การวิเคราะห์วิตามิน บี ในอาหารทารกโดยวิธีทางจุลชีววิทยา

อรทัย ลีลาพจนาพร

อาหารเป็นหนึ่งในปัจจัยหลักเพื่อการดำรงชีวิตของคน อาหารให้พลังงานและเสริมสร้างร่างกายให้เจริญเติบโต สำหรับทารกแรกเกิดถึง ช่วง 4 เดือนแรก นมแม่คืออาหารหลักของทารกน้อย แต่เมื่อสภาวะทางเศรษฐกิจและสังคมเกิดความเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ ขึ้นจึงเป็นเหตุให้คุณแม่ในปัจจุบันต้องเลี้ยงทารกน้อยของตนด้วยนมผงและผลิตภัณฑ์อาหารสำเร็จรูปที่มีจำหน่ายอย่างแพร่หลายเป็นส่วนใหญ่

นมผงดัดแปลงสำหรับเลี้ยงทารกหมายถึงผลิตภัณฑ์นมที่มีการดัดแปลงส่วนประกอบต่างๆ ของนมวัวให้มีคุณลักษณะใกล้เคียงกับนมแม่ เพื่อให้เกิดประโยชน์ในการเลี้ยงทารกมากที่สุด ผลิตภัณฑ์นมผงดัดแปลงสำหรับเลี้ยงทารกที่ผลิตหรือนำเข้าเพื่อขายหรือแจกจ่ายภายในประเทศไทย ต้องมีส่วนประกอบคุณค่าอาหารครบถ้วนตามที่กำหนดไว้ในประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 156 (พ.ศ. 2537) เรื่อง นมผงดัดแปลงสำหรับทารกและนมผงดัดแปลงสูตรต่อเนื่อง สำหรับทารกและเด็กเล็ก รวมทั้งประกาศกระทรวงฯ ฉบับที่ 157 (พ.ศ. 2537) เรื่องอาหารทารกและอาหารสูตรต่อเนื่องสำหรับทารกและเด็กเล็ก ซึ่งได้กำหนดจำนวนพลังงานที่ได้รับเป็นหลัก กล่าวคือน้ำนมที่ผสมตามอัตราส่วนผสมที่ระบุไว้ตามฉลากจำนวน 100 มิลลิลิตร จะต้องให้พลังงานไม่น้อยกว่า 272 กิโลจูล แต่ไม่เกิน 293 กิโลจูล หรือระหว่าง 65-70 กิโลแคลอรี่ ต่อน้ำนมที่ผสมแล้ว 100 มิลลิลิตร

นอกจากนี้ยังกำหนดรายละเอียดเกี่ยวกับคุณค่าขององค์ประกอบของอาหารทารกด้วยคือ ในจำนวนพลังงาน 100 กิโลแคลอรี่ กำหนดปริมาณโปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน แร่ธาตุ และวิตามิน

นมผงดัดแปลงสำหรับทารก สูตรทั่วไปคือนมที่มีการลดปริมาณและดัดแปลงคุณภาพของโปรตีนปรับเปลี่ยนอัตราส่วนของโปรตีน เวย์ (whey protein) และเคซีน (casein) ให้ใกล้เคียงนมมารดา พร้อมทั้งลดปริมาณไขมันเนยลง เพิ่มไขมันจากพืชแทนเพื่อช่วยการย่อยและดูดซึมของทารก นมผงทารกสูตรทั่วไปจะมีโปรตีนจากนมวัวและน้ำตาลแลคโตสเป็นส่วนประกอบหลัก แต่สำหรับทารกบางรายที่พบว่ามีปัญหาการแพ้นมวัว สามารถใช้นมผงสูตรพิเศษ (special formula) ซึ่งผลิตขึ้นสำหรับทารกที่มีปัญหาการย่อยและดูดซึม ปัญหาการแพ้นมวัว นมผงสูตรพิเศษเหล่านี้จะระบุว่า ปราศจากน้ำตาลแลคโตส (Lactose free) โดยใช้น้ำตาลจากแหล่งอื่น คือ corn syrup solid และ hydrolyzed corn starch เป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรต แทนและโปรตีนจากถั่วเหลืองแทนโปรตีนจากนมวัว

