เทคนิค LC/MS/MS เพื่อระบุชนิดเจละตินที่ใช้ในอาหารฮาลาล

นางสาวนูรีซัน สามาลูกา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2554
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

THE LC/MS/MS TECHNIQUE FOR IDENTIFICATION OF GELATIN UTILIZED IN HALAL FOOD

Miss Nureesun Samaluka

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of The Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Food Technology

Department of Food Technology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2011

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	เทคนิค LC/MS/MS เพื่อระบุชนิดเจละตินที่ใช้ในอาหารฮาลาล
โดย	นางสาวนูรีซัน สามาลูกา
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รมณี สงวนดีกุล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร.วินัย ดะห์ลัน
	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทิพยเนตร อริยปิติพันธ์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์.ดร.สุเมธ ตันตระเธียร)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์.ดร.รมณี สงวนดีกุล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์.ดร.วินัย ดะห์ลัน)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทิพยเนตร อริยปิติพันธ์)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(นางสาวอรชุดา สิมารักษ์)

นูรีซัน สามาลูกา : เทคนิค LC/MS/MS เพื่อระบุชนิดเจลาตินที่ใช้ในอาหารฮาลาล (THE LC/MS/MS TECHNIQUE FOR IDENTIFICATION OF GELATIN UTILIZED IN HALAL FOOD) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ.ดร.รมณี สงวนดีกุล อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : รศ.ดร.วินัย ดะห์ลัน, ผศ.ดร.ทิพยเนตร อริยปิติพันธ์, 97 หน้า

เจลาตินเป็นโปรตีนที่ได้จากการไฮโดรไลซ์โปรตีนคอลลาเจนด้วยกรดหรือด่าง ซึ่งมักได้จากเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมโดยเฉพาะสุกรและวัว และได้จากปลา เจลาตินที่มาจากสุกรนั้นถือว่าเป็นสิ่งต้องห้ามทางศาสนาอิสลาม ส่วนเจลาตินจากวัวจะต้องได้จากวัตถุดิบที่ผ่านการเชือดถูกต้องตามหลักศาสนาอิสลาม ทำให้เจลาตินปลาได้รับความสนใจมากขึ้นเพื่อทดแทนเจลาตินทั้งสองชนิด ปัจจุบันมีอุตสาหกรรมหลายประเภทที่นิยมใช้เจลาติน โดยเฉพาะอุตสาหกรรมอาหารได้แก่ ผลิตภัณฑ์นม เยลลี่ และผลิตภัณฑ์อาหารเสริม งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการสกัดเจลาตินจากตัวอย่างอาหารและศึกษาความแตกต่างของเจลาตินจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและปลา โดยการพัฒนาวิธีการสกัดเจลาติน จากตัวอย่างอาหารจำลองคือวุ้นเจลาตินสุกร และนมยูเอชทีรสจืดผสมเจลาตินสุกร โดยใช้เอธานอลและกรดอะซิติกในการตกตะกอน ส่วนการศึกษาความแตกต่างของเจลาตินด้วยเทคนิค LC/MS/MS นั้น พบ marker ion ของเจลาตินสุกรเป็น 915 และ 1044 m/z เมื่อทำ ms/ms ของ ion ทั้งสอง พบว่า ion ที่ 915 m/z สามารถแตกตัวได้เป็น 342, 568, 681 และ 897 m/z ส่วน ion ที่ 1044 m/z สามารถแตกตัวได้เป็น 471, 697, 810, 897 และ 1026 m/z จากการนำตะกอนที่สกัดได้ในขั้นตอนแรกมายืนยันด้วยเทคนิค LC/MS/MS พบ marker ion เป็น 915 และ 1044 m/z ที่มีลักษณะเดียวกับเจลาตินที่ไม่ผ่านการสกัด เมื่อนำเทคนิคดังกล่าวมาศึกษา marker ion ของเจลาตินวัวและปลา พบว่า เจลาตินจากวัวมีลักษณะสเปคตรัมที่คล้ายคลึงกับเจลาตินสุกรคือพบ marker ion ที่ 915 และ 1044 m/z แต่มีความเข้มหรือ S/N ratio ต่ำกว่า และพบว่าพีกของโครมาโทแกรมที่ได้ไม่ชัดเจน สำหรับเจลาตินปลานั้นไม่พบ marker ion ดังกล่าว และเมื่อเทคนิคนี้มาวิเคราะห์ตัวอย่างอาหารทางการค้าที่มีส่วนผสมของเจลาติน จำนวน 10 ตัวอย่าง พบว่ามีสเปคตรัมที่คล้ายคลึงกับเจลาตินสุกรและ/หรือวัว จำนวน 8 ตัวอย่าง และพบสเปคตรัมลักษณะเดียวกับเจลาตินปลา จำนวน 2 ตัวอย่าง จากงานวิจัยนี้สรุปได้ว่าสามารถใช้เอธานอลร่วมกับกรดอะซิติกในการตกตะกอนเจลาตินในอาหารทั้งที่มีองค์ประกอบไม่ซับซ้อนและซับซ้อน โดยไม่ทำลายเจลาตินที่สนใจ และจากการศึกษา marker ion ของเจลาตินจากสุกร วัว และปลาด้วยเทคนิค LC/MS/MS สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเจลาตินจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมได้แก่ สุกรและวัว ออกจากเจลาตินปลาได้อย่างชัดเจน

ภาควิชา.....เทคโนโลยีทางอาหาร..... ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา....เทคโนโลยีทางอาหาร..... ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ปีการศึกษา.....2554..... ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5272384423 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY
KEYWORDS : GELATIN / LC/MS/MS / HALAL

NUREESUN SAMALUKA : THE LC/MS/MS TECHNIQUE FOR IDENTIFICATION OF GELATIN UTILIZED IN HALAL FOOD. THESIS ADVISOR : ROMANEE SANGUANDEEKUL Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : WINAI DAHLAN Ph.D., TIPAYANATE ARIYAPITIPUN Ph.D. 97 pp.

Gelatin is a protein derived from hydrolyzed collagen found within mammalian tissues, especially from porcine and bovine. Since porcine-based gelatin are forbidden by the Islamic rules and bovine must be slaugthered by Islamic law, fish gelatin is highly concern as a replacement for mammalian gelatin however, it is still limited in terms of quality and price. Currently, gelatin has been widely used in many industries. Examples of the common uses of gelatin by the food industries are jelly, milk products and food supplement. This study aims to develop a method for extracting gelatin and determine gelatin derived from porcine, bovine and fish using LC/MS/MS. Jellies and UHT plain milk containing gelatin were used as models for developing gelatin extraction method with 95% ethanol and acetic acid. A method was developed to hydrolyse gelatin, followed by detection of the marker ion at 915 m/z and 1044 m/z. Under the ms / ms, the ion at 915 m/z fragmented into 342, 568, 681 and 897 m/z while the ion at 1044 m / z fragmented into 471, 697, 810, 897 and 1026 m/z. The marker ion found for bovine gelatin was 915 and 1044 m / z but the intensity or S / N ratio were lower. However, the marker ion for fish gelatin was not found. This technique has been used to detect 10 samples of food products containing gelatin, 8 samples were found to be similar to porcine or bovine gelatins and 2 samples were similar to fish gelatin. The gelatin in food products can be extracted using absoluted ethanol and acetic acid in this study. The marker ion of the gelatin used in this study can distinguish between the mammalian gelatin namely porcine and bovine from fish gelatin.

Department.....Food Technology.....	Student's Signature……..……
Field of Study.....Food Technology.....	Advisor's Signature……..….....
Academic Year.....2011.....	Co-advisor's Signature……..……
	Co-advisor's Signature……..……

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ด้วยความกรุณาจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รมณี สงวนดีกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก รองศาสตราจารย์ ดร.วินัย ดะห์ลัน และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทิพยเนตร อริยปิติพันธ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่สละเวลาอันมีค่ามาให้คำแนะนำ ให้คำปรึกษาในการแก้ไขปัญหา เทคนิคในการดำเนินงานวิจัย ตลอดจนข้อคิดต่างๆในการทำงาน จึงขอขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้เป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ดร.สุเมธ ตันตระเธียร ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และนางสาวอรชุดา สิมารักษ์ ที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณผศ.ดร.วนิดา นพพรพันธุ์ คณบดีคณะสหเวชศาสตร์ อาจารย์ ดร. สุกฤต ศิริขวัญพงศ์ อาจารย์สาขาโภชนาการและการกำหนดอาหาร และอาจารย์ ดร. ศิริพร แสงสุธรรม อาจารย์ภาควิชาเคมีคลินิกคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้คำแนะนำทางด้านเทคนิคการวิเคราะห์และเทคนิคด้าน LC/MS/MS และให้ความช่วยเหลือตลอดการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้งบประมาณสนับสนุนงานวิจัยและให้ความอนุเคราะห์ในด้านสถานที่ อุปกรณ์ สารเคมีและข้อมูลในการทำวิจัย รวมถึงบุคลากรทุกท่านที่คอยให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจ

ขอขอบคุณพี่ๆเพื่อนๆน้องๆ นิสิตปริญญาโท ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกคนที่คอยให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในการทำวิจัยมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่ให้การสนับสนุน ให้ความช่วยเหลือ ความเข้าใจ และกำลังใจที่มีให้ตลอดมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฌ

สารบัญภาพ..... ฎ

บทที่ 1 บทนำ..... 1

บทที่ 2 วารสารปริทัศน์..... 4

2.1 อุตสาหกรรมฮาลาล.....4

2.2 เจละติน..... 12

2.3 การตกตะกอนเจละติน..... 21

2.4 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford..... 23

2.5 การวิเคราะห์โปรตีนด้วย LC/MS/MS..... 24

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย..... 33

3.1 วัตถุดิบ สารเคมี วัสดุและอุปกรณ์..... 33

3.2 ขั้นตอนดำเนินการวิจัย..... 35

บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง..... 41

4.1 การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC/MS/MS..... 41

4.2 การศึกษาความแตกต่างของเจละตินจากสุกร วัว และปลาด้วยเทคนิค LC/MS/MS..... 50

4.3 การวิเคราะห์เจละตินในตัวอย่างอาหาร..... 57

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ..... 69

5.1 สรุปผลการทดลอง..... 69

5.2 ข้อเสนอแนะ..... 70

รายการอ้างอิง..... 71

ภาคผนวก..... 77

ภาคผนวก ก..... 78

หน้า

ภาคผนวก ข..... 81
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 97

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 สถิติการนำเข้าเจละติน……..…….. 10

2.2 คุณสมบัติของเจละติน Type A และ Type B ……..…… 14

2.3 ปริมาณกรดอะมิโนในเจละตินปลาและเจละตินจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม……. 19

2.4 การเกิดไอออไนเซชันของ Coomassei Briliant Blue G250……..…… 23

3.1 อัตราส่วนที่เหมาะสมของสารละลายเฟสเคลื่อนที่ต่อเวลา……..…. 35

3.2 สัดส่วนนมต่อสารละลายเจละติน (0.1g/mL)……..... 37

3.3 การเจือจางสารละลายเจละตินด้วย Solvent A……..…….…. 38

3.4 การเจือจางสารละลายเจละตินปลาด้วย Solvent A…… 39

4.1 ปริมาณโปรตีนก่อนและหลังการสกัดในวุ้นเจละตินเจละตินด้วยเอธานอล…... 44

4.2 ปริมาณโปรตีนในนมยูเอชทีรสจืดก่อนและหลังการสกัด
ด้วยกรดอะซิติกที่ความเข้มข้นต่างๆกัน……..……..…. 47

4.3 ปริมาณโปรตีนในนมยูเอชทีรสจืดผสมเจละตินก่อนและหลังการตกตะกอน
เจละตินด้วยกรดอะซิติกและเอธานอลที่ความเข้มข้นของเจละตินต่างๆกัน…… 48

4.4 รายละเอียดตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารทางการค้า...……..……..... 63

ก.1.1 สัดส่วนของส่วนประกอบในวุ้นเจละตินสุกรและวัว……..…… 79

ก.1.2 สัดส่วนของส่วนประกอบในวุ้นเจละตินปลา…… 79

ก.1.3 สัดส่วนของ BSA ต่อ น้ำกลั่น…….. 80

ข.1.1 ค่า Signal to noise ratio ที่ 915 m/z ของเจละตินที่ย่อยด้วยกรด 3Mและ6M.. 82

ข.1.2 ค่า Signal to noise ratio ที่ 915 m/z ของเจละตินที่ย่อยด้วยเวลา 30 40
และ 50 นาที…….. 82

ข.1.3 ปริมาณโปรตีนก่อนและหลังการสกัดเจละตินในวุ้นเจละตินวัวด้วยเอธานอล….82

ข.1.4 ปริมาณโปรตีนก่อนและหลังการสกัดเจละตินในวุ้นเจละตินปลาด้วยเอธานอล. 83

ข.1.5 ปริมาณโปรตีนก่อนและหลังการสกัดเจละตินในนมด้วยกรดอะซิติกและ
เอธานอลที่ความเข้มข้นของเจละตินวัวต่างๆกัน…… 84

ข.1.6 ปริมาณโปรตีนก่อนและหลังการสกัดเจละตินในนมด้วยกรดอะซิติกและ
เอธานอลที่ความเข้มข้นของเจละตินปลาต่างๆกัน…….. 84

ข.1.7 ค่า S/N ratio ของเจละตินสุกรและวัวที่ 915.5และ1044.5m/z……..... 86

ตารางที่ **หน้า**

ข.1.8 ค่า S/N ratio ของเจละตินสุกรและวัวที่ ms/ms-915.5m/z..... 87

ข.1.9 ค่า S/N ratio ของเจละตินสุกรและวัวที่ ms/ms-1044.5m/z..... 88

ข.2.0 ผลการวิเคราะห์เจละตินสุกรด้วย LC/MS/MS ที่ความเข้มข้นเจละตินต่างๆกัน..89

ข.2.1 ผลการวิเคราะห์เจละตินวัวด้วย LC/MS/MS ที่ความเข้มข้นเจละตินต่างๆกัน... 90

ข.2.2 รายละเอียดตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารทางการค้า.....96

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 สถิติการนำเข้าเจละติน.....	9
2.2 จำนวนบริษัทและผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของเจลาตินที่มีการขอรับรองฮาลาล...	11
2.3 จำนวนผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของเจลาตินชนิดต่างๆ.....	11
2.4 การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนคอลลาเจนเป็นเจละติน.....	13
2.5 การเกิดเจลของเจละติน.....	16
2.6 โครงสร้างของโปรตีนที่ผิวหน้าระหว่างน้ำกับน้ำมัน.....	17
2.7 (A) MS Spectrum ของเจละตินจากสุกร (B) MS/MS Spectrum ของเจละตินจากสุกร ที่ 1044 m/z (บน) และ Internal std. leucine enkiphalin 556 m/z (ล่าง).....	21
2.8 แหล่งกำเนิดไอออน	27
2.9 แหล่งกำเนิดไอออนแบบ APCI.....	28
2.10 แหล่งกำเนิดไอออนแบบ ESI.....	29
2.11 Desorption of ions from solution.....	29
2.12 Ion trap mass analyzer.....	31
4.1 การเปรียบเทียบโครมาโทแกรม MS ของเจละตินมาตรฐานจากสุกรที่ย่อยด้วย 3M และ 6M HCl.....	42
4.2 โครมาโทแกรมและสเปคตรัมของเจละตินสุกรที่ย่อยด้วย 6M HCl 40 นาที (A)Extracted Chromatogram (บน) และ MS Spectrum (ล่าง (B) Total Chromatogram (บน) และ MS/MSSpectrum (ล่าง).....	42
4.3 การเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของเจละตินมาตรฐานจากสุกรที่ย่อยด้วย 6M HCl เวลา 30 40 และ 50 นาที.....	43
4.4 โครมาโทแกรมและสเปคตรัมของเจละตินสุกร ที่ย่อยด้วย 6M HCl 40 นาที (A) Extracted Chromatogram (บน) และ MS Spectrum (ล่าง (B) Total Chromatogram (บน) และ MS/MS Spectrum (ล่าง).....	43
4.5 การเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของเจละตินมาตรฐานจากสุกรที่สกัดจากวุ้นเจละติน 0.01-0.04g/ml และย่อยด้วย 6M HCl.....	45
4.6 โครมาโทแกรมและสเปคตรัมของวุ้นเจละตินสุกรที่ความเข้มข้น 5%	

ภาพที่ **หน้า**

(A) Extracted Chromatogram (บน) และ MS Spectrum (ล่าง)
(B) Total Chromatogram (บน) และ MS/MS Spectrum (ล่าง)……. 45
4.7 โครมาโทแกรมและสเปคตรัมของวุ้นเจละตินสุกรที่ความเข้มข้น 20%
(A) Extracted Chromatogram (บน) และ MS Spectrum (ล่าง)
(B) Total Chromatogram (บน) และ MS/MS Spectrum (ล่าง) ……. 48
4.8 การเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของเจละตินมาตรฐานจากสุกรที่สกัดจาก
นมสดพาสเจอร์ไรส์ผสมเจละติน 0.00-0.05 g/ml และย่อยด้วย 6M HCl…… 49
4.9 โครมาโทแกรมและสเปคตรัมของนมยูเอชที รสจืด (A) Extracted
Chromatogram (บน) และ MS Spectrum (ล่าง) (B) Total
Chromatogram (บน) และ MS/MS Spectrum (ล่าง)…… 49
4.10โครมาโทแกรมและสเปคตรัมของนมยูเอชทีรสจืดผสมเจละตินสุกรที่ความ
เข้มข้น 0.04g/ml (A) Extracted Chromatogram (บน) และ MS Spectrum
(ล่าง) (B) Total Chromatogram (บน) และ MS/MS Spectrum (ล่าง)…….... 49
4.11 การเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของเจละตินสุกรที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกัน.. 50
4.12โครมาโทแกรมและสเปคตรัมของเจละตินสุกร0.05%
(A) Extracted Chromatogram (บน) และ MS Spectrum (ล่าง)
(B) Total Chromatogram (บน) และ MS/MS Spectrum (ล่าง)…… 51
4.13โครมาโทแกรมและสเปคตรัมของเจละตินสุกร 0.5%
(A) Extracted Chromatogram (บน) และ MS Spectrum (ล่าง)
(B) Total Chromatogram (บน) และ MS/MS Spectrum (ล่าง)…… 51
4.14 การเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของเจละตินวัวที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกัน…. 52
4.15 โครมาโทแกรมและสเปคตรัมของเจละตินวัว 0.3% (A) Extracted
Chromatogram (บน) และ MS Spectrum (ล่าง) (B) Total Chromatogram
(บน) และ MS/MS Spectrum (ล่าง)…….. 53
4.16 โครมาโทแกรมและสเปคตรัมของเจละตินปลา Extracted Chromatogram
(บน) และ MS Spectrum (ล่าง)……..…….. 54
4.17 โครมาโทแกรมและสเปคตรัมของเจละตินผสม (A) Extracted Chromatogram
(บน) และ MS Spectrum (ล่าง) (B) Total Chromatogram (บน) และ MS/MS

ภาพที่ **หน้า**

Spectrum (ล่าง)…….…..…. 54
4.18 การเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของเจละตินสุกร วัว และปลา…… 56
4.19 การเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของเจละตินสุกรและวัวที่ความเข้มข้น 0.5%.... 56
4.20 การเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของเจละตินสุกรและวัวที่ความเข้มข้น 0.05%
และ 0.3% ตามลำดับ…….…… 57
4.21การเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของเจละตินวัวที่สกัดจากวุ้นเจละติน0.01-0.05%58
4.22 โครมาโทแกรมและสเปคตรัมของวุ้นเจละตินวัวที่ความเข้มข้น 0.01g/ml
(A) Extracted Chromatogram (บน) และ MS Spectrum (ล่าง)
(B) Total Chromatogram (บน) และ MS/MS Spectrum (ล่าง)…….…… 58
4.23 โครมาโทแกรมและสเปคตรัมของวุ้นเจละตินสุกรที่ความเข้มข้น 0.04g/ml
(A) Extracted Chromatogram (บน) และ MS Spectrum (ล่าง)
(B) Total Chromatogram (บน) และ MS/MS Spectrum (ล่าง)…… 59
4.24 โครมาโทแกรมและสเปคตรัมของวุ้นเจละตินปลาที่ความเข้มข้น0.01%
(A) Extracted Chromatogram (บน) และ MS Spectrum (ล่าง)
(B) Total Chromatogram (บน) และ MS/MS Spectrum (ล่าง)…….…… 59
4.25 การเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของเจละตินวัวที่สกัดจากนมผสมเจละติน
ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน…….…..…. 60
4.26 โครมาโทแกรมและสเปคตรัมของนมยูเอชที รสจืด (A) Extracted
Chromatogram (บน) และ MS Spectrum (ล่าง (B) Total Chromatogram
(บน) และ MS/MS Spectrum (ล่าง)…….…… 60
4.27โครมาโทแกรมและสเปคตรัมของนมยูเอชทีรสจืดผสมเจละตินวัวที่ความเข้มข้น
0.05g/ml (A) Extracted Chromatogram (บน) และ MS Spectrum (ล่าง)
(B) Total Chromatogram (บน) และ MS/MS Spectrum (ล่าง)…….. 61
4.28 โครมาโทแกรมและสเปคตรัมของนมยูเอชที รสจืด (A) Extracted
Chromatogram (บน) และ MS Spectrum (ล่าง)
(B) Total Chromatogram (บน) และ MS/MS Spectrum (ล่าง)……. 62
4.29โครมาโทแกรมและสเปคตรัมของนมยูเอชทีรสจืดผสมเจละตินปลาที่ความเข้มข้น
0.05g/ml (A) Extracted Chromatogram (บน) และ MS Spectrum (ล่าง)

ภาพที่ **หน้า**

(B) Total Chromatogram (บน) และ MS/MS Spectrum (ล่าง)…….. 62
4.30โครมาโทแกรมและสเปคตรัมของตัวอย่างที่ Sam01 (A) Extracted Chromatogram (บน) และ MS Spectrum (ล่าง)
(B) Total Chromatogram (บน) และ MS/MS Spectrum (ล่าง)…….…. 64
4.31 การเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของเจละตินสุกร วัว กับตัวอย่างที่ Sam01……. 64
4.32โครมาโทแกรมและสเปคตรัมของตัวอย่างที่ Sam02 (A) Extracted Chromatogram (บน) และ MS Spectrum (ล่าง) (B) Total Chromatogram (บน) และ MS/MS Spectrum (ล่าง)……... 65
4.33 การเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของเจละตินสุกร วัว กับตัวอย่างที่ Sam02……. 65
4.34โครมาโทแกรมและสเปคตรัมของตัวอย่างที่ Sam05 (A) Extracted Chromatogram (บน) และ MS Spectrum (ล่าง)
(B) Total Chromatogram (บน) และ MS/MS Spectrum (ล่าง)…….…. 66
4.35 การเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของเจละตินสุกร วัว กับตัวอย่างที่ Sam05….. 66
4.36โครมาโทแกรมและสเปคตรัมของตัวอย่างที่ Sam07 (A) Extracted Chromatogram (บน) และ MS Spectrum (ล่าง)
(B) Total Chromatogram (บน) และ MS/MS Spectrum (ล่าง)…….…. 67
4.37 การเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของเจละตินสุกร วัว กับตัวอย่างที่ Sam07……. 67
4.38โครมาโทแกรมและสเปคตรัมของตัวอย่างที่ Sam10 (A) Extracted Chromatogram (บน) และ MS Spectrum(ล่าง)
(B) Total Chromatogram (บน) และ MS/MS Spectrum (ล่าง)…….…. 68
4.39 การเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของเจละตินสุกร วัว กับตัวอย่างที่ Sam10…... 68
ก.1.1 วุ้นเจละตินปลาที่ความเข้มข้น 5-20% (A) วุ้นเจละตินสุกรที่ความเข้มข้น 5-20% (B) วุ้นเจละตินวัวที่ความเข้มข้น 5-20% (C)..... 79
ข.1.1 ตะกอนเจละตินที่สกัดจากวุ้นเจละตินด้วยเอธานอล…… 83
ข.1.2 สารละลายที่ได้หลังจากตกตะกอนด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น 10,20,30 และ 40% เรียงจากซ้ายไปขวา……..…… 83
ข.1.3 นมผสมเจละตินก่อนเติมกรดอะซิติก…… 85
ข.1.4 ผลหลังจากตกตะกอนด้วยกรดอะซิติกในนมผสมเจละติน…… 85

ภาพที่ **หน้า**

ข.1.5 ตะกอนเจละตินปลาที่ได้หลังจากการตกตะกอนด้วยเอธานอลและ
นำไปทำให้แห้ง..... 85
ข.1.6 ตะกอนเจละตินปลาที่ได้หลังจากการตกตะกอนด้วยเอธานอลและ
นำไปทำให้แห้ง..... 86
ข.1.7โครมาโทแกรมและสเปคตรัมของตัวอย่างที่ Sam03
(A) Extracted Chromatogram (บน) และ MS Spectrum (ล่าง)
(B) Total Chromatogram (บน) และ MS/MS Spectrum (ล่าง)..... 91
ข.1.8 การเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของเจละตินสุกร วัว กับตัวอย่างที่ Sam03.... 91
ข.1.9โครมาโทแกรมและสเปคตรัมของตัวอย่างที่ Sam04
(A) Extracted Chromatogram (บน) และ MS Spectrum (ล่าง)
(B) Total Chromatogram (บน) และ MS/MS Spectrum (ล่าง)..... 92
ข.10 การเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของเจละตินสุกร วัว กับตัวอย่างที่ Sam04..... 92
ข.11โครมาโทแกรมและสเปคตรัมของตัวอย่างที่ Sam06 (A) Extracted
Chromatogram (บน) และ MS Spectrum (ล่าง)
(B) Total Chromatogram (บน) และ MS/MS Spectrum (ล่าง)..... 93
ข.12 การเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของเจละตินสุกร วัว กับตัวอย่างที่ Sam06..... 93
ข.13โครมาโทแกรมและสเปคตรัมของตัวอย่างที่ Sam08
(A) Extracted Chromatogram (บน) และ MS Spectrum (ล่าง)
(B) Total Chromatogram (บน) และ MS/MS Spectrum (ล่าง)..... 94
ข.14 การเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของเจละตินสุกร วัว กับตัวอย่างที่ Sam08..... 94
ข.15โครมาโทแกรมและสเปคตรัมของตัวอย่างที่ Sam09 (A) Extracted
Chromatogram (บน) และ MS Spectrum (ล่าง)
(B) Total Chromatogram (บน) และ MS/MS Spectrum (ล่าง)..... 95
ข.16 การเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของเจละตินสุกร วัว กับตัวอย่างที่ Sam09..... 95

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันอุตสาหกรรมอาหารฮาลาลเป็นที่ต้องการเป็นอย่างมากทั้งในประเทศและต่างประเทศ เพราะฉะนั้นการพัฒนาและยกระดับมาตรฐานอุตสาหกรรมฮาลาลจึงเป็นสิ่งที่สำคัญเพื่อสร้างความเชื่อมั่นและทำให้เกิดการยอมรับผลิตภัณฑ์ การนำวิทยาศาสตร์มาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมฮาลาลจึงเป็นเรื่องสำคัญที่จะป้องกันการปนเปื้อนหะรอมที่มาจากวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์ เนื่องจากวัตถุดิบที่นำมาประกอบอาหารในปัจจุบันนั้น ถูกแปรสภาพไปจากเดิมจนไม่สามารถที่จะมองได้ด้วยตาเปล่าว่ามีต้นกำเนิดมาจากแหล่งใด จึงมีอยู่บ่อยครั้งที่มีการนำเอาวัตถุดิบที่ผิดหลักศาสนาอิสลามมาใช้ในกระบวนการผลิตอาหารด้วยความเข้าใจผิดหรือไม่รู้ เมื่อมีการกำหนดมาตรฐานอาหารต่างๆว่าวัตถุบางชนิดเป็นสิ่งต้องห้าม ซึ่งรวมถึงอนุพันธ์หรือสิ่งที่ผลิตได้จากต้นตอนั้นย่อมเป็นสิ่งต้องห้ามด้วย

เจละตินนับเป็นวัตถุดิบชนิดหนึ่งที่อาจมีปัญหาในการใช้ในอุตสาหกรรมฮาลาล เนื่องจากเจละตินเป็นโปรตีนที่ได้จากการไฮโดรไลซ์โปรตีนคอลลาเจนที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมได้แก่ สุกร วัว เป็นต้น และจากปลา เจละตินที่มาจากสุกรนั้นถือว่าเป็นสิ่งต้องห้ามทางศาสนาอิสลาม ส่วนเจละตินจากวัวจะต้องได้จากวัตถุดิบที่ผ่านการเชือดถูกต้องตามหลักศาสนาอิสลาม ทำให้เจละตินจากปลาได้รับความสนใจมากขึ้นเพื่อทดแทนเจละตินทั้งสองชนิด แต่เจละตินปลามีคุณภาพที่ด้อยกว่าและราคาแพงกว่าจึงต้องเฝ้าระวังการปนเปื้อนเจละตินจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมในเจละตินปลา ปัจจุบันมีอุตสาหกรรมหลายประเภทที่นำเจละตินไปใช้ประโยชน์ ทั้งอุตสาหกรรมอาหาร ยาและเครื่องสำอาง โดยเฉพาะอุตสาหกรรมอาหารที่นิยมนำเจละตินมาใช้ในผลิตภัณฑ์ต่างๆเช่น เยลลี่ ผลิตภัณฑ์นม ผลิตภัณฑ์อาหารเสริม เป็นต้น การใช้กระบวนการทางนิติวิทยาศาสตร์ในการวิเคราะห์เจละตินนั้นมีหลายวิธี ได้แก่ เทคนิคการตกตะกอนด้วย Picric acid (AOAC, 1996) ซึ่งสามารถบอกได้ว่าตัวอย่างมีการปนเปื้อนเจละตินโดยพิจารณาจากผลของความขุ่นและตะกอนที่เกิดขึ้น อีกวิธีหนึ่งเป็นการวิเคราะห์ปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนซึ่งเป็นกรดอะมิโนหลักที่พบในเจละติน (AOAC, 1996) อย่างไรก็ตามทั้งสองเทคนิคนี้ไม่สามารถบอกแหล่งที่มาของเจละตินได้

การศึกษาวิธีการแยกความแตกต่างของเจละตินต่างชนิดกันจึงเป็นเรื่องที่ได้รับความสนใจในปัจจุบันมีหลายเทคนิคที่ได้ศึกษาและพัฒนาขึ้น ไม่ว่าจะเป็นเทคนิคทางเคมีในการวิเคราะห์ด้วยแคลเซียมฟอสเฟต (Hidaka และ Liu, 2003) เทคนิคด้าน Chromatography ซึ่งใช้ HPLC ในการจำแนกชนิดของเจละตินโดยใช้ความแตกต่างของรูปแบบกรดอะมิโนในเจละตินมาตรฐานของหมู วัว และปลา (ซูไบด๊ะ บุระดาเลง และปิยเนตร จันทรสอน, 2548) แต่ผลที่ได้มีระดับ fragmentation ต่ำ อาจทำให้ผลการวิเคราะห์ไม่จำเพาะกับแหล่งที่มาของเจละติน ส่วน Nemati และคณะ (2004) ได้ศึกษาความแตกต่าง โดยใช้ HPLC และวิเคราะห์ต่อด้วย PCA (Principal Component Analysis) จึงสามารถแยกความแตกต่างได้ ซึ่งถือว่าเป็นวิธีที่ยุ่งยากสำหรับจะนำมาวิเคราะห์ต่อในตัวอย่างอาหาร อีกเทคนิคหนึ่งที่สามารถวิเคราะห์ความแตกต่างของเจละตินสุกรและวัวคือ การใช้ FTIR ในการวิเคราะห์ความแตกต่างของสเปคตรัม และวิเคราะห์ต่อด้วย PCA เช่นเดียวกัน (Hashim และคณะ, 2010)

สำหรับเทคนิคด้าน Liquid Chromatography Mass Spectrometer หรือ LC/MS/MS เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์โปรตีน และมีความไวสูง Zhang และคณะ (2009) ได้นำเทคนิคนี้มาวิเคราะห์หา marker peptide ของเจละตินจากสุกร และวัว แต่อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ไม่ได้ศึกษา marker peptide ของเจละตินปลา ซึ่งมีการใช้ในอุตสาหกรรมเช่นกัน และยังได้สรุปอีกว่าอาจต้องศึกษาเพิ่มเติมในเจละตินสุกรและวัวพันธุ์อื่นๆที่มีแหล่งกำเนิดต่างกัน ซึ่งอาจจะยุ่งยากหากต้องมาวิเคราะห์ในตัวอย่างอาหารต่อไป ในขณะที่ Ocana และคณะ (2004) ได้นำเทคนิคด้าน LC/MS/MS มาศึกษาเจละตินสุกรแต่ไม่ได้มีวัตถุประสงค์ในการแยกความแตกต่าง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะนำเทคนิคดังกล่าวมาศึกษาความแตกต่างของเจละตินทั้ง 3 ชนิด คือ สุกร วัว และปลา เพื่อระบุแหล่งที่มาของเจละตินในผลิตภัณฑ์อาหาร

สมมุติฐานงานวิจัย

สามารถสกัดเจละตินจากผลิตภัณฑ์อาหารด้วยเอธานอลและกรดอะซิติก และสามารถแยกความแตกต่างของเจละตินจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมออกจากเจละตินปลาที่ผ่านการย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกโดยใช้เทคนิค LC/MS/MS

วัตถุประสงค์งานวิจัย

1. เพื่อพัฒนาวิธีการสกัดเจละตินจากผลิตภัณฑ์อาหาร
2. เพื่อแยกความแตกต่างของเจละตินจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมออกจากเจละตินปลาด้วยเทคนิค LC/MS/MS
3. เพื่อวิเคราะห์ชนิดเจละตินในผลิตภัณฑ์อาหาร

ขอบเขตงานวิจัย

1. พัฒนาวิธีการสกัดเจละตินจากผลิตภัณฑ์วุ้นเจละตินและผลิตภัณฑ์นม
2. ศึกษาความแตกต่างของเจละตินมาตรฐานจากสุกร วัว และปลา
3. วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์อาหารประเภทวุ้นเจละติน เยลลี่เจละติน และผลิตภัณฑ์นม

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

2.1 อุตสาหกรรมฮาลาล

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความอุดมสมบูรณ์ในด้านทรัพยากรธรรมชาติ ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญต่อผลิตผลทางการเกษตรและอาหาร นำไปสู่การส่งออกสินค้าและบริการสู่ตลาดต่างประเทศและพึ่งพารายได้จากการส่งออกอย่างมากในการขับเคลื่อนเศรษฐกิจของประเทศ ตลาดส่งออกสำคัญของประเทศไทย ได้แก่ สหรัฐอเมริกา สหภาพยุโรป ญี่ปุ่น ผลิตภัณฑ์ส่งออกส่วนใหญ่ยังคงเป็นผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมที่มีมูลค่าเพิ่มให้กับประเทศค่อนข้างต่ำเนื่องจากเป็นอุตสาหกรรมลักษณะรับจ้างผลิตที่คนไทยมิได้เป็นเจ้าของเทคโนโลยี เป็นต้นว่า อุตสาหกรรมยานยนต์ สิ่งทอ ชิ้นส่วนคอมพิวเตอร์ วงจรไฟฟ้า อัญมณี คิดเป็นมูลค่าสูงถึง 78% ในปี พ.ศ.2550 ในขณะที่การส่งออกผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าเพิ่มสูง ได้แก่ ผลิตภัณฑ์จากอุตสาหกรรมอาหารและการเกษตร กลับมีมูลค่าต่ำเพียง 16% โดยมีสัดส่วนลดลงมาอย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลาสิบปีที่ผ่านมา (ศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2554)

เมื่อเกิดวิกฤติร้ายแรงทางเศรษฐกิจในกลุ่มประเทศพัฒนาอย่างสหรัฐอเมริกา ตลาดส่งออกในประเทศพัฒนาเหล่านี้ทั้งในสหรัฐอเมริกา สหภาพยุโรป ญี่ปุ่น ออสเตรเลีย ส่งผลกระทบอย่างกว้างขวางแก่ประเทศที่พึ่งพาการส่งออกไปยังตลาดของประเทศพัฒนาแล้วเหล่านั้น เห็นควรที่ประเทศที่พึ่งพาการส่งออกไปยังประเทศพัฒนาเหล่านี้พึงตั้งรับทางเศรษฐกิจด้วยการขยายตลาดภายในประเทศของตนให้สูงขึ้นและด้วยการแสวงหาตลาดใหม่ ซึ่งตลาดฮาลาลทั้งที่เป็นผลิตภัณฑ์อาหารและมิใช่อาหารนับเป็นตลาดทางเลือกที่ดีที่สุดเนื่องจากโลกมุสลิม ได้รับผลกระทบจากวิกฤติทางเศรษฐกิจครั้งนี้ต่ำที่สุด การมุ่งสู่ตลาดฮาลาลจึงนับเป็นทางออกที่ดีที่สุดสำหรับประเทศไทยในการหลีกเลี่ยงผลกระทบจากวิกฤติเศรษฐกิจครั้งใหม่นี้ (ศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2554)

การที่ประเทศไทยหันหน้ามาสนใจในผลิตภัณฑ์ฮาลาลนั้น ทำให้ลดการพึ่งพาตลาดหลักที่เคยมีอยู่ทั้งตลาดสหรัฐอเมริกา สหภาพยุโรป ญี่ปุ่นและตลาดพัฒนาแล้วอื่นๆ และเป็นการเพิ่มมูลค่าเนื่องจากตลาดฮาลาลของประเทศไทยคือผลิตภัณฑ์ทางอุตสาหกรรมการเกษตรและอาหาร

ซึ่งให้สัดส่วนกำไรสูงเมื่อเทียบกับผลิตภัณฑ์ทางอุตสาหกรรมอื่นๆ หากประเทศไทยมีส่วนแบ่งในตลาดฮาลาลเท่าเทียมกับตลาดอาหารโลกทั้งหมดเช่นที่เป็นอยู่ย่อมหมายความว่าประเทศไทยจะต้องมีส่วนแบ่งในตลาดฮาลาลระหว่างประเทศ 2% ซึ่งเท่ากับว่าประเทศไทยสูญเสียมูลค่าในตลาดอาหารฮาลาลเท่ากับ 2-0.64 = 1.36% คิดเป็นมูลค่าที่หายไปเท่ากับ 3,612.5 ล้านเหรียญสหรัฐ ซึ่งถือเป็นการขาดทุนที่ประเทศไทยมิทันได้คิดเป็นมูลค่ามหาศาล (ศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2554)

