

## การวิเคราะห์ปริมาณทอรีนในตัวอย่างน้ำนมแปรรูปโดยเทคนิคโครมาโตกราฟี ของเหลวสมรรถนะสูง DETERMINATION OF TAURINE IN PROCESSED MILK SAMPLES BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

รพีพัฒน์ บัวสุวรรณ<sup>1\*</sup> พรพิมล ม่วงไทย<sup>2</sup>  
Rapeepat Buasuwan<sup>1\*</sup>, Pornpimol Muangthai<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Srinakharinwirot University.

<sup>2</sup>คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

<sup>2</sup>Faculty of Science, Srinakharinwirot University.

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

### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์ที่จะทำการศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนด้วยเทคนิค โครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยเตรียมเป็นสารอนุพันธ์ของทอรีน ทั้งนี้ได้ทำการศึกษารายละเอียดเตรียมอนุพันธ์ของทอรีน 2 ชนิด ได้แก่ ออร์โท-ฟทาลัลดีไฮด์และฟลูออเรสคามีน พบว่าออร์โท-ฟทาลัลดีไฮด์ มีความเหมาะสมที่จะใช้ในการเตรียมอนุพันธ์ของทอรีนเพื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงมากกว่า ฟลูออเรสคามีน ซึ่งสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนคือใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.02 โมลาร์ต่ออะซิโตนไตรล์ 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 น้ำนมแปรรูปที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อนสูงกว่านั้นมีปริมาณทอรีนต่ำกว่าน้ำนมที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อนที่น้อยกว่า น้ำนมที่ผ่านกระบวนการแต่งกลิ่นเลียนแบบธรรมชาติมีปริมาณทอรีนต่ำกว่าน้ำนมที่ไม่ผ่านกระบวนการแต่งกลิ่นเลียนแบบธรรมชาติ

คำสำคัญ: ทอรีน ออร์โท-ฟทาลัลดีไฮด์ 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*-phthalaldehyde and fluorescamine were used to react with taurine for detected by fluorescence detector. The result presented that

O-phthalaldehyde was the appropriate substance for derivatise 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  $\mu$ m 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-phthalaldehyde, Fluorescamine, Processed Milk

## บทนำ

ทอรีน (Taurine หรือ 2-aminoethane sulfonic acid) เป็นกรดอะมิโนอิสระที่มีคุณสมบัติเป็นกลางและไม่ใช้หน่วยย่อยของโปรตีน ภายในโครงสร้างของทอรีนมีกำมะถันหรือซัลเฟอร์ (Sulfur) เป็นองค์ประกอบโดยสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมนั้นสามารถสร้างทอรีนได้จากกระบวนการเมตาบอลิซึมโดยมีซิสเตอีน (Cysteine) เป็นสารตั้งต้น และทอรีนจะถูกขับออกทางปัสสาวะ [1] ทอรีนนั้นมีบทบาทสำคัญต่อการเจริญเติบโตของมนุษย์ ดังนั้นเด็กที่มีภาวะขาดทอรีนอาจทำให้เกิดการเจริญเติบโตได้ช้ากว่าปกติและถ้ามีภาวะขาดทอรีนอย่างรุนแรงอาจทำให้เกิดอาการเซื่องซึม ผอมเปลี่ยนสี ตับถูกทำลาย สูญเสียกล้ามเนื้อและไขมันได้ เนื่องจากกระบวนการสังเคราะห์ทอรีนภายในร่างกายนั้นจำเป็นต้องมีวิตามินบี 6 ทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ด้วย ดังนั้นหากร่างกายได้รับวิตามินบี 6 น้อยเกินไปก็สามารถทำให้ร่างกายเสี่ยงต่อการเกิดภาวะขาดทอรีนได้เช่นกัน [2] ทอรีนนั้นมีบทบาทในการทำงานของอวัยวะส่วนต่างๆ ของร่างกาย เช่น สมอง

หัวใจ ตับ กล้ามเนื้อลาย เรตินาและในเลือด ซึ่งหากอวัยวะเหล่านี้มีการทำงานผิดปกตินั้นจะทำให้ผู้ป่วยมีความเสี่ยงต่อการเป็นโรคหลอดเลือดหัวใจตามมา ดังนั้นทอรีนจึงช่วยในการลดความผิดปกติของอวัยวะเหล่านี้และช่วยลดความเสี่ยงต่อการเป็นโรคหลอดเลือดหัวใจอีกด้วย [3]