วิตามิน เป็นสารอาหาร 1 ใน 5 หมู่ของสารอาหารหลักที่ร่างกายต้องการ เพื่อการดำรงสภาพได้อย่างปกติ ซึ่งร่างกายคนต้องการวิตามินในปริมาณน้อย ๆ ในระดับไมโครกรัมต่อวันเท่านั้น วิตามินเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่ทำหน้าที่ร่วมกับสารอาหารอื่น ๆ เพื่อเพิ่มพลังและเสริมฤทธิ์ซึ่งกันและกัน เป็นตัวควบคุมกระบวนการเคมีต่าง ๆ ในร่างกาย เป็นตัวเสริมประสานในการทำงาน การทำหน้าที่และการดูดซึมอาหาร ซึ่งเป็นการใช้ประโยชน์ของสารอาหารชนิดอื่นให้เป็นปกติสมบูรณ์ กระบวนการเคมีต่าง ๆ ในร่างกายเพื่อเสริมสร้างพลังงานและย่อยสารอาหารนี้เรียกว่า กระบวนการเมตตาโบลิซึม (Metabolism)

วิตามินแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ ตามคุณสมบัติการละลายได้ดังนี้

1. กลุ่มวิตามินที่ละลายในน้ำมันหรือไขมัน (fat soluble vitamins) ได้แก่ วิตามินเอ อี ดี และเค

2. กลุ่มวิตามินที่ละลายในน้ำ (water soluble vitamins) ได้แก่ วิตามินซี และกลุ่มวิตามินบีรวมทั้งหลาย กรดโฟลิค ไบโอติน

กลุ่มวิตามินบีรวมหมายถึงวิตามินบีชนิดต่าง ๆ ประกอบด้วย วิตามินบี 1 บี 2 บี 6 บี 12 ไนอาซินและกรดแพนโทธีนิค วิตามินเหล่านี้จะทำงานทำหน้าที่ร่วมกัน เพื่อการเสริมฤทธิ์เสริมประสิทธิภาพซึ่งกันและกัน

ความสำคัญและหน้าที่ของวิตามินบี ชนิดต่าง ๆ ที่จำเป็นสำหรับทารกมีดังนี้

วิตามินบี 1	ช่วยให้ทารกเจริญเติบโตเป็นปกติ, บำรุงระบบประสาทและกล้ามเนื้อ
วิตามินบี 2	ช่วยสร้างพลังงานในร่างกาย ป้องกันความผิดปกติของสายตา ผิวหนัง ป้องกันโรคปากนกกระจอกและร่วมกับวิตามินบี 12 ในการสร้างเม็ดโลหิตแดง
วิตามินบี 6	มีความสำคัญต่อระบบประสาทของทารก ใช้ในการสร้างกรดอะมิโน ควบคุมการทำงานของโปรตีน และคาร์โบไฮเดรต
วิตามินบี 12	จำเป็นต่อการสร้างเม็ดโลหิตแดง ถ้าขาดวิตามินชนิดนี้หรือได้รับไม่เพียงพอจะทำให้เกิดความผิดปกติกับเม็ดโลหิตแดง ทำให้เกิดโรคโลหิตจางได้
ไนอาซีน (บี 3)	เป็นโคเอนไซม์ 1 และ 2 ในระบบการหายใจ ในระบบการทำงานของคาร์โบไฮเดรตและไขมัน ส่งเสริมการทำหน้าที่ของระบบประสาทกระตุ้นการหมุนเวียนของโลหิต
กรดแพนโทธีนิค (บี5)	เป็นโคเอนไซม์ เอ ในกระบวนการเมตาโบลิซึม ช่วยเปลี่ยนแปลงโปรตีน คาร์โบไฮเดรตและไขมัน ให้เป็นพลังงาน และใช้ในกระบวนการสร้างกรดไขมัน
กรดโฟลิค	เป็นโคเอนไซม์สำหรับการสร้างกรดนิวคลีอิค (Nucleic acid synthesis) ในการแบ่งเซลล์ และที่มีส่วนร่วมในกระบวนการเมตาโบลิซึมต่าง ๆ ในการเจริญเติบโต ทำงานร่วมกับ วิตามิน บี12 ในการสร้างเม็ดโลหิต
ไบโอติน	เป็นโคเอนไซม์ในกระบวนการเมตาโบลิซึมของกรดอะมิโนและคาร์โบไฮเดรต มีส่วนสำคัญต่อการเจริญเติบโตร่างกายในระบบต่าง ๆ เช่นบำรุงผิวหนัง เส้นผม เส้นประสาท การสร้างยูเรีย