สิ่งสำคัญที่ประเทศไทยต้องทำ คือพยายามกู้คืนส่วนแบ่งที่หายไปและเพิ่มพูนส่วนแบ่งในตลาดอาหารฮาลาลโลกให้ได้มากกว่า 2% ที่ประเทศไทยได้จากตลาดทั่วไป การดำเนินการเพื่อให้ได้ตามเป้าประสงค์นี้แม้ทำได้ยากแต่มีความเป็นไปได้ โดยประเทศไทยต้องทำการศึกษาและทำความเข้าใจกับลักษณะของตลาดอาหารฮาลาลให้ได้เสียก่อน คู่แข่งที่ยึดครองตลาดอาหารฮาลาลระหว่างประเทศมูลค่า 265,000 ล้านเหรียญสหรัฐปัจจุบันนี้ ได้แก่ ประเทศมหาอำนาจทางการเกษตรและอุตสาหกรรมการเกษตร ได้แก่ บราซิล ฝรั่งเศส เนเธอร์แลนด์ เยอรมนี สหรัฐอเมริกา ยูเครน ออสเตรเลีย นิวซีแลนด์ อาร์เจนตินา ซึ่งล้วนเป็นประเทศพัฒนาแล้วและกึ่งพัฒนาและมิใช่ประเทศมุสลิมทั้งสิ้น ประเทศเหล่านี้มีมาตรฐานการผลิตอาหารที่สูง ซึ่งเป็นที่ต้องการของตลาดโลกมุสลิมส่วนใหญ่ การเข้าไปแข่งขันในตลาดอาหารฮาลาลจึงน่าเชิญชวนเนื่องจากเป็นตลาดระดับสูงที่ให้ผลกำไรคุ้มค่าและท้าทายเนื่องจากต้องแข่งขันกับประเทศพัฒนาแล้วทั้งหลาย ด้วยเหตุนี้การยกระดับการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารและการเกษตรของประเทศไทยจึงนับเป็นเรื่องจำเป็นและต้องกระทำอย่างเร่งด่วน (ศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2554)

ความปลอดภัยอาหารเป็นประเด็นสำคัญ ในส่วนความปลอดภัยด้านกายภาพที่กำหนดกันอยู่ตามมาตรฐานอาหาร เช่น ปลอดภัยจากอันตรายทางเคมี ชีวภาพและกายภาพ ซึ่งภาคอุตสาหกรรมอาหารดำเนินการกันอยู่ด้วยระบบ Good Manufacturing Practices หรือ GMP ระบบการวิเคราะห์อันตรายและจุดควบคุมวิกฤติหรือ HACCP และระบบอื่นๆ อย่างไรก็ตาม ในกรณีของตลาดอาหารฮาลาลมีความปลอดภัยอีกด้านหนึ่งที่ทางอุตสาหกรรมมักละเลยนั่นคือความปลอดภัยด้านจิตวิญญาน (spiritual safety) อันได้แก่ การปนเปื้อนสิ่งที่ขัดแย้งกับหลักการในศาสนาอิสลาม อันได้แก่ การปนเปื้อนสารจากสัตว์ 9 ประเภทตามมาตรฐานฮาลาลของโคเด็กซ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสุกรและสิ่งมึนเมา หากประสงค์จะเข้าไปแข่งขันในตลาดฮาลาลทั้งที่เป็นอาหาร

และมิใช่อาหาร ผลิตภัณฑ์จากประเทศไทยจำเป็นต้องสร้างความมั่นใจให้แก่ผู้บริโภคว่าปราศจากการปนเปื้อนสิ่งต้องห้ามในทางศาสนาอิสลามเหล่านั้น

การปนเปื้อนดังกล่าวนับวันยิ่งมีความซับซ้อนเนื่องจากอุตสาหกรรมอาหารและสิ่งที่เกี่ยวเนื่องจากอาหารเปลี่ยนสภาพจากต้นกำเนิดเป็นอย่างมาก เครือข่ายการค้าที่ครอบคลุมไปทั่วโลกทำให้การตรวจสอบย้อนกลับถึงต้นกำเนิดมีความยุ่งยากมากขึ้น นอกจากนี้ผู้ประกอบการทางอุตสาหกรรมอาหารส่วนใหญ่มิใช่มุสลิมที่มีความเข้าใจความอ่อนไหวด้านความปลอดภัยทางจิตวิญญานของมุสลิมหรือผู้นับถือศาสนาอิสลาม จำเป็นอย่างยิ่งที่การตรวจสอบด้วยกระบวนการทางวิทยาศาสตร์หรือการใช้ห้องปฏิบัติการทางนิติวิทยาศาสตร์จะต้องเข้าไปมีส่วนร่วม โดยศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สะสมประสบการณ์ด้านงานนิติวิทยาศาสตร์ฮาลาล (Halal forensic laboratory) มาอย่างยาวนาน กระทั่งได้รับการยอมรับจากนานาประเทศว่าเป็นศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาลแห่งแรกในโลก ได้รับรางวัลระดับนานาชาติจากการประชุมฮาลาลโลก ณ ประเทศมาเลเซียเมื่อปี พ.ศ.2549 จากนายกรัฐมนตรีมาเลเซีย และเมื่อปี 2554 ที่ผ่านมา ทางศูนย์ได้รับรางวัลชนะเลิศในงานวิจัยด้านการวางระบบฮาลาลในโรงงานอุตสาหกรรมอาหารทะเลโดยระบบ HAL-Q ที่ศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาลพัฒนาขึ้น ระบบดังกล่าวเป็นระบบบูรณาการระบบฮาลาลสากล เข้ากับระบบมาตรฐานอุตสาหกรรม HACCP ควบคู่กับการตรวจสอบทางนิติวิทยาศาสตร์ฮาลาลและการชำระล้างด้วยดินสบู่ อันเป็นผลงานวิจัยของศูนย์ฯ และได้รับรางวัลด้านการศึกษาพารามิเตอร์ทางห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ที่ใช้ตรวจสอบสัตว์ที่ได้รับการปฏิบัติอย่างขาดมนุษยธรรมก่อนการเชือด แสดงถึงความห่วงใยด้านสวัสดิการสัตว์ของประเทศไทย

อย่างไรก็ตาม แม้ทางศูนย์ฯจะพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการนิติวิทยาศาสตร์ฮาลาลเพื่อตรวจวิเคราะห์สภาพการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ฮาลาลกระทั่งสามารถถ่ายทอดเทคโนโลยีการวิเคราะห์แก่นักวิทยาศาสตร์ของประเทศสมาชิกอาเซียนได้ในการอบรมเมื่อเดือนสิงหาคม 2551 กระทั่งโครงการของศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาลได้รับการยอมรับให้จัดเป็นโครงการของกลุ่มความร่วมมือทางเศรษฐกิจสามฝ่ายอินโดนีเซีย-มาเลเซีย-ประเทศไทย (IMT-GT) จากผลการประชุมระดับรัฐมนตรีของ IMT-GT เมื่อวันที่ 23 ตุลาคม 2551 ในการประชุม ณ เมืองปาเล็มบัง เกาะสุมาตรา อินโดนีเซีย กลับปรากฏว่ายังมีสิ่งปนเปื้อนที่ซับซ้อนอยู่จำนวนหนึ่งที่ไม่สามารถตรวจพิสูจน์ได้ด้วยเทคนิคทางห้องปฏิบัติการนิติวิทยาศาสตร์ฮาลาลระดับปกติอัน

เนื่องมาจากความซับซ้อนในกระบวนการผลิตองค์ประกอบของอาหารตลอดจนการเลือกใช้แหล่งวัตถุดิบ จำเป็นต้องพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ที่ซับซ้อนโดยการใช้เทคโนโลยีการตรวจที่ทันสมัยร่วมกันหลายเทคนิค สิ่งนี้เป็นเหตุผลที่ทำให้ต้องดำเนินงานวิจัยในครั้งนี้ ซึ่งเป็นโครงการที่อยู่ภายใต้ศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล ในหัวข้อเรื่อง “การผสมผสานเทคนิคการวิเคราะห์ด้านโอมิกส์เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนวัตถุต้องห้ามในผลิตภัณฑ์ฮาลาลที่เป็นอาหารและมิใช่อาหารเพื่อการส่งออก” (Combination of Omics Analytical Techniques for Adulteration Inspection of Unpermitted Substances in Halal Food and Non-Food Products for Export) ทั้งนี้เพื่อคงสถานะนำด้านวิทยาศาสตร์ฮาลาลให้คงอยู่กับประเทศไทย อันนับเป็นการสร้างภาพลักษณ์ใหม่ให้แก่ประเทศไทยในการก้าวเข้าสู่การเป็นศูนย์กลางด้านอุตสาหกรรมฮาลาลดังที่ประเทศไทยมุ่งหวังไว้

2.1.1 ฮาลาลตามหลักศาสนาอิสลาม

ฮาลาล เป็นคำในภาษาอาหรับ มีความหมายว่า “อนุมัติ” หรือ “อนุญาต” หมายถึงพระผู้เป็นเจ้าหรืออัลลอฮ์ ซุบบะฮานะฮูวะตะอาลา [อัลลอฮ์ (ซ.บ.)] ทรงอนุมัติให้กระทำได้ หรือนำไปใช้ประโยชน์ได้ หรือหากเป็นอาหารให้บริโภคได้ เป็นการอนุมัติโดยไม่มีข้อจำกัดและเงื่อนไข ผู้ที่มิใช่มุสลิมหรือมิได้นับถือศาสนาอิสลามมักเข้าใจผิดว่าฮาลาลหมายถึงอาหาร ซึ่งเป็นความเข้าใจที่ไม่ถูกต้อง อันที่จริงฮาลาลมีความหมายกว้างขวางกว่านั้น ฮาลาลมีความหมายครอบคลุมตั้งแต่การกระทำ พฤติกรรม การทำงาน การทำธุรกิจ การเงิน การธนาคาร ไปจนถึงเรื่องอุปโภคบริโภค รวมถึงอาหารและเครื่องดื่ม ฮาลาลจึงมิได้จำกัดอยู่เฉพาะเรื่องของอาหาร คำตรงข้ามของฮาลาลคือ “หะรอม” มีความหมายว่า ห้าม หรือไม่อนุมัติให้กระทำหรือไม่ให้บริโภค ฮาลาลจึงเป็นเรื่องของวิถีชีวิตมุสลิม (วินัย ดะห์ลัน ศุภสร ชโยวรรณ และอรชุดา สิมารักษ์, 2542)

นอกเหนือจากความเข้าใจผิดว่าฮาลาลมีความหมายเฉพาะอาหารแล้ว ผู้ที่มิใช่มุสลิมจำนวนไม่น้อยยังเข้าใจผิดว่าอาหารฮาลาลคือ “อาหารมุสลิม” หรืออาหารตามวัฒนธรรมมุสลิม ซึ่งอาหารกลุ่มนี้ที่รู้จักกันมากที่สุดคืออาหารอินเดียและอาหารอาหรับ ความเข้าใจผิดนี้เองมีผลทำให้แนวคิดในเรื่องอาหารฮาลาลแคบลง ส่งผลกระทบต่อการทำธุรกิจการค้ากับมุสลิมหรือโลกอิสลามอย่างมาก มีนักธุรกิจจำนวนไม่น้อยมองข้ามความสำคัญของตลาดอาหารฮาลาลโดยเข้าใจผิดว่าอาหารฮาลาลหมายถึงอาหารตามวัฒนธรรมมุสลิมในเอเชียใต้และตะวันออกกลางทั้งๆที่ในข้อเท็จจริงอาหารเกือบร้อยละ 90 ที่ค้าขายอยู่ในตลาดอาหารโลกไม่มีองค์ประกอบของ

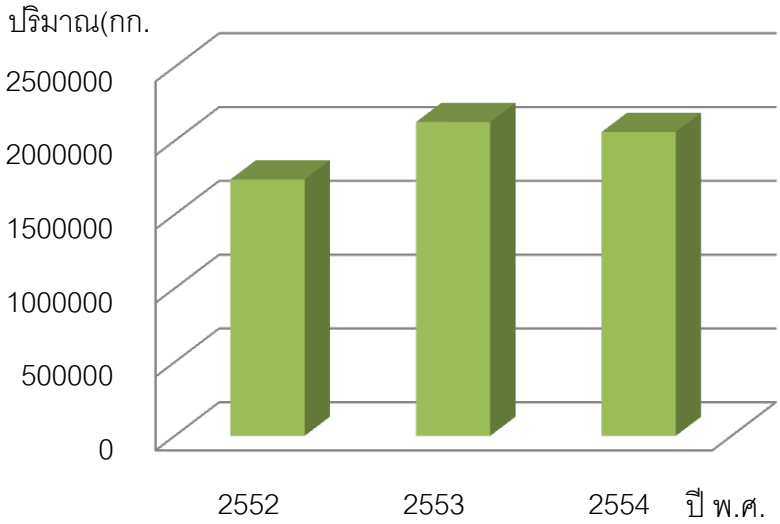
สุกรและเหล้าเจือปน อาหารส่วนใหญ่อาจไม่ปนเปื้อนและมีความเป็นฮาลาลโดยธรรมชาติเสียด้วยซ้ำ (วินัย ดะห์ลัน และคณะ, 2542)

อาหารฮาลาลมิใช่อาหารมุสลิม แต่หมายถึง อาหารที่มุสลิมบริโภคได้ ไม่ว่าจะเป็นอาหารในวัฒนธรรมใด ลักษณะไหน จะเป็นอาหารอเมริกัน อิตาเลียน เกาหลี ญี่ปุ่น จีน ไทย ไม่ว่าจะเป็นก๋วยเตี๋ยว พิซซ่า แฮมเบอร์เกอร์ ซูชิ หากอาหารเหล่านั้นเป็นอาหารที่ไม่มีสิ่งหะรอมปนเปื้อน อาหารนั้นคืออาหารฮาลาลสำหรับมุสลิม ความเข้าใจที่ถูกต้องเช่นนี้ย่อมส่งผลให้ตลาดอาหารฮาลาลกว้างขึ้นอีกมาก ฮาลาลและหะรอมนับเป็นสิ่งสำคัญในวิถีชีวิตของมุสลิมเนื่องจากมุสลิมหรือผู้ที่นับถืออิสลามมิได้คิดว่าอิสลามเป็นเพียงศาสนาหรือสิ่งที่ยึดถือกันในลักษณะพิธีกรรมหรือในทำนองประเพณี วัฒนธรรมแต่ยึดเป็นแนวทางปฏิบัติในชีวิต มุสลิมเชื่อว่าหากกระทำการสิ่งใดที่ฮาลาลซึ่งอัลลอฮ์ (ซ.บ.) ทรงอนุมัติให้ทำได้จะได้รับความโปรดปรานและเป็นผลดีต่อภพหน้า ส่วนการใช้ชีวิตสัมผัสสิ่งหะรอมซึ่งอัลลอฮ์ (ซ.บ.) ทรงห้ามมิให้กระทำ มุสลิมเชื่อว่าผู้ละเมิดจะได้รับความโกรธกริ้วและมิได้รับความโปรดปรานจากอัลลอฮ์ (ซ.บ.) เหตุนี้เองที่ทำให้เรื่องราวของฮาลาล-หะรอม โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเรื่องของอาหารซึ่งเป็นกรณีฮาลาล-หะรอมที่เห็นได้ชัดเจนที่สุดกลายเป็นแนวทางปฏิบัติที่ค่อนข้างเคร่งครัดสำหรับมุสลิมทั่วโลก (วินัย ดะห์ลัน และคณะ, 2542)

ดังนั้น ผู้ที่ประสงค์จะทำธุรกิจหรือประกอบการค้าที่เกี่ยวข้องกับฮาลาล ไม่ว่าจะเป็นการทำธุรกิจภายในประเทศหรือนอกประเทศจึงจำเป็นต้องมีความเข้าใจความหมายของคำว่าฮาลาลอย่างถ่องแท้ให้ได้เสียก่อน อีกทั้งต้องเข้าใจความสำคัญของอาหารฮาลาลที่มีต่อวิถีชีวิตของมุสลิม โดยควรทำความเข้าใจหลักการอิสลามในเรื่องฮาลาลโดยสังเขป หากขาดความเข้าใจแล้ว การผลิตอาหารฮาลาล การทำธุรกิจการค้าฮาลาลอาจไม่ฮาลาลดังหวังหรือเป็นเพียงฮาลาลตามความเข้าใจของตนเองเพียงฝ่ายเดียวแต่ผิดหลักศาสนบัญญัติอิสลาม สิ่งเหล่านี้จะกลายเป็นการละเมิดสิทธิของผู้บริโภคมุสลิมไปได้ โดยเฉพาะอุตสาหกรรมอาหารฮาลาล ที่มาของวัตถุดิบนั้นย่อมเป็นสิ่งที่สำคัญ เจละตินถือเป็นหนึ่งในวัตถุดิบที่ต้องสงสัยและมีปัญหาในอุตสาหกรรมฮาลาล จึงต้องมีการตรวจสอบถึงแหล่งที่มาว่าสามารถใช้ในกระบวนการผลิตอาหารฮาลาลได้ โดยเจละตินส่วนใหญ่จะนำเข้าจากประเทศต่างๆ ที่มีศักยภาพในการผลิต

2.1.2 การนำเข้าเจละติน

จากข้อมูลการนำเข้าเจละตินของกรมศุลกากรพบว่ามีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นและมีปริมาณมากถึงประมาณสองล้านกิโลกรัมต่อปีดังภาพที่ 2.1 ส่วนใหญ่นำเข้าจากประทศจีน รองลงมาประเทศญี่ปุ่น อาร์เจนตินา่ เยอรมัน และไต้หวันตามลำดับ ดังตารางที่ 2.2 จึงนำไปสู่การประยุกต์ใช้เจละตินในผลิตภัณฑ์ต่างๆเพิ่มขึ้นด้วย ดังข้อมูลการขอรับรองฮาลาลจากสำนักงานคณะกรรมการอิสลามประจำกรุงเทพมหานคร ซึ่งนับเป็นจังหวัดที่มีโรงงานมากที่สุดในประเทศไทยนั้น ก็มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจากปี พ.ศ. 2552-2554 ดังภาพที่ 2.2



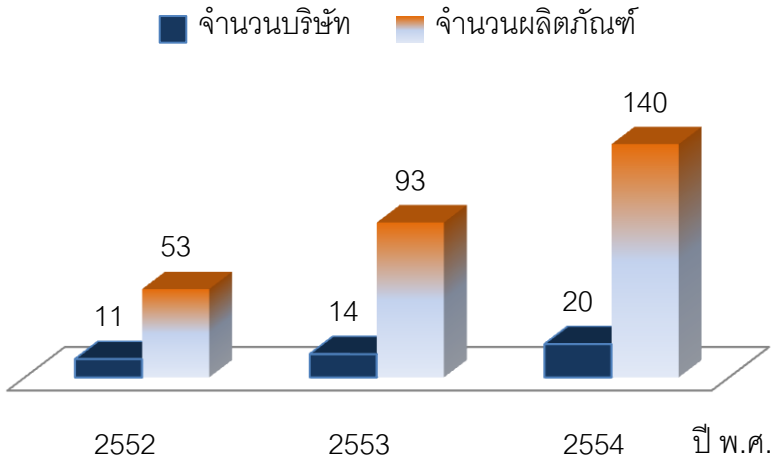
ภาพที่ 2.1 สถิติการนำเข้าเจละติน
ที่มา : รวบรวมข้อมูลจากกรมศุลกากร ปี 2552-2554

สำหรับข้อมูลการนำเข้าเจละตินที่กล่าวมาข้างต้นนั้นเป็นข้อมูลในภาพรวม โดยไม่ได้ระบุชนิดหรือแหล่งที่มาของเจละติน อีกทั้งมีการนำเข้าจากประเทศที่ไม่ใช่ประเทศมุสลิม อาจขาดความเข้าใจในศาสนบัญญัติอิสลาม ส่งผลให้สิ่งต้องห้ามตามศาสนบัญญัติอิสลามจำนวนไม่น้อยหลุดรอดทั้งโดยเจตนาและไม่เจตนาเข้าสู่กระบวนการผลิต เพราะฉะนั้นจึงต้องมีกระบวนการตรวจสอบย้อนกลับว่าเจละตินเหล่านั้นมีที่มาจากแหล่งใด กระบวนการผลิตถูกต้องตามหลักศาสนาอิสลามหรือไม่ งานวิจัยครั้งนี้นับเป็นส่วนหนึ่งที่จะช่วยให้อุตสาหกรรมฮาลาลสามารถตรวจสอบและนำวัตถุดิบที่ไม่ผิดหลักศาสนามาใช้ในกระบวนการผลิตได้

ตารางที่ 2.1 สถิติการนำเข้าเจละติน ประจำปี 2552 – 2554

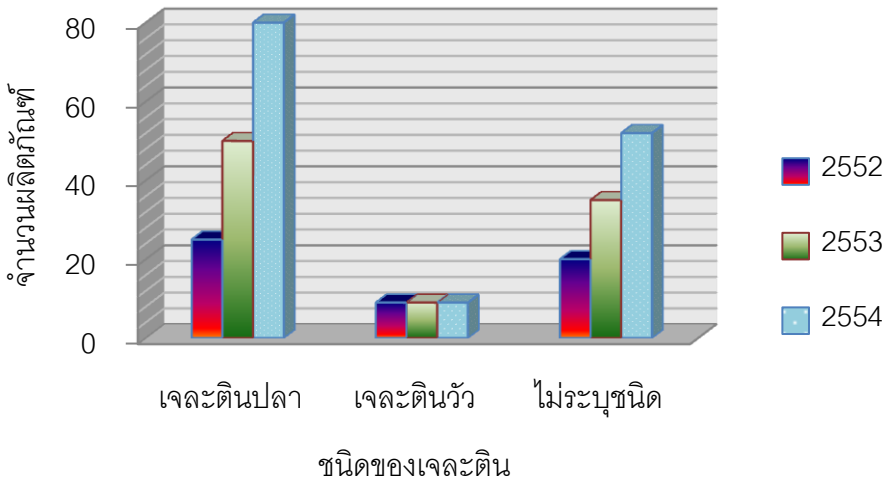
ลำดับที่	ประเทศ	ปริมาณ (กิโลกรัม)			รวม (กิโลกรัม)
		ปี 2552	ปี 2553	ปี 2554	
1	China	560,703	710,520	777,600	2,048,823
2	Japan	286,702	406,456	366,875	1,060,033
3	Argentina	180,000	200,000	290,500	670,500
4	Germany	41,354	194,560	189,793	425,707
5	Taiwan	143,500	120,500	131,800	395,800
6	New Zealand	90,000	147,500	130,000	367,500
7	India	218,000	61,000	36,000	315,000
8	Brazil	0	194,000	72,000	266,000
9	Netherland	120,015	0	0	120,015
10	Hong Kong	21,000	40,000	35,000	96,000
11	Australia	24,000	3,512	11,500	39,012
12	United States	30,200	400	603	31,203
13	Bangladesh	12,000	10,000	0	22,000
14	Malaysia	1,460	20,000	0	21,460
15	South Africa	6,000	8,000	7,000	21,000
16	France	2,025	10,000	540	12,565
17	Korea R.	520	0	6,500	7,020
18	Belgium	0	0	3,000	3,000
19	Switzerland	112	70	6	188
20	Italy	122	0	0	122
21	Sweden	60	0	0	60
รวม (กิโลกรัม)		1,737,773	2,126,518	2,058,717	5,923,008

ที่มา : รวบรวมข้อมูลจากกรมศุลกากร ปี 2552-2554



ภาพที่ 2.2 จำนวนบริษัทและผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของเจละตินที่มีการขอรับรองฮาลาล
ที่มา : รวบรวมข้อมูลจากสำนักงานคณะกรรมการอิสลามประจำจังหวัดกรุงเทพฯ ปี 2552-2554

สำหรับข้อมูลจากสำนักงานคณะกรรมการอิสลามประจำกรุงเทพมหานครเรื่องการขอรับรองฮาลาลผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของเจละตินนั้น ส่วนใหญ่เป็นผลิตภัณฑ์เยลลี่หรือวุ้นเจละตินและผลิตภัณฑ์อาหารเสริม ซึ่งวัตถุดิบที่ใช้จะอยู่ในรูปของคอลลาเจนโดยเฉพาะคอลลาเจนจากปลา และมีการใช้แคปซูลที่มีเจละตินเป็นองค์ประกอบหลัก เมื่อพิจารณาจากแผนภูมิดังภาพที่ 2.3 พบว่าการใช้คอลลาเจนจากปลาเป็นวัตถุดิบนั้นมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น จึงต้องมีการเฝ้าระวังถึงการปนเปื้อนของเจละตินจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเพิ่มขึ้นด้วย



ภาพที่ 2.3 จำนวนผลิตภัณฑ์ที่ใช้เจละตินชนิดต่างๆ
ที่มา : รวบรวมข้อมูลจากสำนักงานคณะกรรมการอิสลามประจำจังหวัดกรุงเทพฯ ปี 2552-2554

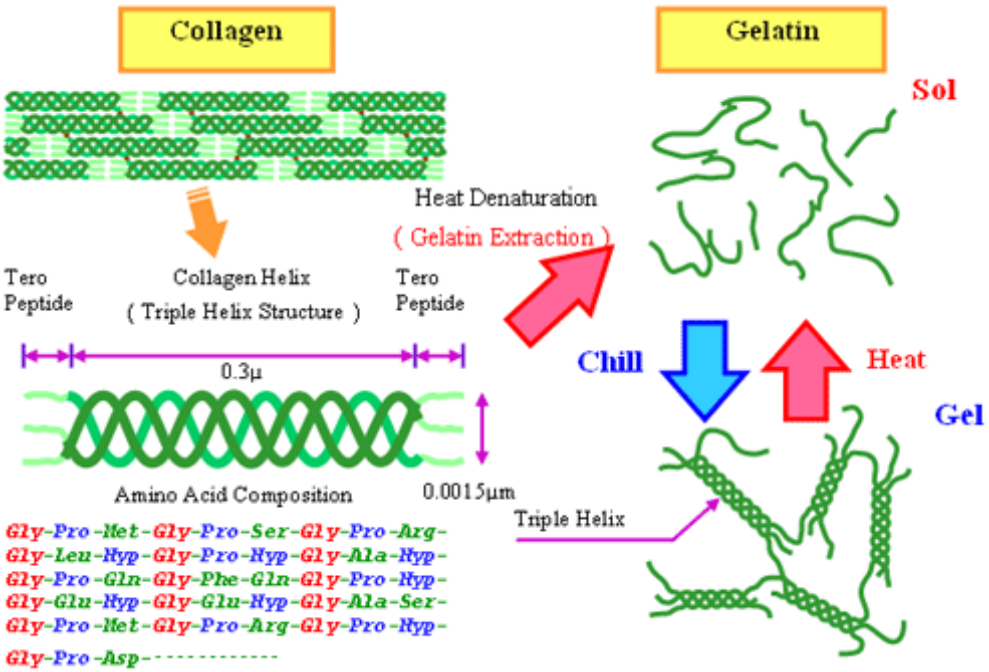
2.2 เจละติน

เจละตินเป็นพอลีเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ได้มาจากการไฮโดรไลซ์คอลลาเจนด้วยความร้อน กรดหรือด่าง (Hoque และคณะ, 2011; Kittiphattanabawon และคณะ 2010; Eysturskaro และคณะ, 2009) สามารถสกัดได้จากกระดูก หนัง และเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น สุกร วัว และจากสัตว์ทะเลประเภทปลา เช่น ปลา cod pallock haddock เป็นต้น (Karim and Bhat,2008) ซึ่งคอลลาเจนเป็นโปรตีนเส้นใยและเป็นโปรตีนโครงสร้างของเนื้อเยื่อต่างๆ ลักษณะการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนใน primary structure เป็นลักษณะพิเศษ จึงทำให้โปรตีนชนิดนี้ไม่ละลายน้ำ องค์ประกอบและโครงสร้างของคอลลาเจนเกิดจากสายพอลิ-เปปไทด์ที่ขดเป็นเกลียว โดยภายในสายพอลิเปปไทด์แต่ละสายจะเกิดจากชุดของกรดอะมิโน $(Gly\text{-}X\text{-}Y)_n$ มาเรียงต่อกันไปเป็นสายพอลิเมอร์ที่ยาวขึ้น โดย Gly คือ ไกลซีน X และ Y ส่วนใหญ่เป็น โพรลีน และ 4-ไฮดรอกซีโพรลีน (วิทวัส มิ่งวานิช, 2007; Khew และ Tong, 2007)

คอลลาเจนมีประมาณ 27 ชนิด แต่ชนิดที่มีปริมาณมากและใช้ในการสกัดเจละติน คือ type I เป็นคอลลาเจนที่พบในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่ประกอบด้วย α1-chain 2 สาย และ α2-chain 1 สาย เกิดเป็น triple-helix (Gomez-Guillen และคณะ, 2011) type II เป็นคอลลาเจนที่พบใน cartilage tissue หรือ กระดูกอ่อน type III เป็นคอลลาเจนที่พบมากในผิวที่มีอายุไม่มาก เมื่ออายุมากขึ้นจะสูญเสียการสร้างคอลลาเจนชนิดนี้ แต่จะเปลี่ยนไปสร้างคอลลาเจน type I แทน ทำให้เกิดความยืดหยุ่นและความตึงของผิว ส่วน type อื่นๆพบได้น้อย (Karim และ Bhat,2009) เจละตินประกอบด้วยกรดอะมิโน ประเภทไกลซีนประมาณร้อยละ 27 โพรลีนและ4-ไฮดรอกซี-โพรลีน ร้อยละ 25 กรดกลูตามิกร้อยละ 10 อาลานินร้อยละ 9 อาร์จีนีนร้อยละ8 กรดแอสพา-ติกร้อยละ6 และอื่นๆอีกร้อยละ 10 โครงสร้างโดยทั่วไปเป็นดังนี้ -Ala-Gly-Pro-Arg-Gly-Glu-4Hyp-Gly-Pro-

ในการไฮโดรไลซ์โปรตีนคอลลาเจนไปเป็นเจละติน โปรตีนเกิดการคลายเกลียวและมีโมเลกุลที่สั้นกว่า ทำให้สามารถละลายน้ำได้ และเจลสามารถเปลี่ยนกลับไปมาได้ด้วยความร้อน (thermo-reversible) ดังภาพที่ 2.4 ส่วนประกอบหลักที่พบในเจละติน คือสายเกลียวของ α-chain (one-polymer chain) , β-chain (two α-chains covalently crosslinked) และ γ-chain (two α-chains covalently crosslinked) (Karim และ Bhat,2009) ซึ่งคอลลาเจนในธรรมชาติจะมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 300 kDa ในทางกลับกันเจละตินจะมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 300

kDa และเมื่อนำมาย่อยต่อเป็นคอลลาเจนไฮโดรไลเสทจะมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 50 kDa (Zhang และคณะ, 2005)



ภาพที่ 2.4 การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนคอลลาเจนเป็นเจละติน
ที่มา:http://images.google.co.th/imgres

เจละตินแบ่งออกเป็น 2 ชนิด ขึ้นกับวิธีการเตรียม ได้แก่

Type A เป็นเจละตินที่สกัดด้วยกรด โดยมักใช้กับวัตถุดิบที่มาจากสุกร และปลา เนื่องจากเป็นแหล่งที่มีการ crosslink ของคอลลาเจนด้วยพันธะโควาเลนท์ที่น้อยกว่า ซึ่งเกิดจากองค์ประกอบและปริมาณของกรดอะมิโนในโปรตีน รวมทั้งลำดับการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนบนสายพอลีเปปไทด์นั้นๆ type A มีค่า pI ประมาณ 7-9 เกิดจากการย่อย แบบ limited hydrolyse ของกรดอะมิโนแอสพาราจีนและกลูตามีน (Cole, 2000)

Type B เป็นเจละตินที่สกัดด้วยด่าง ซึ่งมักใช้กับวัตถุดิบที่มีลำดับการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนบนสายพอลีเปปไทด์ที่มีความซับซ้อนกว่า พบได้ในกระดูกวัวและหนังวัว type B มีค่า pI ประมาณ 4.8-5.2 ซึ่งเกิดจากการย่อยด้วยด่าง ทำให้กรดอะมิโนแอสพาราจีนและกลูตามีน ซึ่งมีหมู่เอไมด์ที่ถูกสลายได้ง่ายในสภาวะที่เป็นด่างหรือที่อุณหภูมิสูง ทำให้เกิดการขจัดหมู่เอไมด์เกิดเป็นกรดแอสพาติกและกรดกลูตามิก (Cole, 2000)

เจละตินทั้ง 2 ชนิดนี้จะมีสมบัติที่แตกต่างกันดังตารางที่ 2.2 โดยเจละตินที่ได้จากกระดูกวัวและหนังวัวจะให้ฟิล์มที่แข็งแรงแต่ค่อนข้างเปราะ ส่วนเจละตินที่ได้จากหนังหมูจะช่วยให้ฟิล์มยืดหยุ่น ดังนั้นการผลิตแคปซูลชนิดแข็งจะใช้เจละตินทั้ง 2 ชนิดนี้ผสมกัน ซึ่งสัดส่วนและน้ำหนักโมเลกุลจะขึ้นอยู่กับชนิดของสารตั้งต้นและวิธีการเตรียม

ตารางที่ 2.2 สมบัติของเจละติน Type A และ Type B

สมบัติ	Type A	Type B
ความชื้น	8-12%	8-12%
พีเอช	3.8-5.5	5.0-7.5
Isoelectric point	7.0-9.0	4.7-5.1
ความแข็งแรงของเจล	50-300 bloom	50-275 bloom
ความหนืด	2.0-7.0 cP	2.0-7.5 cP
เถ้า	0.30%	0.5-2.0%

2.2.1 กระบวนการผลิตเจละติน (ณรงค์ชัย แก้วนาค และคณะ, 2546 ; Baziwane and He, 2003)

การผลิตเจละตินประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

1. การปรับสภาพ (Conditioning) เป็นการนำวัตถุดิบเช่น หนัง กระดูก เป็นต้น มาตัดให้มีขนาดที่เหมาะสม แล้วจึงล้างเพื่อกำจัดส่วนที่เป็นไข น้ำมัน และแร่ธาตุบางส่วนออก ซึ่งจะทำให้ได้คอลลาเจนมีสภาพที่เหมาะสมก่อนที่จะนำไปสกัดเจละติน
2. การสกัด (Extraction) โดยนำวัตถุดิบมาผสมกับน้ำอุ่นที่สะอาดซึ่งต้องควบคุมอุณหภูมิให้เหมาะสม ประมาณ 50-70°C เพื่อให้เจละตินถูกสกัดออกมา
3. การกรอง (Filtration) นำของเหลวที่ได้จากการสกัดมาแยกส่วนที่ยังเป็นกากออก โดยการปั่นแยกอนุภาคขนาดเล็ก ที่ไม่สามารถกรองได้ออกแล้วค่อยนำมากรองแยกอีกครั้งหนึ่ง
4. การทำให้เข้มข้น (Concentration) น้ำส่วนใหญ่จะถูกระเหยไปในขั้นตอนนี้จะทำให้ได้เจละตินในรูปของเหลวที่มีความหนืดสูงสีเหลืองปนน้ำตาล
5. การทำให้แห้ง (Drying) อาจใช้วิธีการอบ หลังจากนั้นอาจทำให้อยู่ในรูปแผ่น หรือนำไปบดต่ออยู่ในรูปผง

2.2.2 สมบัติของเจละติน

เจละตินมีสมบัติเป็น amphoteric คือจะมีประจุบวกเมื่ออยู่ในสารละลายกรดแก่ และจะมีประจุลบเมื่ออยู่ในสารละลายด่างแก่ และสามารถละลายได้ดีในน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 30 องศาเซลเซียส จะไม่ละลายน้ำแต่จะดูดน้ำไว้และพองออก เมื่อนำมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เจละตินจะหลอมเป็นของเหลวหนืด ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ของเหลวจะเซตตัวกลายเป็นเจล นอกจากนี้เจละตินยังสามารถละลายในสารละลายโพลีไฮดริก-แอลกอฮอล์ (polyhydric alcohols) เช่น ซอร์บิทอล (sorbital) โพรพิลีนไกลคอล (propylene glycol) และ กลีเซอรีน (glycerin) เป็นต้น แต่จะไม่ละลายในสารละลายแอลกอฮอล์ (alcohol) และอะซิโตน (acetone) (Cole, 2000)

การเกิดเจล (Gelation) (สุปราณี มนูรักษ์ชินากร วิสาขะ อนันธวัช และทนง เอี่ยวศิริ, 2009)

การเกิดเจลเป็นปรากฏการณ์ที่เกิดจากการเรียงตัวของโปรตีนในสภาวะที่มีแรงดึงดูดและแรงผลักอย่างสมดุล ทำให้เกิดเป็นโครงสร้าง 3 มิติ ซึ่งสามารถยึดจับน้ำไว้ได้จำนวนมาก การเกิดเจลของเจละตินเป็นแบบ translucent เนื่องจากอัตราการเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนเร็วกว่าอัตราการรวมตัวกัน เจลที่ได้มีการจัดเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบ ให้ความแข็งแรงและความยืดหยุ่นเพิ่มมากขึ้น

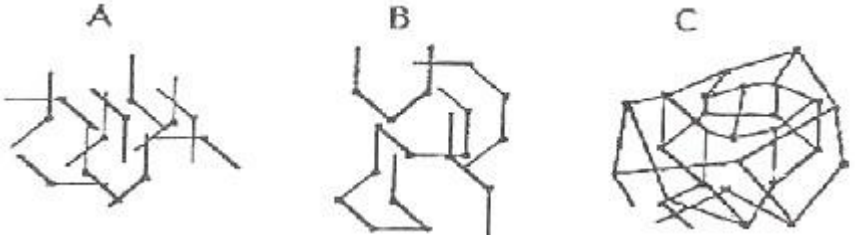
กลไกการเกิดเจล เกิดจากขั้นตอนที่สำคัญ 2 ขั้นตอน คือ

ขั้นตอนที่ 1 การทำให้โปรตีนเกิดการคลายตัว ดังภาพ 2.5A

สามารถทำได้โดยการให้ความร้อน หรือด้วยปัจจัยอื่นๆ เช่น การปรับพีเอช หรือการเติมเกลือ เป็นต้น เมื่อโปรตีนสูญเสียสภาพธรรมชาติ ความหนืดของระบบโปรตีนเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นผลจากการคลายตัวของโมเลกุลร่วมกับการเริ่มจับตัวกันระหว่างโมเลกุลโปรตีนบางส่วนที่คลายตัวออกมา

