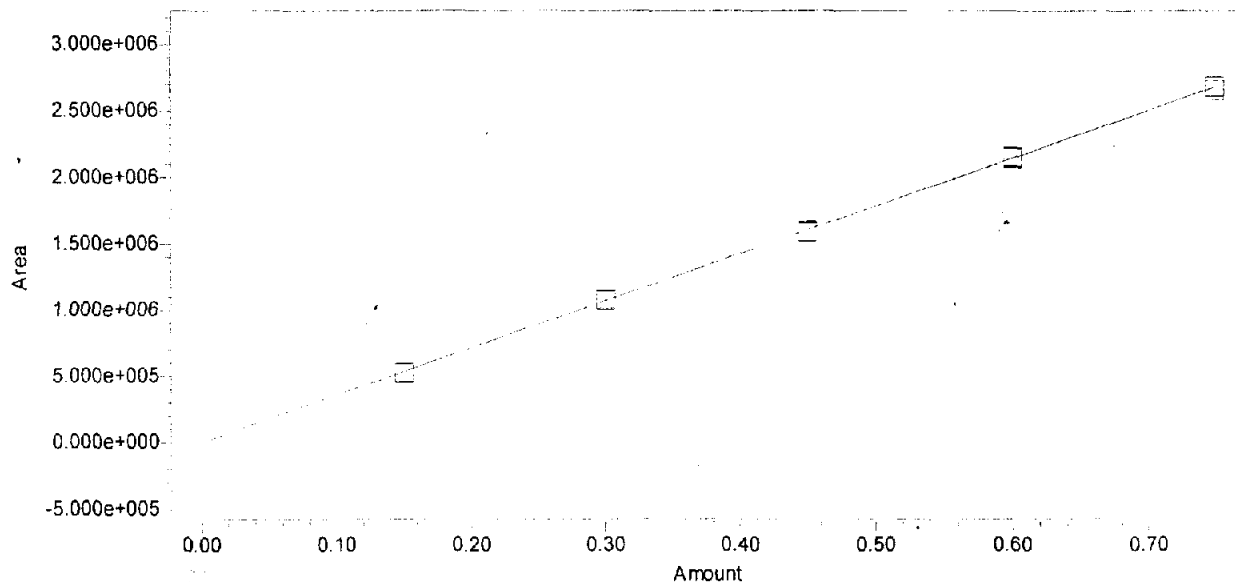
Calibration Information

Name sucrose
System 600_717_410
Channel 410
Fit Type Linear thru Zero

A 0.000000e+000
B 3.568268e+006
C 0.000000e+000
D 0.000000e+000
R² 0.999797

Calibration Id 4908
Date Calibrated 07/Jul/2003 5:32:41 PM
Time 6.890
Processing Method sugar 1st

Calibration Plot



Peak: sucrose

	Name	Level	X Value	Response	Calc. Value	% Deviation	Manual	Ignore
1	sucrose		0.150020	528521.021308	0.148117	-1.269	No	No
2	sucrose		0.150020	525675.490864	0.147320	-1.800	No	No
3	sucrose		0.150020	529764.033553	0.148465	-1.036	No	No
4	sucrose		0.300040	1073764.761800	0.300920	0.293	No	No
5	sucrose		0.300040	1076698.966534	0.301743	0.568	No	No
6	sucrose		0.300040	1084517.552746	0.303934	1.298	No	No
7	sucrose		0.450060	1594296.319883	0.446798	-0.725	No	No
8	sucrose		0.450060	1587463.438303	0.444883	-1.150	No	No
9	sucrose		0.450060	1603232.120321	0.449303	-0.168	No	No
10	sucrose		0.600800	2156297.068499	0.604298	0.582	No	No
11	sucrose		0.600800	2148859.425143	0.602214	0.235	No	No
12	sucrose		0.600800	2155849.581680	0.604173	0.561	No	No
13	sucrose		0.750100	2655288.286433	0.744139	-0.795	No	No
14	sucrose		0.750100	2681326.183540	0.751436	0.178	No	No
15	sucrose		0.750100	2684220.932307	0.752248	0.286	No	No

รูปที่ 6 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานน้ำตาลซูโครส ระหว่างความเข้มข้น กับ peak area