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

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

เป็นที่ทราบกันดีว่านมมีคุณค่าทางโภชนาการต่อมนุษย์มากมาย ในปัจจุบันผู้คนมีการบริโภคนมมากขึ้น อีกทั้งยังมีผลิตภัณฑ์จากนมหลากหลายชนิดโดยผลิตภัณฑ์เหล่านี้มีการปรุงแต่งเพิ่มรสชาติให้ได้รับความนิยมจากผู้บริโภคและเป็นการเพิ่มทางเลือกให้ผู้บริโภคอีกด้วย นอกจากนี้ในปัจจุบันก็มีรายงานเกี่ยวกับปริมาณทอรีนในนมเช่นกัน [4] โดยงานวิจัยนี้ทำการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนโดยการเตรียมเป็นสารอนุพันธ์ที่แตกต่างกันเพื่อนำไปใช้ในการศึกษาปริมาณทอรีนในตัวอย่างน้ำนมที่ผ่านกระบวนการแปรรูปและการปรุงแต่งรสชาติต่างๆ

### วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อเลือกใช้สารที่เตรียมเป็นสารอนุพันธ์กับทอรีนที่เหมาะสมเพื่อใช้วิเคราะห์ปริมาณด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง
2. เพื่อวิเคราะห์ปริมาณทอรีนในตัวอย่างน้ำนมแปรรูปและน้ำนมแต่งกลิ่น

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### อุปกรณ์และสารเคมี

- สารมาตรฐานทอรีน (tarine) จากบริษัท Sigma
- สารออร์โท - พทาอัลดีไฮด์ (o-phthalaldehyde) จากบริษัท Pickering
- สารฟลูออเรสคามีน (fluorescamine) จากบริษัท Sigma
- ตัวอย่างน้ำนมแปรรูปทั้งหมด 9 ชนิด ได้แก่ นมพาสเจอร์ไรส์รสจืด นมพาสเจอร์ไรส์รสช็อคโกแลต นมพาสเจอร์ไรส์รสสตอเบอร์รี่ นมพาสเจอร์ไรส์รสกล้วย นมยูเอชทีรสจืด นมยูเอชทีรสช็อคโกแลต นมยูเอชทีรสสตอเบอร์รี่ นมยูเอชทีรสหวาน และนมสเตอริไลส์
- เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ที่ใช้ตัวตรวจวัดแบบ fluorescence (รุ่น HP 1100) จากบริษัท Hewlett-Packard โดยใช้คอลัมน์ C18 (5 ไมครอน, 4.6x250 mm) จากบริษัท fortis

- เครื่องฟลูออเรสเซนส์สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ 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-พทาอัลดีไฮด์ (OPA) เตรียมเป็นสารอนุพันธ์

สารมาตรฐานทอรีนเข้มข้น 1000 มิลลิกรัม/ลิตร เตรียมโดยชั่งสารทอรีน 0.10 กรัมละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน เก็บใส่ในขวดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สารละลายออร์โท-พทาอัลดีไฮด์เตรียมโดยการชั่งออร์โท-พทาอัลดีไฮด์มา 0.25 กรัมละลายด้วยเมทานอล 1.0 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 2-เมอร์แคปโตเอทานอล 200 ไมโครลิตร ทำการปรับปริมาตรเป็น 5 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.4 M จากนั้นเตรียมเป็นสารอนุพันธ์ของทอรีนกับออร์โท-พทาอัลดีไฮด์โดยปิเปตต์สารมาตรฐานทอรีน 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองและเติมสารละลายออร์โท-พทาอัลดีไฮด์ 20 ไมโครลิตร จากนั้นทำให้เข้ากันด้วยเครื่องวอร์เท็กซ์และตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงนำไปหาความยาวคลื่นของการกระตุ้น ( $\lambda_{ex}$ ) และความยาวคลื่นของการเปล่งแสง ( $\lambda_{em}$ )

ด้วยเครื่องสเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์เพื่อเก็บค่าความยาวคลื่นของการกระตุ้น ( $\lambda_{ex}$ ) และความยาวคลื่นของการเปล่งแสง ( $\lambda_{em}$ ) 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 : อะซิโตนไตรลอัตราส่วน 65 : 35 (v/v) ให้เป็นระบบที่ 2 ; คอลัมน์ C18 เส้นผ่านศูนย์กลางและความยาว 4.6 x 250 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 5 ไมครอน; อัตราการไหล 0.8 มิลลิลิตร/นาที; ปริมาตรต่อหนึ่งตัวอย่างวิเคราะห์ 20 ไมโครลิตร; ตัวตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ดีเทคเตอร์ใช้ความยาวคลื่นของการกระตุ้นและการเปล่งแสงเท่ากับ 333 และ 451 นาโนเมตร ตามลำดับ