ขั้นตอนที่ 2 การรวมตัวของสายโปรตีน เกิดเป็นโครงสร้างร่างแห

โปรตีนที่สูญเสียสภาพธรรมชาติหรือโมเลกุลที่คลายตัวอย่างสมบูรณ์แล้ว จะรวมตัวกันและจับกันอย่างช้าๆ ดังภาพ 2.5B ในระหว่างการจับตัว เพื่อเกิดโครงสร้าง 3 มิติ ความหนืดของโปรตีนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและในระยะสุดท้ายระบบของเจลก็จะมีสมบัติที่มีความยืดหยุ่นและมีความแข็งแรง ดังภาพที่ 2.5C



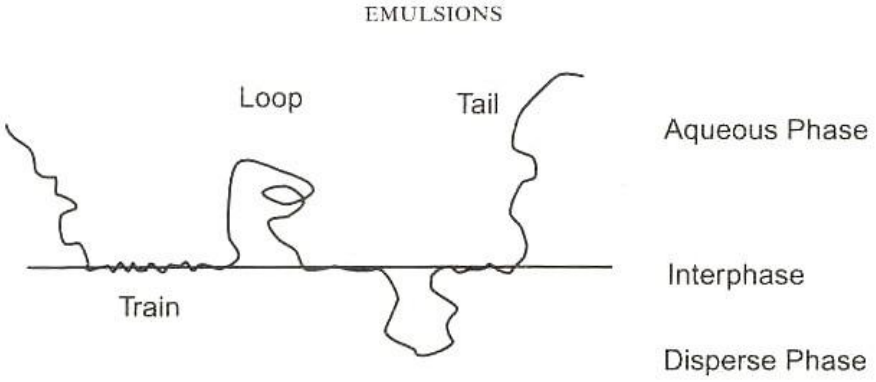
ภาพที่ 2.5 การเกิดเจลของเจละติน
ที่มา : สุปราณี มนูรักษ์ชินากร และคณะ, 2009

ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดเจลและสมบัติของเจล ได้แก่ อุณหภูมิ พีเอช ionic strength เป็นต้น สมบัติที่สำคัญอย่างหนึ่งของเจละตินก็คือเจลสามารถเปลี่ยนกลับไปมาได้ด้วยความร้อน (thermo-reversible) ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ คุณภาพของเจลประเมินได้ โดยวัดความแข็งแรงของเจล (gel strength) ด้วยเครื่อง bloom gelometer ซึ่งเป็นเครื่องมือมาตรฐานสำหรับอุตสาหกรรม โดยทั่วไปแล้วเจละตินจะมีความแข็งแรงประมาณ 50-300 bloom

การเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (Emulsifier)

สมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของเจละติน เป็นการเพิ่มความคงตัวของอาหารประเภทอิมัลชัน สายของโปรตีนจะเกิดการคลายตัวและแทรกตัวไปอยู่ที่ผิวระหว่างอนุภาคของน้ำมันและน้ำ บางส่วนจะเข้าไปดูดซับอยู่บริเวณพื้นผิวของอนุภาคไขมัน ส่งผลให้แรงตึงผิวระหว่างน้ำมันและน้ำลดลง ทำให้การกระจายตัวของอนุภาคของน้ำมันดีขึ้น โดยโครงสร้างของโปรตีนจะป้องกันไม่ให้อนุภาคของน้ำมันเกิดการรวมตัวกันได้

สายโปรตีนบริเวณส่วนหาง (tail) ที่เป็นปลายโมเลกุลด้านหมู่อะมิโนและปลายโมเลกุลด้านหมู่คาร์บอกซิลจะทำหน้าที่กระจายตัวหรือละลายในน้ำ บางส่วนที่เป็นสายที่มีลักษณะเป็นห่วง (loop) จะทำหน้าที่ละลายน้ำและป้องกันไม่ให้อนุภาคของไขมันรวมตัวกัน และส่วนของโปรตีนที่เป็นสายยาว (train) จะทำหน้าที่กระจายตัวหรือละลายในน้ำมัน



ภาพที่ 2.6 โครงสร้างของโปรตีนที่ผิวหน้าระหว่างน้ำกับน้ำมัน
ที่มา : สุปราณี มนูรักษ์ชินากร และคณะ, 2009)

การเกิดโฟม (Foaming)

โครงสร้างของโฟมเป็นระบบคอลลอยด์ ซึ่งประกอบด้วยเฟสของของเหลวและแก๊ซ โดยโปรตีนเจละตินทำหน้าที่เป็นสารลดแรงตึงผิว ช่วยในการเกิดฟอง และรักษาความคงตัวของอากาศที่กระจายอยู่ได้

กลไกในการเกิดฟอง ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน

1. โปรตีนในสารละลายจะเกิดการเคลื่อนที่ไปยังผิวหน้าระหว่างน้ำและอากาศโดยอาศัยกระบวนการแพร่ และ/หรือการพา
2. โปรตีนที่เคลื่อนที่มาจะเกิดการแทรกตัวไปยังระหว่างชั้นของน้ำและอากาศซึ่งจะทำให้ความเข้มข้นที่ผิวหน้าเพิ่มขึ้น แรงตึงผิวลดลง
3. โปรตีนจะเกิดการคลายตัว และเกิดการจัดเรียงตัวใหม่ ให้เกิดเป็นฟิล์มห่อหุ้มอากาศไว้โดยโปรตีนจะหันส่วนที่ชอบน้ำไปยังเฟสของน้ำ และหันส่วนที่ไม่ชอบน้ำไปยังเฟสของอากาศ

นอกจากนี้เจละตินยังสมบัติด้านอื่นๆ เช่น การเกิดฟิล์ม thickening agent และเพิ่มความคงตัวของผลิตภัณฑ์ เป็นต้น

2.2.3 การประยุกต์ใช้เจละติน

สำหรับภาพรวมทางอุตสาหกรรมมีการนำเจละตินมาประยุกต์ใช้เป็นส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์หลายชนิด เช่น เครื่องสำอาง ยา อาหาร ผลิตภัณฑ์อาหารสริม และ Photographic film ในทางเภสัชกรรมจะใช้ เจละตินในการเคลือบเม็ดยาและผลิตเป็นแคปซูลทั้งชนิดแคปซูลแข็งและแคปซูลนิ่มเพื่อใช้บรรจุยา ใช้เป็นสารเพิ่มความหนืดในตำรับยาต่าง ๆ เป็นต้น โดยเฉพาะทางด้านอุตสาหกรรมอาหาร ซึ่งใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารชนิดต่างๆ (Melnichenko และ Klepko, 1992 ; ปาริชาติ ลบแย้ม, 2548) ได้แก่

1. ผลิตภัณฑ์นม - ใช้ในกระบวนการ HTST หรือ UHT นม, นมเปรี้ยว (ใช้ 0.2-0.8%) เนยนิ่ม (soft cheese) เช่น ซาวร์ครีม ครีมชีส คอตเตจชีส ชีสสเปรด (เนยทาขนมปัง) เค้กแช่แข็ง พุดดิ้ง เต้าหู้นมสด คัสตาร์ด มูส ไอศครีม เนยไขมันต่ำ มาการีน (ใช้เจละติน 0.5-3.5%)

2. ขนมหวาน - เยลลี่ เม็ดเยลลี่ มาร์ชแมลโล อาหารเคลือบน้ำตาล เคลือบผิวขนม เค้กแช่แข็ง เคลือบทอฟฟี่(ช็อกโกแลตหรือหมากฝรั่ง) กัมมีแบร์ หมากฝรั่ง ขนมเคี้ยวหนึบ แยม ชีสเค้ก

3. ผลิตภัณฑ์เนื้อ - เนื้อบรรจุกระป๋อง ไส้กรอก เคลือบผิวแฮม อาหารทะเลกระป๋อง

4. อาหารอื่นๆ - ซุป ซอส มายองเนสไขมันต่ำ น้ำสลัด น้ำผลไม้

2.2.4 การเปรียบเทียบเจละตินจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมกับเจละตินปลา

องค์ประกอบของกรดอะมิโนที่แตกต่างกันระหว่างเจละตินจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมกับเจละตินจากปลา ดังตารางที่ 2.3 และน้ำหนักโมเลกุลเจละตินที่ต่างกันนั้นส่งผลให้สมบัติของเจละตินแต่ละชนิดแตกต่างกัน โดยเฉพาะความแข็งแรงของเจลและความคงตัวต่อความร้อน (Gomez-Guillen และคณะ, 2011) เจละตินจากปลาเป็นเจละตินที่มีปริมาณกรดอะมิโนชนิดโพรลีนและไฮดรอกซีโพรลีนต่ำกว่าเจละตินจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเช่น สุกร และวัว เป็นต้น ทำให้อุณหภูมิการเกิดเจลและการหลอมเหลวต่ำกว่า โดยมีอุณหภูมิเท่ากับ 4-5°C และ 12-13°C ตามลำดับ (Karim และ Bhat, 2008) ในขณะที่เจละตินจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอย่างเจละตินสุกรเกิดเจลและการหลอมเหลวที่ 25 °C และ 31°C และเจละตินวัวมีอุณหภูมิการเกิดเจลและการหลอมเหลวที่ 21 °C และ 31°C ตามลำดับ (Boran และ Regenstein, 2010)

ตารางที่ 2.3 ปริมาณกรดอะมิโนในเจละตินปลาและเจละตินจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

Amino acids	Residues/1000 amino acids	
	Fish gelatin	Mammalian gelatin
Ala	112	114
Arg	49	51
Asp	48	45
Cys	–	–
Glu	72	71
Gly	347	313
His	11	5
Hyl	5	11
Hyp	60	86
Ile	11	11
Leu	21	25
Lys	28	34
Met	13	6
Phe	13	13
Pro	96	135
Ser	63	37
Thr	24	18
Try	–	–
Tyr	9	3
Val	18	22

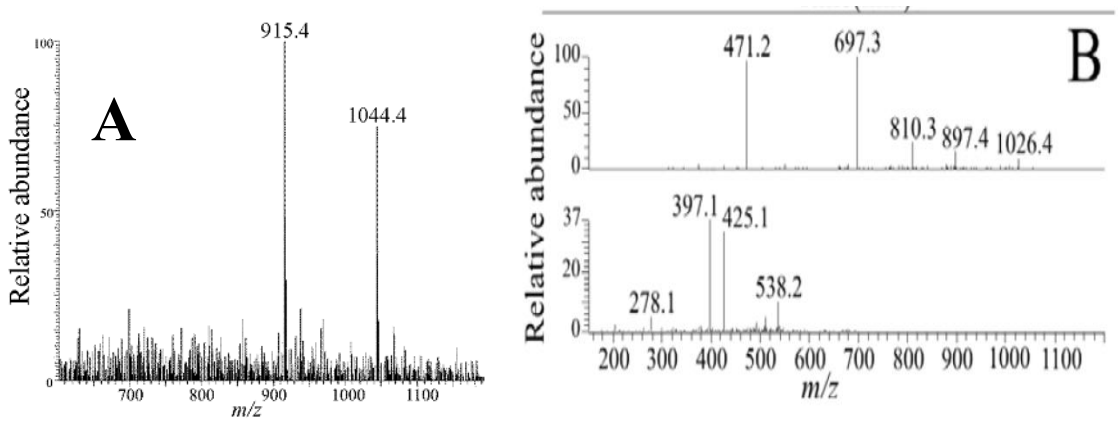
ที่มา : Haug, Draget และ Smidsrod, 2004

เจละตินปลามีสมบัติการเกิดเจลที่อุณหภูมิต่ำทำให้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการการเกิด syneresis ได้ เจละตินปลามีคุณสมบัติการเกิดฟิล์มที่ยอมให้น้ำซึมผ่านได้น้อยกว่าเจละตินจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมได้แก่ สุกร และวัว ทำให้ลดการสูญเสียน้ำได้ เมื่อนำไปประยุกต์ใช้ในอาหารแช่เย็นและแช่แข็ง เนื่องจากเจละตินปลามีปริมาณกรดอะมิโนกลุ่มไม่ชอบน้ำเป็นจำนวนมากและมีปริมาณโพรลีนและไฮดรอกซีโพรลีนต่ำทำให้เกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุลได้น้อยกว่าเจละตินชนิดอื่น (Karim และ Bhat, 2009)

2.2.5 การศึกษาความแตกต่างของเจลาตินจากแหล่งต่าง ๆ

จากรายงานการศึกษาวิธีการแยกความแตกต่างของเจลาตินต่างชนิดกันนั้น ปัจจุบันมีการศึกษาด้วยเทคนิคต่างๆมากมาย ทั้งเทคนิคทางเคมี เช่นการวิเคราะห์ด้วยแคลเซียมฟอสเฟต (Hidaka และ Liu, 2003) เป็นต้น ซึ่งเจลาตินมีความสามารถในการเกิดปฏิกิริยากับแคลเซียมและฟอสเฟตเกิดเป็นตะกอน calcium phosphate precipitation พบว่าที่ความเข้มข้น 0.5 mg/ml และ 2.0 mg/ml จะให้ความแตกต่างของเจลาตินจากวัวและสุกร ตามลำดับ แต่เมื่อนำผลิตภัณฑ์อาหารที่มีเจลาตินมาทดสอบกลับพบว่าไม่สามารถแยกความแตกต่างของเจลาตินได้ ส่วนเทคนิคด้าน Chromatography โดยใช้ HPLC ในการจำแนกชนิดของเจลาตินโดยใช้ความแตกต่างของรูปแบบกรดอะมิโนในเจลาตินมาตรฐานของหมู วัว และปลา ด้วยเทคนิค HPLC พบว่าปริมาณของกรดอะมิโน 6 ชนิด คือ ซีรีน ฮิสทีดีน ไกลซีน อาร์จีนีน อาลานีน และ ฟีนิลอาลานีน สามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นเพื่อการบ่งชี้ชนิดของเจลาติน (ซูไบด๊ะ บุระดาเลง และปิยเนตร จันทรสอน, 2548) แต่ผลที่ได้มีระดับ fragmentation ต่ำ อาจทำให้ผลการวิเคราะห์ไม่จำเพาะกับแหล่งที่มาของเจลาติน ส่วน Nemati และคณะ (2004) ได้มีการศึกษาความแตกต่าง โดยใช้ HPLC และวิเคราะห์ต่อด้วย PCA (Principal Component Analysis) จึงสามารถแยกความแตกต่างได้ ซึ่งถือว่าเป็นวิธีที่ยุ่งยากสำหรับจะนำมาวิเคราะห์ต่อในตัวอย่างอาหาร อีกเทคนิคหนึ่งที่สามารถวิเคราะห์ความแตกต่างของเจลาตินสุกรและวัวคือ FTIR ซึ่งจะมีความแตกต่างที่สเปคตรัมในช่วง 3290-3280 cm^{-1} และ 1660-1200 cm^{-1} และวิเคราะห์ต่อด้วย PCA เช่นเดียวกัน แต่ในการทดลองนี้ยังไม่ได้มีการทำ second derivative ของ FTIR spectrum ซึ่งทำให้ไม่สามารถแยก secondary structure ของเจลาตินที่มาจากสุกรและวัวได้ (Hashim และคณะ , 2010)

สำหรับเทคนิคด้าน Liquid Chromatography Mass Spectrometer หรือ LC/MS/MS เป็นเทคนิคที่เหมาะสมในการวิเคราะห์โปรตีน และมีความไวสูง Zhang และคณะ (2009) ได้นำเทคนิคนี้มาวิเคราะห์หา marker peptide ของเจลาตินจากสุกร และวัว ซึ่งพบว่าความแตกต่างที่ได้เกิดจากการ hydroxylation ของกรดอะมิโน proline ทำให้เปปไทด์ของทั้งสองชนิดมีการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนต่างกัน แต่ต้องศึกษาเพิ่มเติมในเจลาตินสุกรและวัวพันธุ์อื่นๆที่มีแหล่งกำเนิดต่างกัน ซึ่งอาจจะยุ่งยากหากต้องมาวิเคราะห์ในตัวอย่างอาหารต่อไป สำหรับ Ocana และคณะ, (2004) ได้นำเทคนิคด้าน LC/MS/MS มาศึกษา marker ion ของเจลาตินสุกรได้ผลดังภาพที่ 2.7



ภาพที่ 2.7 (A) MS Spectrum ของเจละตินจากสุกร (B) MS/MS Spectrum ของเจละตินจากสุกร ที่ 1044 m/z (บน) และ Internal std. leucine enkiphalin 556 m/z (ล่าง)
ที่มา : Ocana และคณะ, 2004

2.3 การตกตะกอนโปรตีน (Scopes, 1988)

การที่โปรตีนสามารถละลายในน้ำได้เนื่องจากโมเลกุลของโปรตีนมีส่วนที่ชอบน้ำ สามารถเกิดแรงดึงดูดทางไฟฟ้าทำให้โมเลกุลของน้ำมาล้อมรอบโมเลกุลของโปรตีนได้ และบนโมเลกุลของโปรตีนมีประจุไฟฟ้าสุทธิสูงกว่าแรงดึงดูดไฟฟ้าสถิตย์ ทำให้โมเลกุลของโปรตีนอยู่ห่างกัน จึงไม่สามารถรวมตัวเข้ามาอยู่ใกล้กันแล้วตกตะกอนลงมาได้ ดังนั้นปัจจัยใดก็ตามที่สามารถเพิ่มปฏิกิริยาระหว่างโมเลกุลของโปรตีนด้วยกันเอง (protein – protein interaction) หรือการลดปฏิกิริยาระหว่างโมเลกุลของโปรตีนกับน้ำ (protein – water interaction) ทำให้ความสามารถในการละลายน้ำของโปรตีนลดลง โปรตีนตกตะกอนในที่สุด ได้แก่

1. การตกตะกอนที่ค่าจุดไอโซอิเลคทริค (Isoelectric precipitation)
2. การตกตะกอนโปรตีนโดยการเพิ่มความแรงอิออน ด้วยวิธีการตกตะกอนแบบลำดับส่วนด้วยเกลือ (Ionic strength หรือ Salt fraction precipitation)
3. การตกตะกอนด้วยการใช้สารพอลิเมอร์อินทรีย์ (Precipitation by organic polymers)
4. การตกตะกอนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (Organic solvent precipitation)

ในโมเลกุลของโปรตีนมีส่วนเกี่ยวข้องกับการตกตะกอนอยู่ 2 ส่วน คือส่วนที่ชอบน้ำ สามารถเกิดแรงดึงดูดกับน้ำได้ดี (Hydrophilic patches) และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic patches)

1. การตกตะกอนโดยเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช

โปรตีนแต่ละชนิดมีค่าความเป็นกรดด่าง ที่ทำให้สมดุลของประจุสุทธิบนโมเลกุลเป็นศูนย์ เรียกค่านี้ว่าจุดไอโซอิเลคทริค (Isoelectric Point ; pI) เป็นค่าเฉพาะของโปรตีนแต่ละชนิด เมื่อใดก็ตามที่ทำการปรับค่าพีเอชของสารละลายโปรตีนผสมจนกระทั่งมีค่าเท่ากับ pI ของโปรตีนที่ต้องการ การแยกโปรตีนชนิดนั้นจะเกิดการรวมตัวกันแล้วตกตะกอนลงมา เนื่องจากโมเลกุลของโปรตีนนั้นมีประจุสุทธิเป็นศูนย์ จึงไม่มีแรงผลักดันไฟฟ้าสถิตย์ระหว่างโมเลกุลของโปรตีนเอง โปรตีนจึงเข้าใกล้กันมากพอที่จะเกิดการรวมตัวกัน (Aggregation) ตกตะกอนลงมาได้

2. การตกตะกอนโดยอาศัยหลักการเพิ่มค่าความแรงของอิออนโดยใช้เกลือ

การตกตะกอนโปรตีนโดยใช้เกลือที่มีความเข้มข้นสูง เรียกวิธีการนี้ว่า “Salting Out” เป็นการเติมเกลือลงไปในสารละลายโปรตีนในปริมาณมากขึ้น เพื่อเพิ่มความแรงอิออน (ionic strength) ของสารละลายให้สูงขึ้น จนกระทั่งอิออนของเกลือไปแย่งจับโมเลกุลของน้ำที่ล้อมรอบโมเลกุลโปรตีนออกมาล้อมรอบโมเลกุลของเกลือเอง จึงทำให้โปรตีนเกิดการรวมตัวกันและตกตะกอนลงมา โปรตีนแต่ละชนิดจะตกตะกอนที่ความเข้มข้นของเกลือต่างกัน อาจกล่าวได้ว่าเป็นการแข่งขันระหว่างโมเลกุลของโปรตีนและโมเลกุลของเกลือในการเกิดแรงกริยาทางไฟฟ้ากับโมเลกุลของน้ำนั่นเอง เมื่อใดก็ตามที่แรงกระทำระหว่างโมเลกุลของโปรตีนกับน้ำมีค่าเหลือน้อยกว่าแรงกระทำระหว่างโมเลกุลของโปรตีนกับโปรตีน โปรตีนก็จะจับตัวกันตกตะกอนลงมา

3. การใช้สารพอลิเมอร์อินทรีย์

พอลิเมอร์ที่นิยมใช้ ได้แก่ โพลีเอธิลีนไกลคอล (PEG) ซึ่งจัดเป็น non-ionic water-soluble polymer มีขนาดโมเลกุลในช่วง 6,000 และ 20,000 การใช้ PEG อาจมีข้อเสียหากต้องการนำไปแยกต่อด้วย gel filtration chromatography เพราะ PEG จะทำให้โปรตีนที่แยกได้มีมวลโมเลกุลใหญ่กว่าขนาดจริง

4. การตกตะกอนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

ตัวทำละลายอินทรีย์ที่นิยมใช้ เช่น อะซิโตน เอธานอล เป็นต้น จะไปเปลี่ยนแปลงค่าคงที่ไดอิเลคตริค (dielectric constant) ของสารละลายที่มีน้ำเป็นตัวทำละลายลดลง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์มากขึ้นเรื่อยๆ จนถึงจุดที่แรงกระทำระหว่างโมเลกุลของโปรตีนในส่วนของพลังงานไฟฟ้าสถิตย์บนโมเลกุลโปรตีนมีแรงกระทำที่สูงกว่าแรงกระทำระหว่างโปรตีนกับน้ำ เกิดแรงยึดเหนี่ยวประเภท eleltrostatic attraction เกิดการเข้ามารวมตัวกันของโมเลกุลโปรตีนและตกตะกอนลงมาในที่สุด

2.4 **การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี** Bradford (Owusu-Apenten, 2002)

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนมีหลายวิธี ขึ้นกับระดับความถูกต้องและระดับความแม่นยำที่ต้องการ และปัจจัยแทรกซ้อนที่ลดความแม่นยำของวิธีการที่จะเลือกใช้ สำหรับวิธี Bradford นั้นเป็นวิธีที่สามารถวัดได้ละเอียดในระดับ 1-60 µg โดยใช้สารละลาย Coomassie Brilliant Blue G-250 in acidic solution ซึ่งปกติจะมี λ_{max} อยู่ที่ 465 nm แต่เมื่อจับกับโปรตีน จะเปลี่ยน λ_{max} เป็น 595 nm ภายใน 2 นาที สีจะเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีฟ้าดังตารางที่ 2.4 และสีจะคงสภาพไว้ได้เพียง 20 นาที หลังจากนั้นสีจะจางลงอย่างช้าภายใน 20-50 นาที

ตารางที่ 2.4 การเกิดไอออไนเซชันของ Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBBG)

Dye form	Anion ⇄	Neutral ⇄	Cation
Structure	$(CBBG)^{1-}$	$(CBBG)^{0}$	$(CBBG)^{1+}$
Net charge	-1	0	+1
Color	Blue	Green	Red/leuco
λ_{max} (nm)	595	650	470-475
+ve charge	1	2	3
-ve charge	2	2	2
pH	1.8-7	1.6	1.25

ที่มา : Owusu-Apenten, 2002

2.5 **การวิเคราะห์โปรตีนด้วย** Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC/MS/MS)

ลิควิดโครมาโทกราฟีแมสสเปกโทรเมทรี เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลต่อประจุของไอออนหรือของสารตัวอย่างในสภาวะที่เป็นไอออไนซ์ โดยวิธีการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลในสารชีวโมเลกุล เช่น โปรตีน เปปไทด์ เป็นต้น มีความถูกต้องสูงมาก และเทคนิคนี้ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานได้หลาย ๆ ด้าน เช่น

1. งานด้านเทคโนโลยีชีวภาพ (biotechnology) ใช้ในการศึกษาวิเคราะห์โปรตีนและโอลิโกนิวคลีโอไทด์
2. งานทางด้านเภสัชกรรม ใช้ในการศึกษาวิเคราะห์ค้นพบยาใหม่ๆ ศึกษาเภสัชจลนศาสตร์และวิถีเมแทบอลิซึมของยา
3. งานทางการวินิจฉัยโรค ใช้ในการศึกษาโรคทางพันธุกรรม ศึกษาฮีโมโกลบิน
4. งานทางด้านสิ่งแวดล้อม การวัดสารพวกไฮโดรคาร์บอน คุณภาพของน้ำและการปนเปื้อนของอาหาร
5. งานทางด้านสภาพภูมิศาสตร์ เช่น ใช้ในการศึกษาส่วนประกอบของน้ำมัน เป็นต้น

โดยเฉพาะงานทางด้านชีวเคมีพบว่าเครื่องแมสสเปกโทรเมทรี มีประโยชน์อย่างมากในการศึกษาสารชีวโมเลกุลต่างๆ ในสิ่งมีชีวิต โดยที่สามารถบอกคุณภาพของสารที่ใช้ตรวจวิเคราะห์ว่ามีความบริสุทธิ์มากน้อยเพียงใด วิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโนหรือแม้แต่วิเคราะห์การม้วนพับของโปรตีนหรือการมีปฏิสัมพันธ์กันระหว่างโปรตีนหรือเปปไทด์ (สมปอง ธรรมศิริรักษ์, 2550)

LC/MS/MS เป็นเทคนิคเพื่อแยกสารผสมออกจากกันตามสมบัติทางเคมีโดยอาศัยสมดุลระหว่างเฟสคงที่ (stationary phase) และเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีก่อน แล้วทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคสเปกโทรเมทรี ซึ่งการนำเทคนิคโครมาโทกราฟีมาเชื่อมต่อกับเทคนิคแมสสเปกโทรเมทรีจะทำให้สามารถทำการวิเคราะห์ทางปริมาณและคุณภาพไปพร้อมๆกันได้ เนื่องจากจะได้ข้อมูลเกี่ยวกับโครงสร้างของสารโดยอาศัยหลักการทำให้โมเลกุลแตกตัวเป็นไอออนแล้ววิเคราะห์รูปแบบการแตกตัวของสาร ซึ่งมีลักษณะเฉพาะของสารแต่ละชนิด ดังนั้นเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟีแมสสเปกโทรเมทรี จึงเป็นเทคนิคที่มีประโยชน์โดยสามารถทำได้ทั้งปริมาณวิเคราะห์และการพิสูจน์โครงสร้างสารไปได้พร้อมๆกัน นอกจากนั้นข้อดีอีกประการ

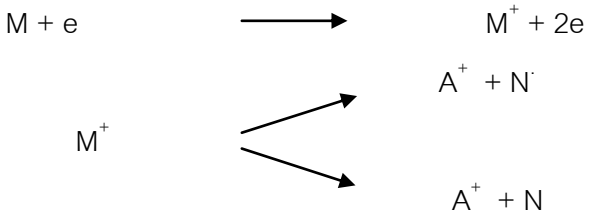
หนึ่งของเทคนิคนี้คือสามารถวิเคราะห์สารปริมาณน้อยได้อย่างมีประสิทธิภาพด้วย (เกศินี ประกอบนา และวรกร พิทยานุกูล, 2547)

2.5.1 Liquid Chromatography

โครมาโทกราฟี เป็นเทคนิคการแยกสารผสมออกจากกันโดยอาศัยสมดุลระหว่างเฟสคงที่ (stationary phase) และเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) โดยมีคอลัมน์ที่บรรจุของแข็งซึ่งเป็นเฟสคงที่แล้วให้เฟสเคลื่อนที่ผ่านเข้าไปชะสารตัวอย่างที่ผ่านเข้าไปในคอลัมน์ออกมา ต่อมาได้มีการพัฒนาเฟสคงที่ให้มีขนาดอนุภาคภายในคอลัมน์เล็กลงเพื่อให้มีประสิทธิภาพในการแยกดีขึ้น สามารถวิเคราะห์สารตัวอย่างที่มีปริมาณน้อยๆ ได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ โดยจะมีเครื่องสูบฉีดของเหลวความดันสูงพาเฟสเคลื่อนที่ให้ผ่านเข้าไปในเฟสคงที่ เพื่อทำให้สารเกิดการแยกแล้วตรวจวัดด้วยเครื่องมือที่เหมาะสม จากนั้นรายงานผลเป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลา (แกนนอน) กับสัญญาณไฟฟ้า (แกนตั้ง) เรียกว่า โครมาโทแกรม

2.5.2 Mass Spectrometry

เมื่อทำให้โมเลกุลของสารเกิดการสูญเสียอิเล็กตรอน โมเลกุลนั้นจะกลายเป็นไอออนและมีประจุบวก (molecular ion, M^+) โมเลกุลที่มีประจุบวกนี้ ถ้ามีพลังงานมากพออาจเกิดการแตกตัวออกเป็นส่วนย่อยๆ (fragment ion) ซึ่งส่วนย่อยๆเหล่านี้อาจเป็นอนุภาคที่เป็นกลาง (neutral) เป็น cation redicle หรือเป็น cation เช่น



ในทำนองเดียวกันถ้าไอออนย่อยยังมีพลังงานมากพอที่จะแตกตัวต่อไป เกิดเป็นไอออนย่อยอันใหม่ต่อไปเรื่อยๆจนในที่สุดเหลือพลังงานน้อยลงจนไม่พอจะแตกตัวต่อไปได้อีก เมื่อพิจารณาจากแมสสเปกตรัม จะบ่งบอกถึงลักษณะการแตกตัวของโมเลกุลไอออน หรือรวมรูปแบบของการแตกตัวของแต่ละไอออนทั้งหมดเข้าด้วยกันจะได้รูปแบบการแตกตัว (fragmentation

pattern) ของโมเลกุล ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของสารประกอบแต่ละชนิด รูปแบบการแตกตัวนี้นอกจากจะขึ้นอยู่กับสารแต่ละชนิดแล้วยังขึ้นกับพลังงานที่ใช้ โครงสร้างของโมเลกุล เวลาระหว่างการเกิดและการตรวจพบไอออนด้วย โดยแมสสเปกโทรมิเตอร์จะเป็นเครื่องมือที่ใช้แยกและวัดมวลของไอออนด้วยการใช้อัตราส่วนมวลต่อประจุ (m/z) โดยทั่วไปไอออนมักจะมีประจุ +1 ดังนั้นค่า m/z จึงมีค่าเท่ากับมวลไอออนโดยตรง โดยที่ระยะเวลาสั้นๆหลังจากเกิดไอออไนเซชันแล้ว จะเห็นไอออนต่างๆเกิดขึ้น ถ้าทราบชนิดและปริมาณของไอออนเหล่านั้นจะสามารถหาความสัมพันธ์ของมันได้ โดยแกน x แสดงค่า m/z และให้แกน Y แสดงปริมาณสัมพัทธ์ (relative abundant) ซึ่งเรียกว่า แมสสเปกตรัม

องค์ประกอบของเครื่องแมสสเปกโทรมิเตอร์ที่ใช้เป็นเครื่องตรวจวัด (เกศินี ประกอบนา และวรกร พิทยานุกูล, 2547) การตรวจวัดมีขั้นตอนคือ การทำให้สารตัวอย่างเป็นไอ จากนั้นทำให้เกิดการแตกตัวเป็นไอออนหรือชิ้นส่วนย่อย ๆ (fragment) ไอออนต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นจะถูกแยกตามขนาดของมวลต่อประจุ (m/z) แล้วตรวจวัดและบันทึกผล เครื่องมือที่จำเป็นในการทำให้เกิดสิ่งเหล่านี้ประกอบด้วยส่วนใหญ่ ๆ 4 ส่วน คือ

1. ระบบการใส่ตัวอย่าง (Sample Introduction)
2. แหล่งผลิตไอออน (Ionization Source)
3. การแยกไอออนหรือส่วนวิเคราะห์มวล (Mass Analyzer)
4. ระบบการตรวจไอออน (Ions Detection)

1. ระบบการใส่ตัวอย่าง (Sample Introduction)

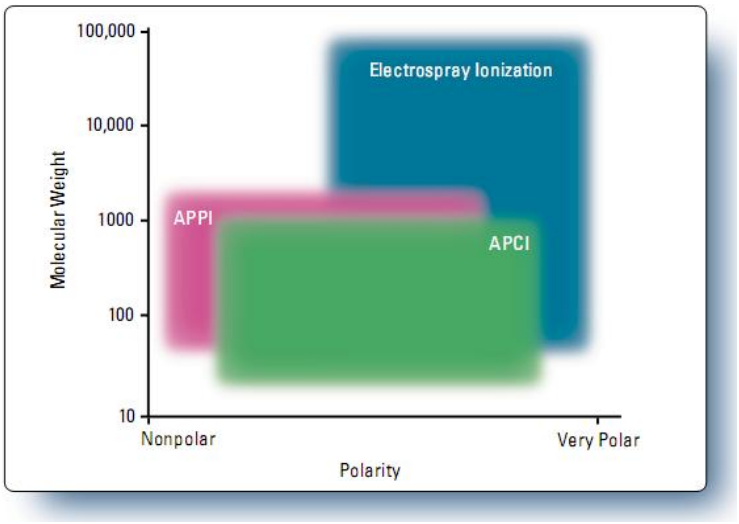
ในที่นี้จะกล่าวถึงเฉพาะระบบแมสสเปกที่ต่อกับเครื่องลิควิดโครมาโทกราฟี ดังนั้นเครื่องลิควิดโครมาโทกราฟี จึงทำหน้าที่เป็น Inlet system นำสารตัวอย่างเข้าสู่ แมสสเปกโทรมิเตอร์

2. แหล่งกำเนิดไอออน (Ionization Source)

แหล่งผลิตไอออนเป็นแหล่งที่ทำให้โมเลกุลของสารตัวอย่างเกิดเป็นไอออน และเกิดการแตกตัว ซึ่งแหล่งนี้ถือได้ว่าเป็นส่วนสำคัญของเครื่องแมสสเปกโทรมิเตอร์ในการเชื่อมต่อการทำงานกับส่วนลิควิดโครมาโทกราฟี เนื่องจากการแยกสารด้วยลิควิดโครมาโทกราฟี เป็นกระบวนการเกิดขึ้นภายใต้สภาวะบรรยากาศทั่วไป แต่กระบวนการทำงานของแมสสเปกโทรมิเตอร์จะเกิดขึ้นภายใต้สภาวะที่เป็นสุญญากาศเท่านั้น ดังนั้นจึงมีระบบเชื่อมต่อระหว่างระบบ

ของลิควิดโครมาโทกราฟีและแมสสเปกโทรมิเตอร์ ซึ่งเรียกว่า Interface ระบบเชื่อมต่อ Interface ทำหน้าที่กำจัดตัวทำละลาย ทำให้สารที่ต้องการทดสอบอยู่ในรูปของประจุ สำหรับระบบ Interfaces ที่รู้จักกันโดยทั่วไป แบ่งเป็น 3 แบบ คือ

1. Atmospheric pressure chemical ionization (APCI)
2. Atmospheric Pressure Photoionization (APPI)
3. Electrospray Ionization (ESI)



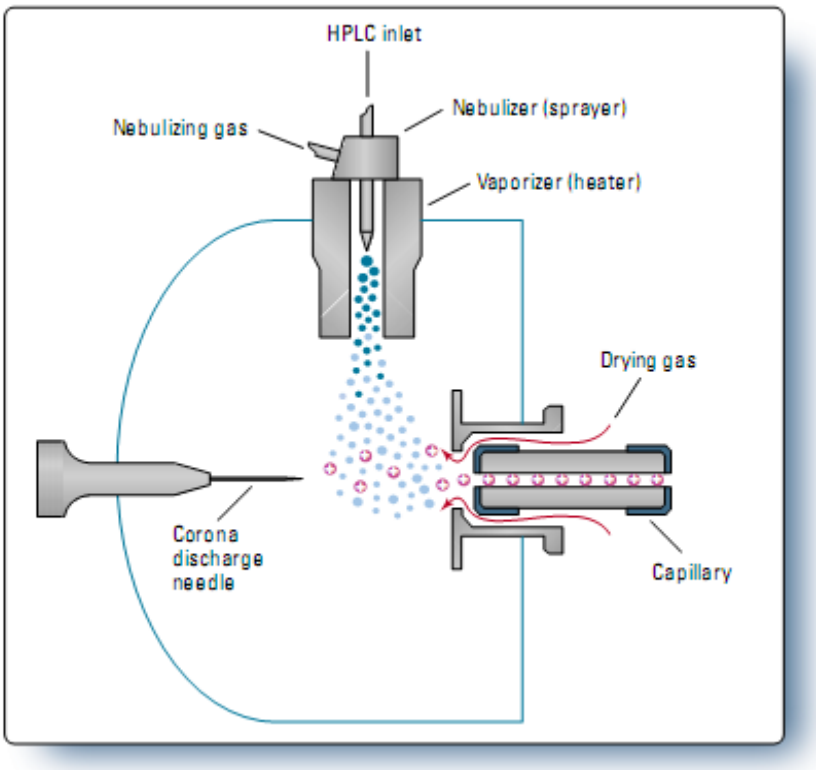
ภาพที่ 2.8 แหล่งกำเนิดไอออน
ที่มา: Basic of LC/MS, Agilent Technologies, 2001

1. Atmospheric pressure chemical ionization (APCI)

เป็นการทำให้สารตัวอย่างเกิดเป็นไอออนในขณะที่สารอยู่ในสภาวะแก๊ส โดยเกิดจากการชนกันระหว่างโมเลกุลของสารกับรีเอเจนท์ไอออน (reagent ion) โดยรีเอเจนท์ไอออนนี้เกิดจากการที่ของเหลวในสารตัวอย่างเกิดเป็นไอออนขึ้นโดยการใช้เข็มที่มีศักย์ไฟฟ้าพลังงานสูงซึ่งอาจจะให้ศักย์ไฟฟ้าเป็นบวกหรือลบก็ได้ขึ้นกับความเหมาะสมในการตรวจวัด โดยจะมีการใช้ความร้อนในการระเหยตัวทำละลายออกจากสารตัวอย่างเพื่อช่วยให้สารเกิดเป็นไอออนในสภาวะแก๊ส จากนั้นไอออนของสารตัวอย่างจะถูกส่งผ่านไปยังช่องแคบเล็กๆ (skimmer) ที่มีการใช้แก๊ส