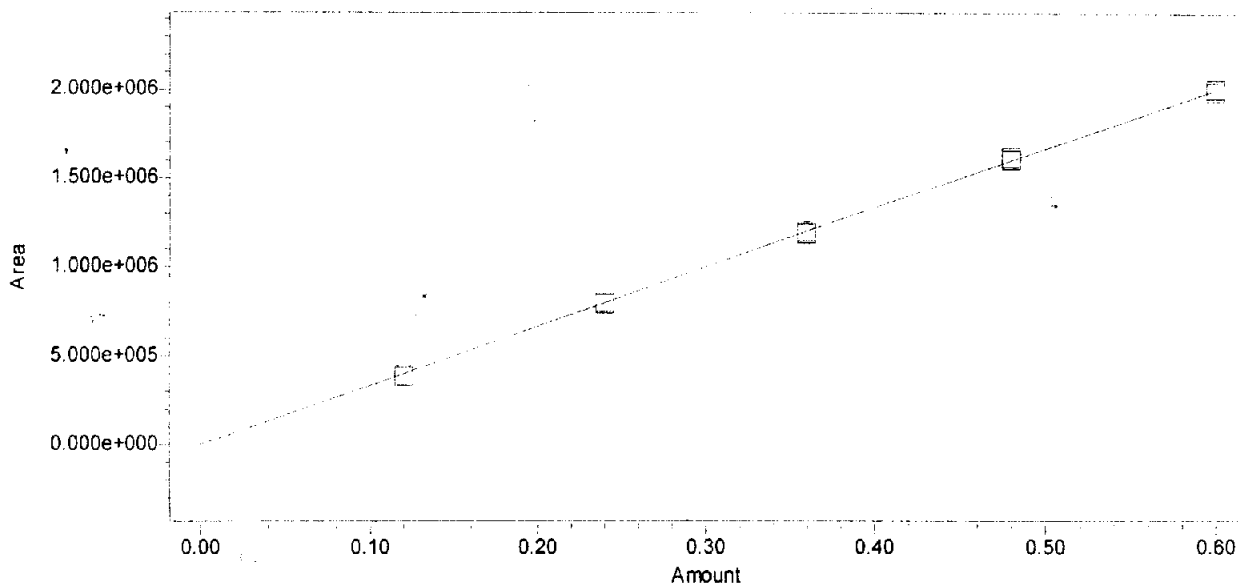
Calibration Information

Name maltose
System 600_717_410
Channel 410
Fit Type Linear thru Zero

A 0.000000e+000
B 3.338816e+006
C 0.000000e+000
D 0.000000e+000
R² 0.999665

Calibration Id 4908
Date Calibrated 07/Jul/2003 5:32:41 PM
Time 7.855
Processing Method sugar 1st

Calibration Plot



Peak: maltose

	Name	Level	X Value	Response	Calc. Value	% Deviation	Manual	Ignore
1	maltose		0.120010	391004.687540	0.117109	-2.417	No	No
2	maltose		0.120010	385373.356676	0.115422	-3.823	No	No
3	maltose		0.120010	385598.373315	0.115490	-3.767	No	No
4	maltose		0.240020	796562.088679	0.238576	-0.602	No	No
5	maltose		0.240020	798231.725742	0.239076	-0.393	No	No
6	maltose		0.240020	809397.388200	0.242420	1.000	No	No
7	maltose		0.360030	1193175.185651	0.357365	-0.740	No	No
8	maltose		0.360030	1185502.592253	0.355067	-1.379	No	No
9	maltose		0.360030	1202866.440284	0.360267	0.066	No	No
10	maltose		0.480040	1610622.395966	0.482393	0.490	No	No
11	maltose		0.480040	1605461.708736	0.480848	0.168	No	No
12	maltose		0.480040	1621217.652716	0.485567	1.151	No	No
13	maltose		0.600050	1991121.351305	0.596355	-0.616	No	No
14	maltose		0.600050	2010548.340823	0.602174	0.354	No	No
15	maltose		0.600050	2008305.690699	0.601502	0.242	No	No

รูปที่ 7 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานน้ำตาลมอลโทส ระหว่างความเข้มข้น กับ peak area