## 1.2 การศึกษาการใช้สารฟลูออเรสคามีน (fluorescamine) เตรียมเป็นสารอนุพันธ์

เตรียมสารมาตรฐานทอรีนตามขั้นตอนที่แสดงไว้ดังหัวข้อ 1.1 จากนั้นเปิดตั้สารละลายมาตรฐานทอรีนเข้มข้น 1000 มิลลิกรัม/ลิตร มา 1 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.025 mM pH 9.2 ต่อมาเตรียมสารละลายฟลูออเรสคามีนโดยการชั่งฟลูออเรสคามีน 0.07 กรัม ละลายในอะซิโตนไตรล และปรับปริมาตรให้ได้ 25 มิลลิลิตร จากนั้นเก็บใส่ขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเตรียมเป็นสารอนุพันธ์ของทอรีนกับฟลูออเรสคามีนโดยผสมสารละลายมาตรฐานทอรีนในบอเรตบัฟเฟอร์ pH 9.2 กับสารละลายฟลูออเรสคามีน อัตราส่วน 2 : 1 ทำการผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องวอร์เท็กซ์และตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำไปหาความยาวคลื่นของ

การกระตุ้น ( $\lambda_{ex}$ ) และความยาวคลื่นของการเปล่งแสง ( $\lambda_{em}$ ) ด้วยเครื่องสเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์เพื่อเก็บค่าความยาวคลื่นของการกระตุ้น ( $\lambda_{ex}$ ) และความยาวคลื่นของการเปล่งแสง ( $\lambda_{em}$ ) เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป ต่อมาทำการสร้างกราฟมาตรฐานด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงโดยใช้สภาวะดังนี้ ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ เป็นสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 2.6 เข้มข้น 0.015 M : อะซิโตนไตรล อัตราส่วน 65 : 35 (V/V) [7] อัตราการไหล 0.6 มิลลิลิตร/นาที ให้เป็นระบบที่ 3 เปรียบเทียบกับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 5.4 เข้มข้น 0.02 M : อะซิโตนไตรลอัตราส่วน 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; ตัวตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ดีเทคเตอร์ใช้ความยาวคลื่นของการกระตุ้นและการเปล่งแสงเท่ากับ 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 ขั้ว จากนั้นสร้างกราฟมาตรฐานจากค่าเฉลี่ยของแต่ละความเข้มข้นโดยการเตรียมเป็นสารอนุพันธ์ที่เหมาะสมที่ได้จากขั้นตอนที่ 1.1 และ 1.2 จากนั้นคำนวณด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแล้วหาค่า LOD และ LOQ โดยใช้การคำนวณ  $3\sigma/S$  และ  $10\sigma/S$  ตามลำดับ เมื่อ  $\sigma$  คือส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และ  $S$  คือค่าความชันที่ได้จากกราฟมาตรฐาน