ไนโตรเจนช่วยพ่นตัวทำละลาย ไอออนขนาดใหญ่และโมเลกุลที่เป็นกลางออกไป เป็นการจำกัดปริมาณแก๊สที่จะเข้าสู่ส่วนต่อไปทำให้ช่วยรักษาความเป็นสุญญากาศของเครื่องได้

ลักษณะของการทำให้เกิดเป็นไอออนด้วยเทคนิค APCI (ดังภาพที่ 2.8)จะได้ข้อมูลเกี่ยวกับมวลโมเลกุลของสารเนื่องจากเป็น soft ionization technique เหมาะกับสารตัวอย่างที่ค่อนข้างไม่มีขั้ว และสามารถใช้กับเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟีที่มี flow rate สูงถึง 1ml/min ได้



ภาพที่ 2.9 แหล่งกำเนิดไอออนแบบ APCI

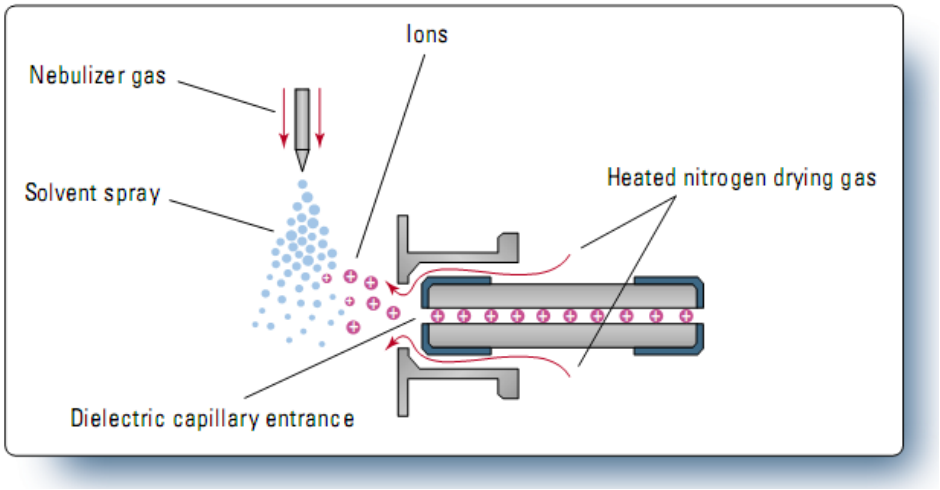
ที่มา: Basic of LC/MS, Agilent Technologies, 2001

2. Atmospheric Pressure Photoionization (APPI)

การทำให้สารเกิดเป็นไอออนในสภาวะความดันบรรยากาศ จะทำให้โมเลกุลของสารได้รับพลังงานพอเหมาะ จึงไม่ค่อยเกิดการแตกตัวออกเป็นไอออนย่อยๆ วิธีนี้เหมาะกับตัวอย่างที่ค่อนข้างไม่มีขั้ว

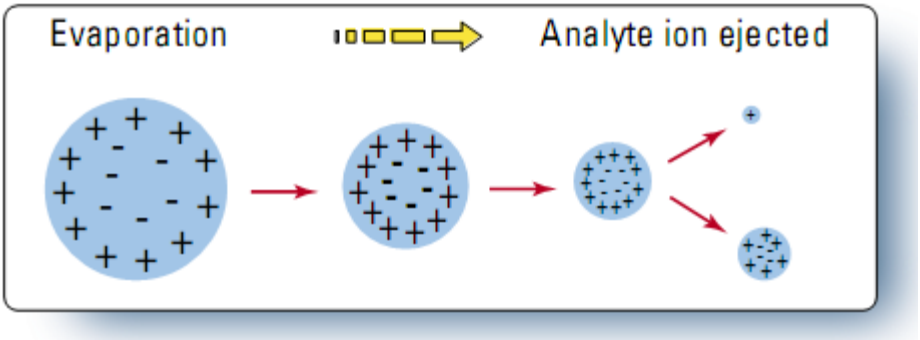
3. Electrospray Ionization (ESI)

การใช้ศักย์ไฟฟ้าจะทำให้สารตัวอย่างที่ถูกส่งผ่านแคพิลารีเกิดเป็นไอออน ในขณะที่สารระเหยตัวอย่างอยู่ในสภาวะของเหลว จากนั้นจะพ่นสารออกมาเป็นละอองฝอยแล้วให้ความร้อนเพื่อระเหยตัวทำละลายออกไป ทำให้สารกลายเป็นประจุที่มีขนาดเล็กลงเรื่อยๆได้ เนื่องจากความหนาแน่นของประจุจะสูงขึ้นเรื่อยๆ จากการที่ระเหยตัวทำละลายออกแล้วประจุมีขนาดเล็กลงจนถึงจุดหนึ่งที่แรงผลักระหว่างประจุสูงเกินกว่าแรงตึงผิวของสารละลาย ทำให้ไอออนของสารตัวอย่างเกิดการแตกตัวออกเป็นไอออนเดี่ยวๆจำนวนมาก



ภาพที่ 2.10 แหล่งกำเนิดไอออนแบบ ESI

ที่มา: Basic of LC/MS, Agilent Technologies, 2001



ภาพที่ 2.11 Desorption of ions from solution

ที่มา: Basic of LC/MS, Agilent Technologies, 2001

การเพิ่ม sensitivity ในการทำให้สารเกิดเป็นไอออนด้วยเทคนิค ESI ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยด้วยกันคือ

1. Ionization
- pKa ของสารตัวอย่าง
- pKa ของสารละลาย
2. Nebulization
- แรงตึงผิวของสารละลาย
- ความหนืดของสารละลาย
3. Desolvation
- อุณหภูมิและความเร็วของ drying gas
- ค่าความร้อนในการทำให้สารเกิดการระเหยกลายเป็นไอ
4. Desorption of ion
- พลังงานในการทำให้สารถูกล้อมรอบด้วยตัวทำละลาย
5. Gas phase reaction
- ความสามารถในการดึงดูดโปรตอนของสาร (proton affinity)
- ความสามารถในการแลกเปลี่ยนไอออน ซึ่งขึ้นกับความสามารถในการกลายเป็นไอออน (ionization energy)

<u>ลักษณะของการทำให้สารเกิดเป็นไอออนด้วยเทคนิค ESI</u>

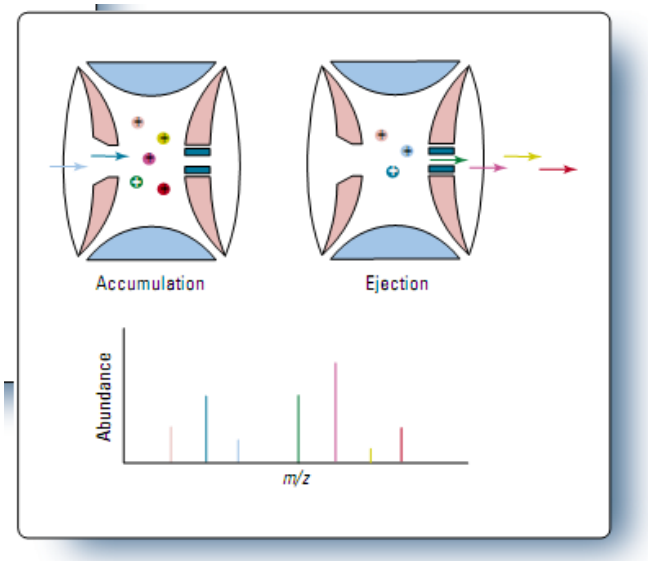
จะได้ข้อมูลเกี่ยวกับมวลโมเลกุลของสารเนื่องจากเป็น Soft ionization technique และเหมาะกับตัวอย่างที่มีประจุมากกว่า 1 ในสารละลาย เช่น เปปไทด์หรือโปรตีน (ชูติมา ศรีวิบูลย์, 2546) สารตัวอย่างที่มีขั้วหรือสารไอออนิก และเหมาะกับการวิเคราะห์สารโมเลกุลใหญ่ เช่น สารพวกชีวโมเลกุลหรือพอลิเมอร์ เป็นต้น เนื่องจากสามารถเกิดเป็นไอออน $[M+nH]^{n+}$ ได้ แต่ไม่สามารถใช้กับเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟีที่มี flow rate สูง ๆ ได้

3. ส่วนวิเคราะห์มวล (Mass Analyzer)

ส่วนวิเคราะห์มวลในเครื่องแมสสเปกโทรมิเตอร์นั้น จะติดตั้งอยู่ระหว่างแหล่งที่ทำให้เกิดไอออนกับระบบการตรวจไอออน ซึ่งเครื่องวิเคราะห์มวลมีอยู่หลายประเภท เช่น Time-of-Flight

Analyzer (TOF), Magnetic Sector Mass Analyzer, Quadrupole Analyzer และ Ion Trap ใน ที่นี้จะกล่าวถึงเฉพาะ Ion trap mass analyzer

ion trap mass analyzer เป็นบริเวณที่มีขั้วไฟฟ้ามาอยู่รวมกันและใส่คลื่นวิทยุทำให้ บริเวณนี้มีการกักขังไอออนที่ผ่านเข้ามาจากแหล่งผลิต ไอออนจะอยู่บริเวณแนวแกนทั้ง 4 ด้าน ที่ มีการเสริมศักย์ไฟฟ้า DC ที่ขั้วไฟฟ้า



ภาพที่ 2.12 Ion Trap Mass Analyzer
ที่มา: Basic of LC/MS, Agilent Technologies, 2001

ion-trap mass analyzer อาจเรียกว่าเป็นควอดูโพล (quadrupole) แบบสามมิติเพราะ การกักขังไอออนนั้นใช้แรงจากสนามไฟฟ้าสามทิศทางด้วยกัน ส่วนของ mass analyzer ประกอบ ไปด้วยขั้วไฟฟ้า (ring electrode) แยกเป็นขั้วไฟฟ้ารูปครึ่งวงกลม 2 อันปิดทั้งด้านบนและด้านล่าง ion-trap mass spectrometer สามารถเก็บ ions ที่ไม่ได้ถูกคัดเลือกและจะปลดปล่อยออกไปเมื่อ ทำการสแกนสนามไฟฟ้าอย่างเป็นลำดับ

4. ระบบการตรวจไอออน (Ions Detection)

ระบบการตรวจไอออนจะมีหน้าที่ในการเปลี่ยนไอออนที่ได้จากส่วนวิเคราะห์มวล (Mass Analyzer) ให้กลายเป็นสัญญาณไฟฟ้าหรืออื่น ๆ แล้วบันทึกออกมาเป็น Mass Spectrum ซึ่งมีทั้ง

การตรวจวัดที่ขยายสัญญาณและไม่ขยายสัญญาณ โดยระบบการตรวจวัดแบบหนึ่งที่ใช้ก็คือ Channeltron Electron Multiplier (CEM) ซึ่งเป็นการตรวจวัดที่มีการขยายสัญญาณของอิเล็กตรอน โดยจะใช้อุปกรณ์เป็นท่อที่ทำมาจากแก้วหรือโลหะซึ่งมีลักษณะโค้งงอโดยภายในจะเคลือบด้วยสารที่สามารถปลดปล่อยอิเล็กตรอนได้ นำมาต่อเข้ากับศักย์ไฟฟ้าโดยจะมีการเพิ่มศักย์ไฟฟ้าที่เป็นบวกขึ้นเรื่อย ๆ ตามระยะทางที่ห่างจากส่วนวิเคราะห์มวล เมื่อไอออนผ่านมากระทบบริเวณส่วนต้นของท่อนี้จะทำให้อิเล็กตรอนถูกกระตุ้นให้หลุดออกมาแล้วถูกดึงดูดให้ชนต่อไป เกิดการขยายสัญญาณต่อไปเรื่อย ๆ

2.5.3 **การวิเคราะห์เจละตินด้วยเครื่อง** LC/MS/MS

เมื่อทำการย่อยเจละตินด้วยกรดหรือเอนไซม์เกิดเป็นเปปไทด์สายสั้นและกรดอะมิโนซึ่งสามารถตรวจวัดได้ด้วยเทคนิค liquid chromatography electrospray ionisation mass spectrometry (LC-ESI-MS-MS) ซึ่งเป็นเทคนิคที่เหมาะกับตัวอย่างที่มีประจุมากกว่า 1 ในสารละลาย เช่น เปปไทด์หรือโปรตีน (ชูติมา *ศรีวิบูลย์*, 2546) โดย Ocana และคณะ (2004) ได้ศึกษา gelatin derived peptide โดยทำการย่อยเจละตินด้วย hydrochloric acid ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม จะได้เปปไทด์สายสั้น และกรดอะมิโน ซึ่งจะถูกแยกให้บริสุทธิ์ด้วย Liquid Chromatography เป็นการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างที่เป็นของเหลว ซึ่งจะถูกปั๊มเข้าสู่คอลัมน์ที่ภายในบรรจุด้วยอนุภาคของแข็งขนาดเล็ก ทำหน้าที่เป็นวัฏภาคคงที่ (stationary phase) การแยกเกิดขึ้นในคอลัมน์ได้เนื่องจากสารแต่ละชนิดเคลื่อนที่ผ่านวัฏภาคคงที่ด้วยความเร็วที่แตกต่างกัน จากนั้นสารบริสุทธิ์จะถูกตรวจวัดด้วยเครื่องมือ mass spectrometry โดยจะตรวจวัดไอออนที่เกิดขึ้นและปรากฏเป็น peak บนสเปกตรัมตามขนาดมวลต่อประจุ พบว่า spectrum ที่ 915 และ 1044 m/z มีความจำเพาะกับเจละตินสุกร

บทที่ 3

การดำเนินการวิจัย

3.1 วัตถุดิบ อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 วัตถุดิบ

เจละตินสุกรมาตรฐานจากบริษัท Sigma (Type A ,Sigma)

เจละตินวัวมาตรฐานจากบริษัท Sigma (Type B ,Sigma)

เจละตินปลามาตรฐานจากบริษัท Sigma (45%gelatin ,Sigma)

นมยูเอชที รสจืด ยี่ห้อ โฟร์โมสต์

น้ำตาลทราย ยี่ห้อ มิตรผล

เจละตินแผ่น ยี่ห้อ Gelita

คอลลาเจนปลา ไม่มียี่ห้อ

นมถั่วเหลืองผสมคอลลาเจน ยี่ห้อ แลคตาซอย

เครื่องดื่มเยลลี่คาราจีแนนผสมคอลลาเจน ยี่ห้อ Jele'

เยลลี่เจละติน ยี่ห้อ HARIBO

เยลลี่เจละติน ยี่ห้อ จอลลี่ โคล่า

วุ้นเจละติน ยี่ห้อ อิมพีเรียล

เครื่องดื่มผสมคอลลาเจน ยี่ห้อ สก็อต คอลลาเจน-อี

เครื่องดื่มผสมคอลลาเจน ยี่ห้อ สก็อต คอลลาเจน-คิว10

เครื่องดื่มผสมคอลลาเจน ยี่ห้อ สก็อต คอลลาเจน-เอ็ม วิธ ซิงค์

3.1.2 สารเคมี

แอมโมเนียมไบคาบอเนต, NH_4HCO_3 (Sigma, A6141-500G, Germany)

กรดไฮโดรคลอริก, HCl (Merck, 1.00317 2500, Germany)

อะซิโตไนไตร, CH_3CN (Merck, 1.14291.4000, Germany)

กรดฟอร์มิก, HCOOH (Merck, 1.00264.1000, Germany)

น้ำปราศจากไอออน (Deionized water)

Coomassie Briliant Blue G250 (Usb, 32812 25 GM, UK)

เอธานอล 95%, C_2H_5OH (Merck, 1.00983.2500, Germany)

กรดฟอสฟอริก 85%, H_3PO_4 (Merck, 1.00573.1000, Germany)

กรดอะซิติก, CH_3COOH (BDH, 100015N, England)

Bovine Serum Albumin (BSA) (Sigma, P5369-10ML, USA)

3.1.3 วัสดุและอุปกรณ์ในการวิเคราะห์เจลาตินด้วย LC/MS/MS

เครื่องชั่งน้ำหนัก 4 ตำแหน่ง (SARTORIUS CP 2245, 17304408, Germany)

Autopipette ขนาด 50 µL, 200 µL, 1000 µL (GILSON , France)

Tip ขนาด 200 µL และ 1,000 µL

Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 mL

Heat box (Wealtec, HB-2, Taiwan)

Vortex Mixture (Vortex-Genie2, USA)

เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วรุ่น TX-201

Mass Spectrometer (Bruker HCT, Germany)

HPLC (Agilent , 1100 Series, USA)

3.1.4 วัสดุอุปกรณ์ในการสกัดเจลาติน

เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (SARTORIUS CP 2245, 17304408, Germany)

หลอดทดลองฝาเกลียว ขนาด 16 x 125 mm

Graduate pipette ขนาด 1 mL, 5mL

Autopipette ขนาด 50 µL, 200 µL, 1000 µL (GILSON , France)

กรวยกรอง

กระดาษกรอง Whatman No.1

อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

เครื่องปั่นเหวี่ยง (MPW-52, 0365, Poland)

สเปกโตรมิเตอร์ (UV-vis, power wave 340, BIOTEK)

เครื่องทำความร้อนแบบหลุม (Heat Box)

3.2 ขั้นตอนดำเนินการวิจัย

3.2.1 การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC/MS/MS

3.2.1.1 การหาสภาวะที่เหมาะสม(ความเข้มข้นและเวลา)ในการย่อยเจละตินสุกรด้วยกรด HCl เพื่อศึกษาต่อด้วยเทคนิค LC/MS/MS

ชั่งตัวอย่างเจละตินสุกร 5 mg ใส่ใน microtube เติมกรดไฮโดรคลอริก 3M และ 6M ปริมาตร 1000 µL เขย่าด้วยเครื่อง Vortex ให้เจละตินละลายเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 40 และ50 นาที จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเย็น ปิเปตสารละลายเจละติน 100 µL ใส่ในหลอดๆละ เติม NH_4HCO_3 2M 150 ไมโครลิตร และเติมน้ำปราศจากไอออน 250 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน นำไป centrifuge ที่ 12000 g นาน 30 นาที (Ocana และคณะ, 2004) เจือจางสารละลายเจละตินใน solvent A (0.1 % v/v FA ใน 98 % H_2O) ให้ได้ความเข้มข้น 0.2 µg/µL ที่อัตราส่วน 50: 450 µL วิเคราะห์เจละตินด้วยเทคนิค LC-MS/MS (ESI ion trap) ใช้แหล่งกำเนิดไอออนแบบ Electrospray Ionization (ESI) และมีส่วนวิเคราะห์มวล ion trap สำหรับสภาวะที่ใช้ในโครมาโทกราฟีใช้คอลัมน์ Biobasic C18 ขนาด 1.0 x 150 mm (Thermo Finnigan) เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้คือ solvent A (0.1 % v/v FA ใน 98 % H2O) และ solvent B (95 % ACN containing 0.1 % v/v FA) โดยมีอัตราส่วน gradient elution ดังตารางที่ 3.1 อัตราการไหลทั้งหมด (total flow rate) เป็น 0.1 mL/min อุณหภูมิของ column เป็น 30°C ปริมาตรของตัวอย่างจะถูกฉีดครั้งละ 5 µL.

ตารางที่ 3.1 อัตราส่วนที่เหมาะสมของสารละลายเฟสเคลื่อนที่ต่อเวลา

เวลา (นาที)	A%	B%
0	95	5
65	35	65
70	20	80
95	95	5

ESI-MS สารที่ถูกชะออกมาจาก column ของ HPLC จะเข้าสู่ MS โดยผ่านทางเข็ม ES ionization ที่ให้ศักย์ไฟฟ้า 3500 V แล้วให้ความร้อน 300 °C ที่ 8 mL/min และใช้ Nebulizer gas ที่ 35 psi เพื่อระเหยตัวทำละลายออกไปและทำให้สารกลายเป็นประจุที่มีขนาดเล็กลง ระยะเวลาที่ให้ไอออนอยู่ใน mass analyzer คือ 200 milliseconds ไอออนต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นจะถูกแยกตามขนาดของมวลต่อประจุ (m/z) ในรูปแบบ positive ion mode โดยการวิเคราะห์ข้อมูลจะอยู่ในช่วง 250-1,500 m/z เฉพาะ mass 915 และ 1044 m/z จะถูกเลือกเพื่อวิเคราะห์ด้วย MS/MS โดยอัตโนมัติ ใช้โปรแกรม Hystar ควบคู่ไปกับ Esquire Control สำหรับควบคุมเครื่อง HPLC และ Mass spectrometer ใช้โปรแกรม Data Analysis 3.2 สำหรับวิเคราะห์ข้อมูล

3.2.1.2 การพัฒนาวิธีการสกัดเจละตินจากตัวอย่างอาหารด้วย Ethanol และ Acetic acid เพื่อตรวจยืนยันด้วยเทคนิค LC/MS/MS

3.2.1.2.1 การตกตะกอนด้วย Ethanol ในกรณีของวุ้นเจละติน

เตรียมผงวุ้นเจละติน ประกอบด้วยเจละตินสุกรกับน้ำตาล ความเข้มข้นของเจละตินเท่ากับ 5% 10% 15% และ 20% หลังจากนั้น ชั่งผงวุ้นเจละตินความเข้มข้นละ 2 g เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ให้ความร้อนที่ 50 องศาเซลเซียส จนเจละตินละลาย ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นและนำเข้าตู้เย็นเพื่อให้เกิดเป็นเจล ชั่งวุ้นเจละตินที่แข็งตัวมา 200 มิลลิกรัม เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร (จะได้ความเข้มเท่ากับ 0.01, 0.02, 0.03 และ 0.04 g/mL) อุ่นที่ 37 องศาเซลเซียส เมื่อครบ 10 นาที เติมเอธานอล 2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองแล้วบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่ 37 องศาเซลเซียสต่ออีก 10 นาที แล้วนำมาตั้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง (25°C) นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นตกตะกอนด้วยความเร็วปานกลาง (Hitachi-Himac, CF7D2) ที่ 3000 rpm นาน 20 นาที สังเกตตะกอนที่เกิดขึ้น ถ้าเห็นตะกอนชัดเจนสามารถเทส่วนใสทิ้งและเก็บตะกอนไปวิเคราะห์ต่อ หากไม่ชัดเจนให้นำไปเป่าให้แห้งด้วยไนโตรเจนพร้อมให้ความร้อนที่ 60 องศาเซลเซียส นำตะกอนที่ได้มาวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford Assay (Owusu-Apenten, 2002) และย่อยต่อด้วยกรดไฮโดรคลอริกหลังจากนั้นวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC/MS/MS

3.2.1.2.2 การตกตะกอนด้วย Acetic acid และ Ethanol ในกรณีของผลิตภัณฑ์นม

3.2.1.2.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของกรดอะซิติกในการตกตะกอนโปรตีนเคซีนในนมยูเอชทีรสจืด

ปิเปตตัวอย่างนมยูเอชทีรสจืดปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปให้ความร้อนที่ 37°C นาน 10 นาที เติม acetic acid (Ferris, 1922) (ที่ความเข้มข้น 10%, 20%, 30% และ 40% ตามลำดับ) หลอดละ 1 mL. ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที นำไป centrifuge ที่ 3,000 rpm อุณหภูมิ 25°C นาน 20 นาที กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.01 นำส่วนใสไปให้ความร้อนที่ 35-37°C หลังจากนั้นเติม acetic acid อีกครั้งเพื่อตกตะกอนเคซีนที่เหลืออยู่ (ที่ความเข้มข้น 10%, 20%, 30% และ 40% ตามลำดับ) หลอดละ 1 mL แล้ว ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที นำไป centrifuge ที่ 3,000 rpm อุณหภูมิ25°C นาน 20 นาที กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 นำส่วนใสให้ความร้อนที่ 35-37°C 10 นาที แล้วเติม ethanol ลงไป 2 mL บ่มต่ออีก 10 นาที นำไป centrifuge ที่ 3,000 rpm อุณหภูมิ 25°C นาน 20 นาที สังเกตตะกอนที่เกิดขึ้น แล้วนำตะกอนที่ได้มาวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford Assay

3.2.1.2.2 การตกตะกอนเจลาตินในผลิตภัณฑ์นม

เตรียมเจลาตินความเข้มข้น 0.1 g/mL ละลายด้วยน้ำกลั่นและให้ความร้อนจนเจลาตินละลายหมด เตรียมตัวอย่างนม โดยปิเปตนมใส่ในหลอดทดลองดังตารางที่ 4 (หลอดละ 2 ซ้ำ)

ตารางที่ 3.2 สัดส่วนนมต่อสารละลายเจลาติน (0.1g/mL)

ลำดับที่	ปริมาตรนม (mL)	ปริมาตรเจลาติน (mL)
1	5.0	0
2	4.5	0.5
3	4.0	1.0
4	3.5	1.5
5	3.0	1.0
6	2.5	2.5

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.2.1.2.1 สังเกตตะกอนที่เกิดขึ้น ถ้าเห็นตะกอนชัดเจนสามารถเทส่วนใสทิ้งและเก็บตะกอนไปวิเคราะห์ต่อ หากไม่ชัดเจนให้นำไปเป่าให้แห้งด้วย

ไนโตรเจนพร้อมให้ความร้อนที่ 60°C นำตะกอนที่ได้มาวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford Assay และย่อยต่อด้วยเทคนิค LC/MS/MS

3.2.2 การศึกษาความแตกต่างของเจละตินจากสุกร วัว และปลา ด้วยเทคนิค LC/MS/MS

3.2.2.1 การหาปริมาณเจละตินสุกรที่เหมาะสมและปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้

ชั่งตัวอย่างเจละตินสุกร 0.1, 0.3, 0.5, 1.0, 3.0, และ 5.0 mg ใส่ใน microtube เติมกรดไฮโดรคลอริก 6M ปริมาตร 1000 µLจะได้ความเข้มข้น 0.01%, 0.03%, 0.05% 0.1%,0.3%,0.5% และ 1% น้ำหนักต่อปริมาตร,(w/v) เขย่าด้วยเครื่อง Vortex ให้เจละตินละลายเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95°C นาน 40 นาที จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเย็น ปิเปตสารละลายเจละตินหลอดละ 100 µL ใส่ในหลอดใหม่ แล้วเติม NH_4HCO_3 2M 150 µL และเติมน้ำปราศจากไอออน 250 µL ผสมสารละลายให้เข้ากัน นำไป centrifuge ที่ 12000 g นาน 30 นาที เจือจางสารละลายเจละตินใน solvent A ให้ได้ความเข้มข้นไม่เกิน 0.2 µg/ µL ที่อัตราส่วนดังตารางข้างล่าง โดยฉีดเข้าเครื่องครั้งละ 5 µL ทำการทดลอง 6 ซ้ำ

ตารางที่ 3.3 การเจือจางสารละลายเจละตินด้วย Solvent A (ความเข้มข้นไม่เกิน 0.2 µg/ µL)

	ความเข้มข้นของเจละติน (%w/v)						
	0.01	**0.03**	**0.05**	**0.1**	**0.3**	**0.5**	**1.0**
สารละลายเจละติน (ไมโครลิตร)	500	500	500	166.7	100	50	33.3
Solvent A (ไมโครลิตร)	-	-	-	333.3	400	450	466.7

3.2.2.2 การศึกษา Marker ion ของเจละตินวัวและหาปริมาณที่เหมาะสมและปริมาณต่ำสุดที่สามารถวัดได้

ทำเช่นเดียวกับเจละตินสุกร ในข้อ 3.2.1.1

3.2.2.3 การศึกษา Marker ion ของเจละตินปลาและหาปริมาณที่เหมาะสมและปริมาณต่ำสุดที่สามารถวัดได้

เตรียมเจลละตินปลาจากเจลละตินมาตรฐาน 45% solid โดยชั่งเจลละติน 10, 20, 30, 40, และ 50mg จะได้เจลละตินเข้มข้น 0.45, 0.90, 1.35, 1.80 และ 2.25% w/v เติมกรดไฮโดรคลอริก 6M ปริมาตร 1000 µL เขย่าด้วยเครื่อง Vortex ให้เจลละตินละลายเป็นเนื้อเดียวกัน หลังจากนั้นทำเช่นเดียวกับเจลละตินสุกร ในข้อ 3.1 และเจือจางสารละลายดังตารางที่ 6

ตารางที่ 3.4 การเจือจางสารละลายเจลละตินปลาด้วย Solvent A (ความเข้มข้นไม่เกิน 0.2 µg/ µL)

	ความเข้มข้นของเจลละติน (%w/v)				
	0.45	**0.90**	**1.35**	**1.80**	**2.25**
สารละลายเจลละติน (ไมโครลิตร)	111	55.6	37	27.8	22.2
Solvent A (ไมโครลิตร)	389	444.4	463	472.2	477.8

1. การศึกษา marker ion เจลละตินผสม

ชั่งเจลละตินสุกร วัว และปลา ในอัตราส่วน 2 : 2 : 4 (1.8g solid) ตามลำดับ เติมน้ำ 20 ml ให้ความร้อนที่ 50 องศาเซลเซียส ผสมจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เมื่อตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เจลละตินจะแข็งตัว และชั่งเจลละตินมา 100mg เติมกรดไฮโดรคลอริก 6M ปริมาตร 1000 µL เขย่าด้วยเครื่อง Vortex ให้เจลละตินละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ทำการทดลองต่อเช่นเดียวกับข้อ 3.2.1.1

3.2.3 การวิเคราะห์เจลละตินในตัวอย่างอาหาร

3.2.3.1 วิเคราะห์จากตัวอย่างอาหารที่จำลองขึ้น

เตรียมวุ้นเจลละตินวัวและปลา เช่นเดียวกับวุ้นเจลละตินสุกร ดังข้อ 3.2.1.2.1 เตรียมนมผสมเจลละตินวัวและปลา เช่นเดียวกับนมผสมเจลละตินสุกร ดังข้อ 3.2.1.2.2

3.2.3.2 วิเคราะห์จากตัวอย่างอาหารทางการค้า

3.2.3.2.1 การคัดเลือกตัวอย่างอาหารทางการค้า

เลือกตัวอย่างที่มีส่วนผสมของเจลละติน ซึ่งระบุชัดเจนบนฉลากผลิตภัณฑ์ และเป็นผลิตภัณฑ์นมและผลิตภัณฑ์ที่มีองค์ประกอบไม่ซับซ้อน

3.2.3.2.2 สำหรับผลิตภัณฑ์ที่มีองค์ประกอบไม่ซับซ้อน

ถ้าเป็นของแข็งเช่น วุ้นเจละติน เยลลี่เจละติน ให้ชั่งมา 2 กรัม แล้วเติมน้ำกลั่น 5 mL ให้ความร้อนที่ 50 องศาสเซลเซียส คนจนเป็นสารละลายเดียวกัน ปิเปตสารละลาย 1 mL ใส่หลอดทดลองฝาเกลียว

ส่วนผลิตภัณฑ์ที่เป็นของเหลวให้ปิเปตมา 1 mL ใส่หลอดทดลองฝาเกลียว หลังจากนั้นนำไปตั้งในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส 10 นาที เติมเอธานอล 2 mL ตั้งทิ้งไว้ต่ออีก 10 นาที นำไปวิเคราะห์ต่อ ดังข้อ 3.2.1.2.1

3.2.3.2.3 สำหรับผลิตภัณฑ์ที่มีองค์ประกอบซับซ้อน ได้แก่ ผลิตภัณฑ์นม

ปิเปตตัวอย่างอาหารมา 5mLใส่หลอดทดลองฝาเกลียว หลังจากนั้นทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.1.2.2.2

3.2.4 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิจัยนี้วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 11.5 ข้อมูลทั่วไปของกลุ่มตัวอย่างแสดงเป็นค่าเฉลี่ย สัดส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เปรียบเทียบความแตกต่างของตัวอย่างก่อนและหลังการตกตะกอนเจละตินในตัวอย่างนมผสมเจละตินและวุ้นเจละติน โดยใช้ pair t-test กำหนดระดับนัยสำคัญที่ $\alpha = 0.05$

บทที่ 4

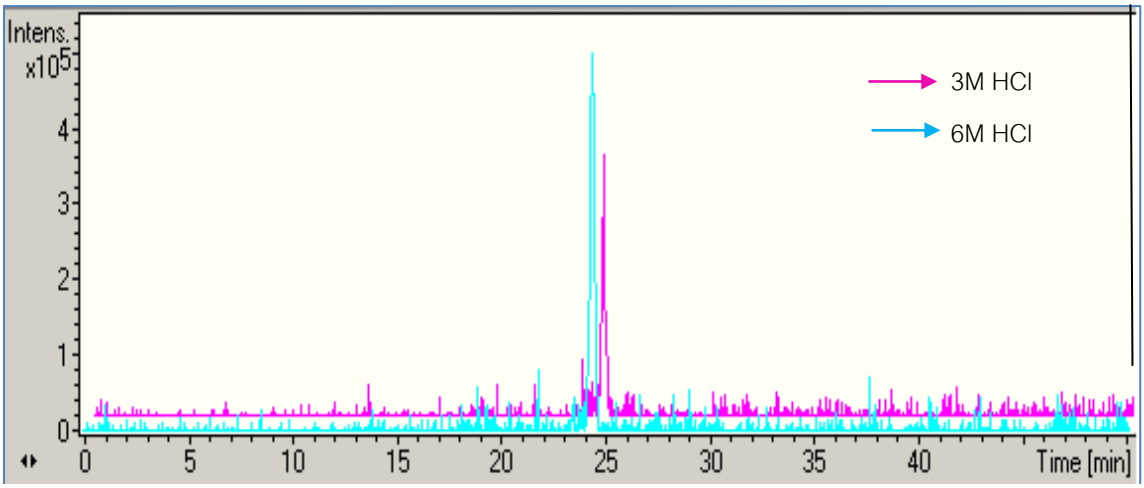
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากรายงานการวิจัยที่เคยศึกษาความแตกต่างของเจละตินนั้น สำหรับเทคนิคด้าน Liquid Chromatography Mass Spectrometer หรือ LC/MS/MS เป็นเทคนิคที่เหมาะสมในการวิเคราะห์โปรตีน และมีความไวสูง Ocana และคณะ (2004) ได้นำเทคนิคนี้มาศึกษาเจละตินสุกร แต่ไม่ได้มีวัตถุประสงค์ในการแยกความแตกต่าง อีกทั้งงานวิจัยดังกล่าวยังไม่มีการศึกษาในผลิตภัณฑ์อาหารทางการค้า เนื่องจากในผลิตภัณฑ์ต่างๆ เจละตินถูกรวมอยู่กับองค์ประกอบอื่นๆหลายชนิด ซึ่งทำให้การวิเคราะห์ชนิดของเจละตินยุ่งยากขึ้น เนื่องจากอาจเกิดการรบกวนจากสารอื่นๆได้ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการสกัดเจละตินออกจากตัวอย่างอาหาร และศึกษาความแตกต่างของเจละตินจากสุกร วัวและปลา โดยการหา marker ion ของเจละตินแต่ละชนิด และ marker ion ดังกล่าวเฉพาะเจาะจงกับโปรตีนเจละตินเท่านั้น โดยศึกษาด้วยเทคนิค LC/MS/MS ซึ่งตัวอย่างจะผ่านการย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสม

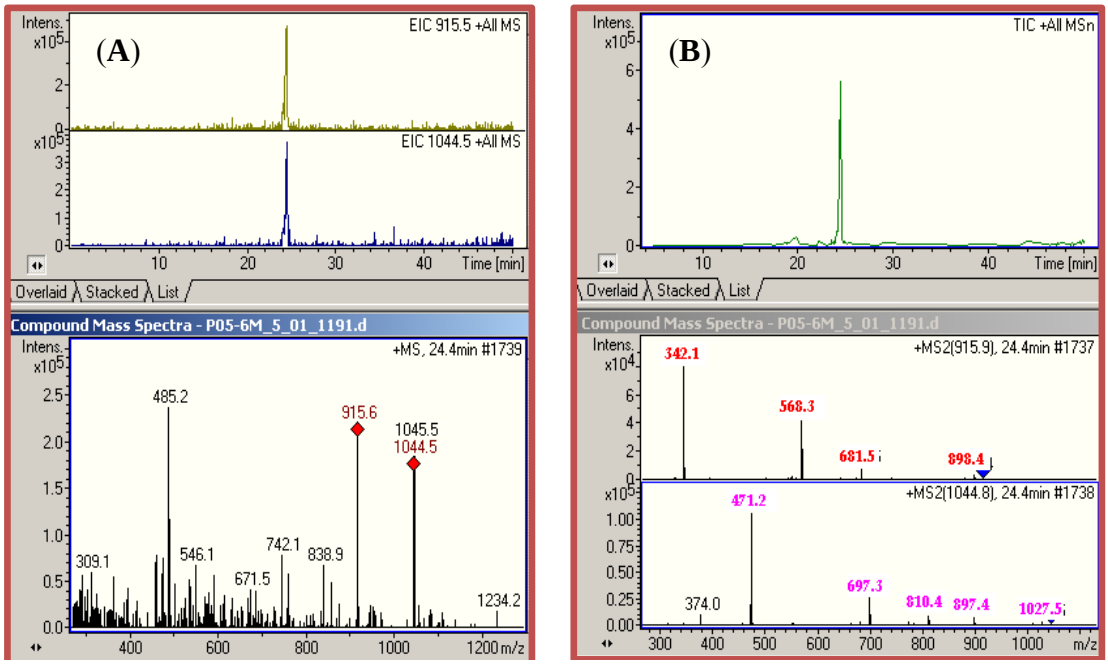
4.1 การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC/MS/MS