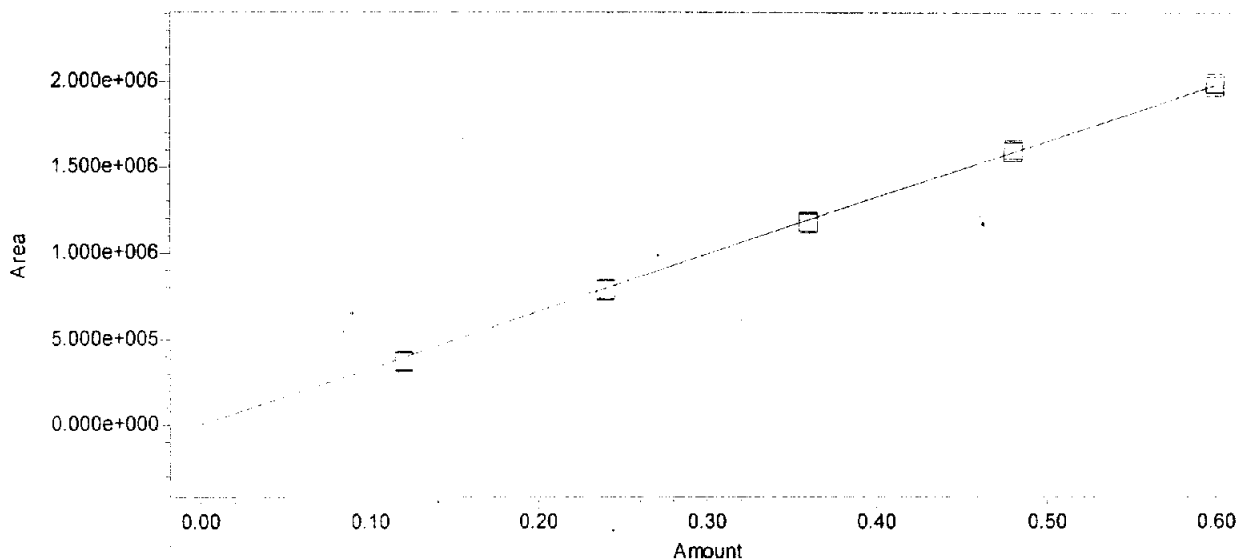
Calibration Information

Name lactose
System 600_717_410
Channel 410
Fit Type Linear thru Zero

A 0.000000e+000
B 3.300659e+006
C 0.000000e+000
D 0.000000e+000
R² 0.999379

Calibration Id 4908
Date Calibrated 07/Jul/2003 5:32:41 PM
Time 8.799
Processing Method sugar 1st