## 2. วิเคราะห์ปริมาณทอรีนในผลิตภัณฑ์นมที่ผ่านกระบวนการแปรรูปแตกต่างกัน

เก็บตัวอย่างน้ำนมแปรรูป 9 ชนิด แต่ละชนิดนำมาชั่งด้วยเครื่องชั่งละเอียด

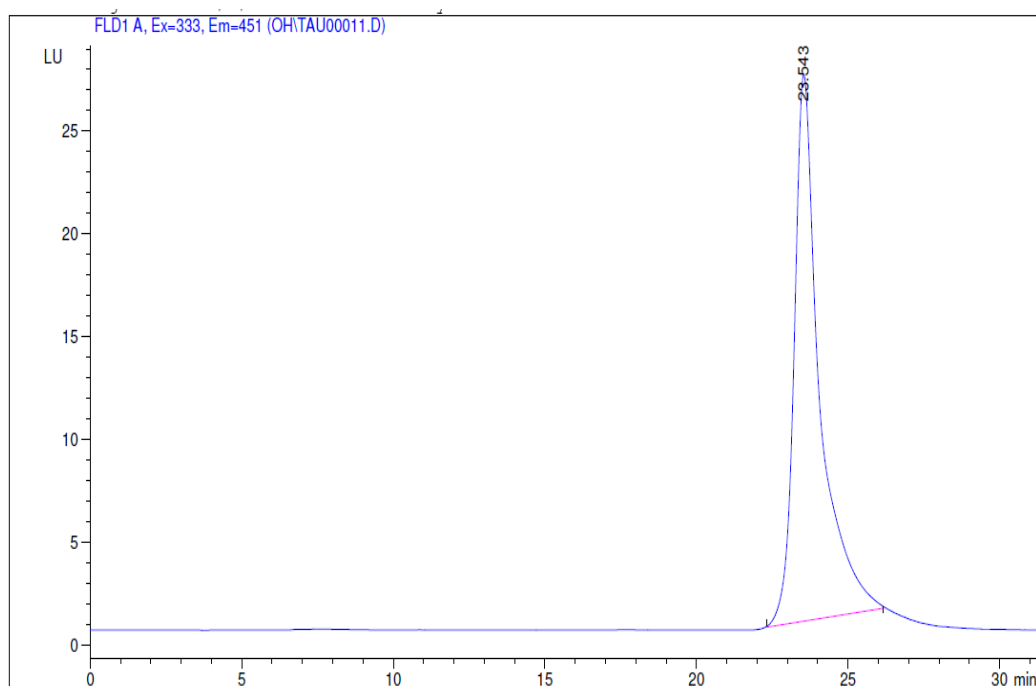
4 ตำแหน่ง ตัวอย่างละ 2.XXXX กรัม นำตัวอย่าง น้ำนมมาตกตะกอนโปรตีนในน้ำนมด้วย 5% กรดไตรคลอโรอะซิติกปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง ที่ความเร็ว 4500 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วเก็บส่วนสารละลายใส 1 มิลลิลิตร กรองผ่าน ไซริงจ์ ด้วยตัวกรองไนลอนขนาด 0.45 ไมครอน จากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณทอรีน ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยทำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ซึ่งตัวอย่างน้ำนมแปรรูป ทั้ง 9 ชนิด ได้แก่

- นมพาสเจอร์ไรส์สดจืดที่มีส่วนประกอบของ น้ำนมโคสด 100 เปอร์เซ็นต์
- นมพาสเจอร์ไรส์รสช็อคโกแลตที่มีส่วนประกอบของนมพว่องมันเนย น้ำตาล และผงโกโก้
- นมพาสเจอร์ไรส์รสสตอเบอรี่ที่มีส่วนประกอบของนมพว่องมันเนย น้ำตาล สารแต่งสี และกลิ่นสังเคราะห์
- นมพาสเจอร์ไรส์รสกล้วยที่มีส่วนประกอบของน้ำนมโค น้ำตาล นมผงขาดมันเนย สารแต่งสี และกลิ่นสังเคราะห์
- นมยูเอชทีรสจืดที่มีส่วนประกอบของ น้ำนมโคสด 100 เปอร์เซ็นต์
- นมยูเอชทีรสช็อคโกแลตที่มีส่วนประกอบของน้ำนมโคสด น้ำตาล ผงโกโก้ และแต่งกลิ่นเลียนแบบธรรมชาติ
- นมยูเอชทีรสสตอเบอรี่ที่มีส่วนประกอบของน้ำนมโคสด น้ำตาล กลิ่นสตอเบอรี่ เลียนแบบธรรมชาติ และเจือสีสังเคราะห์
- นมยูเอชทีรสหวานที่มีส่วนประกอบของ น้ำนมโคสดและน้ำตาล
- นมสเตอริไลส์ที่มีส่วนประกอบของน้ำนมโค 100 เปอร์เซ็นต์