4.1.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยเจละตินด้วยกรด HCl

จากการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยเจละตินสุกรด้วยกรด HCl ทั้งความเข้มข้นของกรดที่ 3M และ 6M และระยะเวลาในการย่อยที่ 30 40 และ 50 นาทีนั้น พบว่าที่ 6M HCl จะให้สเปคตรัมที่ชัดเจน และเมื่อพิจารณาค่า signal to noise ratio (S/N ratio) ก็พบว่าจะมีค่าที่สูงกว่าการใช้ 3M HCl อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $P<0.05$ ดังภาพที่ 4.1 เป็นการเปรียบเทียบโครมาแกรมของเจละตินสุกรที่ย่อยด้วยกรด 3M และ 6M และเมื่อพิจารณารายละเอียดดังภาพที่ 4.2A ก็พบว่าหลังทำการ Extracted Chromatogram ที่ 915 และ 1044 m/z (mass to charge ratio) นั้น จะได้สเปคตรัมที่มีความชัดเจน และเมื่อทำการแตกตัว marker ion ทั้งสอง ก็จะได้รายละเอียดดังภาพที่ 4.2B marker ion เป็นไอออนที่ตรวจวัดได้บนเปปไทด์สายสั้นๆหลังจากถูกย่อยด้วยกรด ซึ่งพบว่าไอออนสองตัวนั้นเป็นเอกลักษณ์เฉพาะของเจละตินสุกร



ภาพที่ 4.1 การเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของเจละตินมาตรฐานจากสุกร ที่ย่อยด้วย 3M และ 6M HCl

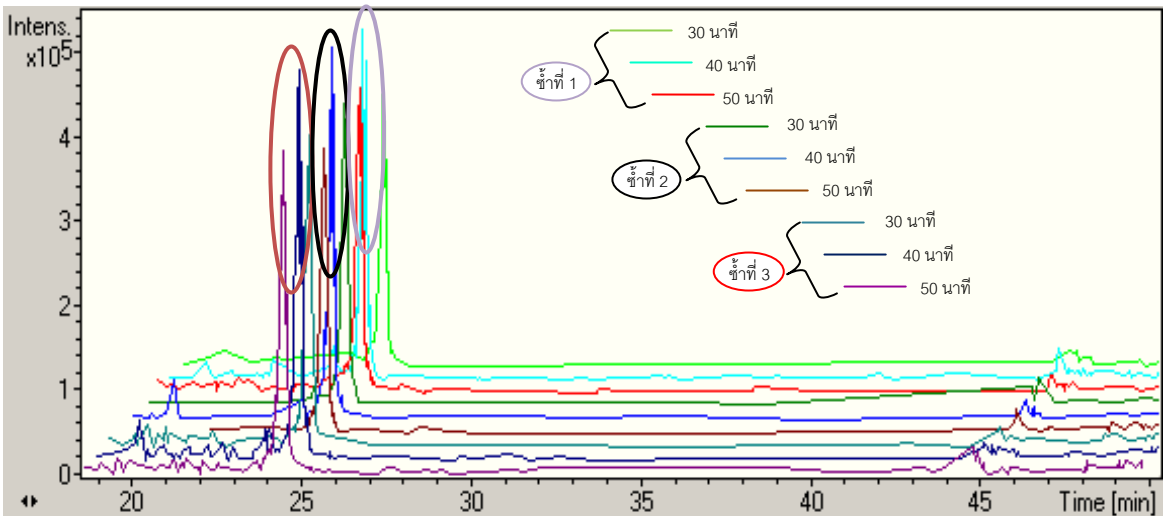


ภาพที่ 4.2 โครมาโทแกรมและสเปคตรัมของเจละตินสุกรที่ย่อยด้วย 6M HCl 40 นาที

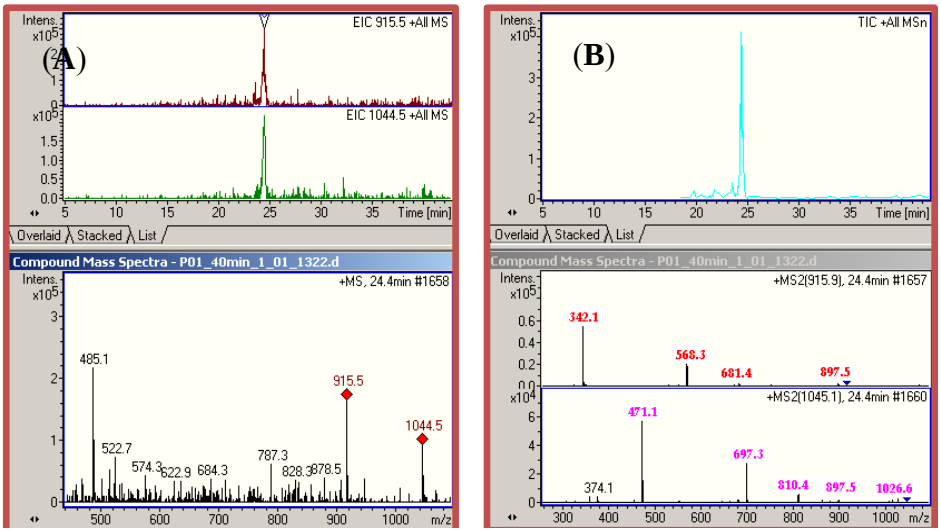
(A) Extracted Chromatogram (บน) และ MS Spectrum (ล่าง (B) Total Chromatogram (บน) และ MS/MS Spectrum (ล่าง)

สำหรับการหาเวลาที่เหมาะสมในการย่อยก็เช่นเดียวกัน พบว่าที่เวลา 40 นาที ทั้ง 3 ซ้ำการทดลองจะให้ความเข้มของโครมาโทแกรมสูงกว่าที่เวลา 30 และ 50 นาที ดังภาพที่ 4.3 และเมื่อพิจารณาสเปคตรัมที่ได้ ดังภาพที่ 4.4A&B พบว่าค่า S/N ratio ของ marker ion ที่สนใจ ก็มีค่าที่สูงกว่าจาก 2 สภาวะ จึงสรุปได้ว่าความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกและเวลาที่เหมาะสมคือ 6M ที่ 40 นาที

ปัจจัยที่สำคัญที่ต้องควบคุมการย่อยด้วยกรดนั้นคือความเข้มข้นและเวลา (Fountoulakis, 1998) ถ้าย่อยด้วยสภาวะที่ต่ำไป หรือที่สภาวะสูงไปอาจจะไม่ได้ marker ion ที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะของเจละติน เนื่องจากการย่อยด้วยกรดเป็นการย่อยแบบสุ่มไม่จำเพาะเจาะจง สำหรับงานวิจัยนี้พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมก็ทำให้ได้ marker ion ของเจละติน สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ocana และคณะ (2004) นั่นคือ พบ marker ion ที่ 915 และ 1044 m/z (mass to charge ratio) และเมื่อทำการแตกตัว ion ทั้งสองพบว่า ion ที่ 915 m/z สามารถแตกตัวได้เป็น 342, 568, 681 และ 897 m/z ส่วน ion ที่ 1044 m/z สามารถแตกตัวได้เป็น 471, 697, 810, 897 และ 1026 m/z



ภาพที่ 4.3 การเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของเจละตินมาตรฐานจากสุกรที่ย่อยด้วย 6M HCl เวลา 30 40 และ 50 นาที



ภาพที่ 4.4 โครมาโทแกรมและสเปคตรัมของเจละตินสุกร ที่ย่อยด้วย 6M HCl 40 นาที
(A) Extracted Chromatogram (บน) และ MS Spectrum (ล่าง) (B) Total Chromatogram (บน) และ MS/MS Spectrum (ล่าง)

4.1.2 การพัฒนาวิธีการสกัดเจละตินจากตัวอย่างอาหารด้วย Ethanol และ Acetic Acid เพื่อตรวจยืนยันด้วยเทคนิค LC/MS/MS

4.1.2.1 การตกตะกอนเจละตินด้วย Ethanol ในวุ้นเจละติน

จากการศึกษาการตกตะกอนเจละตินในวุ้นเจละติน โดยเตรียมวุ้นเจละตินที่มีความเข้มข้นของเจละตินตั้งแต่ 0.01-0.04 g/mL และทำการสกัดเจละตินออกด้วยเอธานอล หลังจากนั้นนำตะกอนที่ได้ไปวัดปริมาณโปรตีน ได้ผลดังตารางที่ 4.1 พบว่าโปรตีนเริ่มต้นนั้นมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามลำดับความเข้มข้นของเจละตินที่ผสมลงไป และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนหลังจากการสกัดแล้ว พบว่าปริมาณโปรตีนจะลดลงไปจากเดิมเล็กน้อยไม่ต่างจากก่อนการสกัดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P<0.05$

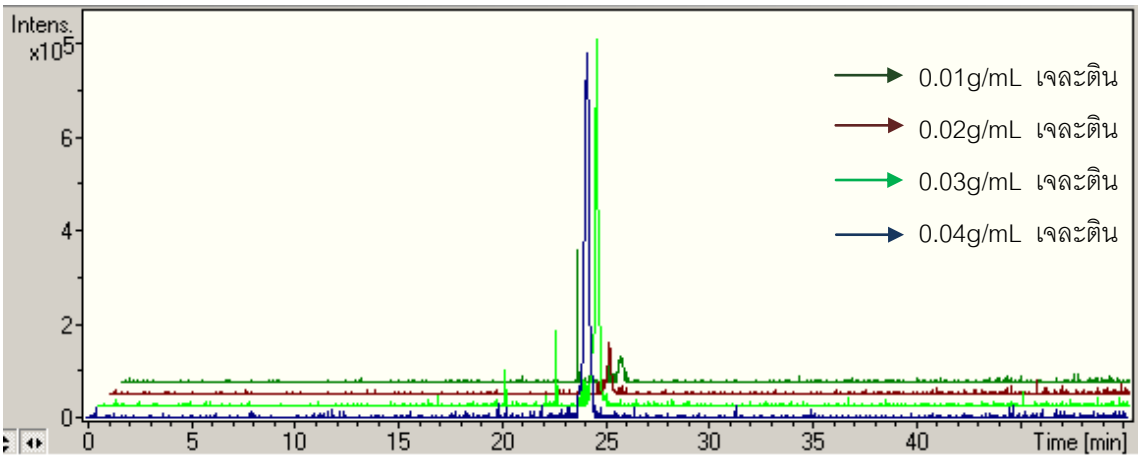
เมื่อนำตะกอนที่ได้ไปทำการย่อยต่อด้วย 6M HCl ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที และนำสารที่ได้ไปศึกษาด้วยเทคนิค LC/MS/MS จะให้โครมาโทแกรมดังภาพที่ 4.5 โดยเปรียบเทียบโครมาโทแกรมที่ได้เห็นว่าความเข้มเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของเจละติน และในภาพที่ 4.6A และ 4.6B แสดงถึงแมสสเปคตรัมของตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของเจละติน

0.01g/mL อาจทำให้ความเข้มของพีกและสเปคตรัมที่ได้ไม่ชัดเจน เนื่องจากเมื่อปริมาณเจละตินมีน้อยทำให้สัดส่วนของเจละตินต่อกรดมากขึ้น เกิดการย่อยมากเกินระดับที่ต้องการ จึงได้ ion ที่สนใจในปริมาณต่ำไปด้วย ส่วนในภาพที่ 4.7A และ 4.7B นั้น จะให้สเปคตรัมที่ชัดเจน

ตารางที่ 4.1 ปริมาณโปรตีนก่อนและหลังการสกัดเจละตินในวุ้นเจละตินด้วยเอธานอล

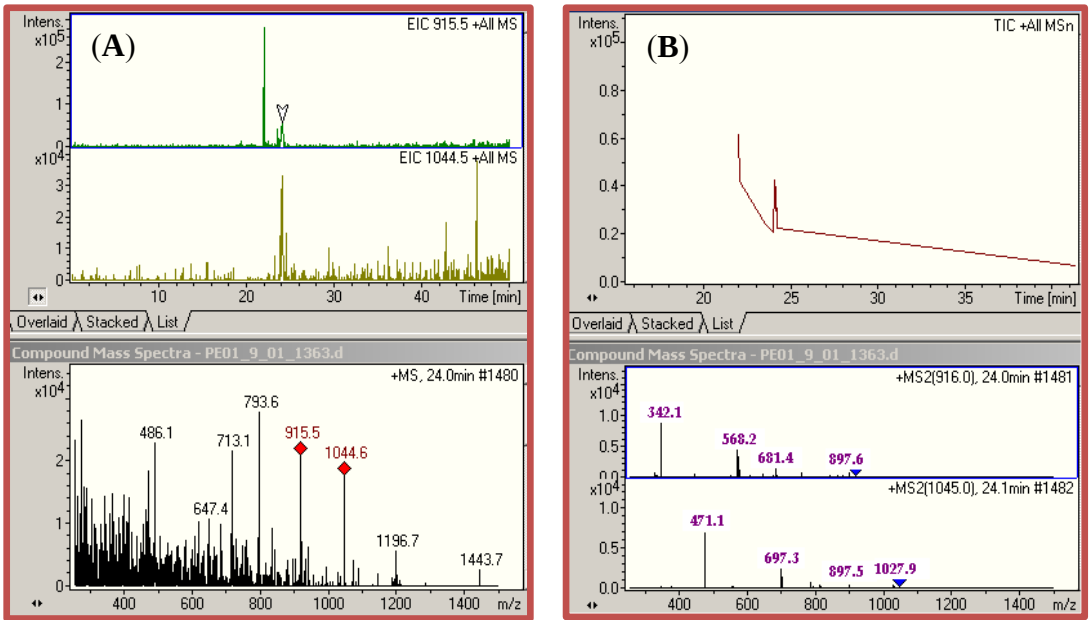
ลำดับที่	ความเข้มข้นเจละติน (g/mL)	ปริมาณโปรตีน(μg/μL)^{ns}	
		ก่อน	หลัง
1	0.01	0.17±0.02	0.14±0.01
2	0.02	0.19±0.01	0.18±0.02
3	0.03	0.22±0.05	0.16±0.01
4	0.04	0.27±0.02	0.24±0.04

ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

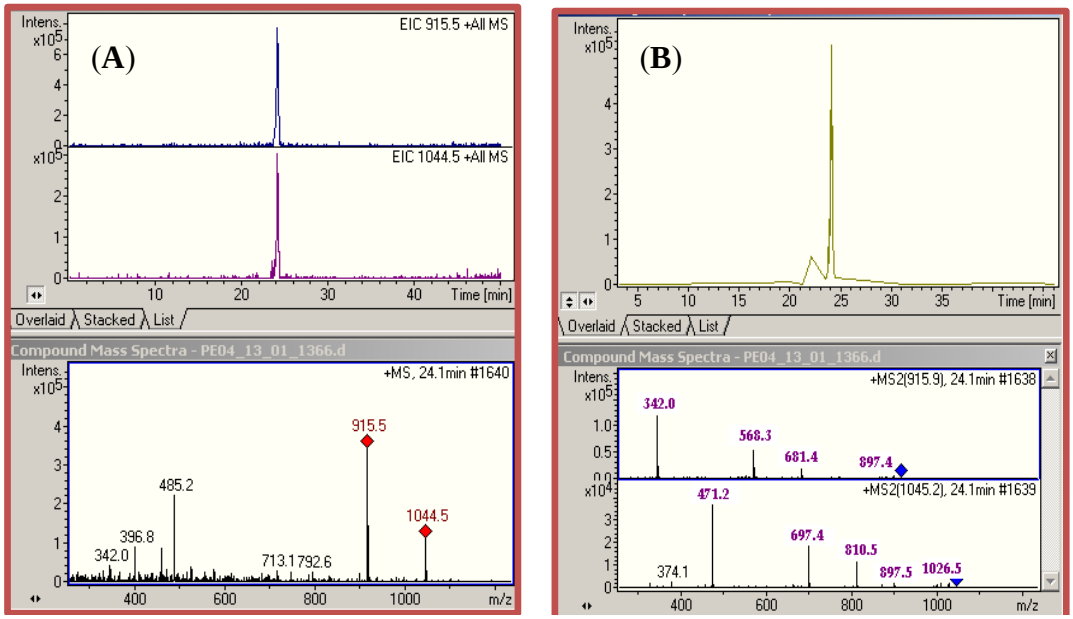


ภาพที่ 4.5 การเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของเจละตินมาตรฐานจากสุกร ที่สกัดจากวุ้นเจละติน 0.01-0.04g/mL

เจละตินสามารถตกตะกอนได้ด้วยเอธานอล เนื่องจากเอธานอลเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดหนึ่ง ซึ่งจะไปลดค่ากิจกรรมของน้ำโดยมีผลต่อค่า dielectric constant ของสารละลายที่มีน้ำเป็นตัวทำละลายลดลง ทำให้ความสามารถในการเป็นตัวทำละลายของน้ำลดลง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์มากขึ้นเรื่อยๆ จนถึงจุดที่แรงกระทำระหว่างโมเลกุลของโปรตีนในส่วนของพลังงานไฟฟ้าสถิตย์บนโมเลกุลโปรตีนมีแรงกระทำที่สูงกว่าแรงกระทำระหว่างโปรตีนกับน้ำ เกิดการเข้ามารวมตัวกันของโมเลกุลทำให้โปรตีนตกตะกอนลงมาได้ (Scopes, 1988)



ภาพที่ 4.6 โครมาโทแกรมและสเปคตรัมของวุ้นเจละตินสุกรความเข้มข้น 0.01g/mL (A) Extracted ion chromatogram ของ 915 m/z และ 1044m/z (บน) และ MS Spectrum (ล่าง) (B) Total ion chromatogram (ms/ms) (บน) และ MS/MS Spectrum (ล่าง)



ภาพที่ 4.7 โครมาโทแกรมและสเปคตรัมของวุ้นเจละตินสุกรความเข้มข้น 0.04g/mL (A) Extracted ion chromatogram ของ 915 m/z และ 1044m/z (บน) และ MS Spectrum (ล่าง) (B) Total ion chromatogram (ms/ms) (บน) และ MS/MS Spectrum (ล่าง)

4.1.2.2 การตกตะกอนเจลละตินด้วย Acetic Acid ในผลิตภัณฑ์นมยูเอชทีรสจืด

จากการศึกษาการตกตะกอนเจลละตินในผลิตภัณฑ์นมโดยใช้กรดอะซิติกในการตกตะกอนเคซีนและนำสารละลายใสตกตะกอนเจลละตินด้วยเอธานอลนั้น สำหรับการหาความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่เหมาะสม โดยใช้กรดอะซิติกที่มีความเข้มข้น 10% 20% 30% และ 40% ตกตะกอนเคซีนในนมสดพาสเจอร์ไรส์ พบว่าที่ความเข้ม 10% สามารถตกตะกอนเคซีนได้มากที่สุด โดยมีปริมาณโปรตีนต่ำที่สุด ได้ผลดังตารางที่ 4.2 จากการวัดปริมาณโปรตีนเริ่มต้นเทียบกับโปรตีนหลังจากทำการสกัด จะเห็นว่าปริมาณโปรตีนลดลงอย่างเห็นได้ชัด เนื่องจากปกติแล้วความเป็นกรดด่าง(pH)ของน้ำนมประมาณ pH 6.6 ซึ่งมีฤทธิ์เป็นกรดเล็กน้อย หากลด pH ต่ำลงด้วยการเติมกรด เคซีนจะไม่คงตัวและตกตะกอนที่ pH 4.7 เรียกสภาวะของความเป็นกรด-ด่างที่จุดนี้ว่า Isoelectric point ของเคซีน ซึ่งเป็นสภาวะที่เคซีนมีประจุไฟฟ้าเท่ากับศูนย์ แรงผลักกันระหว่างประจุที่เหมือนกันจะลดลง ประจุบวกและลบที่มีอยู่เท่าๆกัน ณ.จุดนี้จะดูดกัน ทำให้เคซีนตกตะกอนลงมาในที่สุด สำหรับการใช้กรดอะซิติกที่ 10% จะสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ferris (1922) ซึ่งได้ใช้ในการตกตะกอนเคซีนเพื่อหาปริมาณเจละตินในไอศครีม และ Vasbinder และคณะ (2003) ได้ใช้ในการตกตะกอนเคซีน เพื่อหาปริมาณโปรตีนเวย์ในนม

ตารางที่ 4.2 ปริมาณโปรตีนในนมยูเอชทีรสจืดก่อนและหลังการสกัดด้วยกรดอะซิติกที่ความเข้มข้นต่างๆกัน

ลำดับที่	ปริมาตรนม (mL)	กรดอะซิติกเข้มข้น (%)	ปริมาณโปรตีน(μg/μL)[1]	
			ก่อน	หลัง
1	5.0	10	12.86±0.03	0.44±0.07[a]
2	5.0	20	12.86±0.03	0.46±0.02[b]
3	5.0	30	12.86±0.03	0.52±0.05[ab]
4	5.0	40	12.86±0.03	0.70±0.13[b]

[1] ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

[a,b...] อักษรที่ต่างกันในแต่ละแถว หมายถึง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

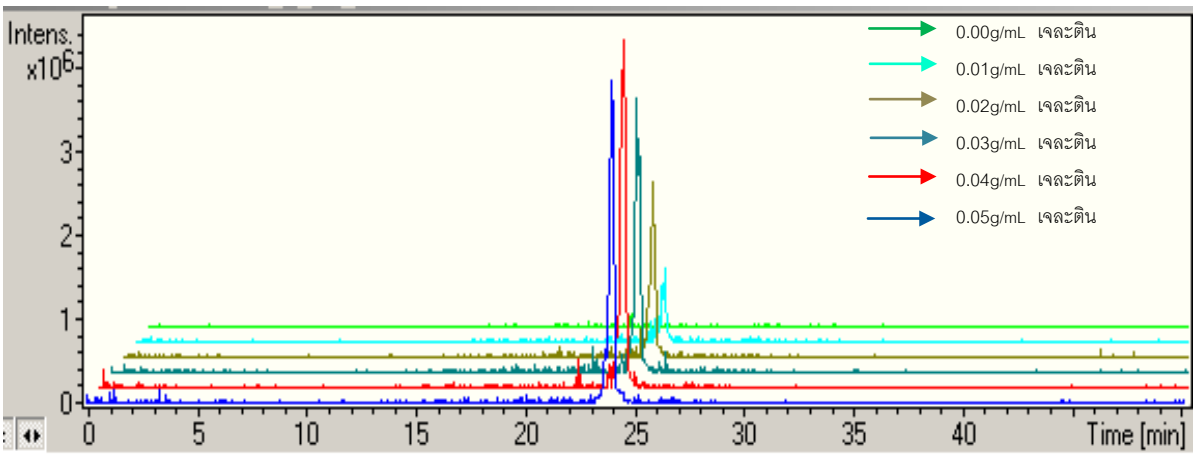
หลังจากนั้นนำกรดเข้มข้น 10% ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมนี้ไปตกตะกอนเคซีนในนมยูเอชทีรสจืดผสมเจละตินที่ความเข้มข้น 0.01 – 0.05 g/mL หลังจากนั้นจึงตกตะกอนเจละตินต่อ

ด้วยเอธานอล หากเห็นตะกอนไม่ชัดเจนให้เป่าด้วยไนโตรเจนและให้ความร้อนที่ 60 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นสภาวะที่ไม่ทำให้เจละตินเสียสภาพไป เนื่องจากโมเลกุลของโปรตีนเจละตินมีความคงตัวต่อความร้อน โดยในโมเลกุลมีกรดอะ-มิโนโพรลีนและไฮดรอกซีโพรลีนเป็นจำนวนมาก ทำให้เกิดพันธะไฮโดรเจนทั้งภายในโมเลกุลและระหว่างโมเลกุลเป็นจำนวนมากด้วย โครงสร้างของโมเลกุลจึงมีความคงตัวสูงและต้องใช้พลังงานความร้อนเป็นจำนวนมากในการทำลายพันธะไฮโดรเจนดังกล่าว (นิธิยา รัตนาปนนท์, 2545) หลังจากนั้นนำตะกอนที่ได้ไปวัดปริมาณโปรตีน ได้ผลดังตารางที่ 4.3 โดยโปรตีนก่อนการตกตะกอนด้วยอะซิติกจะลดลงตามสัดส่วนของปริมาณนมซึ่งเป็นโปรตีนหลัก หลังจากตกตะกอนเคซีนออกแล้ว จะเห็นว่าปริมาณโปรตีนจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของเจละตินที่เติมลงไป

เมื่อทำการย่อยตะกอนเจละตินและศึกษาต่อด้วยเทคนิค LC/MS/MS จะได้โครมาโทแกรมดังภาพที่ 4.8 และให้สเปคตรัมดังภาพที่ 4.9A และ 4.9B โดยภาพที่ 4.9A นั้น เมื่อทำการ Extracted chromatogram ที่ 915 และ 1044 m/z จะไม่พบพีกดังกล่าวปรากฏขึ้น นั่นหมายถึงที่ ion ดังกล่าวจำเพาะเจาะจงกับเจละตินเท่านั้น ดังภาพที่ 4.10A และ 4.10B เป็นผลจากการสกัดนมผสมเจละติน 0.04 g/ml ซึ่งจะเห็น marker ion ดังกล่าวปรากฏอย่างชัดเจน

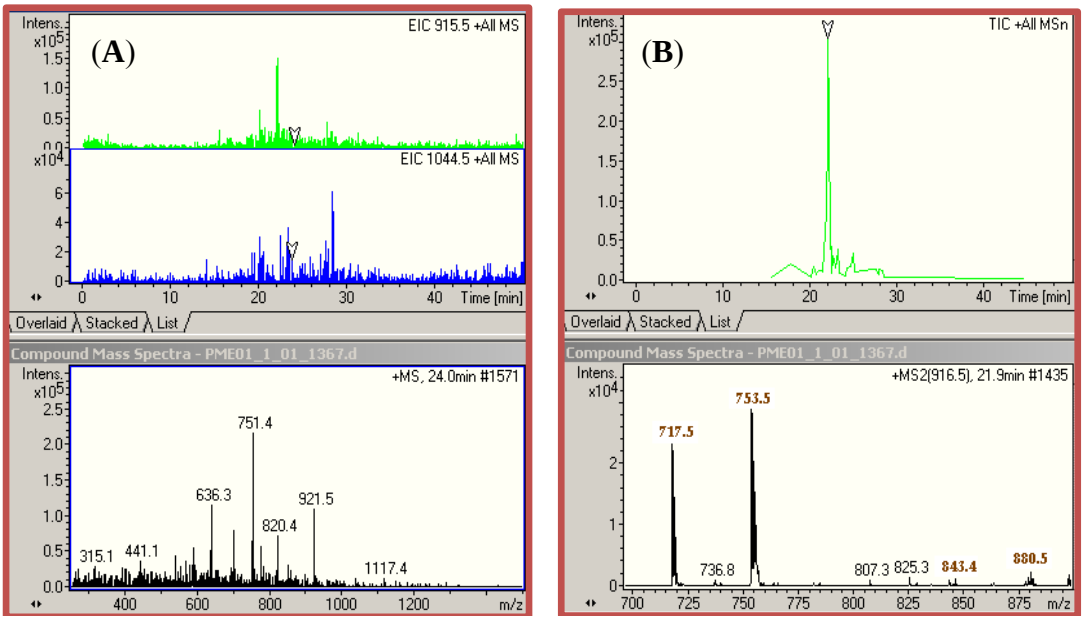
ตารางที่ 4.3 ปริมาณโปรตีนในนมยูเอชทีรสจืดผสมเจละติน ก่อนและหลังจากตกตะกอนด้วยกรดอะซิติกและเอธานอลที่ความเข้มข้นของเจละตินต่างๆกัน

ลำดับที่	ความเข้มข้นเจละติน (g/mL)	ปริมาณโปรตีน(μg/μL)	
		ก่อน	หลัง
1	0.00	11.23±0.01	0.44±0.02
2	0.01	10.11±0.02	0.50±0.01
3	0.02	10.05±0.01	0.56±0.01
4	0.03	9.71±0.02	0.56±0.01
5	0.04	8.87±0.03	0.55±0.03
6	0.05	7.27±0.01	0.50±0.03

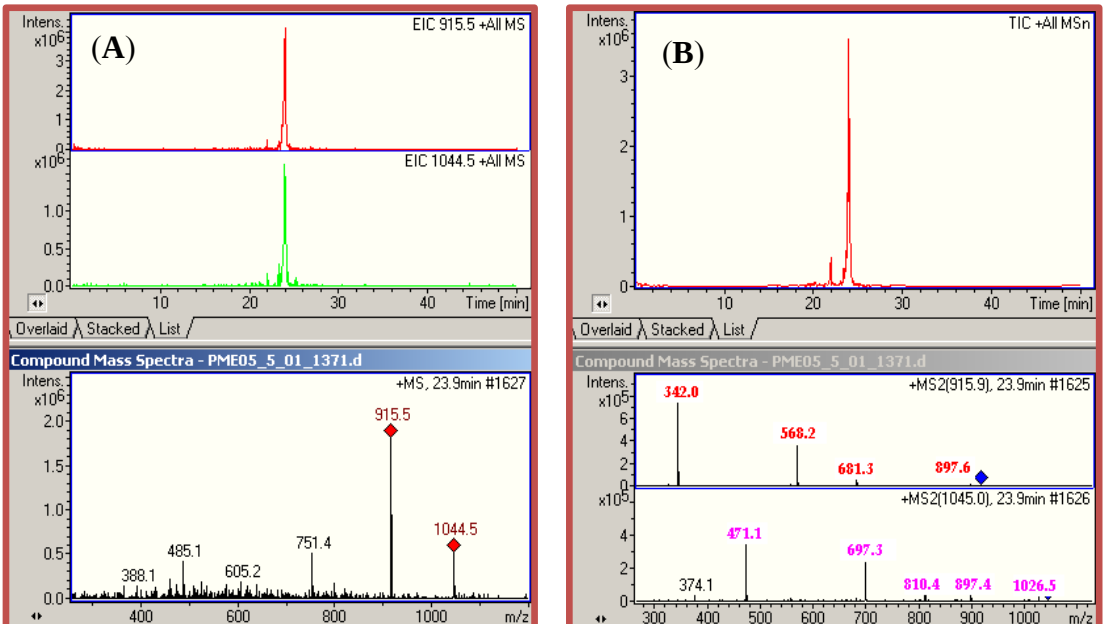


ภาพที่ 4.8 การเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของเจละตินมาตรฐานจากสุกร ที่สกัดจากนมยูเอชทีรสจืดผสมเจละติน 0.00-0.05 g/mL และย่อยด้วย 6M HCl

การตกตะกอนเจละตินด้วยเอธานอลในตัวอย่างอาหารที่ไม่ซับซ้อนได้แก่ วุ้นเจละตินและการตกตะกอนเคซีนด้วยกรดอะซิติกในนมยูเอชทีรสจืดพร้อมกับตกตะกอนเจละตินต่อด้วยเอธานอลนั้น นับว่าเป็นวิธีที่สามารถประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์อาหารได้โดยไม่ทำลายสารตัวอย่าง



ภาพที่ 4.9 โครมาโทแกรมและสเปคตรัมของนมยูเอชทีรสจืด (A) Extracted ion chromatogram ของ 915 m/z และ 1044m/z (บน) และ MS Spectrum (ล่าง) (B) Total ion chromatogram (ms/ms) (บน) และ MS/MS Spectrum (ล่าง)

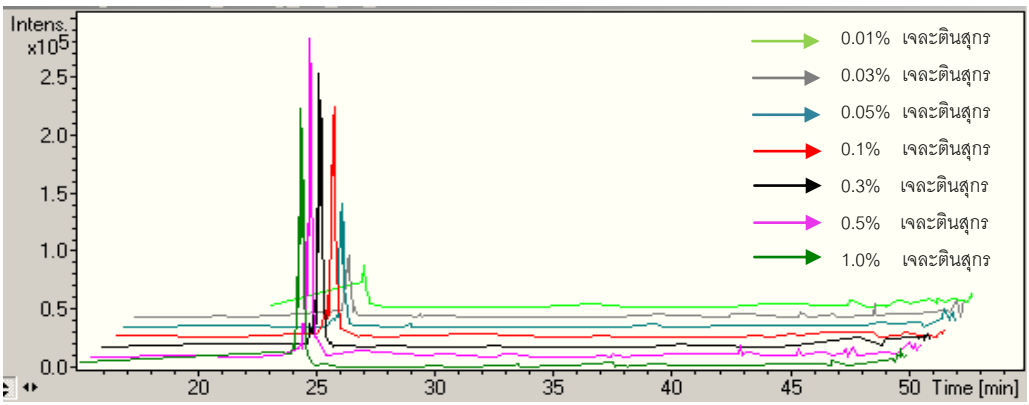


ภาพที่ 4.10 โครมาโทแกรมและสเปคตรัมของนมยูเอชทีรสจืดผสมเจละตินสุกรความเข้มข้น 0.04g/mL (A) Extracted ion chromatogram ของ 915 m/z และ 1044m/z (บน) และ MS Spectrum (ล่าง) (B) Total ion chromatogram (ms/ms) (บน) และ MS/MS Spectrum (ล่าง)

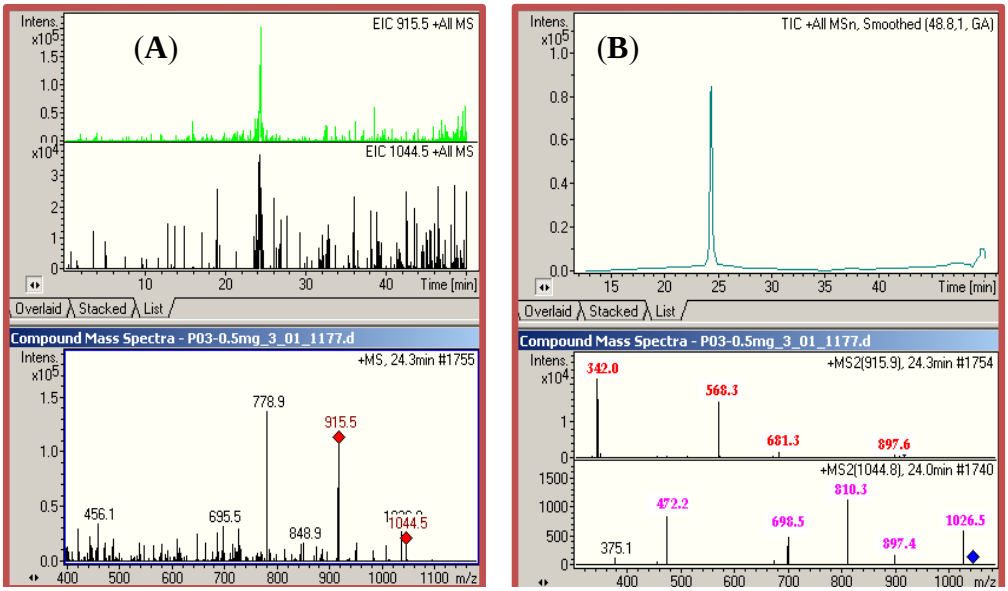
4.2 การศึกษาความแตกต่างของเจละตินจากสุกร วัว และปลา ด้วยเทคนิค LC/MS/MS

4.2.1 การหาปริมาณของเจละตินสุกรที่เหมาะสมและปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้

จากการศึกษาหาปริมาณต่ำสุดและปริมาณที่เหมาะสมของเจละตินสุกร เมื่อทำการแปรความเข้มข้นที่ระดับต่างๆ 7 ระดับ ได้โครมาโทแกรมดังภาพที่ 4.11 จะเห็นว่าความเข้มของพีกเพิ่มขึ้นตามปริมาณเจละตินที่เพิ่มขึ้น และพบว่าที่ความเข้มข้น 0.05% ของเจละตินสุกรนั้น จะเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดได้ด้วยเทคนิคนี้ โดยพิจารณาจากค่า S/N ratio ซึ่งจะพิจารณาจากการแตกตัวแล้วให้ ion ตามที่ได้กล่าวไปแล้วในข้างต้น และที่ความเข้มข้น 0.5% จะเป็นปริมาณที่มีความเหมาะสม โดยให้สเปคตรัมที่มีความชัดเจนและให้ค่า S/N ratio ที่สูง ดังภาพที่ 4.12A และ 4.12B และ 4.13A และ 4.13B ตามลำดับ

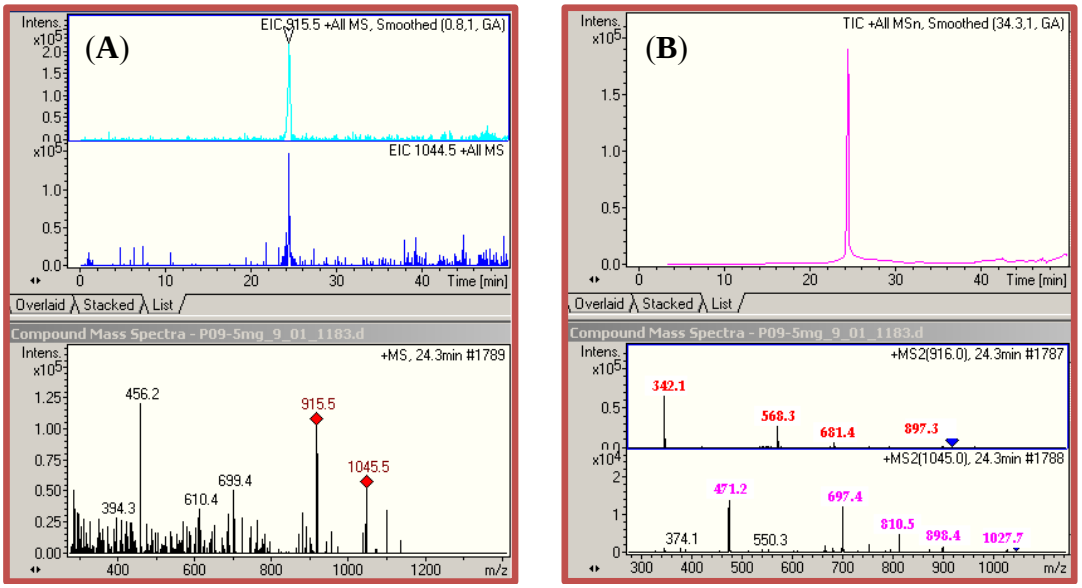


ภาพที่ 4.11 การเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของเจละตินสุกรที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกัน



ภาพที่ 4.12 โครมาโทแกรมและสเปคตรัมของเจละตินสุกรความเข้มข้น 0.05%

(A) Extracted ion chromatogram ของ 915 m/z และ 1044m/z (บน) และ MS Spectrum (ล่าง) (B) Total ion chromatogram (ms/ms) (บน) และ MS/MS Spectrum (ล่าง)