ในความเป็นจริงนั้นวิตามินทุกชนิดจะทำงานร่วมกัน เพื่อให้กระบวนการเคมีต่าง ๆ ในร่างกายดำเนินไปอย่างปกติ ร่างกายของเราโดยเฉพาะทารกซึ่งอยู่ในช่วงวัยที่ต้องการสารอาหารทุกชนิดจากอาหารภายนอก หลังจากคลอดจากครรภ์มารดาแล้ว ทารกต้องการสารอาหารที่ให้พลังงานสูง ต้องการวิตามินทุกชนิดอย่างครบถ้วนไม่ใช่เพียงชนิดใดชนิดหนึ่งเท่านั้นเพื่อไปทำหน้าที่ร่วมกับสารอาหารชนิดอื่นเพื่อสร้างร่างกายให้เจริญเติบโตเต็มที่ต่อไป

ปริมาณวิตามินที่ทารกควรได้รับในแต่ละวันเป็นดังนี้คือ (หน่วย : มิลลิกรัม ต่อวัน, ไมโครกรัม/วัน)

วิตามิน	ทารกอายุ 0-6 เดือน	ทารกอายุ 6 เดือน - 1 ปี
วิตามินบี 1 (มิลลิกรัม/วัน)	0.3	0.5
วิตามินบี 2 (มิลลิกรัม/วัน)	0.4	0.5
วิตามินบี 6 (มิลลิกรัม/วัน)	0.3	0.6
วิตามินบี 12 (ไมโครกรัม/วัน)	0.3	0.5
ไนอาซิน (มิลลิกรัม/วัน)	5	6
กรดแพนโทธีนิค (มิลลิกรัม/วัน)	2	3
ไบโอติน (ไมโครกรัม/วัน)	10	15
กรดโฟลิค (ไมโครกรัม/วัน)	25-50	25-50

ที่มา : RDA. 1989 Recommeded Dietary Allowances 1989

การวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินในอาหารต้องใช้เทคนิควิธีที่มีประสิทธิภาพดีพอที่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณสารชีวเคมีในปริมาณน้อย ๆ ระดับ ไมโครกรัมได้ ซึ่งการวิเคราะห์ โดยวิธีทางจุลชีววิทยา (Microbiological assay) เป็นวิธีหนึ่งซึ่งเป็นที่ยอมรับกันว่ามีประสิทธิภาพมากพอที่จะกำหนดให้ใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินชนิดที่ละลายในน้ำได้ (water soluble vitamins) วิธีวิเคราะห์นี้วัดการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น จากการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ การวัดปริมาณกรดที่เกิดขึ้นหรือวัดความขุ่นที่เกิดขึ้นจากการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ที่ใช้ในการวิเคราะห์ ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้ต้องมีคุณสมบัติที่เฉพาะตัวกับสารอาหารที่จะทำการวิเคราะห์ (specific)

คุณลักษณะของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินในอาหาร

1. เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ทำให้เกิดโรคและไม่สร้างสารพิษ
2. ต้องการสารที่จะวิเคราะห์เป็นปัจจัยสำคัญต่อการเจริญเติบโต
3. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิเคราะห์สามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะที่จำกัด เช่นใน

หลอดทดลองขนาดจำกัด

4. ช่วงเวลาที่ใช้ในการทดลอง ไม่นานจนเกินไปหรือสั้นไปจนไม่สามารถวัดความเปลี่ยนแปลง หรือสังเกตผลการทดลองได้

5. ต้องไม่สามารถสร้างสารที่จะวิเคราะห์ขึ้นมาได้เอง

จุลินทรีย์ที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์ ได้แก่ จุลินทรีย์ในสายพันธุ์ทั่วไปที่ไม่ทำให้เกิดโรคเช่น Lactobacillus Saccharomyces, Leuconostoc, และ Streptococcus ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีการเตรียมให้เป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์ สั่งซื้อจากสถาบันที่เป็นที่น่าเชื่อถือ เช่น American Type Culture Collection (=ATCC) Washington 7, D.C. และ Maryland ประเทศสหรัฐอเมริกา เป็นต้น