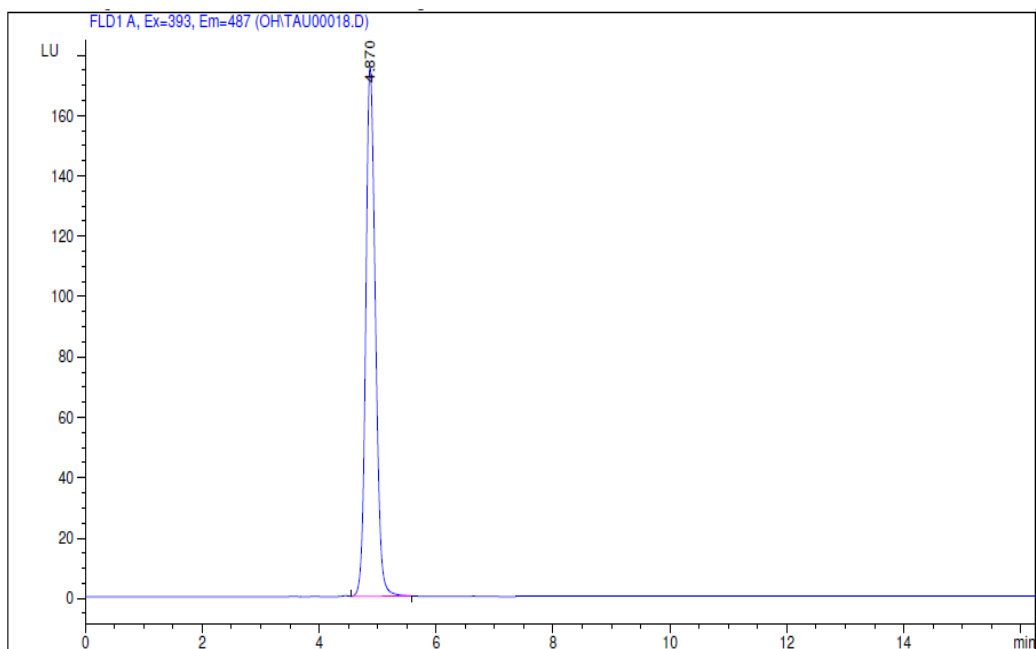
## ผลการวิจัย

จากการทดลองสร้างกราฟมาตรฐาน โดยใช้สารที่ทำอนุพันธ์ คือ ออร์โท-พทาลอัลดีไฮด์โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 5.4 เข้มข้น 0.02 M: เมทานอลอัตราส่วน 60 : 40 (v/v) และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 5.4 เข้มข้น 0.02 M: อะซิโตนไตรอัตราส่วน 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 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานทอรีนที่มีความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร แสดงดังภาพที่ 1 และภาพที่ 2

จากการเปรียบเทียบโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานทอรีนโดยเตรียมเป็นสารอนุพันธ์กับ ออร์โท-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: อะซิโตนไตรอัตราส่วน 65 : 35 (V/V) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่นั้นพบสัญญาณที่เวลา 4.87 นาทีและสัญญาณที่ได้มีลักษณะผอมและสูงกว่าโดยความกว้างของพีคมีค่า 0.18 นาที



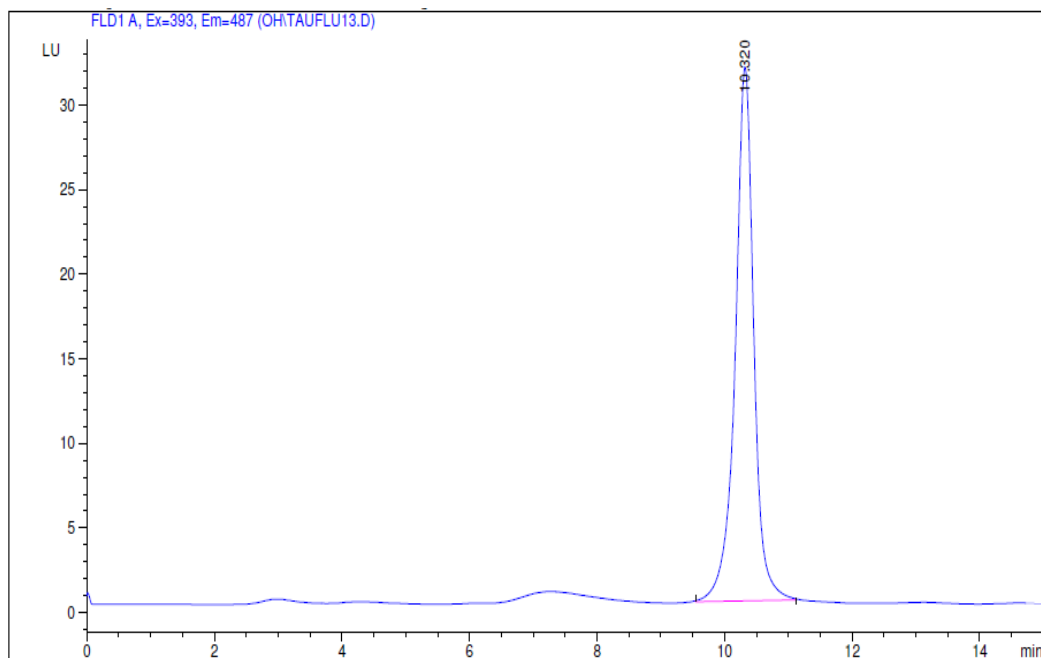
ภาพที่ 1 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานทอรีนเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 5.4 เข้มข้น 0.02 M : เมทานอลอัตราส่วน 60 : 40 (V/V)X