Calibration Plot



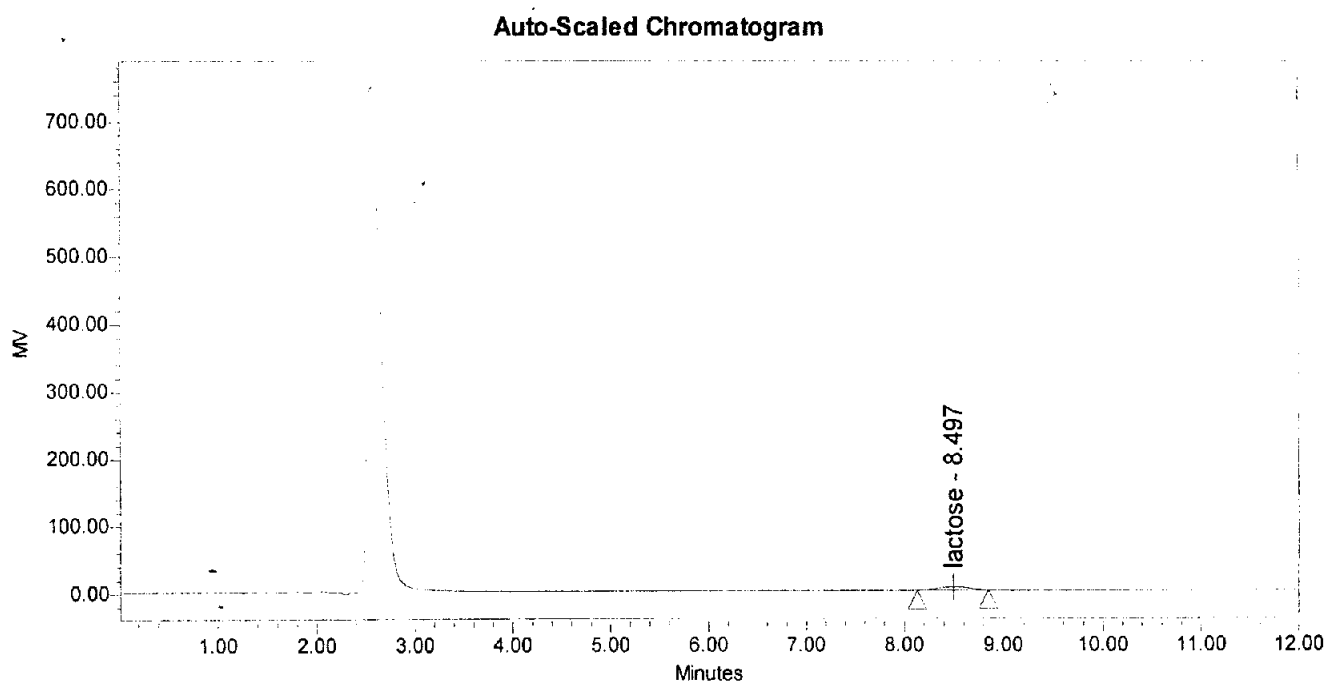
Peak: lactose

	Name	Level	X Value	Response	Calc. Value	% Deviation	Manual	Ignore
1	lactose		0.120030	379869.107759	0.115089	-4.117	No	No
2	lactose		0.120030	374172.352886	0.113363	-5.554	No	No
3	lactose		0.120030	368187.729828	0.111550	-7.065	No	No
4	lactose		0.240060	783130.439070	0.237265	-1.164	No	No
5	lactose		0.240060	779879.363151	0.236280	-1.575	No	No
6	lactose		0.240060	791065.538223	0.239669	-0.163	No	No
7	lactose		0.360090	1180658.897589	0.357704	-0.663	No	No
8	lactose		0.360090	1169532.033661	0.354333	-1.599	No	No
9	lactose		0.360090	1179680.990408	0.357408	-0.745	No	No
10	lactose		0.480120	1588420.856444	0.481244	0.234	No	No
11	lactose		0.480120	1591095.783362	0.482054	0.403	No	No
12	lactose		0.480120	1601857.553200	0.485315	1.082	No	No
13	lactose		0.600150	1975379.331518	0.598480	-0.278	No	No
14	lactose		0.600150	1995268.483572	0.604506	0.726	No	No
15	lactose		0.600150	1994129.576447	0.604161	0.668	No	No

รูปที่ 8 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานน้ำตาลแล็กโทส ระหว่างความเข้มข้น กับ peak area

Sample Information

SampleName	B4	Sample Type	Unknown
Vial	18	Date Acquired	29/Oct/2003 8:08:35 PM
Injection	1	Acq Method Set	Sugar 1st
Injection Volume	20.00 ul	Processing Method	sugar 1st
Channel	410	Date Processed	29/Oct/2003 8:20:47 PM
Run Time	12.0 Minutes		



Peak Results

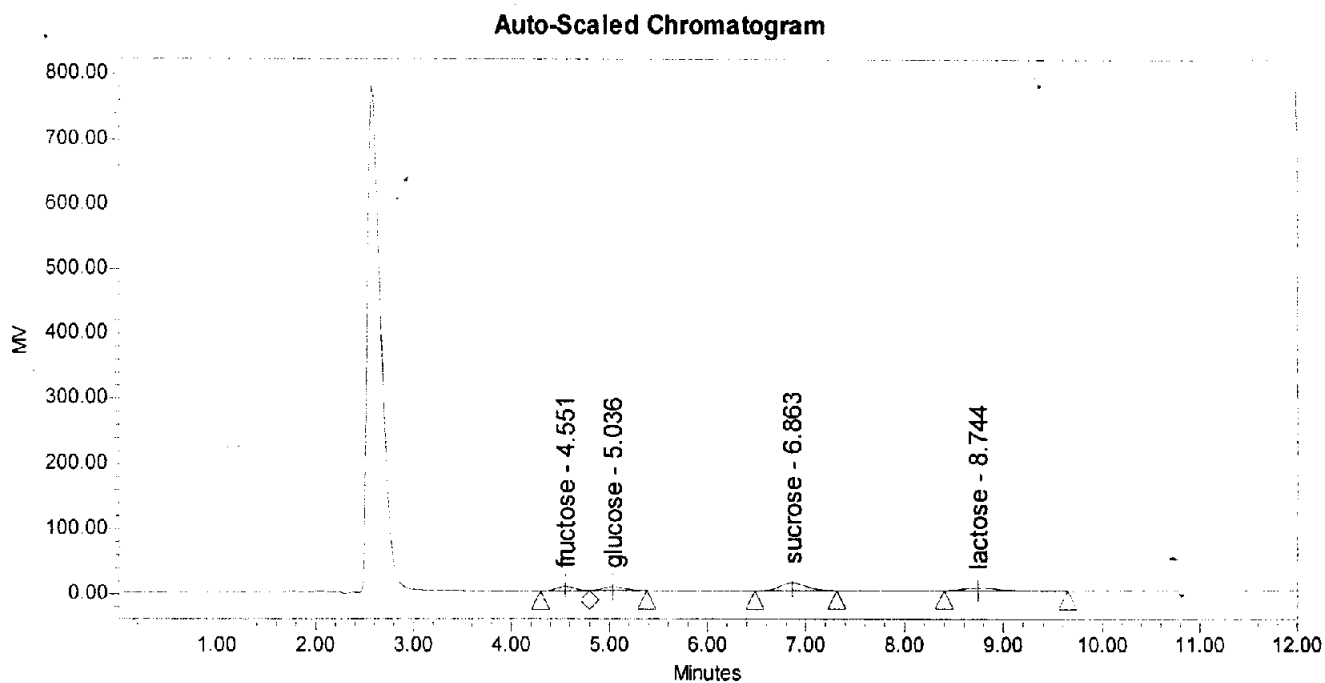
	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	fructose	4.602				
2	glucose	5.097				
3	sucrose	6.890				
4	maltose	7.855				
5	lactose	8.497	105553	4769	0.032	%