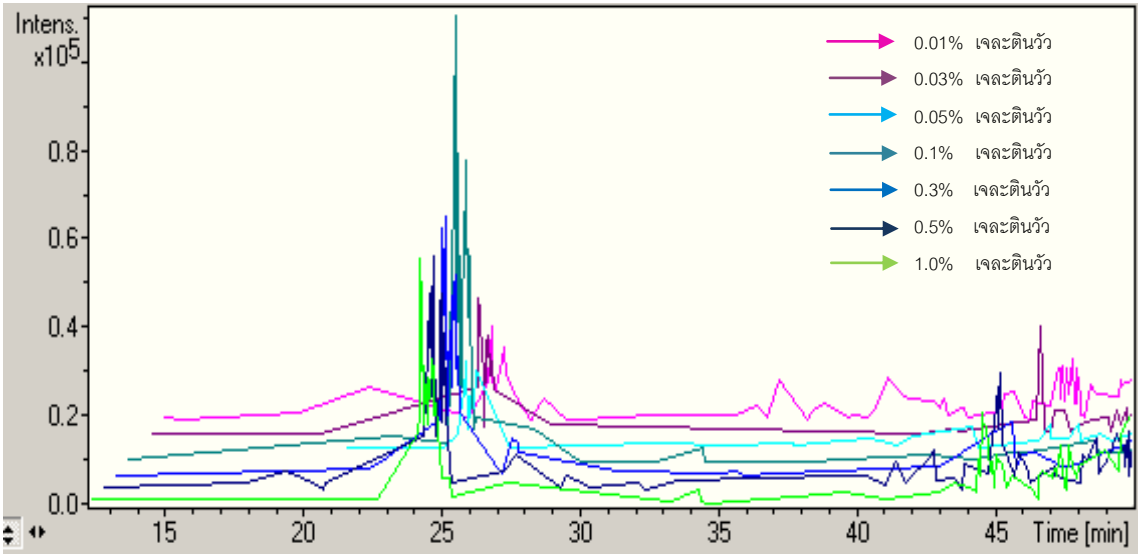


ภาพที่ 4.13 โครมาโทแกรมและสเปคตรัมของเจละตินสุกรความเข้มข้น 0.5% (A) Extracted ion chromatogram ของ 915 m/z และ 1044m/z (บน) และ MS Spectrum (ล่าง) (B) Total ion chromatogram (ms/ms) (บน) และ MS/MS Spectrum (ล่าง)

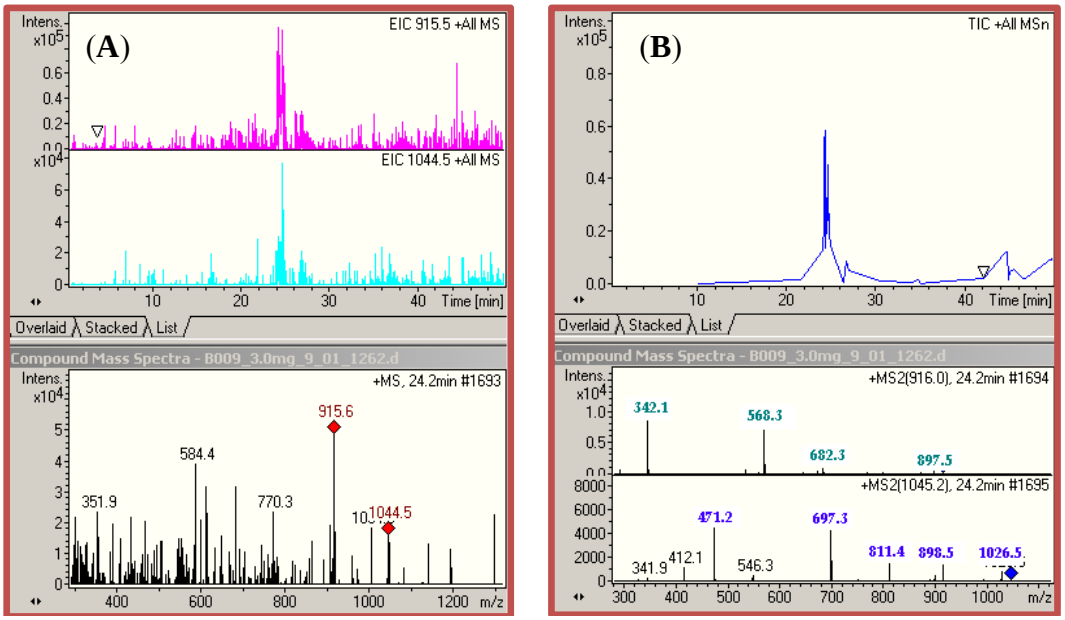
4.2.2 การศึกษา Marker ion ของเจละตินวัว ปริมาณที่เหมาะสมและปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้

จากการนำเทคนิคดังกล่าวมาศึกษาต่อในเจละตินวัวนั้นพบว่า เมื่อทำการ Extracted chromatogram ที่ 915 และ 1044 m/z จะปรากฏพีกดังกล่าว แต่ไม่ชัดเจนเท่าเจละตินสุกรดังภาพที่ 4.14 เป็นการเปรียบเทียบที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกัน เมื่อพิจารณารายละเอียดดังภาพที่ 4.15A และ 4.15B นั้นเห็นว่า จะให้ ion ที่ 915 และ 1044 m/z และเมื่อทำการแตกตัว ion ทั้งสองก็จะได้รายละเอียดเช่นเดียวกัน แต่มีค่าที่ต่ำกว่าในเจละตินสุกร

จากการศึกษาหาปริมาณต่ำสุดและปริมาณที่เหมาะสมนั้น จะเห็นว่า ที่ความเข้มข้น 0.3% จะให้ความชัดเจนของสเปคตรัมและให้ marker ion ตามที่ได้กล่าวไปแล้วในข้างต้น โดยพิจารณาจากค่า S/N ratio



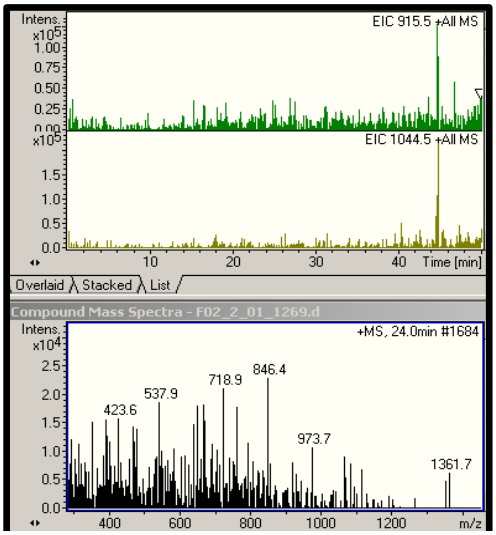
ภาพที่ 4.14 การเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของเจละตินวัวที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกัน



ภาพที่ 4.15 โครมาโทแกรมและสเปคตรัมของเจละตินวัวความเข้มข้น 0.3% (A) Extracted ion chromatogram ของ 915 m/z และ 1044m/z (บน) และ MS Spectrum (ล่าง) (B) Total ion chromatogram (ms/ms) (บน) และ MS/MS Spectrum (ล่าง)

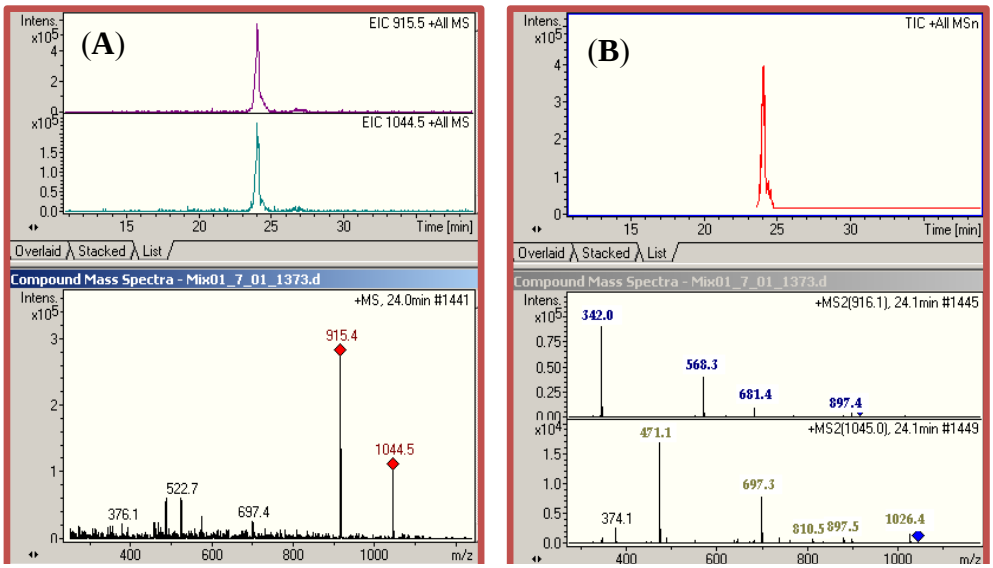
4.2.1 การศึกษา Marker ion ของเจละตินปลา ปริมาณที่เหมาะสมและต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้

สำหรับการศึกษาในเจละตินปลานั้น พบว่า เมื่อทำการ Extracted chromatogram ที่ 915 และ 1044 m/z นั้น จะไม่พบพีกและ ion ดังกล่าวขึ้น ดังภาพที่ 4.16 จึงสรุปได้ว่า marker ion ดังกล่าวจะพบในเจละตินที่มาจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเท่านั้นโดยเฉพาะสุกรและวัว



ภาพที่ 4.16 โครมาโทแกรมและสเปคตรัมของเจละตินปลา Extracted Chromatogram (บน) และ MS Spectrum (ล่าง)

4.2.2 การศึกษา Marker ion ของเจละตินผสมระหว่างสุกร วัว และปลา



ภาพที่ 4.17 โครมาโทแกรมและสเปคตรัมของเจละตินผสม (A) Extracted ion chromatogram ของ 915 m/z และ 1044m/z (บน) และ MS Spectrum (ล่าง) (B) Total ion chromatogram (ms/ms) (บน) และ MS/MS Spectrum (ล่าง)

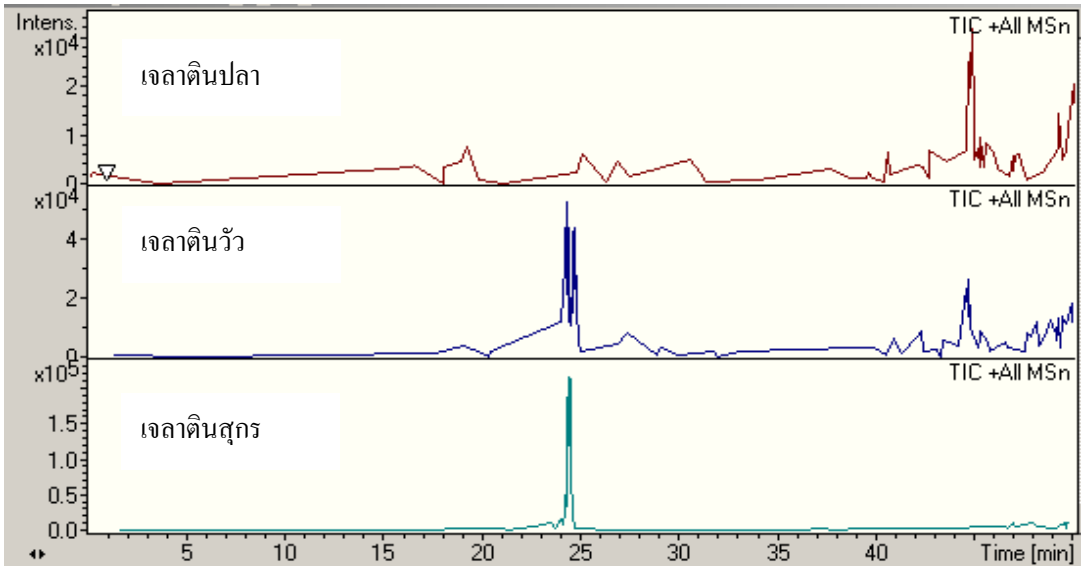
เมื่อนำเจละตินทั้ง 3 ชนิดผสมกันและวิเคราะห์ต่อด้วยเทคนิคดังกล่าวจะเห็นว่า โครมาโทแกรมและสเปคตรัมที่ได้จะมีความชัดเจนเหมือนกับเจละตินสุกรเพียงอย่างเดียว ดังภาพที่ 4.17

จากการเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของเจละตินทั้ง 3 ชนิดพบว่า เจละตินปลาจะไม่พบพีกดังกล่าว ส่วนเจละตินวัวจะปรากฏพีกแต่ไม่ชัดเจนเท่าเจละตินสุกร ดังภาพที่ 4.18 และเมื่อพิจารณาโครมาโทแกรมของเจละตินสุกรและวัวที่ความเข้มข้นเดียวกัน จะเห็นว่าเจละตินวัวมีความเข้มที่น้อยกว่าเจละตินสุกรมาก ดังภาพที่ 4.19 และพีกดังกล่าวในเจละตินวัวจะไม่ชัดเจน เมื่อทำการขยายจะพบว่าเป็นสองพีกซึ่งต่างจากเจละตินสุกรที่พบเพียงพีกเดียว ดังภาพที่ 4.20

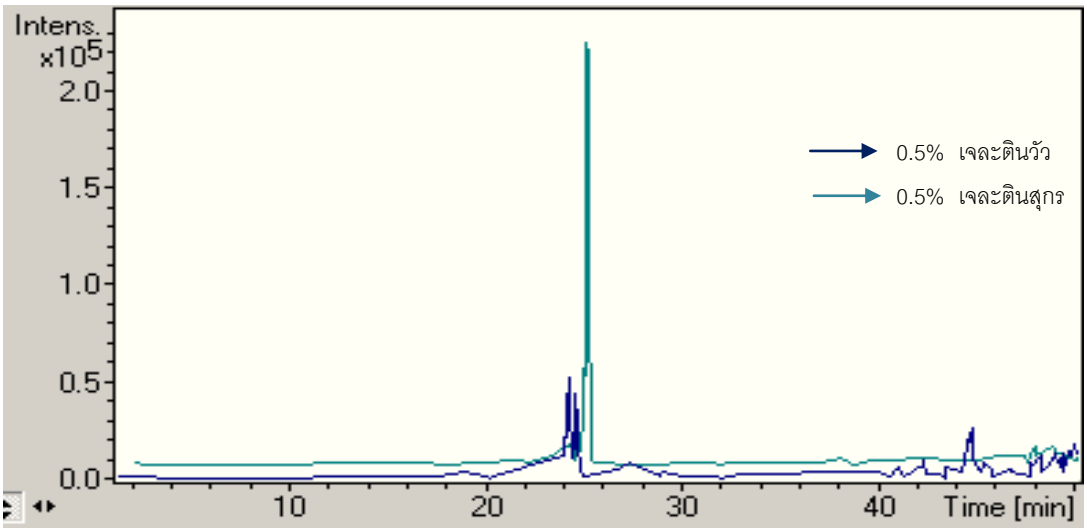
ความแตกต่างของเจละตินทั้ง 3 ชนิด เกิดจากองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่ต่างกัน ดังตารางที่ 2.3 (Haug และคณะ, 2004) การจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนบนสายพอลีเปปไทด์ในเจละตินแต่ละชนิดแตกต่างกัน ความแตกต่างที่เห็นได้ชัดเจนนั่นคือปริมาณของกรดอะมิโนโพรลีนและไฮดรอกซีโพรลีน ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมสูงกว่าในเจละตินปลา (Chiou และคณะ, 2006) จึงทำให้เจละตินสุกรและวัว แตกต่างจากเจละตินปลา โดย marker ion ที่ 915 และ 1044 m/z นั้นหมายถึงน้ำหนักโมเลกุลของเปปไทด์สายสั้นที่ได้จากการย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก ซึ่งจะประกอบด้วยกรดอะมิโนต่างกัน และ ion ดังกล่าวสามารถพบได้ในทุกการทดลองของเจละตินสุกรและวัว จึงสรุปได้ว่า ion ทั้งสองเป็น marker ion หรือตัวบ่งชี้ของเจละตินจากสุกรและวัว ดังนั้นจากงานวิจัยนี้สามารถแยกหรือระบุชนิดเจละตินจากสุกรและวัวออกจากเจละตินปลาได้อย่างชัดเจน

Avena-Bustillos และคณะ (2006); Solgarrd และคณะ (2008) ได้กล่าวว่าคอลลาเจนปลามีปริมาณกรดอะมิโนโพรลีนและไฮดรอกซีโพรลีน ต่ำกว่าคอลลาเจนจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เป็นผลทำให้เกิดการเสียสภาพที่อุณหภูมิต่ำกว่า และทำให้อุณหภูมิการเกิดเจลของเจละตินทั้งสองชนิดต่างกัน และ Raja Mohd Hafidz และคณะ (2011) กล่าวว่า เจละตินสุกรนั้นจะมีปริมาณกรดอะมิโนไทโรซีนและซีรีนสูงกว่าเจละตินวัวซึ่งมีหมู่ไฮดรอกซิลอิสระที่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนได้ ความแตกต่างของปริมาณกรดอะมิโนเหล่านี้จึงเป็นสาเหตุของผลการทดลองที่แตกต่างกันได้ นอกจากปริมาณกรดอะมิโนแล้วน้ำหนักโมเลกุลของเจละตินก็มีผลต่อการทดลองและสมบัติของเจละตินเช่นเดียวกัน (Aewsiri และ คณะ, 2008 ; Gomez-Estaca และคณะ, 2008)

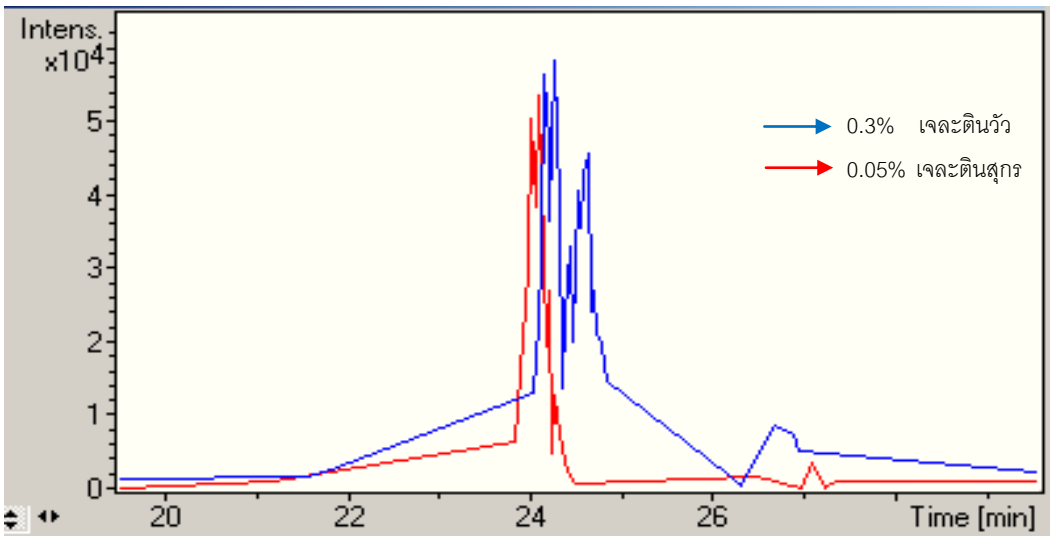
จากการจำลองวุ้นเจละตินจากเจละตินมาตรฐานสุกร วัว และปลานั้น พบว่าที่ความเข้มข้นเดียวกัน การเซตตัวเป็นเจลของเจละตินแต่ละชนิดมีความต่างกันทั้งเวลาและอุณหภูมิ โดยเฉพาะเจละตินปลาจะไม่เกิดการเซตตัวเป็นเจลที่ทุกระดับความเข้มข้น ซึ่งมีรายงานการวิจัยของ Leuenberger (1991) กล่าวว่า เจละตินปลาจะเกิดเจลที่อุณหภูมิต่ำกว่าเจละตินจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เนื่องจากมีปริมาณกรดอิมิโนที่ต่ำกว่า



ภาพที่ 4.18 การเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของเจละตินสุกร วัว และปลา



ภาพที่ 4.19 การเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของเจละตินสุกรและวัวที่ความเข้มข้น 0.5%



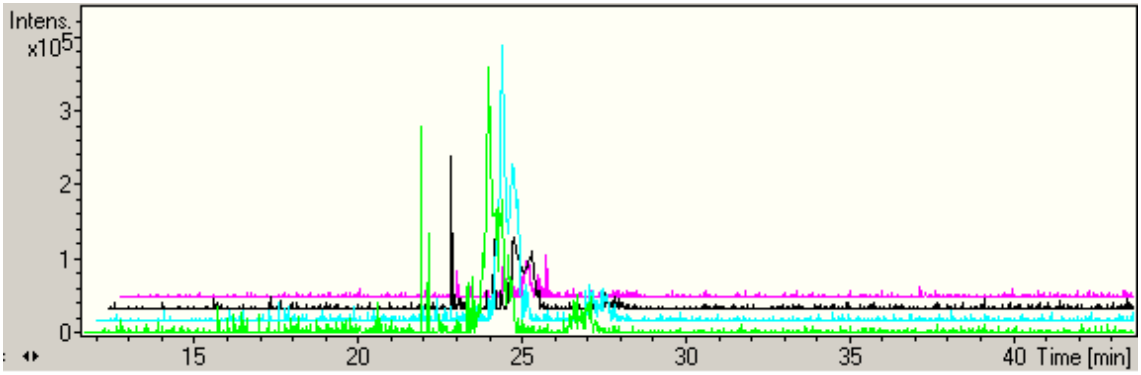
ภาพที่ 4.20 การเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของเจละตินสุกรและวัวที่ความเข้มข้น 0.05% และ 0.3% ตามลำดับ

4.3 การวิเคราะห์เจละตินในตัวอย่างอาหาร

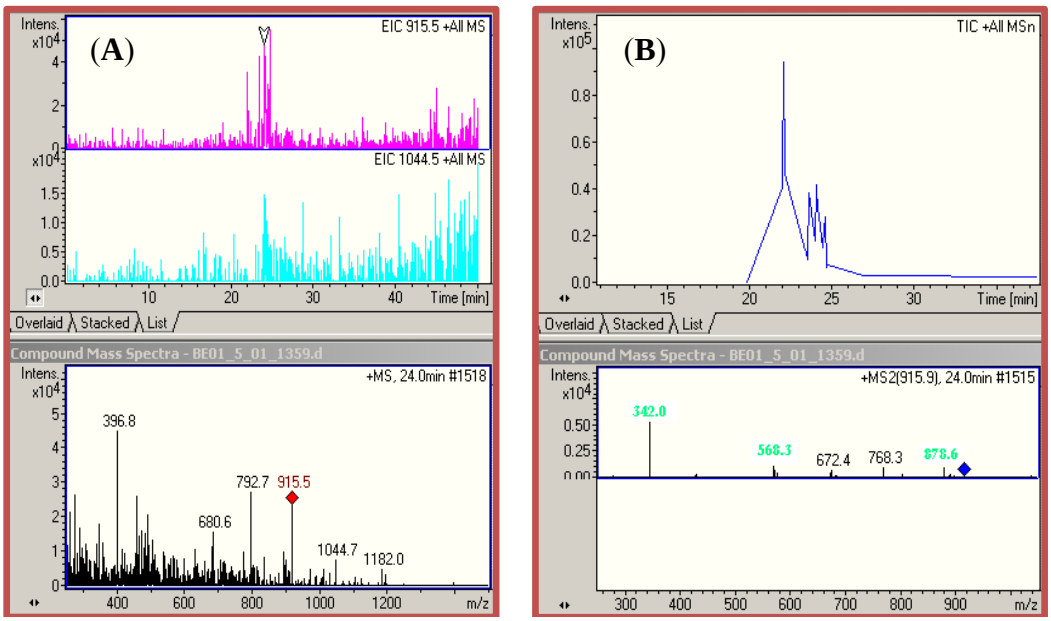
4.3.1 ตัวอย่างอาหารที่จำลองขึ้น

4.3.1.1 วุ้นเจละตินวัว

งานวิจัยนี้ได้ทำการทดลองกับเจละตินวัวและปลา เพื่อเป็นการยืนยันเทคนิคการสกัดทั้งในองค์ประกอบไม่ซับซ้อนได้แก่วุ้นเจละติน และองค์ประกอบซับซ้อนโดยมีองค์ประกอบของโปรตีน ไขมัน อยู่ในผลิตภัณฑ์ ได้แก่ผลิตภัณฑ์นม พบว่าสามารถสกัดเจละตินจากทั้งสองผลิตภัณฑ์ได้ หลังจากนั้นนำตะกอนที่ได้ไปย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6M เป็นเวลานาน 40 นาที จะให้ลักษณะของโครมาโทแกรมและสเปคตรัมเหมือนกับเจละตินมาตรฐานที่ไม่ผ่านการสกัด ดังภาพที่ 4.21 เป็นการเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของวุ้นเจละตินวัวที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 5-20% จะเห็นว่าที่ความเข้มข้น 5% ของเจละตินวัวจะให้สเปคตรัมที่ไม่ชัดเจน ดังภาพที่ 4.22A และ 4.22Bแต่จะชัดเจนขึ้นเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้นดังภาพที่ 4.23A และ 4.23B แต่ในเจละตินปลาก็จะไม่พบ marker ion ดังกล่าว ดังภาพที่ 4.24



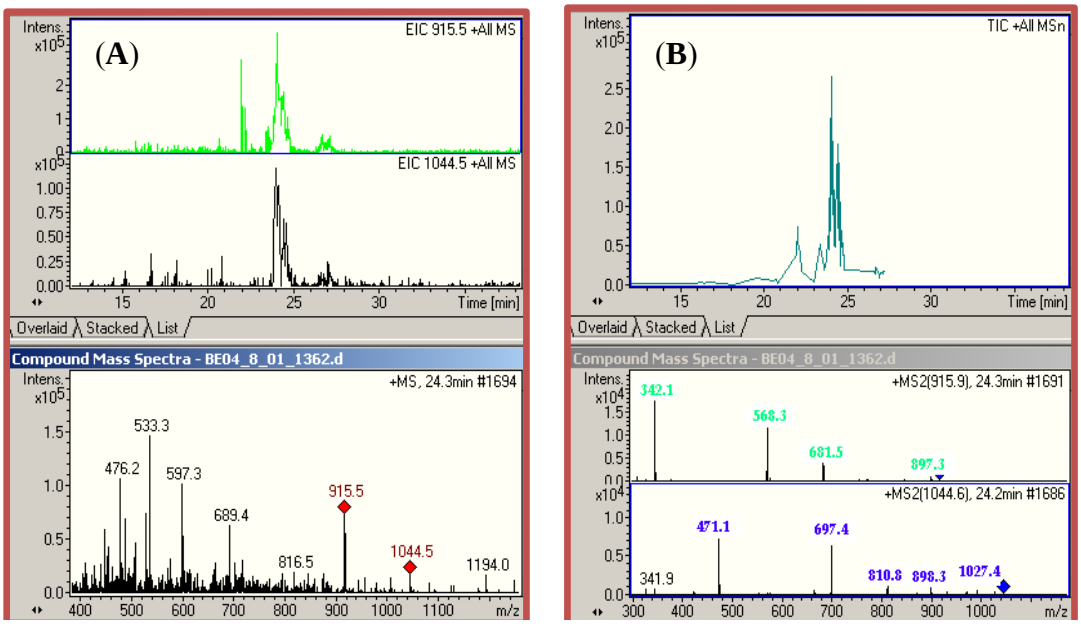
ภาพที่ 4.21 การเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของเจละตินวัว ที่สกัดจากวุ้นเจละติน 0.01-0.04g/mL



ภาพที่ 4.22 โครมาโทแกรมและสเปคตรัมของวุ้นเจละตินวัวความเข้มข้น 0.01g/mL

(A) Extracted ion chromatogram ของ 915 m/z และ 1044m/z (บน) และ MS Spectrum (ล่าง)

(B) Total ion chromatogram (ms/ms) (บน) และ MS/MS Spectrum (ล่าง)

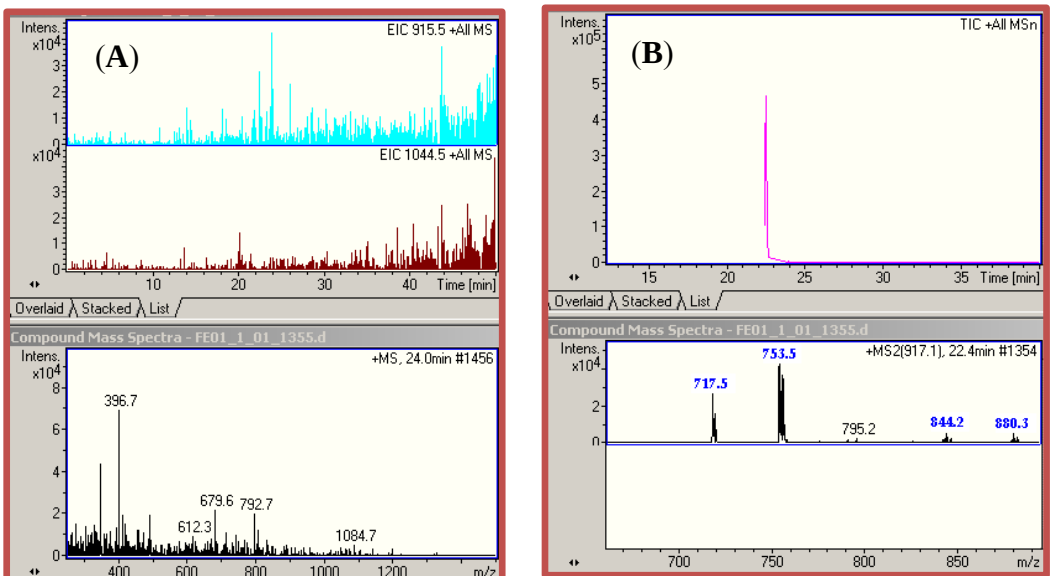


ภาพที่ 4.23 โครมาโทแกรมและสเปคตรัมของวุ้นเจละตินวัวความเข้มข้น 0.01g/mL

(A) Extracted ion chromatogram ของ 915 m/z และ 1044m/z (บน) และ MS Spectrum (ล่าง)

(B) Total ion chromatogram (ms/ms) (บน) และ MS/MS Spectrum (ล่าง)

4.3.1.2 วุ้นเจละตินปลา



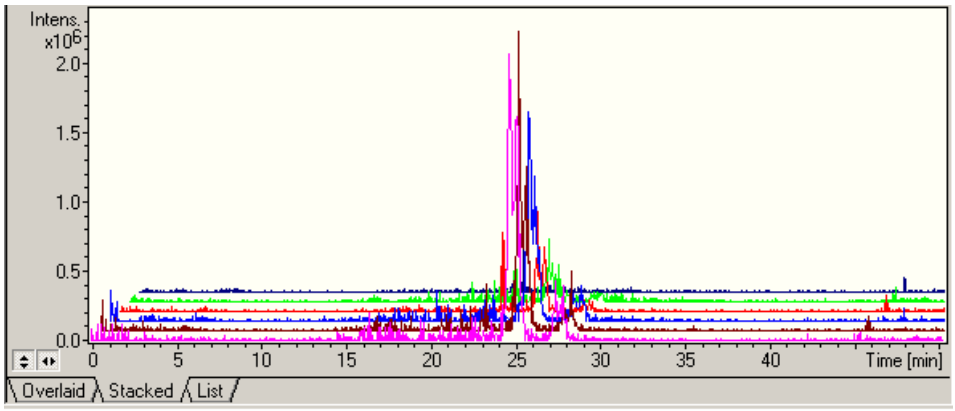
ภาพที่ 4.24 โครมาโทแกรมและสเปคตรัมของวุ้นเจละตินปลาความเข้มข้น 0.01g/mL

(A) Extracted ion chromatogram ของ 915 m/z และ 1044m/z (บน) และ MS Spectrum (ล่าง)

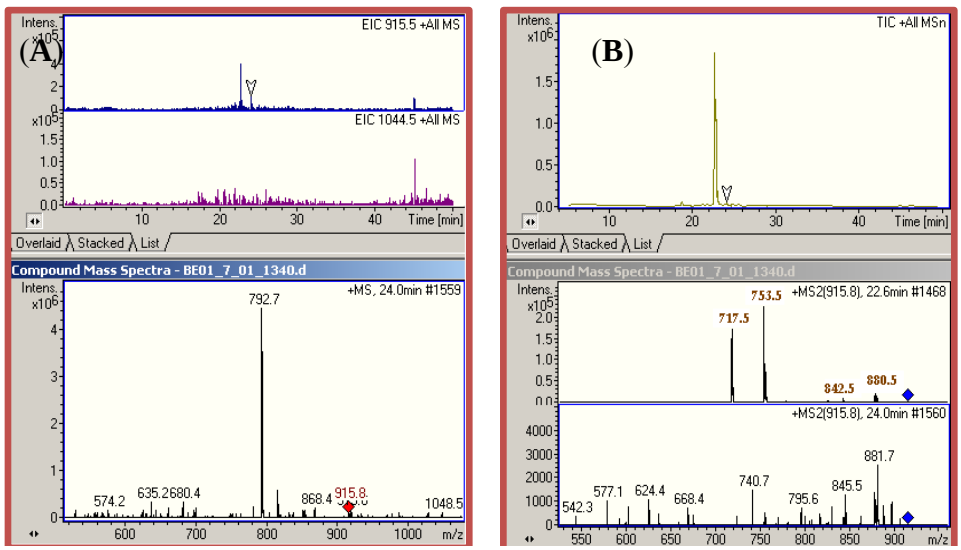
(B) Total ion chromatogram (ms/ms) (บน) และ MS/MS Spectrum (ล่าง)

4.3.1.3 นมยูเอชทีรสจืดผสมเจละตินวัว

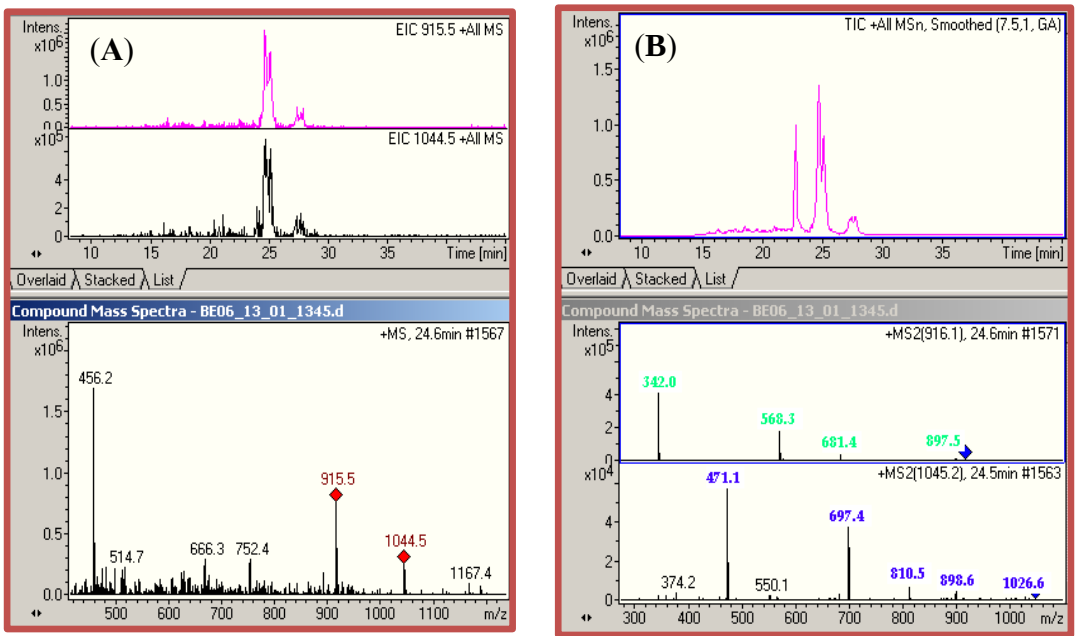
ในการทดลองในผลิตภัณฑ์นมผสมเจละตินวัวนั้น พบว่านมที่ไม่ผสมเจละตินนั้นไม่พบ marker ion ที่ 915 และ 1044 m/z ดังภาพที่ 4.26A และ 4.26B และจะพบ marker ion ได้เมื่อมีการผสมเจละตินที่ทุกความเข้มข้น ดังภาพที่ 4.26 เป็นการเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของนมผสมเจละตินที่ความเข้มข้นต่างๆกัน เมื่อสังเกตที่ความเข้มข้นของเจละติน 0.05g/mL ดังภาพที่ 4.27A และ 4.27B จะเห็น marker ion ที่ชัดเจน



ภาพที่ 4.25 การเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของเจละตินวัวที่สกัดจากนมผสมเจละตินที่ความเข้มข้นต่างๆกัน



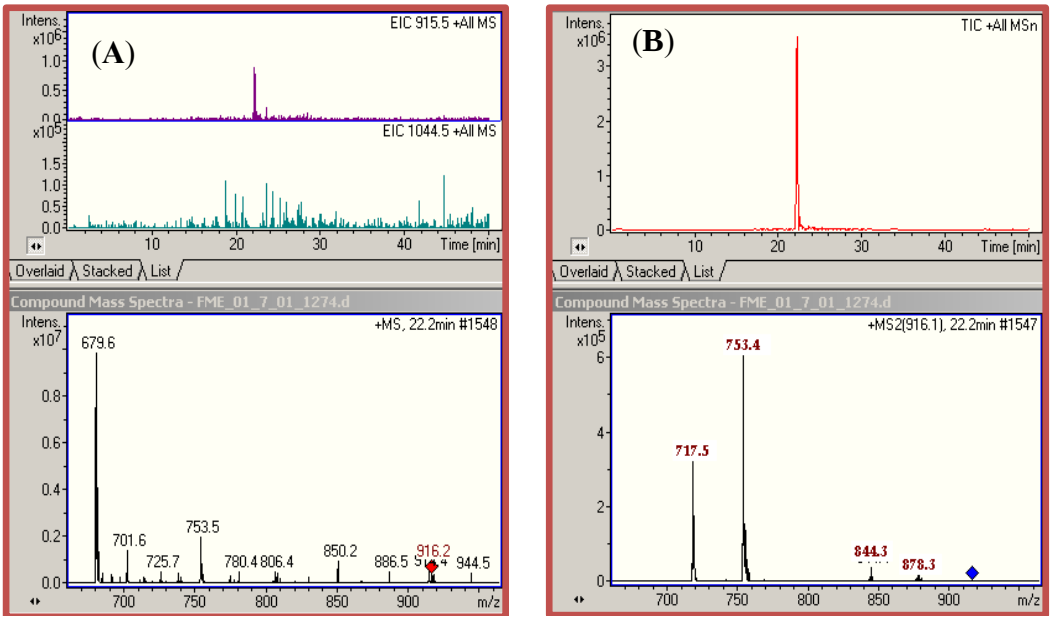
ภาพที่ 4.26 โครมาโทแกรมและสเปคตรัมของนมยูเอชทีรสจืด (A) Extracted ion chromatogram ของ 915 m/z และ 1044m/z (บน) และ MS Spectrum (ล่าง) (B) Total ion chromatogram (ms/ms) (บน) และ MS/MS Spectrum (ล่าง)