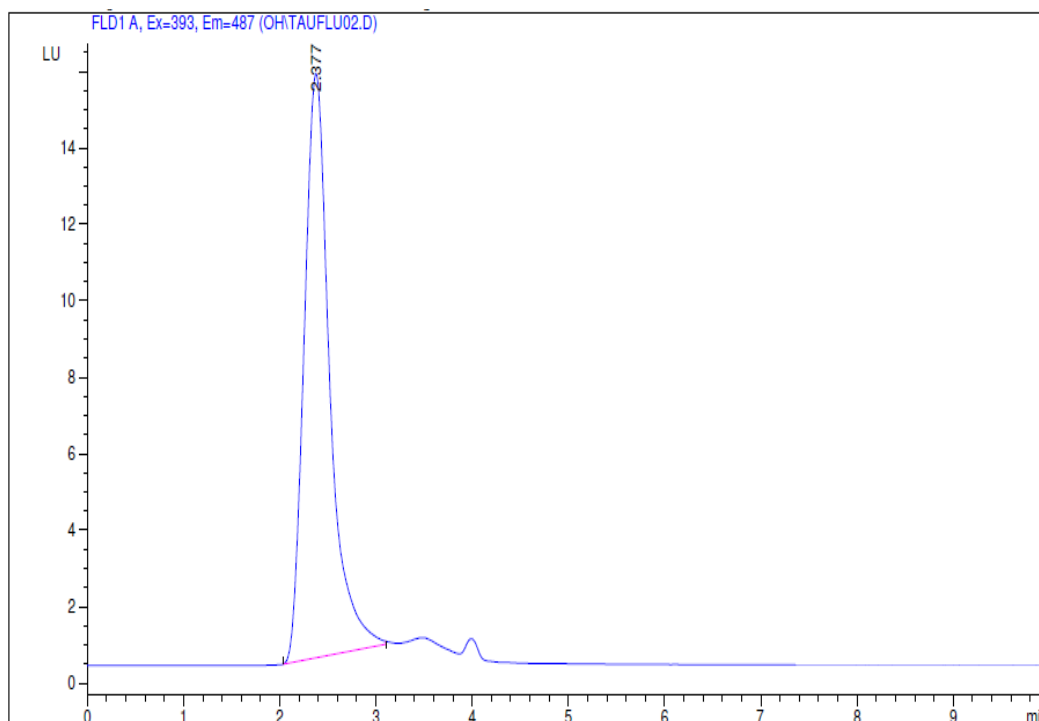
ภาพที่ 2 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานทอรีนเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร วัฏภาคเคลื่อนที่สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 5.4 เข้มข้น 0.02 M: อะซิโตนอัตราส่วน 65 : 35 (V/V)

เมื่อทำการสร้างกราฟมาตรฐานทอรีนโดยใช้สารที่ทำอนุพันธ์คือฟลูออเรสตามีนโดยใช้ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 2.6 เข้มข้น 0.025 M : อะซิโตนไนไตรล์ อัตราส่วน 65 : 35 (V/V) อัตราการไหล 0.6 มิลลิลิตรต่อนาทีและสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 5.4 เข้มข้น 0.02 M : อะซิโตนไนไตรล์อัตราส่วน

65 : 35 (V/V) อัตราการไหล 0.8 มิลลิลิตรต่อ นาทีในช่วงความเข้มข้น 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 : อะซิโตนไนไตรล์ อัตราส่วน 65 : 35 (V/V)



**ภาพที่ 4** โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานทอรีนความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร วิกฤตเคลื่อนที่สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 5.4 เข้มข้น 0.02 M: อะซิโตนไตรลอัตราส่วน 65 : 35 (V/V)