วิตามินต้องการวิเคราะห์	จุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิเคราะห์
วิตามิน บี 1	Lactobacillus fermenti ATCC 9338
วิตามิน บี 2	Lactobacillus casei ATCC 7469
วิตามิน บี 6, อินอซิตอล	Saccharomyces carlsbergensis ATCC 9080
วิตามิน บี 12	Lactobacillus leichmannii ATCC 7830
กรดโฟลิค	Lactobacillus casei ATCC 7469
ไบโอติน, ไนอาซิน, กรดแพนโทธีนิค	Lactobacillus arabinosus ATCC 8014

กระบวนการวิเคราะห์ประกอบด้วยขั้นตอนต่าง ๆ โดยสังเขปดังนี้

1. การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อกระตุ้นเชื้อ (preparation of stock culture) โดยการถ่ายเชื้อจากวุ้นอาหารเดิมสู่วุ้นอาหารหลอดใหม่เพื่อให้ได้เชื้อจุลินทรีย์ที่มีอายุ ไม่เกิน 24 ชั่วโมง

2. การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์เพื่อการวิเคราะห์ (preparation of inoculum) เป็นการถ่ายเชื้อจากวุ้นอาหารสู่อาหารเหลว เพื่อนำเซลล์จุลินทรีย์มาใช้ในการวิเคราะห์ โดยมีอายุของเซลล์จุลินทรีย์ไม่เกิน 24 ชั่วโมงเช่นกัน

3. การเตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์ หมายถึง การแยก สกัด หรือย่อยตัวอย่างโดยกรดหรือเอนไซม์ หรือสารเคมี จากสภาพตัวอย่างที่อยู่ในรูปชิ้นอาหาร ก้อน ผง หรืออื่น ๆ ให้อยู่ในรูปของสารละลายที่พร้อมจะถูกนำมาทำการวิเคราะห์ต่อไป

4. การปรับสภาพความเป็นกรด-ด่างของสารละลายตัวอย่าง ในการวิเคราะห์โดยวิธีจุลินทรีย์นั้นต้องควบคุมสภาวะแวดล้อมให้เหมาะสมกับชนิดจุลินทรีย์ที่ใช้ เพื่อให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตได้ดียิ่ง

5. การเตรียมหลอดทดลองชุดสารละลายมาตรฐาน (preparation of standard tubes) การวิเคราะห์นั้นจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องทำการวิเคราะห์ในสภาวะเดียวกันพร้อม ๆ กัน กับสารละลายตัวอย่างโดยใช้สารละลายมาตรฐานในปริมาณที่เพิ่มตามลำดับ

6. การเตรียมหลอดทดลองชุดสารละลายตัวอย่าง (preparation of assay tubes) โดยการเพิ่มปริมาณสารละลายตัวอย่างตามลำดับภายใต้สภาวะเดียวกัน เช่นกัน

7. การทำลายเชื้อจุลินทรีย์ในสารละลายที่มีอยู่เดิมในชุดวิเคราะห์ (sterilization) เพื่อให้การวิเคราะห์เป็นสภาวะปลอดเชื้อเป็นขั้นตอนการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่มีอยู่เดิมในชุดหลอดทดลองทั้งหมด ก่อนที่จะเติมเชื้อที่ใช้วิเคราะห์ลงไป

8. การเติมเชื้อที่ใช้วิเคราะห์และบ่มเชื้อ (inoculation and incubation) เป็นการหยดเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ลงในชุดหลอดทดลอง และนำเข้าตู้บ่มเชื้อ (incubator) ซึ่งควบคุมอุณหภูมิ ตามช่วงเวลาที่กำหนดเชื้อที่จะนำมาหยดนี้คือเชื้อที่เตรียมไว้จากขั้นตอนที่ 2 โดยถ่ายเซลล์จากหลอด Inoculum Broth ที่เตรียมไว้นำไปปั่นแยกเซลล์จุลินทรีย์ออก และต้องผ่านการล้างเซลล์ด้วย 0.9% Sterilized NaCl (Normal saline) 2 ครั้ง ภายใต้ภาวะการปลอดเชื้อ

9. การบ่มเชื้อ (incubation) เมื่อหยอดเซลล์จุลินทรีย์ลงในชุดหลอดทดลองครบทั้งชุดแล้วต้องนำชุดหลอดทดลองทั้งหมด ไปวางไว้ในตู้บ่มเชื้อ (incubator) ซึ่งมีอุณหภูมิคงที่เป็นระยะเวลาอย่างน้อย 20 ชั่วโมง กรณีวัดปริมาณกรด จะใช้เวลาประมาณ 72 ชั่วโมง