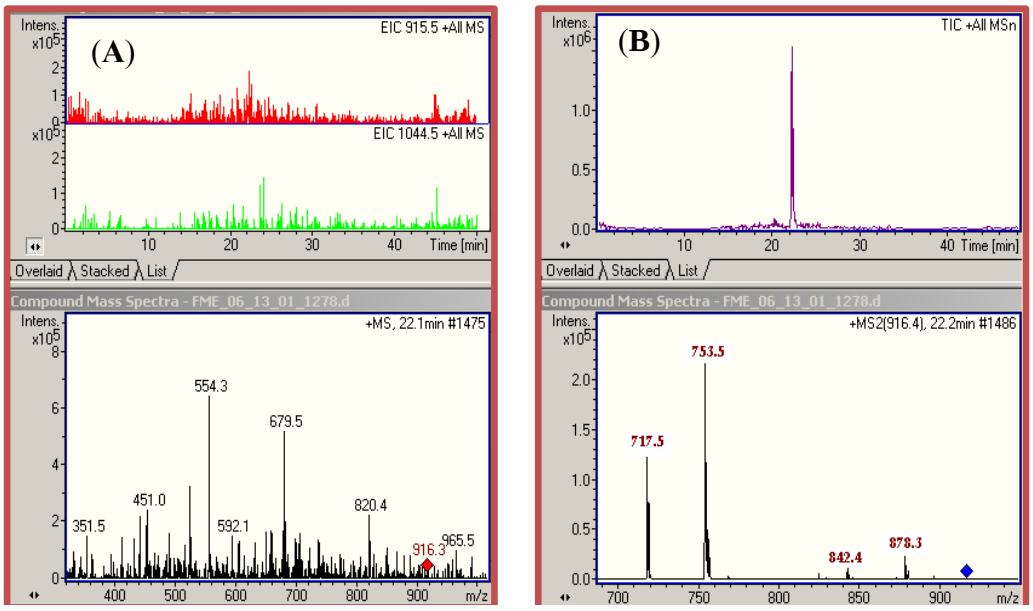
ภาพที่ 4.27 โครมาโทแกรมและสเปคตรัมของนมยูเอชทีรสจืดผสมเจละตินวัว 0.05 g/mL (A) Extracted ion chromatogram ของ 915 m/z และ 1044m/z (บน) และ MS Spectrum (ล่าง) (B) Total ion chromatogram (ms/ms) (บน) และ MS/MS Spectrum (ล่าง)

4.3.1.4 นมยูเอชทีรสจืดผสมเจละตินปลา

สำหรับนมผสมเจละตินปลานั้นก็จะไม่พบ marker ion ดังกล่าวในทุกการทดลอง ดังภาพที่ 4.28A และ 4.28B และภาพที่ 4.29A และ 4.29B จะเห็นว่ามี ion ที่ 915 m/z ปรากฏที่ retention time เท่ากับ 22.1 นาที ซึ่งเป็นคนละเวลากับพีกของเจละตินคือ 24 นาที และเมื่อทำ ms/ms จะแตกตัวให้ ion ที่ต่างจากเจละติน นั่นหมายถึง ion นั้นเป็นสารอื่นที่ไม่ใช่เจละติน และสามารถสรุปได้ว่า ion ที่ 915 m/z และแตกตัวได้เป็น 342, 568, 681 และ 897 m/z เป็นตัวบ่งชี้สำหรับโปรตีนเจละตินสุกรและวัวเท่านั้น



ภาพที่ 4.28 โครมาโทแกรมและสเปคตรัมของนมยูเอชทีรสจืด (A) Extracted ion chromatogram ของ 915 m/z และ 1044m/z (บน) และ MS Spectrum (ล่าง) (B) Total ion chromatogram (ms/ms) (บน) และ MS/MS Spectrum (ล่าง)



ภาพที่ 4.29 โครมาโทแกรมและสเปคตรัมของนมยูเอชทีรสจืดผสมเจลละตินปลา 0.05 g/mL (A) Extracted ion chromatogram ของ 915 m/z และ 1044m/z (บน) และ MS Spectrum (ล่าง) (B) Total ion chromatogram (ms/ms) (บน) และ MS/MS Spectrum (ล่าง)

4.3.2 ตัวอย่างอาหารทางการค้า

ตารางที่ 4.4 รายละเอียดตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารทางการค้า

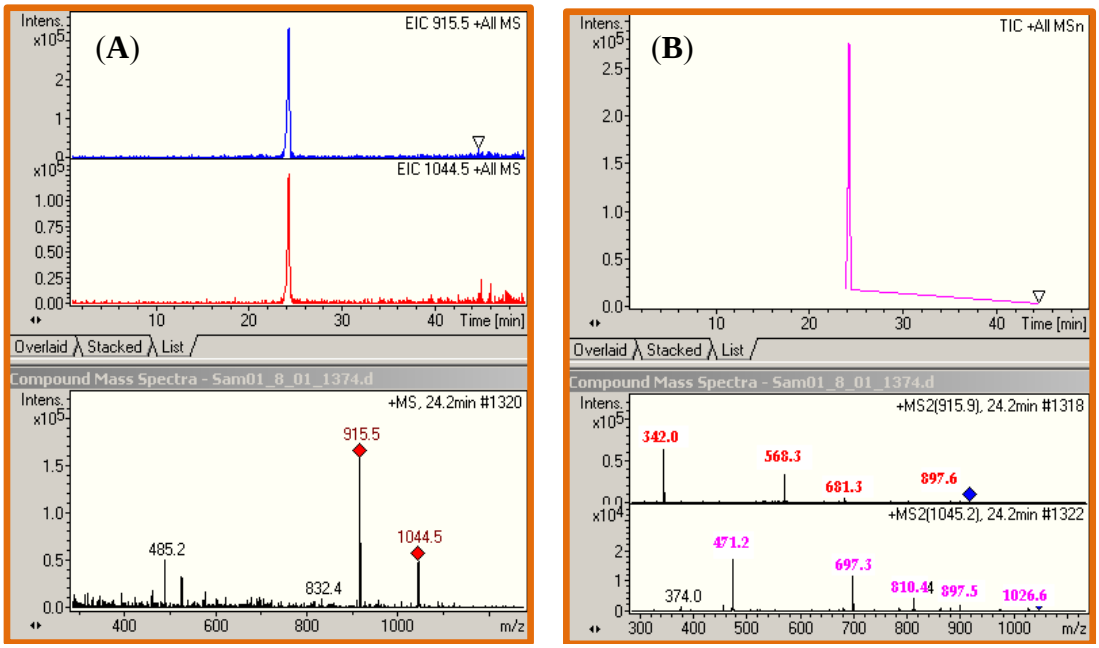
ลำดับที่	ชื่อตัวอย่าง	ประเภทตัวอย่าง	ปริมาณเจละติน/คอลลาเจน*
1	Sam 01	เจละตินแผ่น	100%
2	Sam 02	คอลลาเจนปลา	100%
3	Sam 03	นมถั่วเหลืองผสมคอลลาเจน	0.05%
4	Sam 04	เครื่องดื่มเยลลี่คาราจีแนนผสมคอลลาเจน	0.4%
5	Sam 05	เครื่องดื่มผสมคอลลาเจน	7.9%
6	Sam 06	เครื่องดื่มผสมคอลลาเจน	8.2%
7	Sam 07	เครื่องดื่มผสมคอลลาเจน	8.3%
8	Sam 08	เยลลี่เจละติน	7.5%
9	Sam 09	เยลลี่เจละติน	9%
10	Sam 10	วุ้นเจละติน	11%

*ข้อมูลจากฉลากผลิตภัณฑ์

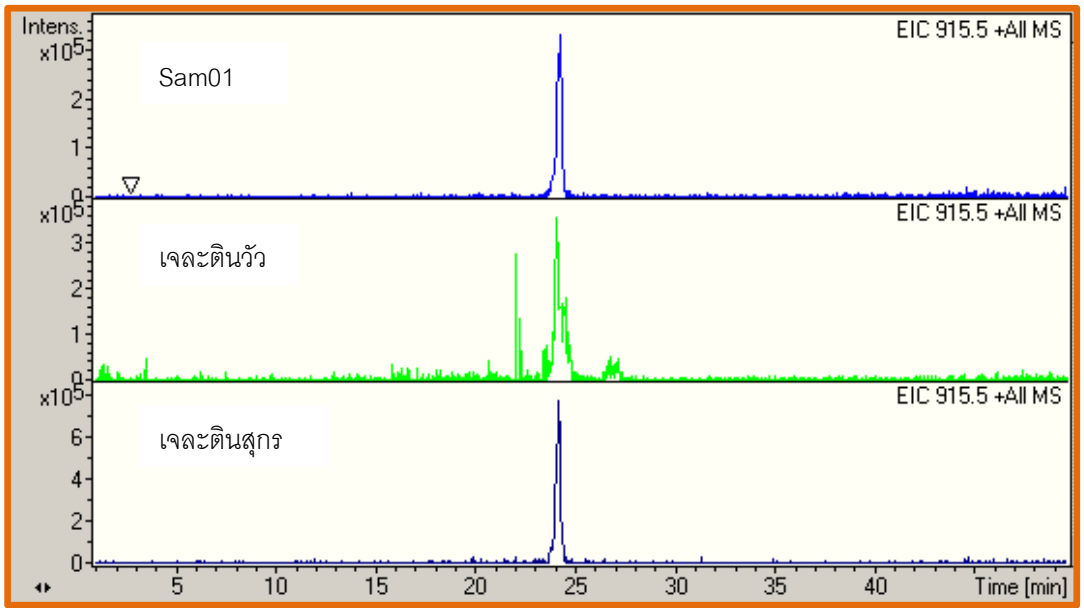
จากการทดลองในตัวอย่างอาหารทางการค้า จำนวน 10 ตัวอย่าง รายละเอียดดังตารางที่ 4.4 พบว่า มี 2 ตัวอย่างที่ให้ผลลักษณะเดียวกับเจละตินปลา คือตัวอย่าง Sam 02 และ Sam 03 ส่วนอีก 8 ตัวอย่างจะให้สเปคตรัมลักษณะเดียวกับเจละตินสุกรและ/หรือวัว โดยมีรายละเอียดบางตัวอย่างดังภาพที่ 4.30A และ 4.30B ถึงภาพที่ 4.39

เมื่อพิจารณาการเปรียบเทียบโครมาแกรมของตัวอย่างกับเจละตินสุกรและวัว เช่นในตัวอย่างที่ Sam 01 ดังภาพที่ 4.31 จะให้ลักษณะเหมือนเจละตินสุกรมากกว่าเจละตินวัว เนื่องจากให้พีกที่ชัดเจนเพียงพีกเดียว และพบว่า marker ion 915 และ 1044m/z มีความเข้มสูง เมื่อพิจารณาโครมาโทแกรมของตัวอย่างที่ Sam 10 จะเห็นว่า โครมาโทแกรมมีลักษณะเดียวกับเจละตินวัวมากกว่าเจละตินสุกร โดยมีลักษณะพีกที่ไม่ชัดเจนเป็นลักษณะ 2 พีกซ้อนกัน ดังภาพที่ 4.39 และพบว่า marker ion 915 และ 1044m/z มีความเข้มต่ำกว่า สำหรับในตัวอย่างที่ Sam 05 พบเพียง ion ที่ 915 m/z แต่เมื่อทำการแตกตัวแล้วก็ให้รายละเอียดเช่นเดียวกับเจละตินสุกรหรือวัว จึงสรุปได้ว่า ion ดังกล่าวเป็นของเจละติน แต่มีปริมาณน้อยทำให้พบแค่ ion ที่ 915 m/z เท่านั้น ดังภาพที่ 4.35A และ 4.35B สำหรับตัวอย่างที่ 5-7 นั้น พบการปนเปื้อนของเจละตินหรือคอลลาเจนจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม(สุกรและวัว) เนื่องจากในฉลากผลิตภัณฑ์ระบุว่ามีการใช้

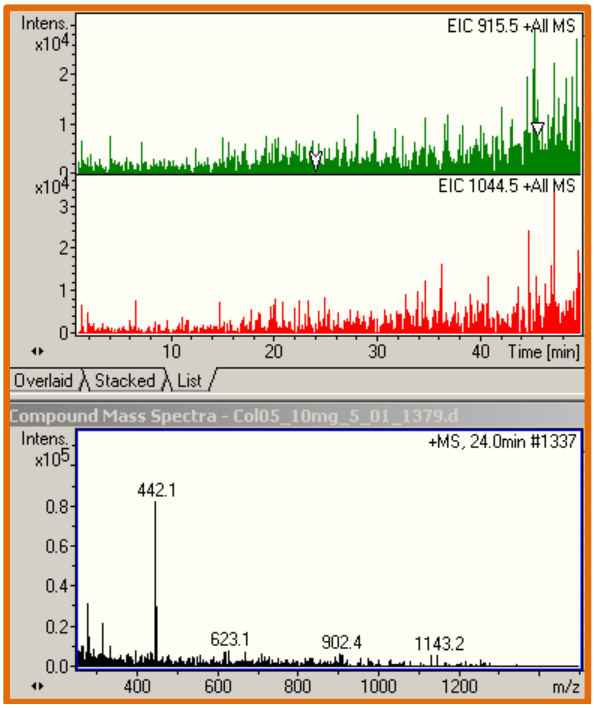
คอลลาเจนจากปลาทะเล แต่ผลการวิเคราะห์พบ marker ion 915 และ 1044m/z ที่เป็นของสุกร และ/หรือวัว ดังข้อมูลตามตารางที่ ข.1.20



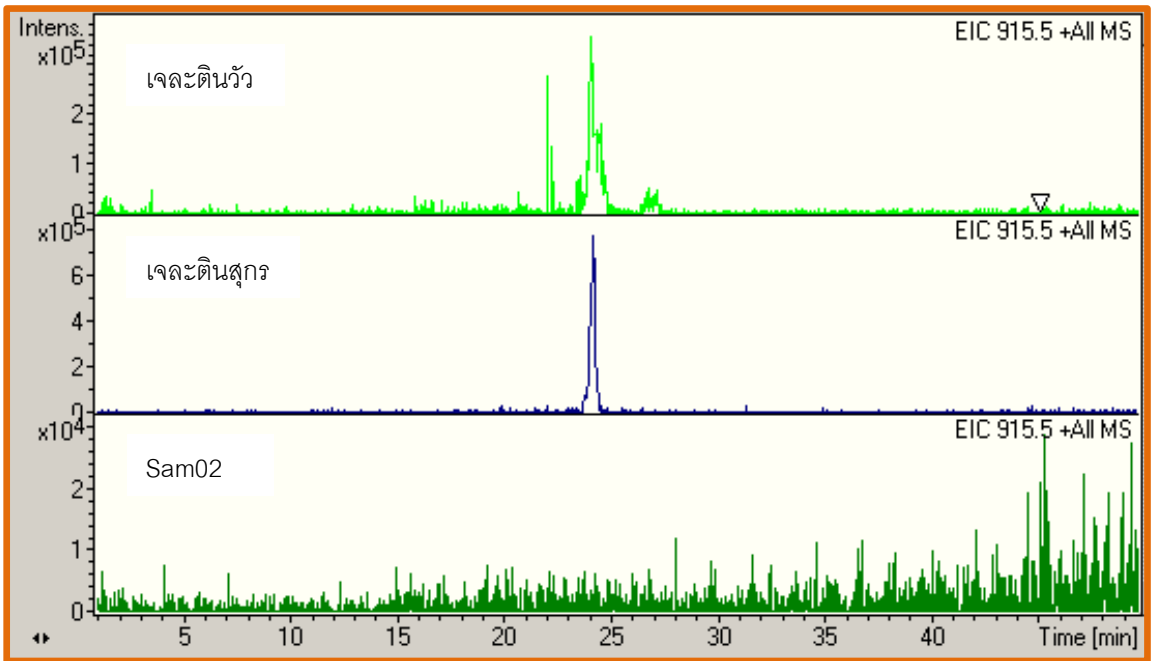
ภาพที่ 4.30 โครมาโทแกรมและสเปคตรัมของตัวอย่าง Sam01 (A) Extracted ion chromatogram ของ 915 m/z และ 1044m/z (บน) และ MS Spectrum (ล่าง) (B) Total ion chromatogram (ms/ms) (บน) และ MS/MS Spectrum (ล่าง)



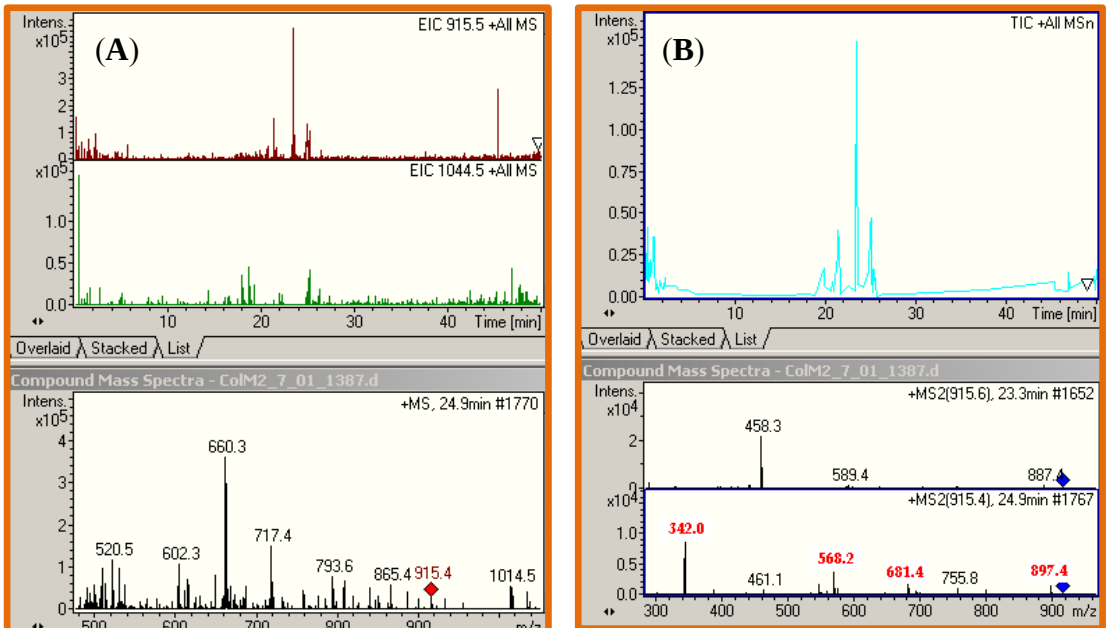
ภาพที่ 4.31 การเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของเจละตินสุกร วัว กับตัวอย่างที่ Sam01



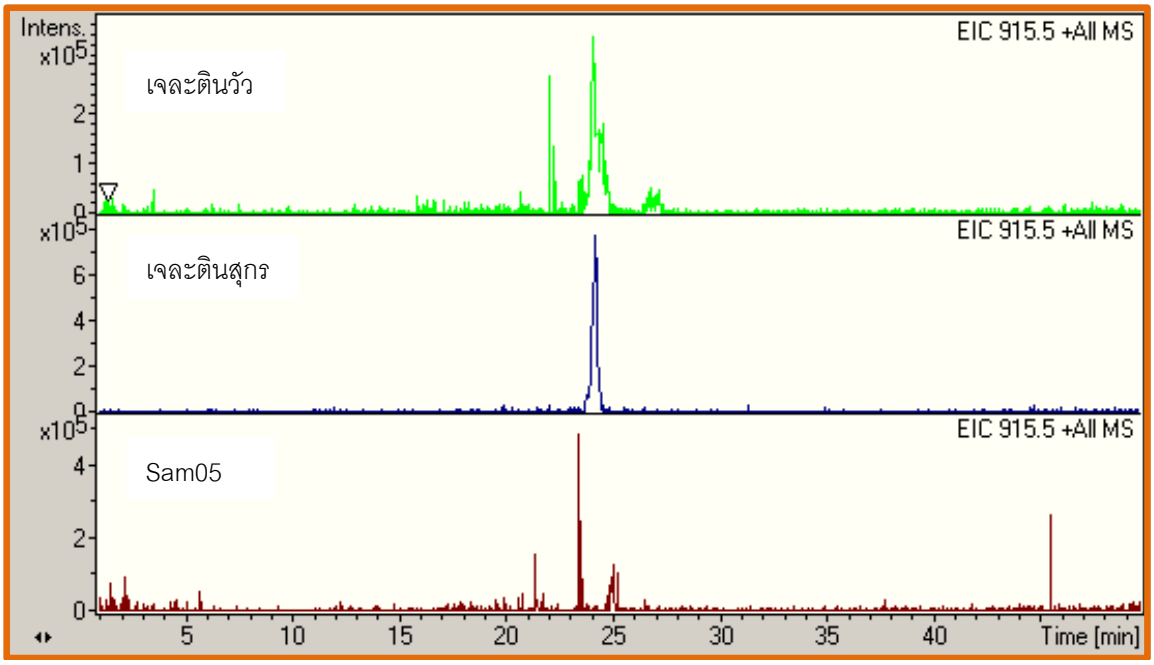
ภาพที่ 4.32 โครมาโทแกรมและสเปคตรัมของตัวอย่างที่ Sam02 : Extracted Chromatogram (บน) และ MS Spectrum (ล่าง)



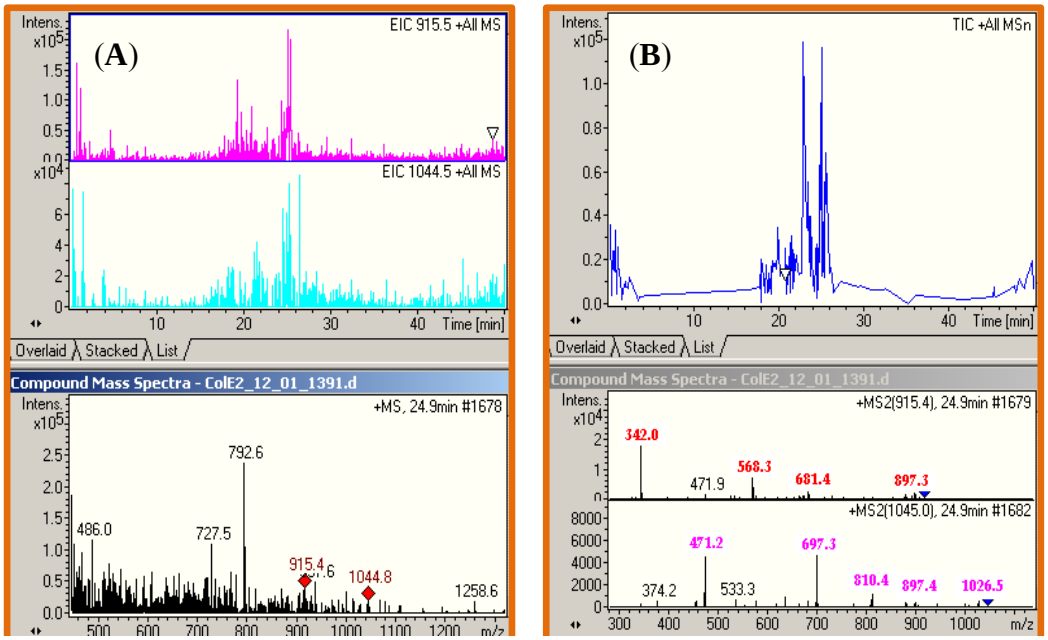
ภาพที่ 4.33 การเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของเจลละตินสุกร วัว กับตัวอย่างที่ Sam02



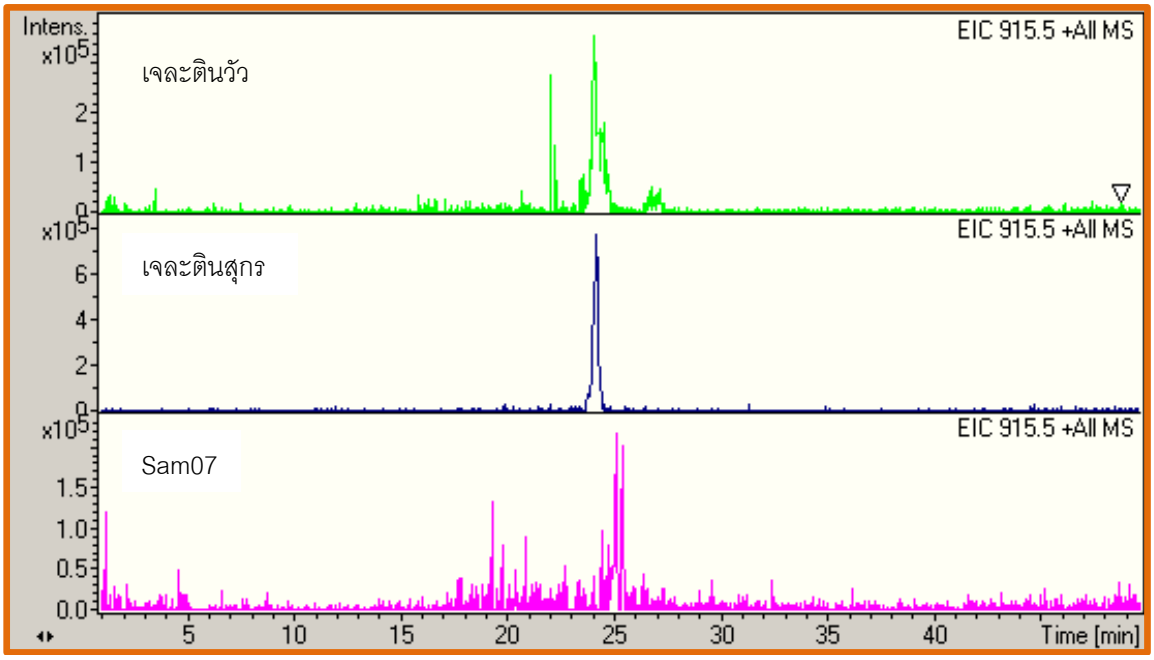
ภาพที่ 4.34 โครมาโทแกรมและสเปคตรัมของตัวอย่างที่ Sam05 (A) Extracted ion chromatogram ของ 915 m/z และ 1044m/z (บน) และ MS Spectrum (ล่าง) (B) Total ion chromatogram (ms/ms) (บน) และ MS/MS Spectrum (ล่าง)



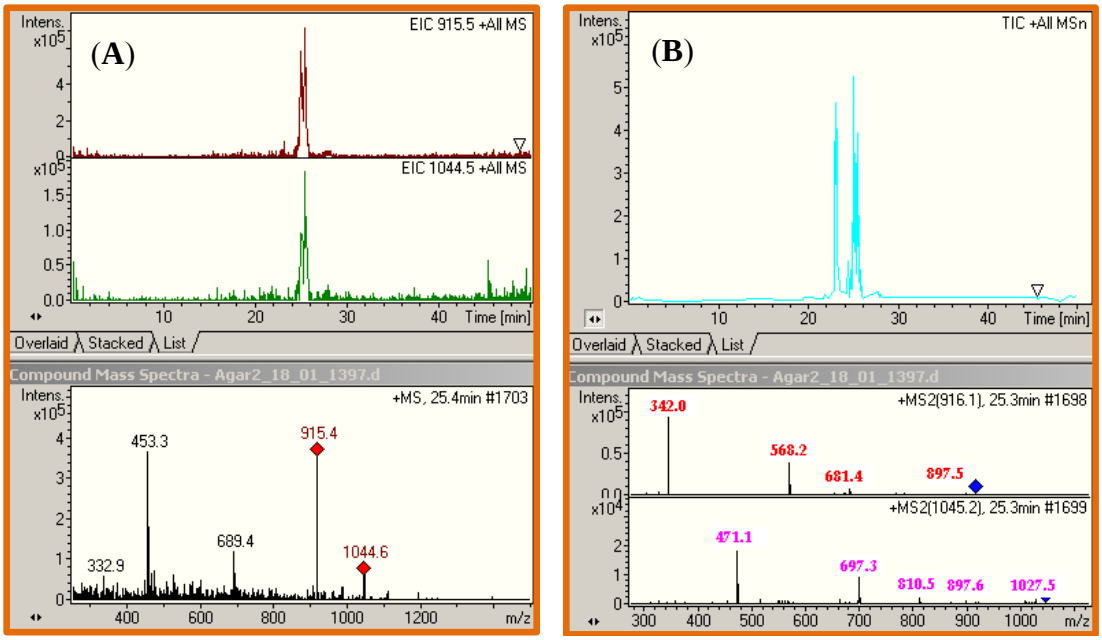
ภาพที่ 4.35 การเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของเจละตินสุกร วัว กับตัวอย่างที่ Sam05



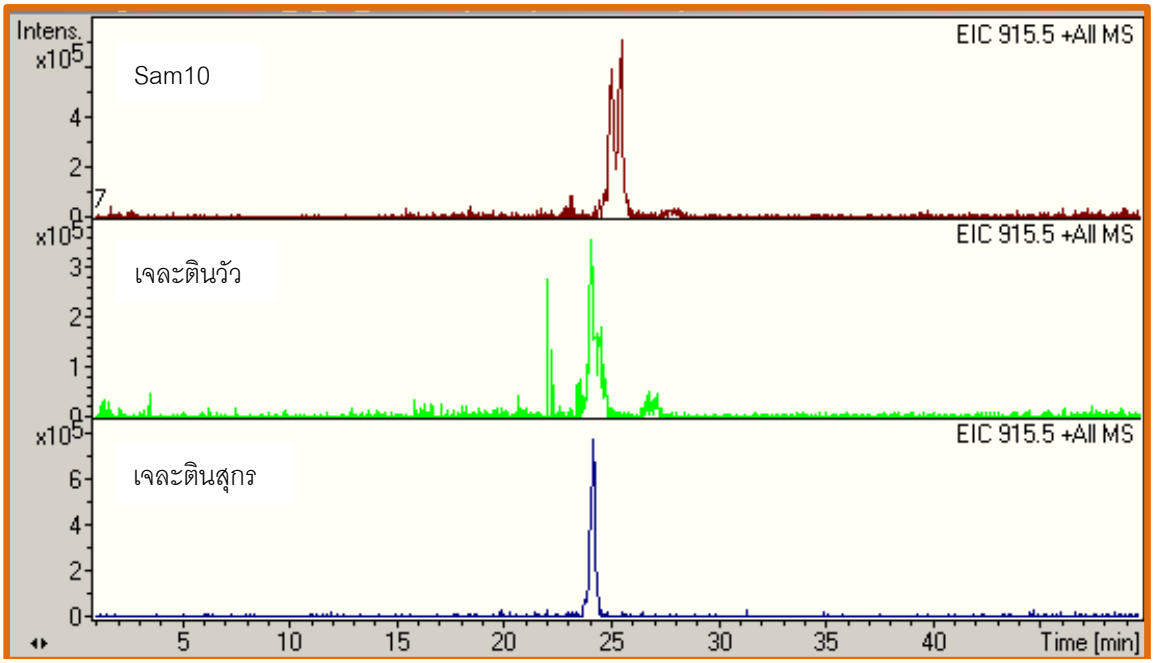
ภาพที่ 4.36 โครมาโทแกรมและสเปคตรัมของตัวอย่างที่ Sam07 (A) Extracted ion chromatogram ของ 915 m/z และ 1044m/z (บน) และ MS Spectrum (ล่าง) (B) Total ion chromatogram (ms/ms) (บน) และ MS/MS Spectrum (ล่าง)



ภาพที่ 4.37 การเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของเจละตินสุกร วัว กับตัวอย่างที่ Sam07



ภาพที่ 4.38 โครมาโทแกรมและสเปคตรัมของตัวอย่างที่ Sam10 (A) Extracted ion chromatogram ของ 915 m/z และ 1044m/z (บน) และ MS Spectrum (ล่าง) (B) Total ion chromatogram (ms/ms) (บน) และ MS/MS Spectrum (ล่าง)



ภาพที่ 4.39 การเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของเจละตินสุกร วัว กับตัวอย่างที่ Sam10

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

เจลาตินถูกใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิด การตรวจสอบย้อนกลับถึงชนิดของเจลาตินนั้นเป็นไปได้ยาก เมื่อเจลาตินรวมตัวกับองค์ประกอบอื่นๆในผลิตภัณฑ์ โดยเฉพาะการวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือที่มีความไวสูงเช่น LC/MS/MS จึงจำเป็นต้องสกัดเจลาตินออกจากตัวอย่างอาหารก่อนทำการวิเคราะห์ดังกล่าว งานวิจัยนี้สามารถพัฒนาวิธีการสกัดเจลาตินจากตัวอย่างอาหารทั้งที่มีองค์ประกอบไม่ซับซ้อน มีเพียงน้ำตาลหรือกลูโคสไซรัปเป็นองค์ประกอบหรือมีองค์ประกอบอื่นๆที่ใกล้เคียงกัน เช่น วุ้นเจลาติน เยลลี่เจลาติน เป็นต้น โดยการใช้เทคนิคการตกตะกอนด้วยเอธานอลเป็นการเปลี่ยนแปลงค่า dielectric constant ของโปรตีน เกิดการรวมตัวกันและตกตะกอนในที่สุด สำหรับตัวอย่างอาหารที่มีองค์ประกอบที่ซับซ้อนนั่นคือมีโปรตีนอื่นร่วมด้วยเช่นในผลิตภัณฑ์นม จะใช้กรดอะซิติกในการตกตะกอนเคซีน โดยไปลดค่า pH ให้เข้าใกล้ค่า pI ทำให้ประจุมีค่าเท่ากับศูนย์ จึงทำให้โปรตีนเข้าใกล้กันเกิดการรวมตัวกันและตกตะกอน โดยพบว่ากรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 10% จะตกตะกอนเคซีนได้มากที่สุดหลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปตกตะกอนเจลาตินด้วยเอธานอล ตะกอนที่ได้จากทั้งสองการทดลองนั้นจะนำมายืนยันด้วยเทคนิค LC/MS/MS พบว่าให้โครมาโทแกรมและสเปคตรัมที่มีลักษณะเดียวกับเจลาตินที่ไม่ผ่านการสกัด จึงสามารถสรุปได้ว่าการใช้เอธานอลและกรดอะซิติกนั้นไม่ทำลายเจลาตินที่เราสนใจ อีกทั้งไม่เป็นอันตรายต่อผู้ปฏิบัติงาน

จากการศึกษาความแตกต่างของเจลาตินจากสุกร วัว และปลา พบว่า เจลาตินสุกรและวัวมี marker ion เป็น 915 และ 1044 m/z และเมื่อทำการแตกตัวหรือทำ ms/ms ของ ion ทั้งสอง พบว่า ion ที่ 915 m/z สามารถแตกตัวได้เป็น 342, 568, 681 และ 897 m/z ส่วน ion ที่ 1044 m/z สามารถแตกตัวได้เป็น 471, 697, 810, 897 และ 1026 m/z แต่ลักษณะของโครมาโทแกรมที่ได้ต่างกัน เนื่องจากวิธีดังกล่าวเหมาะสมกับเจลาตินสุกรมากกว่าเจลาตินวัวเมื่อพิจารณาจากความเข้มหรือความชัดเจนของพีก และเมื่อพิจารณาสเปคตรัมที่ได้ก็มีความชัดเจนกว่าเช่นเดียวกัน ซึ่งเป็นผลจากองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่ต่างกัน สำหรับเจลาตินปลาจะมีความแตกต่างโดยสิ้นเชิงเมื่อเทียบกับเจลาตินสุกรและวัว นั่นคือ ไม่พบ marker ion ดังกล่าว ซึ่งหมายถึงการจัดเรียง

ตัวของกรดอะมิโนของเจละตินปลามีความแตกต่างจากเจละตินสุกรและวัว ทำให้ไม่พบ ion ดังกล่าวเมื่อใช้เทคนิคการวิเคราะห์เดียวกัน จึงสามารถแยกความแตกต่างระหว่างเจละตินจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเช่นสุกร และวัว ออกจากเจละตินปลาได้อย่างชัดเจน เมื่อศึกษาปริมาณต่ำสุดที่สามารถวัดได้จากการแปรความเข้มข้น 7 ระดับ คือ 0.01%, 0.03%, 0.05%, 0.1%, 0.3%, 0.5% และ 1.0% พบว่าที่ 0.05% และ 0.5% เป็นปริมาณที่ต่ำสุดและที่เหมาะสมสำหรับเจละตินสุกร ตามลำดับ และที่ความเข้มข้น 0.3% เป็นปริมาณต่ำสุดและที่เหมาะสมสำหรับเจละตินวัว

เมื่อนำเทคนิคการสกัดและการศึกษาด้วย LC/MS/MS มาประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์อาหารทางการค้าจำนวน 10 ตัวอย่าง ผลที่ได้มีลักษณะเดียวกับเจละตินปลาจำนวน 2 ตัวอย่าง และมีลักษณะเดียวกับเจละตินสุกรและ/วัว จำนวน 8 ตัวอย่าง ซึ่ง 3 ใน 8 พบว่ามีการปนเปื้อนเจละตินสุกรและ/หรือวัว เนื่องจากในฉลากระบุว่าใช้วัตถุดิบในรูปคอลลาเจนจากปลาทะเล งานวิจัยนี้จึงสามารถแยกความแตกต่างของเจละตินจากสัตว์เลี้ยงด้วยนมได้แก่สุกร และวัว ออกจากเจละตินปลาได้อย่างชัดเจน

5.2 ข้อเสนอแนะ

ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในการแยกชนิดเจละติน โดยเฉพาะเจละตินจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ได้แก่ สุกร และวัว โดยใช้เทคนิคอื่นร่วมด้วย อาจเป็นการใช้โปรแกรมการวิเคราะห์องค์ประกอบ เช่น principle component analysis (PCA) เป็นต้น หรือโปรแกรมทางสถิติอื่นๆ และทำการศึกษาในเจละตินจากสัตว์ชนิดอื่นๆ เช่น ไก่ แกะ เป็นต้น

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

เกศินี ประกอบนา และวรกร พิทยานุกูล. 2547. การพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์ปริมาณบิสฟีนอล-เอ-ไดไกลซิดิลอีเธอร์, บิวฟีนอล-เอฟ-ไดไกลซิดิล อีเธอร์ และสารอนุพันธ์ด้วยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟีแมสสเปกโทรเมทรี. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ชูติมา ศรีวิบูลย์. 2546. การวิเคราะห์โดยเครื่องมือโครมาโทกราฟี. กรุงเทพฯ :สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง.