จากภาพที่ 3 จะเห็นได้ว่าโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานทอรีนโดยเตรียมเป็นสารอนุพันธ์กับฟลูออเรสคามิน ที่มีวิกฤตเคลื่อนที่ที่แตกต่างกันนั้นจะเห็นว่าเมื่อใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 2.6 เข้มข้น 0.015 M: อะซิโตนไตรลอัตราส่วน 65 : 35 (V/V) เป็นวิกฤตเคลื่อนที่นั้นพบสัญญาณที่เวลา 10.32 นาที และสัญญาณที่ได้มีความกว้างของพีค 0.30 นาที จากภาพที่ 4 เมื่อใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 5.4 เข้มข้น 0.02 M: อะซิโตนไตรล อัตราส่วน 65 : 35 (V/V) เป็นวิกฤตเคลื่อนที่นั้นพบสัญญาณที่เวลา 2.37 นาที และสัญญาณมีความกว้างของพีค 0.28 นาที

เมื่อเปรียบเทียบผลจากการใช้สารที่เตรียมเป็นสารอนุพันธ์ที่แตกต่างกันระหว่างออร์โท-พทาเลตไดไฮดริด์ และฟลูออเรสคามินนั้นให้ผล

ใกล้เคียงกัน แต่สัญญาณของสารอนุพันธ์ของทอรีนกับออร์โท-พทาเลตไดไฮดริด์จะดีกว่าในแง่ของความไวในการตรวจวัด (Sensitivity) และในแง่ของประสิทธิภาพในการแยกซึ่งดูได้จากความกว้างของพีคที่มีค่าค่อนข้างน้อย อีกทั้งเมื่อพิจารณาปัจจัยอื่นประกอบด้วย เช่น ราคา ปริมาณสารที่ใช้แล้วนั้นออร์โท-พทาเลตไดไฮดริด์เหมาะสมสำหรับการเตรียมสารอนุพันธ์ของทอรีนเพื่อการวิเคราะห์ปริมาณด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟี ของเหลวสมรรถนะสูงมากกว่าฟลูออเรสคามิน ดังนั้นในการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนในตัวอย่างน้ำมันแปรรูปจึงเลือกออร์โท-พทาเลตไดไฮดริด์ ใช้เป็นสารที่เตรียมเป็นสารอนุพันธ์ของทอรีนโดยใช้วิกฤตเคลื่อนที่เป็นสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 5.4 ความเข้มข้น 0.02 M: อะซิโตนไตรลอัตราส่วน 65 : 35 (V/V)



ข้อมูลเปรียบเทียบระหว่างสารที่ใช้เตรียมอนุพันธ์ของทอรีน 2 ชนิดที่สภาวะแตกต่างกันแสดงดังตารางที่ 1

จากตารางที่ 1 แสดงให้เห็นได้ว่าในระบบที่ 2 ซึ่งใช้ออร์โท-พทาลอัลดีไฮด์ เป็นสารที่ทำอนุพันธ์กับทอรีน และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 5.4 เข้มข้น 0.02 M: อะซิโตนไนไตรล์ อัตราส่วน 65 : 35 (v/v) สามารถวิเคราะห์ทอรีน ได้ในช่วงความเข้มข้น 0.1 – 1.0 ppm และให้ค่าของพื้นที่

ใต้พีคที่ความเข้มข้น 1 ppm สูงที่สุดเมื่อเทียบกับระบบอื่นๆ แสดงถึงความไวในการตรวจวัดที่ดี ในแง่ของความเป็นเส้นตรงของสมการที่ได้จากกราฟมาตรฐานนั้น ระบบที่ 4 แสดงค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ที่ต่ำกว่าระบบอื่นและในแง่ของประสิทธิภาพในการแยกนั้นในระบบที่ 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 $\mu$ L          | 20 $\mu$ L           | 100 $\mu$ L          | 100 $\mu$ L          |
| 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

จากการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนในตัวอย่างน้ำมันแปรรูปชนิดต่างๆ นั้นปรากฏว่าในน้ำมันแปรรูปแต่ละชนิดและน้ำมันแปรรูปที่แต่งกลิ่นเลียนแบบธรรมชาติแต่ละชนิดนั้นก็มีปริมาณทอรีนที่แตกต่างกันโดยน้ำมันแปรรูปที่มีปริมาณทอรีนสูงที่สุดคือนมพาสเจอร์ไรส์รสจืดมีปริมาณทอรีนเข้มข้น 16.72 ไมโครกรัม/100 กรัม และน้ำมันแปรรูปที่มีปริมาณทอรีนต่ำที่สุดคือนมยูเอชทีรสช็อคโกแลตซึ่งมีปริมาณทอรีนต่ำกว่า 10 ไมโครกรัม/100 กรัม ปริมาณทอรีนในน้ำมันแปรรูปชนิดต่างๆ นั้นแสดงดังตารางที่ 2 แม้ว่าตอนนี้ยังไม่มียางานที่แน่ชัดว่าปัจจัยที่ส่งผลให้ปริมาณทอรีนในน้ำมันแต่ละชนิดมีความ