รูปที่ 9 แสดงโครมาโตแกรมตัวอย่างนมสดความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดได้ (1 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)

Sample Information

SampleName Yogurt 1
 Vial 1
 Injection 6
 Injection Volume 20.00 ul
 Channel 410
 Run Time 12.0 Minutes

Sample Type Unknown
 Date Acquired 01/Nov/2003 3:34:56 PM
 Acq Method Set Sugar 1st
 Processing Method sugar 1st
 Date Processed 01/Nov/2003 3:47:08 PM



Peak Results

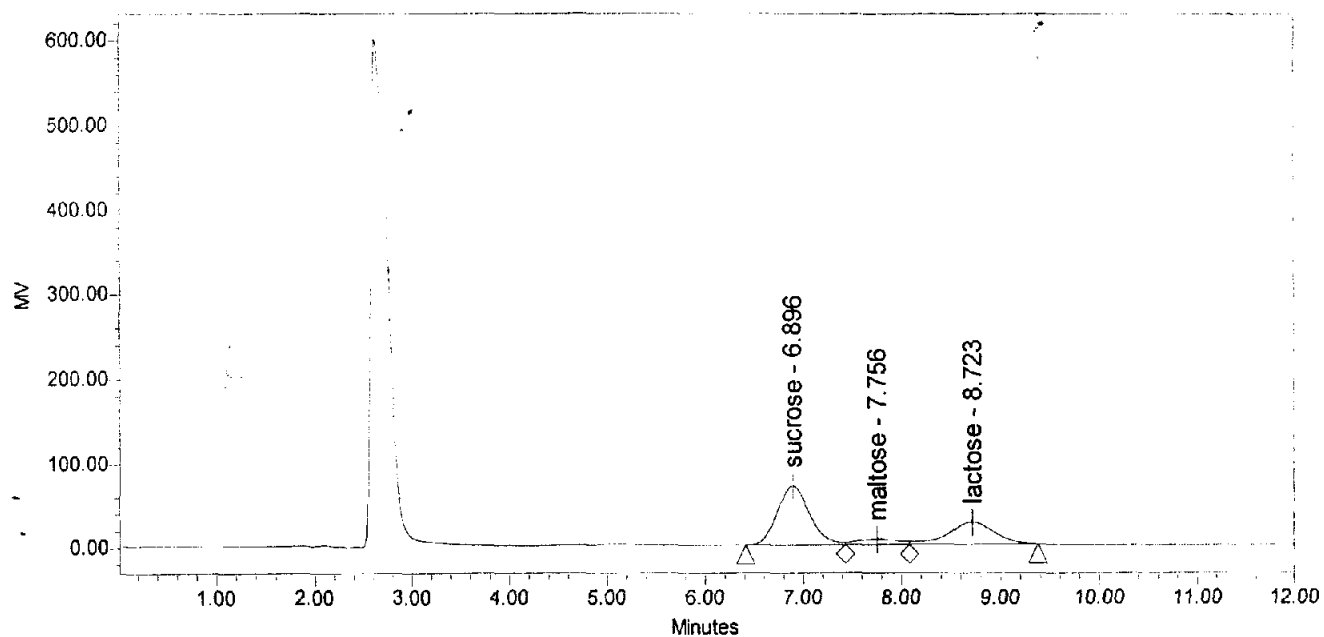
	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	fructose	4.551	87589	6982	0.025	%
2	glucose	5.036	90602	5734	0.025	%
3	sucrose	6.863	219293	11951	0.061	%
4	maltose	7.855				
5	lactose	8.744	109705	4433	0.033	%

รูปที่ 10 แสดงโครมาโตแกรมตัวอย่างโยเกิร์ตผสมสตรอเบอร์รี่ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดได้
 (1 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)