10. การอ่านผลการวิเคราะห์ หลังจากที่บ่มเชื้อไว้ชั่วระยะเวลาหนึ่ง กรณีที่บ่มเชื้อเป็นเวลา 20 ชั่วโมง เราสามารถวัดผลการทดลองโดยการวัดความขุ่นที่เกิดจากการแบ่งเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ หรือกรณีที่ใช้เวลาบ่มเชื้อนานถึง 68-72 ชั่วโมงเราจะวัดผลการวิเคราะห์วัดผลการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นโดยการติเตรตกรดแลกติกที่เกิดขึ้นกับ 0.1N NaOH

11. การคำนวณ (calculation) โดยการนำผลจากการวัดค่าความขุ่น (ค่า absorbance) ที่เกิดขึ้นซึ่งวัดได้โดยใช้เครื่องวัดความขุ่น ในที่นี้วัดค่า Absorbance ด้วยเครื่อง UV/VIS Spectrophotometer double beam ที่ความยาวช่วงคลื่น 620 นาโนเมตรหรือปริมาณด่างที่ใช้การติเตรตกรดแลกติกที่เกิดขึ้นกับ 0.1N NaOH ในจากข้อ 10 มาเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณสารละลายมาตรฐาน กับค่าความขุ่นหรือปริมาณด่างที่ใช้กรณีที่อ่านค่าความขุ่นที่เกิดขึ้น เปรียบเทียบผลจากปริมาณด่างที่ใช้ในชุดสารละลายมาตรฐานกับชุดสารละลายตัวอย่าง

จากการวิเคราะห์หาปริมาณ วิตามิน บี 6 บี 12 ไบโอติน กรดโฟลิค ไนอาซีน และกรดแพนโทธีนิค โดยการใช้วิธีทางจุลชีววิทยา (microbiological assay) ในตัวอย่างนมผงดัดแปลงสำหรับทารกทั้งหมด 15 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นนมสูตรปกติทั่วไป 10 ตัวอย่างและนมสูตรพิเศษสำหรับทารกที่มีอาการแพ้นมวัว 5 ตัวอย่าง ผลการวิเคราะห์ปริมาณ วิตามิน พบว่า ทุกตัวอย่างมีปริมาณวิตามินดังกล่าวสูงกว่าค่าที่กำหนดไว้ในประกาศฯ

ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณวิตามิน ต่อหน่วยน้ำหนัก 100 กรัม

ชนิดวิตามิน	ปริมาณเฉลี่ย (ไมโครกรัม/100 กรัม)
วิตามิน บี6	126.8
วิตามิน บี 12	0.63
ไบโอติน	4.01
กรดโฟลิค	24.0
ไนอาซิน	1254.4
กรดแพนโทธีนิค	594.4
ค่าพลังงานความร้อน (กิโลแคลอรี)*	502.75

หมายเหตุ

* ค่าพลังงานความร้อน : ที่มางานวิเคราะห์อาหารและเครื่องดื่ม กองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ วิตามินในตัวอย่างนมผงที่จำแนกเป็นนมสูตรปกติ 10 ตัวอย่าง และนมสูตรพิเศษสำหรับทารกที่มีอาการแพ้นมวัว หรือมีปัญหาเกี่ยวกับระบบย่อยอาหาร

ปริมาณค่าที่วิเคราะห์ได้โดยเฉลี่ย ต่อหน่วยน้ำหนัก 100 กรัม

ชนิดวิตามิน (ไมโครกรัม/100 กรัม)	นมสูตรทั่วไป	นมสูตรพิเศษ
วิตามิน บี6	119.4	141.8
วิตามิน บี12	0.55	0.79
ไบโอติน	3.43	5.16
กรดโฟลิค	23.6	24.78
ไนอาซิน	1285.1	1193.0
กรดแพนโทธีนิค	548.4	686.5
ค่าพลังงานความร้อน (กิโลแคลอรี)*	505.82	504.25

หมายเหตุ

* ค่าพลังงานความร้อน : ที่มางานวิเคราะห์อาหารและเครื่องดื่ม กองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