แตกต่างกันได้อย่างไรแต่จากรายงานที่ผ่านมาพบว่าน้ำมันสดและน้ำมันที่แปรรูปนั้นมีปริมาณที่แตกต่างกัน [3] อีกทั้งกระบวนการผลิตนมแปรรูปแต่ละชนิดนั้นมีข้อแตกต่างหลายประการ เช่น ส่วนประกอบของปริมาณน้ำมัน ความร้อนที่ใช้ ภาชนะที่ใส่ จุลินทรีย์ที่เหลือหลังกระบวนการผลิตสารเติมแต่งที่ใส่ (สารแต่งกลิ่นเลียนแบบธรรมชาติ) ซึ่งล้วนอาจส่งผลต่อทอรีนในน้ำมันแปรรูปให้มีปริมาณที่แตกต่างกัน

**ตารางที่ 2** แสดงปริมาณทอรีนในน้ำมันแปรรูปชนิดต่างๆ

| ตัวอย่าง                  | ความเข้มข้นทอรีน ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) $n = 3$ |
|---------------------------|--------------------------------------------------------|
| นมพาสเจอร์ไรส์สด          | $16.72 \pm 0.67$                                       |
| นมพาสเจอร์ไรส์รสช็อคโกแลต | $11.80 \pm 0.39$                                       |
| นมพาสเจอร์ไรส์รสสตอเบอรี่ | $13.77 \pm 0.13$                                       |
| นมพาสเจอร์ไรส์รสกล้วย     | $12.71 \pm 0.17$                                       |
| นมยูเอชทีรสจืด            | $12.83 \pm 0.34$                                       |
| นมยูเอชทีรสช็อคโกแลต      | $9.91 \pm 0.50$                                        |
| นมยูเอชทีรสสตอเบอรี่      | $10.67 \pm 0.40$                                       |
| นมยูเอชทีรสหวาน           | $10.92 \pm 0.54$                                       |
| นมสเตอริไลส์              | $11.42 \pm 0.37$                                       |

### สรุปและอภิปรายผล

จากการเปรียบเทียบสารที่ใช้ทำอนุพันธ์กับทอรีนเพื่อวิเคราะห์ปริมาณทอรีนในตัวอย่างน้ำมันแปรรูปด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงนั้นการใช้ออร์โท-พทาลอัลดีไฮด์มีข้อดีกว่าฟลูออเรสคาบินคือมีราคาที่ถูกกว่า สัญญาณที่ได้นั้นให้ความไวในการตรวจวัดมากกว่าซึ่งสามารถตรวจวัดได้ในระดับความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร อีกทั้งยังใช้ปริมาณสารในการทำปฏิกิริยาที่น้อยกว่า ดังนั้นออร์โท-พทาลอัลดีไฮด์จึงมีความเหมาะสมในการใช้เตรียมสารอนุพันธ์ของทอรีนเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนในน้ำมันแปรรูป 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

จากการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนในตัวอย่างน้ำมันแปรรูปแต่ละชนิดนั้นจะเห็นได้ว่าน้ำมัน

แปรรูปที่ผ่านการแต่งกลิ่นชนิดเดียวกันแต่ผ่านกระบวนการให้ความร้อนที่แตกต่างกันนั้นจะมีปริมาณทอรีนที่แตกต่างกันโดยน้ำมันแปรรูปที่ผ่านการให้ความร้อนน้อยกว่าจะมีปริมาณทอรีนที่สูงกว่าน้ำมันแปรรูปที่ผ่านการให้ความร้อนสูงกว่า และเมื่อเปรียบเทียบน้ำมันที่ผ่านการให้ความร้อนแบบเดียวกันแต่มีการแต่งกลิ่นต่างชนิดกันนั้นจะเห็นได้ว่าน้ำมันที่ผ่านการแต่งกลิ่นเลียนแบบธรรมชาตินั้นจะมีปริมาณทอรีนที่ต่ำกว่าน้ำมันที่ไม่มีการแต่งกลิ่นเลียนแบบธรรมชาติ

### กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการทำปริญญานิพนธ์สำหรับนิสิตในระดับบัณฑิตศึกษาคณะวิทยาศาสตร์ 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. *วารสารโภชนาบำบัด*. 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.