Sample Information

SampleName	Milo 1	Sample Type	Unknown
Vial	1	Date Acquired	07/Nov2003 7:12:04 PM
Injection	1	Acq Method Set	Sugar 1st
Injection Volume	20.00 ul	Processing Method	sugar 1st
Channel	410	Date Processed	07/Nov2003 7:24:17 PM
Run Time	12.0 Minutes		

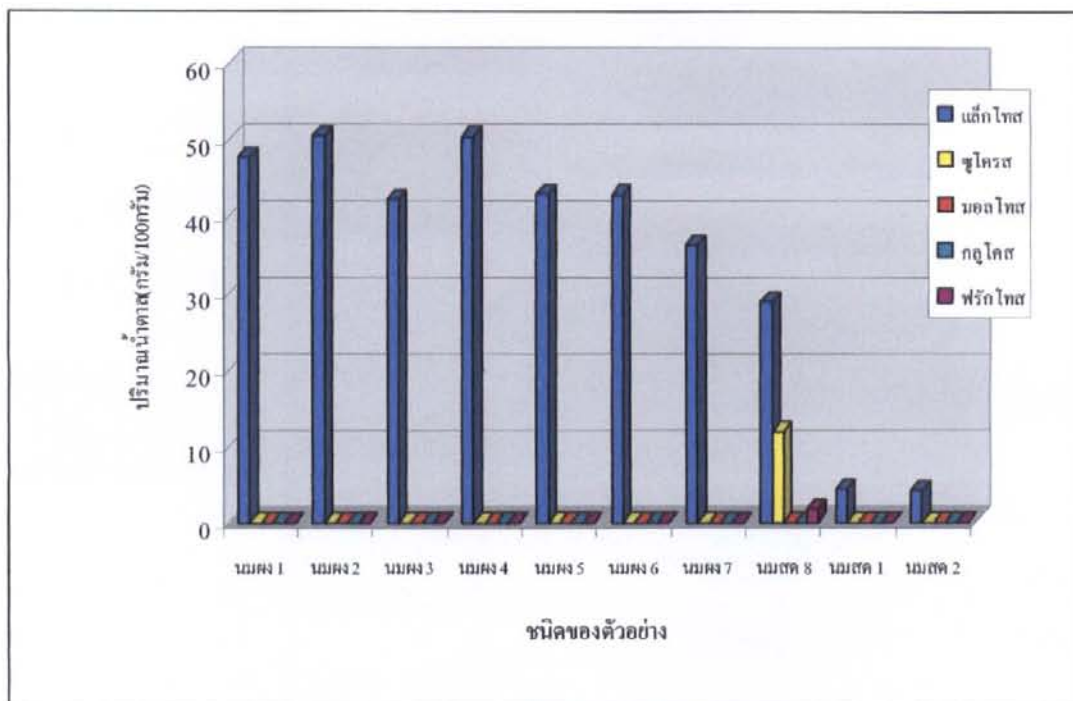
Auto-Scaled Chromatogram



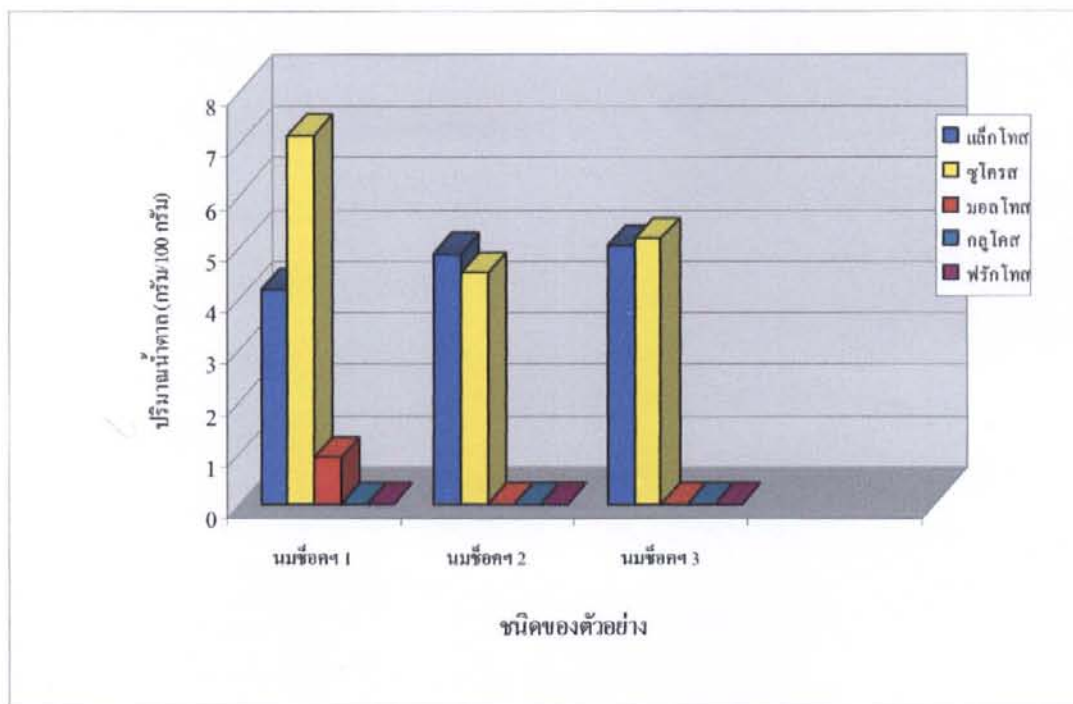
Peak Results