จากปริมาณวิตามินต่าง ๆ นี้เราสามารถวิเคราะห์ได้ว่านมผงหรืออาหารทารกเหล่านี้จัดว่าปริมาณวิตามินในตัวอย่นมผงนั้นมีคุณภาพเป็นไปตามข้อกำหนดของประกาศฯ หรือไม่ จะต้องนำค่าปริมาณวิตามินต่อหน่วยน้ำหนักไปคำนวณเป็นปริมาณค่าต่อหน่วยพลังงานความร้อนที่ให้ต่อไป

ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ วิตามิน ต่อพลังงานความร้อน 100 กิโลแคลอรี่ เป็นค่าที่วิเคราะห์ได้โดยเฉลี่ย โดยการคำนวณ ต่อหน่วยพลังงาน 100 กิโลแคลอรี่

ชนิดวิตามิน (ไมโครกรัม/100 กิโลแคลอรี่)	ปริมาณที่กำหนดในประกาศฯ	นมสูตรทั่วไป	นมสูตรพิเศษ
วิตามิน บี6	45	119.4	141.8
วิตามิน บี12	0.15	0.55	0.79
ไบโอติน	1.5	3.43	5.16
กรดโฟลิค	4.0	23.6	24.78
ไนอาซิน	250	1285.1	1193.0
กรดแพนโทธีนิค	300	548.4	686.5

หมายเหตุ : ค่าที่ได้ต่อหน่วยพลังงานความร้อน 100 กิโลแคลอรี่ ได้จากการคำนวณโดยนำปริมาณวิตามินที่วิเคราะห์ ต่อหน่วยน้ำหนัก 100 กรัม คูณด้วย 100 หารด้วยค่าพลังงานความร้อน

ข้อดีของการใช้วิธีวิเคราะห์โดยจุลินทรีย์นอกจากการที่เป็นวิธีที่นับได้ว่ามีประสิทธิภาพและมีความปลอดภัยพอสมควรซึ่งสามารถจะบอกได้ว่าเป็นวิธีที่ไม่ทำลายสภาวะแวดล้อม ทั้งนี้เพราะ สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์เป็นสารเคมีทั่ว ๆ ไป ไม่มีการใช้สารอินทรีย์ หรือตัวทำละลายที่มีพิษร้ายแรง สารละลายต่าง ๆ ที่เกิดจากการทดลองจะอยู่ในสภาวะเป็นกลางแล้ว เพื่อให้เป็นสภาวะที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ ดังนั้นย่อมไม่เป็นสาเหตุให้สภาวะแวดล้อมเสียได้ และเมื่อการวิเคราะห์เสร็จสิ้นจุลินทรีย์จะถูกทำลายโดยการต้ม เพื่อทำลายจุลินทรีย์ทั้งหมดก่อนทิ้ง

The Association of Vitamin Chemists. **Methods of vitamin assay.** 3rd. ed. New York : Wiley, 1966.

Kutsky, Roman J. **Handbook of vitamins, minerals and hormones.** 2nd. ed. New York : Van Nostrand Reinhold, 1981.

Machlin, Lawrence J. **Handbook of vitamin.** 2 nd ed. New York : Marcel Dekker, 1991.

Merck. **Microbiological determination of vitamins.** Bangkok : Merck, no. date.

กระทรวงสาธารณสุข. กรมอนามัย. **ข้อกำหนดสารอาหารที่ควรได้รับประจำวันและแนวทางการบริโภคสำหรับคนไทย.** กรุงเทพ : องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก, 2532.

..... **ประกาศกระทรวงสาธารณสุข,** ฉบับที่ 156 พ.ศ. 2537. เรื่องนมผงดัดแปลงสำหรับทารกและนมดัดแปลงสูตรต่อเนื่องสำหรับทารกและเด็กเล็ก.

..... **ประกาศกระทรวงสาธารณสุข,** ฉบับที่ 157 พ.ศ. 2537 เรื่องอาหารทารกและอาหารสูตรต่อเนื่องสำหรับทารกและเด็กเล็ก.

จงจิตร อังคทะวานิช. อุมาพร สุทัศน์วรวุฒิ และจุฬาภรณ์ รุ่งพิสุทธิพงษ์. **คู่มือการเลือกใช้นมและอาหารทางการแพทย์ในเด็กและผู้ใหญ่.** กรุงเทพ : Text Journal, 2534.