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	fructose	4.602				
2	glucose	5.097				
3	sucrose	6.896	1593193	70376	0.446	%
4	maltose	7.756	191204	6648	0.057	%
5	lactose	8.723	844870	26611	0.256	%

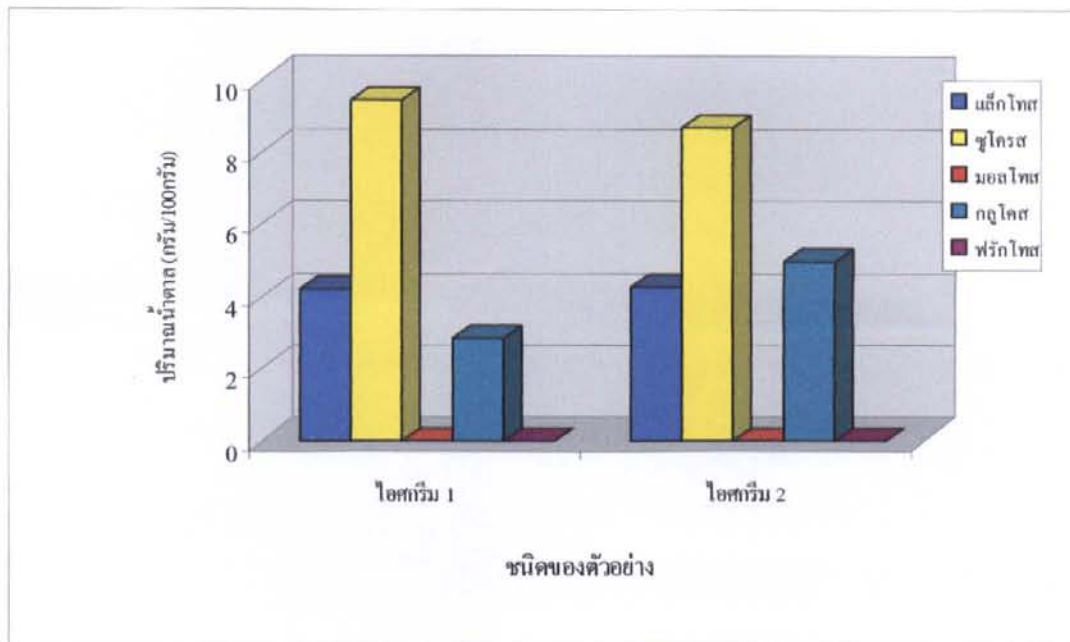
รูปที่ 11 แสดงโครมาโตแกรมตัวอย่างไมโลความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดได้ (1.6 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)



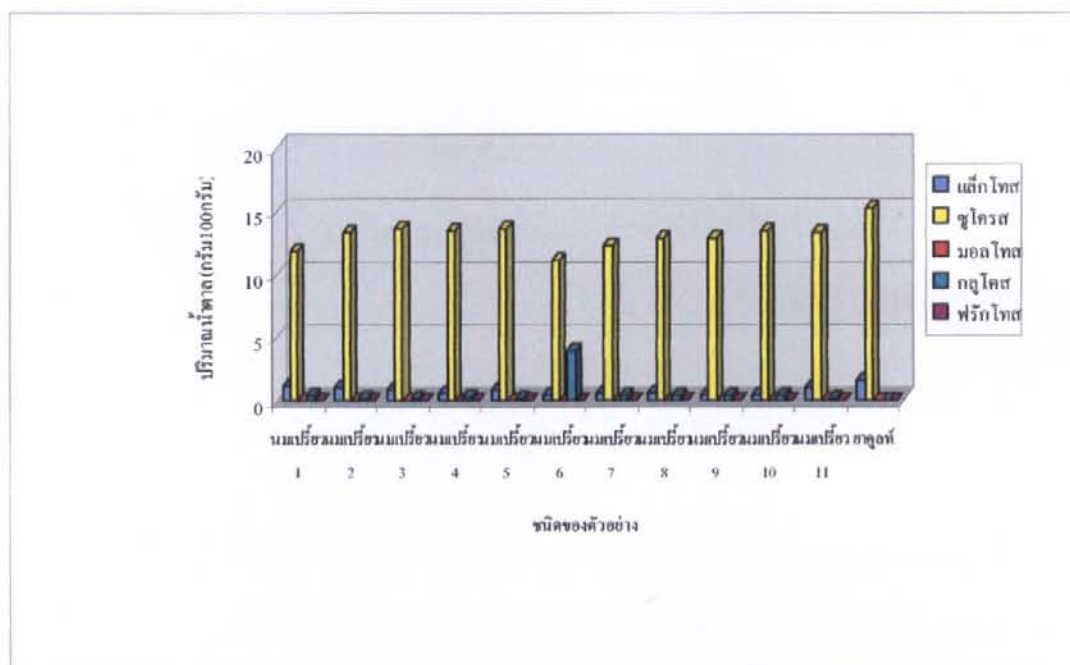
รูปที่ 12 ผลวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลชนิดต่างๆ ในตัวอย่างนมผงดัดแปลงและนมสด



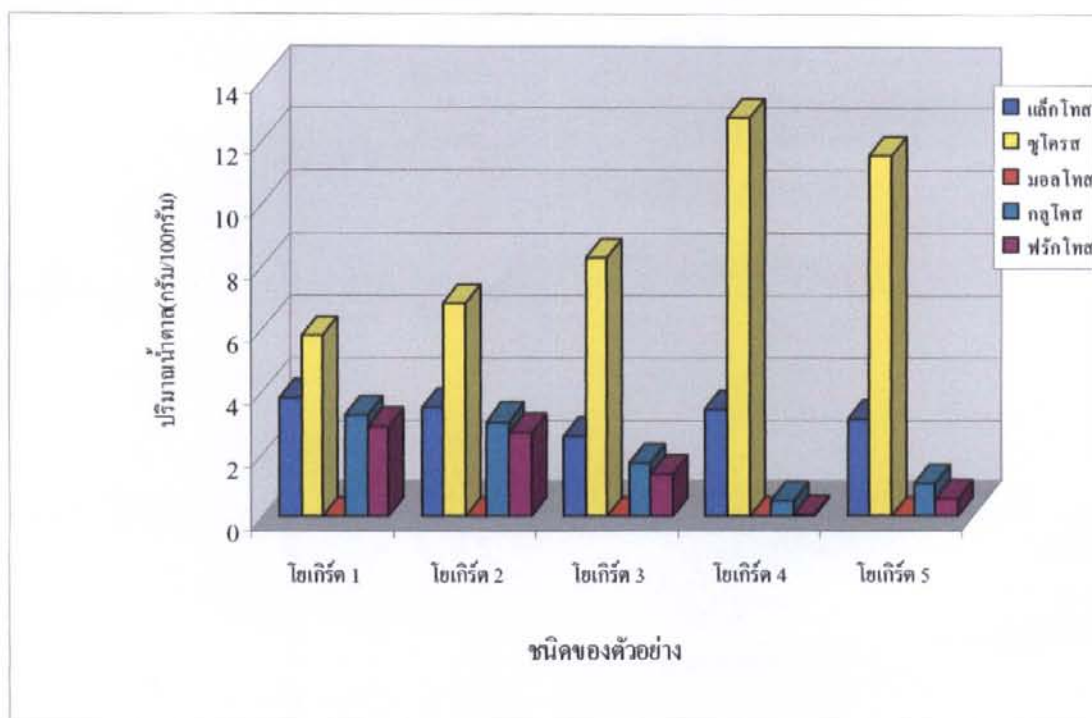
รูปที่ 13 ผลวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลชนิดต่างๆ ในตัวอย่างนมช็อคโกแลต



รูปที่ 14 ผลวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลชนิดต่างๆในตัวอย่างไอศกรีม



รูปที่ 15 ผลวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลชนิดต่างๆในตัวอย่างนมเปรี้ยวพร้อมดื่ม



รูปที่ 16 ผลวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลชนิดต่างๆในตัวอย่างโยเกิร์ตผสมผลไม้