ซูไบด๊ะ บุระดาเลง และปิยเนตร จันทรสอน. 2548. การวิเคราะห์เจลาตินด้วยเทคนิคการตกตะกอนสเปกโตรสโกรปี และโครมาโทกราฟีแบบของเหลวภายใต้ความดันสูง. ปริญญานิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหารและโภชนาการ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ณรงค์ชัย แก้วนาค, ดนัย วิชยณรงค์, พราวศิริ จารุไสลพงษ์ และวิทย์ สุนทรนันท์. 2546. การพัฒนาเจลาตินจากเศษหนังบดเพื่อใช้เป็นตัวประสานในผลิตภัณฑ์ชิ้นขบเคี้ยว. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ธีระ ชีโวนรินทร์. 2553. บทที่ 1 เคมีและหน้าที่ของกรดอะมิโนและโปรตีน [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.med.cmu.ac.th/dept/biochem/webdept ,[2553, กรกฎาคม 10]

นิธิยา รัตนาปนนท์. 2545. เคมีอาหาร. กรุงเทพฯ :สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.

ปาริชาติ ลบแย้ม. 2548. การสกัดและทำให้บริสุทธิ์ของเจลาตินจากเศษหนังสัตว์ใหญ่ที่ยังไม่ผ่านการฟอกโดยใช้แอลคาไลน์โปรทีเอส. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วิทวัส มิ่งวานิช. 2551. เกร็ดความรู้ทางวิชาการ [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.siambig.com/shop/ adver.php?shop=best-skin ,[2553, กรกฎาคม 10]

วินัย ดะห์ลัน ศุภสร ชโยวรรณ และอรชุดา สิมารักษ์. 2542. การวิเคราะห์อันตรายและจุดควบคุมวิกฤติเพื่อจัดเตรียมอาหารฮาลาลในทางอุตสาหกรรมและพาณิชย์ (HALAL-HACCP). กรุงเทพฯ : นิยมการพิมพ์.

ศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2554. รายงานฉบับสมบูรณ์ ผลการดำเนินโครงการภายใต้การพัฒนาพื้นที่พิเศษ 5 จังหวัดชายแดนภาคใต้ ประจำปีงบประมาณ 2554.

สุปราณี มนูรักษ์ชินากร วิสาขะ อนันธวัช และทนง เอี่ยวศิริ. 2553. สื่อการเรียนรู้เพื่อใช้ประโยชน์ร่วมกัน เรื่อง โปรตีนในอาหาร [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://158.108.88.131/courseware/supranee/food-protein/index.html [2553 กันยายน 2]

สมปอง ธรรมศิริรักษ์. 2550. โครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีน [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://202.28.94.202/biochem/sompong [2553, กรกฎาคม 10]

ภาษาอังกฤษ

Aewsiri, T., Benjakul, S., Vinessangman, W. and Tanaka, M. 2008. Chemical compositions and functional properties of gelatin from pre-cooked tuna fin. International Journal of Food Science and Technology, 43:685-693.

Agilent Technologies. 2001. Basic of LC/MS. [Online]. Available from : http://ccc.chem.pitt.edu/wipf/Agilent%20LC-MS%20primer.pdf, [2011, June 15]

AOAC. 1996. Official Methods of Analysis, 16th ed. Washington, Dc : AOAC international.

Avena-Bustillos, R. J., Olsen, C. W., Olson, D. A.,Chiou, B., Yee, E., Bechtel and P. J., 2006. Water vapor permeability of mammalian and fish gelatin films. Food Science, 71:E202-E207.

Baziwane, D. and He, Q. 2003. Gelatin : The paramount food additive. Food Reviews International, 19: 423-435.

Caprette, D.R. 2005. Bradford Protein Assay [Online]. Available from : http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/methods/protein/bradford.html, [2010, July 6]

Chios, B.S., Bustillos, R.J.A., Shey, J., Yee, E., Bechtel, P.J., Imam, S.H., Glenn, G.M., and Orts, W.J. 2006. Rheological and mechanical properties of crosslinked fish gelatins. Polymer, 47:221-229.

Cole,C.G.B. 2000. Gelatin [Online]. Available from : http://www.gelatin.co.za/gltn1.html. [2009, July 26]

Eysturskaro, J., Haug, I. J., Ulset, A. S. and Draget, K. I. 2009. Mechanical properties of mammalian and fish gelatins based on their weight average molecular weight and molecular weight distribution. Food Hydrocolloids, 23: 2315-2321.

Ferris, L.W. 1922. A Method for the quantitative determination of gelatin in ice creams. Food Control Laboratory. Bureau of Chemistry, United States Department of Agriculture, Washington, D. C

Gomez-Guillen, M., Gimenez, B., Lopez, M.and Montero, M. 2011. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. Food Hydrocolloids, 25:1813-1827.

Gomez-Estaca, J., Montero, P., Fernandez-Martin, F., Aleman, A. and Gomez-Guillen, M.C. 2008. Physical and chemical properties of tuna-skin and bovine-hide gelatin films with added aqueous oregano and rosemary extracts. Food Hydrocolloids, 23:1334-1341.

Gui-feng, Z., Liu, T., Wang, Q., Chen, L., Lei, J., Luo, J., Ma, G. and Su, Z. 2008. Identification of marker peptides in digested gelatins by high performance liquid chromatography/Mass spectrometric. Analytical Chemistry, 36(11) : 1499-1504.

Hashim D.M., Che Mana Y.B. ,Norakasha R. ,Shuhaimi M.,Salmah Y.,and Syahariza Z.A. 2010. Potential use of Fourier transform infrared spectroscopy for differentiation of bovine and porcine gelatins. Food Chemistry . 118: 856–860.

Hidaka, S. and Liu, S. Y. 2003. Effects of gelatins on calcium phosphate precipitation: a possible application for distinguishing bovine bone gelatin from porcine skin gelatin. Food Composition and Analysis , 16: 477–483.

Haug, I. J., Draget, K. I. and Smidsrod, O. 2004. Physical and rheological properties of fish gelatin compared to mammalian gelatin. Food Hydrocolloids, 18:203-213

Hoque, M. S., Benjakul, S. and Propran, T. 2011. Effects of partial hydrolysis and plasticizer content on the properties of film from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin gelatin. Food Hydrocolloids, 25: 82-89.

Karim, A. A. and Bhat, R. 2008. Gelatin alternatives for the food industry: recent development, challenges and prospects. Food Science and Technology, 19:644-656.

Karim, A. A. and Bhat, R. 2009. Review fish gelatin : properties, challenges, and prospect as an alternative to mammalian gelatins. Food Hydrocolloids, 23:563-576.

Khew, S. T. and Tong, Y. W. 2007. Characterization of triple-helical conformations and melting analyses of synthetic collagen-like peptides by reversed-phase HPLC. Chromatography, 858: 79-90.

Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W. and Shahidi, F. 2010. Comparative study on characteristics of gelatin from the skins of brownbanded

bamboo shark and blacktip shark as affects by extraction conditions. Food Hydrocolloids, 24: 164-171.

Leuenberger, B. H. 1991. Investigation of viscosity and gelation properties of different mammalian and fish gelatins. Food Hydrocolloids, 54:353-361.

Nemati, M., Oveisi, M. R., Abdollahi, H., and Sabzevari, O. 2004. Differentiation of bovine and porcine gelatins using principal component analysis. Pharmaceutical and Biomedical Analysis . 34(3): 485–492.

Norland Products. 2009. Fish Gelatin [Online]. Available from : http://norlandprod.com/techrpts/fishgelrpt.html [2009, July 26]

Ocana, M. F., Neubert, H., Przyborowska, A., Parker, R., Bramley, P., Halket, J., and Patel, R. 2004. BSE Control : Detection of gelatin-derived peptides in animal feed by mass spectrometry. Analyst, 129 : 111-115.

Owusu-Apenten R. K. 2002, Food Protein Analysis Quantitative Effects of Processing. Marcel Dekker, Inc. pp.196-197.

Raja Mohd Hafidz, R. N., Yaakob, C. M., Amin, I. and Noorfaizan, A. 2011. Chemical and functional properties of bovine and porcine skin gelatin. International Food Research Journal, 18:787-791.

Scopes, R. K. 1988. Protein Purification. 3 rd ed. Springer-Verlag New York, pp.71-101

Solgaard, G. Haug, I.J. and Draget, K.I. 2008. Proteolytic degradation of cold water fish gelatin solutions and gels. International Journal of Biological Macromolecules, 43:192-197.

Vasbinder, A. and Kruif, C. 2003. Casein-whey protein interactions in heated milk: the influence of pH. International Dairy Journal, 13:669-677.

Zhang, G., Liu, T., Wang, Q., Chen, L., Lei, J., Luo, J., Ma, G. and Su, Z. 2009. Mass spectrometric detection of marker peptides in tryptic digests of gelatin : A new method to differentiate between bovine and porcine gelatin. Food Hydrocolloids, 23 : 2001-2007.

Zhang, Z., Li, G. and Shi, B. 2003. Physicochemical properties of collagen, gelatin and collagen hydrolysate derived from bovine limed split wastes. The Society of Leather and Chemists, 90:23-28.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.

วิธีการวิเคราะห์

ก.1 การสกัดเจละตินจากวุ้นเจละตินและนมยูเอชทีรสจืดผสมเจละติน

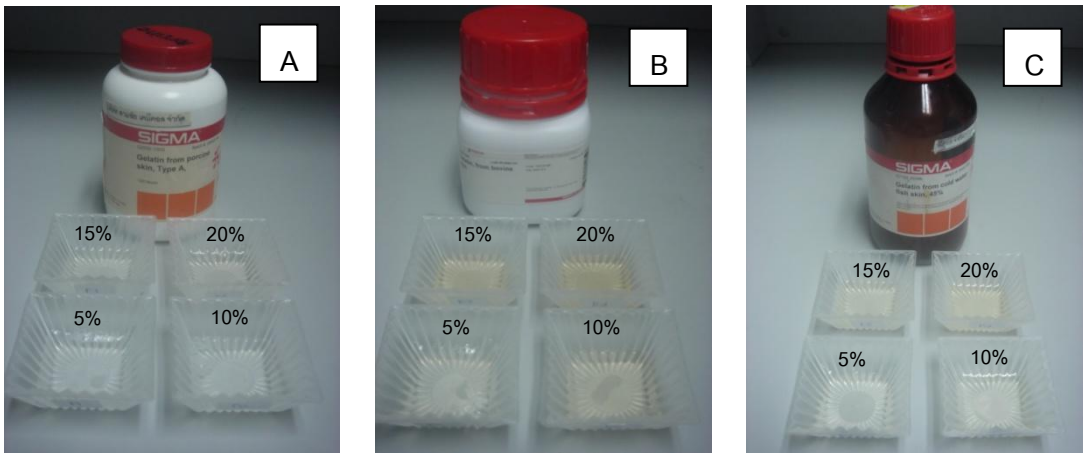
ก.1.1 การเตียมวุ้นเจละติน

ตารางที่ ก.1.1 สัดส่วนของส่วนประกอบในวุ้นเจละตินสุกรและวัว

ความเข้มข้นเจละติน (%)	ปริมาณเจละติน (g)	ปริมาณน้ำตาล (g)	ปริมาตรน้ำกลั่น (ml)
5	0.1	1.9	5
10	0.2	1.8	5
15	0.3	1.7	5
20	0.4	1.6	5

ตารางที่ ก.1.2 สัดส่วนของส่วนประกอบในวุ้นเจละตินปลา

ความเข้มข้นเจละติน (%)	ปริมาณเจละติน (g)	ปริมาณน้ำตาล (g)	ปริมาตรน้ำกลั่น (ml)
5	0.2	1.8	5
10	0.4	1.6	5
15	0.6	1.4	5
20	0.8	1.2	5



ภาพที่ ก.1.1 (A) วุ้นเจละตินสุกรที่ความเข้มข้น 5-20% (B) วุ้นเจละตินวัวที่ความเข้มข้น 5-20% (C) วุ้นเจละตินปลาที่ความเข้มข้น 5-20%

ก.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วย Bradford Assay (Owusu-Apenten, 2002)

ก.2.1 การเตรียม dye reagent

ชั่ง Coomassie Blue G250 10 mg เติม 95% Ethanol 5 ml ค่อยๆเติม Phosphoric acid 10ml และเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 100 ml หลังจากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1

ก.2.2 การเตรียม Standard BSA (ความเข้มข้นเริ่มต้น 200 mg/ml)

ตารางที่ ก.2.1 สัดส่วนของ BSA ต่อ น้ำกลั่น

ความเข้มข้นเริ่มต้น (μg/μL)	**ปริมาตรที่ใช้เจือจาง (μL)**					**น้ำกลั่น (μL)**	**ปริมาตรรวม (mL)**	**ความเข้มข้นที่ต้องการ (μg/μL)**
	1	2	3	4	5			
200	5	-	-	-	-	995	1.0	1.0
1.0	-	800	-	-	-	200	1.0	0.8
0.8	-	-	750	-	-	250	1.0	0.6
0.6	-	-	-	666.7	-	333.3	1.0	0.4
0.4	-	-	-	-	500	500	1.0	0.2

ภาคผนวก ข.

ข้อมูลการทดลอง

ตารางที่ ข.1.1 ค่า Signal to noise ratio ที่ 915 m/z ของเจละตินที่ย่อยด้วยกรด 3M และ 6M

ความเข้มข้น (M)	Signal to noise ratio[1]
3	26.02 ± 1.20[a]
6	33.70 ± 0.14[b]

[1] ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

[a,b...] อักษรที่ต่างกันในแต่ละแถว หมายถึง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ตารางที่ ข.1.2 ค่า Signal to noise ratio ที่ 915 m/z ของเจละตินที่ย่อยด้วยเวลา 30 40 และ 50 นาที

เวลา (นาที)	Signal to noise ratio[1]
30	34.20 ± 0.85[b]
40	38.35 ± 0.78[b]
50	20.06 ± 4.95[a]

[1] ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

[a,b...] อักษรที่ต่างกันในแต่ละแถว หมายถึง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ตารางที่ ข.1.3 ปริมาณโปรตีนก่อนและหลังการสกัดเจละตินในรุ้นเจละตินวัวด้วยเอธานอล

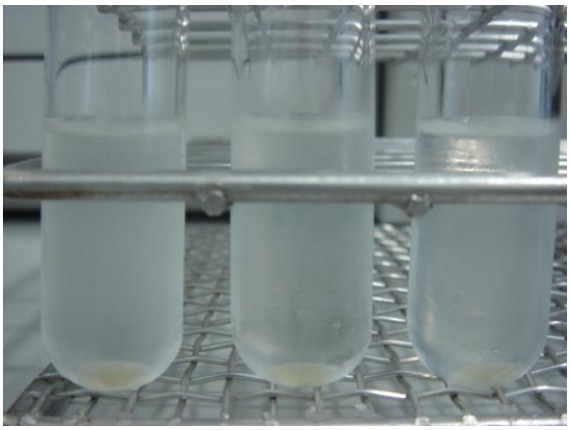
ลำดับที่	ความเข้มข้น เจละติน (g/ml)	ปริมาณโปรตีน(μg/μL)[ns]	
		ก่อน	หลัง
1	0.01	0.19±0.03	0.17±0.01
2	0.02	0.21±0.01	0.15±0.02
3	0.03	0.25±0.01	0.18±0.01
4	0.04	0.29±0.05	0.24±0.04

ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

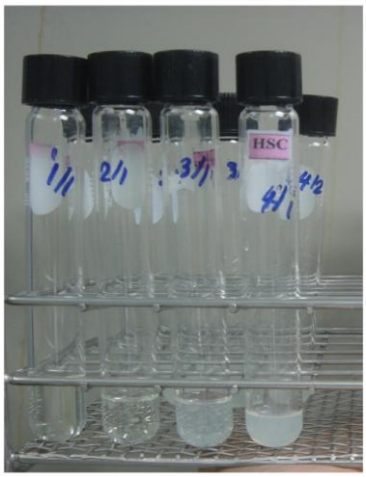
ตารางที่ ข.1.4 ปริมาณโปรตีนในวุ้นเจละตินปลาก่อนและหลังตกตะกอนเจละตินด้วยเอธานอล

ลำดับที่	ความเข้มข้นเจละติน (g/mL)	ปริมาณโปรตีน(μg/μL)[ns]	
		ก่อน	หลัง
1	0.01	0.18±0.03	0.15±0.07
2	0.02	0.19±0.07	0.16±0.06
3	0.03	0.31±0.04	0.28±0.01
4	0.04	0.40±0.05	0.33±0.09

ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)



ภาพที่ ข.1.1 ตะกอนเจละตินที่สกัดจากวุ้นเจละตินด้วยเอธานอล



ภาพที่ ข.1.2 สารละลายที่ได้หลังจากตกตะกอนด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น 10,20,30 และ 40% เรียงจากซ้ายไปขวา

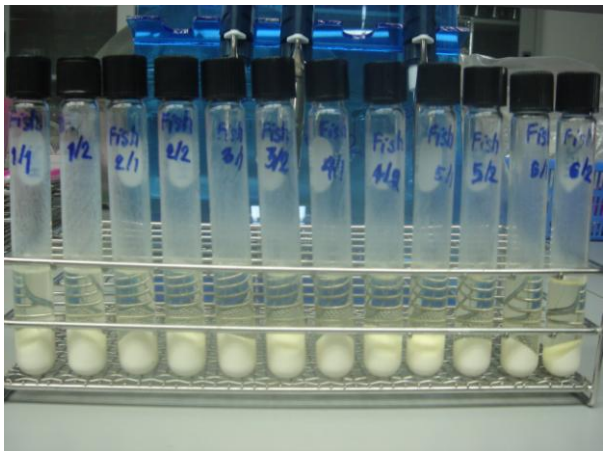
ตารางที่ ข.1.5 ปริมาณโปรตีนก่อนและหลังการสกัดเจละตินในนมด้วยกรดอะซิติกและเอธานอล ที่ความเข้มข้นของเจละตินวัวต่างๆกัน

ลำดับที่	ความเข้มข้น (g/mL)	ปริมาณโปรตีน(μg/μL)	
		ก่อน	หลัง
1	0.00	14.82±0.05	0.36±0.03
2	0.01	12.62±0.01	0.63±0.01
3	0.02	12.56±0.04	0.63±0.02
4	0.03	12.40±0.01	0.59±0.02
5	0.04	9.36±0.03	0.74±0.01
6	0.05	8.46±0.05	0.63±0.04

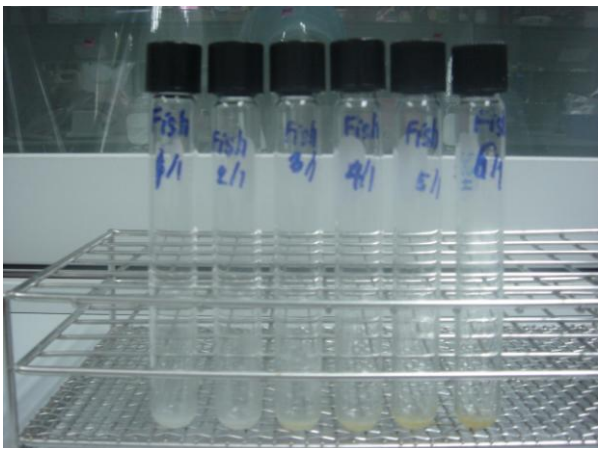
ตารางที่ ข.1.6 ปริมาณโปรตีนก่อนและหลังการสกัดเจละตินในนมด้วยกรดอะซิติกและ เอธานอล ที่ความเข้มข้นของเจละตินปลาต่างๆกัน

ลำดับที่	ความเข้มข้น (g/mL)	ปริมาณโปรตีน(μg/μL)	
		ก่อน	หลัง
1	0.00	14.38±0.10	0.49±0.05
2	0.01	13.12±0.02	0.52±0.02
3	0.02	12.10±0.05	0.53±0.09
4	0.03	10.52±0.03	0.56±0.01
5	0.04	9.82±0.01	0.52±0.02
6	0.05	8.46±0.02	0.37±0.03

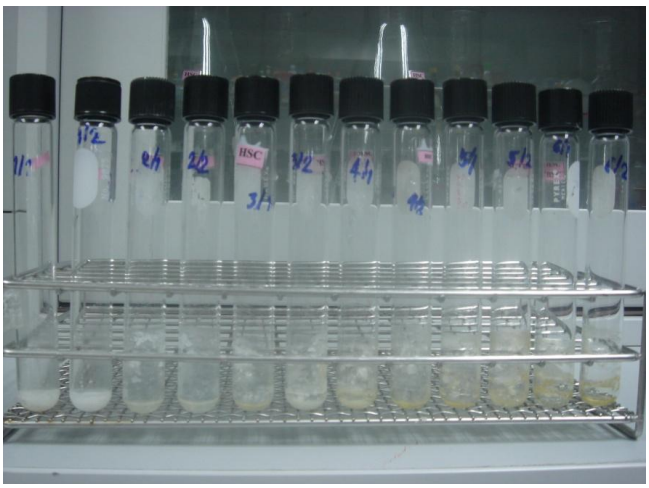
ภาพที่ ข.1.3 นมผสมเจละตินก่อนเติมกรดอะซิติก



ภาพที่ ข.1.4 ผลหลังจากตกตะกอนด้วยกรดอะซิติกในนมผสมเจละติน



ภาพที่ ข.1.5 ตะกอนเจละตินปลาที่ได้หลังจากการตกตะกอนด้วยเอธานอลและนำไปทำให้แห้ง



ภาพที่ ข.1.6 ตะกอนที่เจละตินสุกรได้หลังจากการตกตะกอนด้วยเอธานอลและนำไปทำให้แห้ง

ตารางที่ ข.1.7 ค่า Signal to noise ratio ของเจละตินสุกรและวัว

ความเข้มข้น (%)	Marker ion (m/z)	Signal to noise ratio		
		เจละตินสุกร (P)	**เจละตินวัว** (B)	**สัดส่วน** P/B
0.01	915	5.6	5	1.12
	1044	1.1	1.2	0.92
0.03	915	5.8	7.8	0.74
	1044	3.8	1.8	2.11
0.05	915	7	5.9	1.19
	1044	1.3	1.1	1.18
0.10	915	22.7	10.7	2.12
	1044	6	4.9	1.22
0.30	915	13.8	17.2	0.80
	1044	2.6	5.5	0.47
0.50	915	27.7	5.3	5.23
	1044	5	4.6	1.09
1.00	915	15.8	5.6	2.82
	1044	2.8	7.4	0.38

ตารางที่ ข.1.8 ค่า Signal to noise ratio ของเจละตินสุกรและวัวที่ ms/ms-915m/z

ความเข้มข้น (%)	Marker ion (m/z)	Signal to noise ratio	
		เจละตินสุกร (P)	**เจละตินวัว** (B)
0.01	342	73.4	109.3
	568	76.3	49.6
	681	4.6	-
	897	2.5	-
0.03	342	164.1	69.6
	568	308.9	43.7
	681	50.8	13.7
	897	45.1	7.1
0.05	342	445.1	303.0
	568	302.6	15.4
	681	33.1	3
	897	13.4	12.3
0.10	342	333.6	304.3
	568	180.4	77.1
	681	27.5	65.4
	897	8.9	14
0.30	342	889.2	702.3
	568	361.1	583.8
	681	76.2	39.7
	897	33.4	41.7
0.50	342	1073	237.2
	568	420.3	77.0
	681	74.7	32.8
	897	30	10.2
1.00	342	618.3	134.4
	568	216.8	194.2
	681	45.6	81.4
	897	29.7	4.8

ตารางที่ ข.1.9 ค่า Signal to noise ratio ของเจละตินสุกรและวัวที่ ms/ms-1044m/z

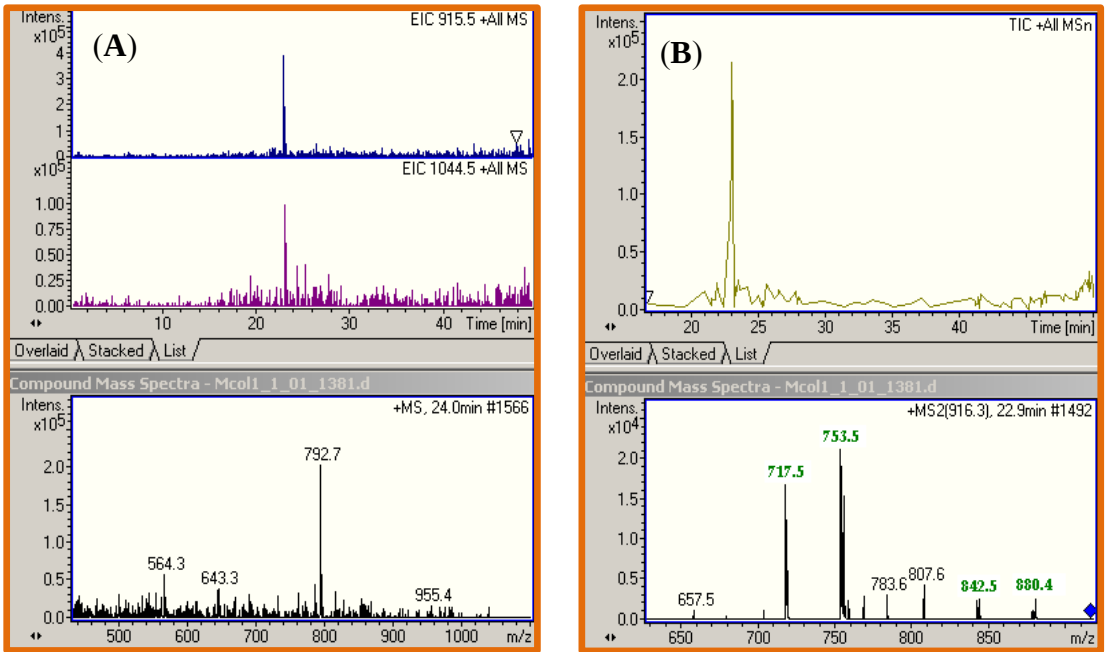
ความเข้มข้น (%)	Marker ion (m/z)	Signal to noise ratio	
		เจละตินสุกร (P)	**เจละตินวัว** (B)
0.01	471	29.9	45.5
	697	44	31.9
	810	18.3	-
	897	-	-
	1026	-	-
0.03	471	70.4	89.9
	697	35.2	34
	810	8.5	-
	897	13.7	-
	1026	-	-
0.05	471	190	27.1
	697	55.7	34
	810	11.5	-
	897	8.8	-
	1026	11.3	-
0.10	471	201.5	81.5
	697	103.3	60.2
	810	33.4	16.3
	897	2.5	89.4
	1026	3.6	-
0.30	471	338.3	127.5
	697	126.3	120.4
	810	38.9	22.6
	897	11.1	10.2
	1026	36.0	20.3

ตารางที่ ข.2.0 ผลการวิเคราะห์เจละตินสุกรด้วย LC/MS/MS ที่ความเข้มข้นต่างๆ

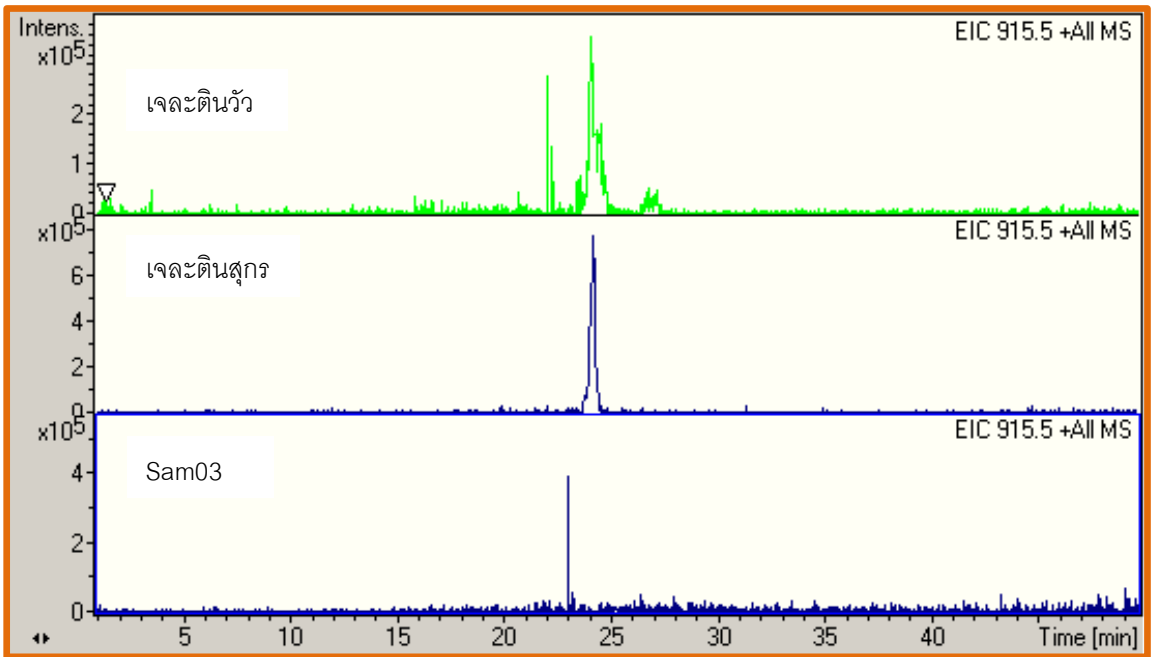
ความเข้มข้นเจละติน (%)	Marker ion (m/z)	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	ซ้ำที่ 5	ซ้ำที่ 6
0.01%	915	5.9	5.6	5.3	4.7	5	4.4
	1044	1.8	1.1	2	1.4	1.7	1.5
0.03%	915	6.5	5.8	8.6	7.1	6.9	7.5
	1044	2.5	3.8	4.8	3.5	4	3.4
0.05%	915	8.5	7.0	7.3	7	6.8	8.1
	1044	4.1	4.7	3.3	4.4	4.7	4.2
0.10%	915	19.7	22.7	35.6	22.7	27.7	16.4
	1044	6.2	6.0	6.1	6.0	6.5	6.4
0.30%	915	25.7	13.8	28.1	23.5	34.4	24.1
	1044	7.6	2.6	6.6	6.2	4.4	4.2
0.50%	915	23.3	27.7	17.4	19.7	27.7	17.6
	1044	11.7	5.0	5	5.8	5	3.1
1.00%	915	25.4	15.8	20.7	26.1	21	27.6
	1044	8.1	2.8	4.9	2.8	4	7.8

ตารางที่ ข.2.1 ผลการวิเคราะห์เจละตินวัวด้วย LC/MS/MS ที่ความเข้มข้นต่างๆ

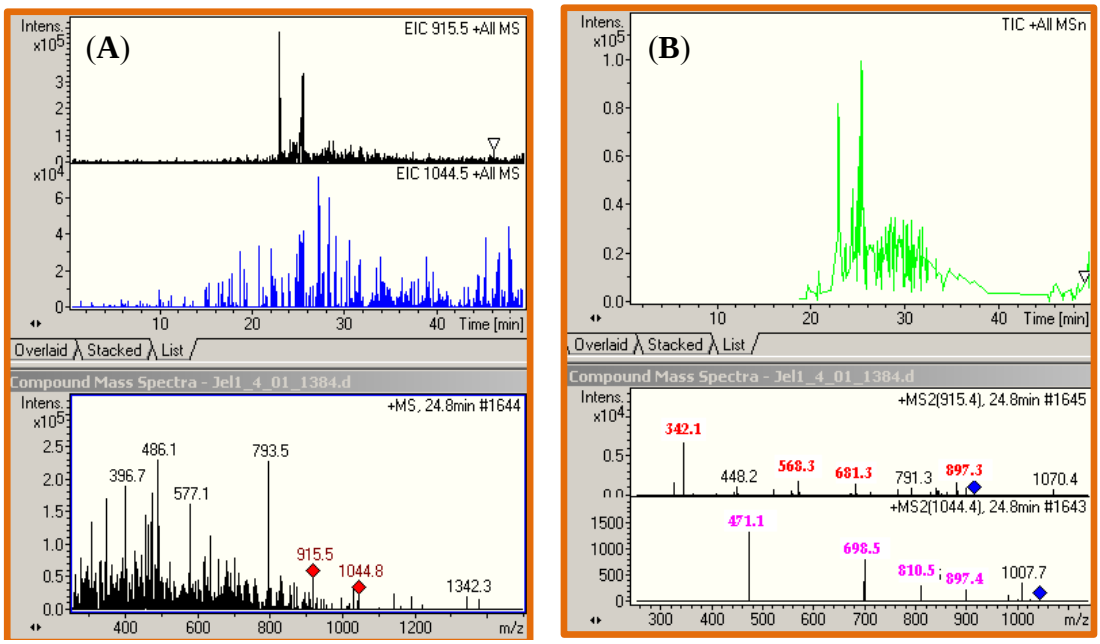
ความเข้มข้นเจละติน (%)	Marker ion (m/z)	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	ซ้ำที่ 5	ซ้ำที่ 6
0.01%	915	4.8	8.9	5.8	4	6	5
	1044	0	0	0	2.6	0	1.2
0.03%	915	8.7	3.8	13.7	6.7	4.3	7.8
	1044	7.1	2.8	0	3.8	5.6	1.8
0.05%	915	5	4	7.7	4	5.2	5.9
	1044	2.7	1.1	1.3	4.7	4.3	1.1
0.10%	915	3.9	13.9	12	10.9	5.3	10.7
	1044	4.6	3.6	4.6	9.5	5.2	4.9
0.30%	915	15.2	17.9	17.1	17.3	15.2	17.2
	1044	4.1	1.1	1.8	6.8	4.5	5.5
0.50%	915	6.9	4.9	6.1	6.5	8.2	5.3
	1044	5.3	5.1	3.3	1.4	6.8	4.6
1.00%	915	4.8	8.1	2.7	6.1	6.6	5.6
	1044	2.6	7.6	2.5	3.4	5.4	7.4



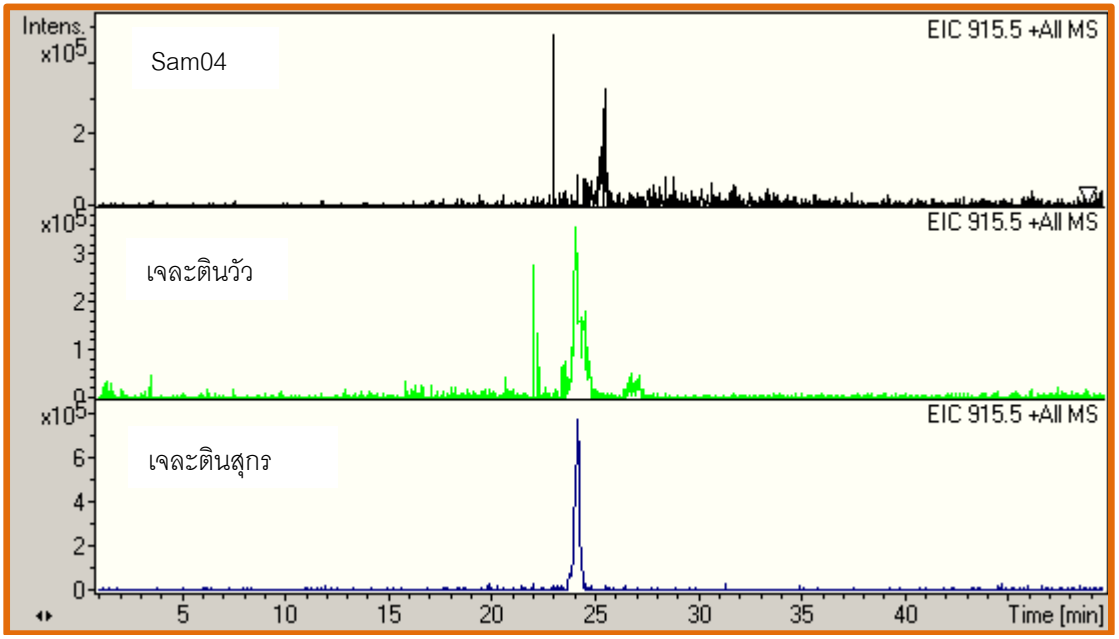
ภาพที่ ข.1.7 โครมาโทแกรมและสเปคตรัมของตัวอย่างที่ Sam03 (A) Extracted Chromatogram (บน) และ MS Spectrum (ล่าง) (B) Total Chromatogram (บน) และ MS/MS Spectrum



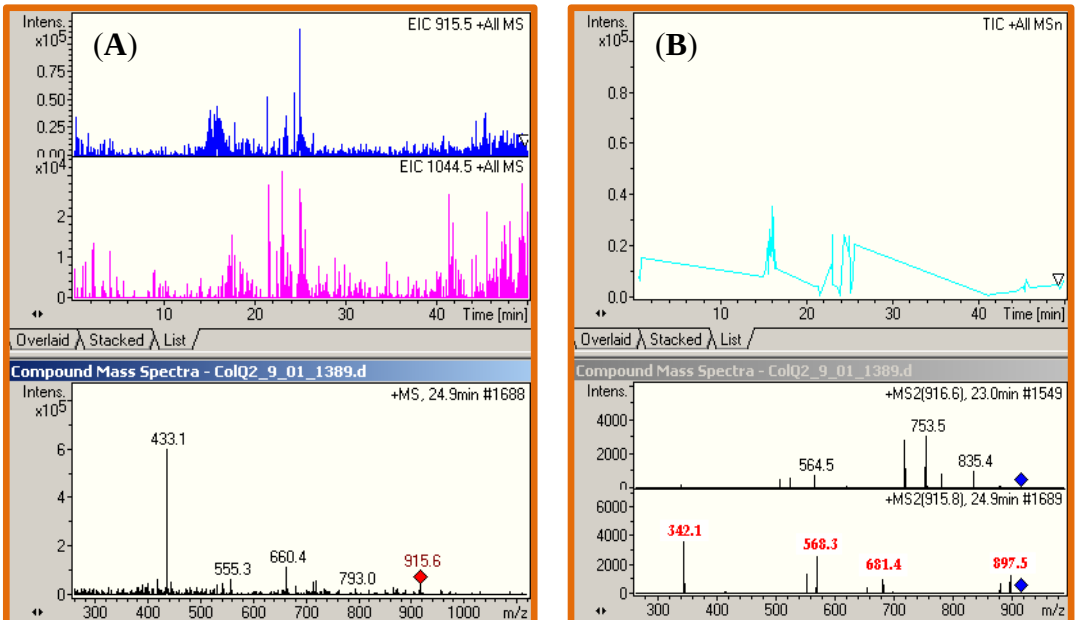
ภาพที่ ข.1.8 การเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของเจละตินสุกร วัว กับตัวอย่างที่ Sam03



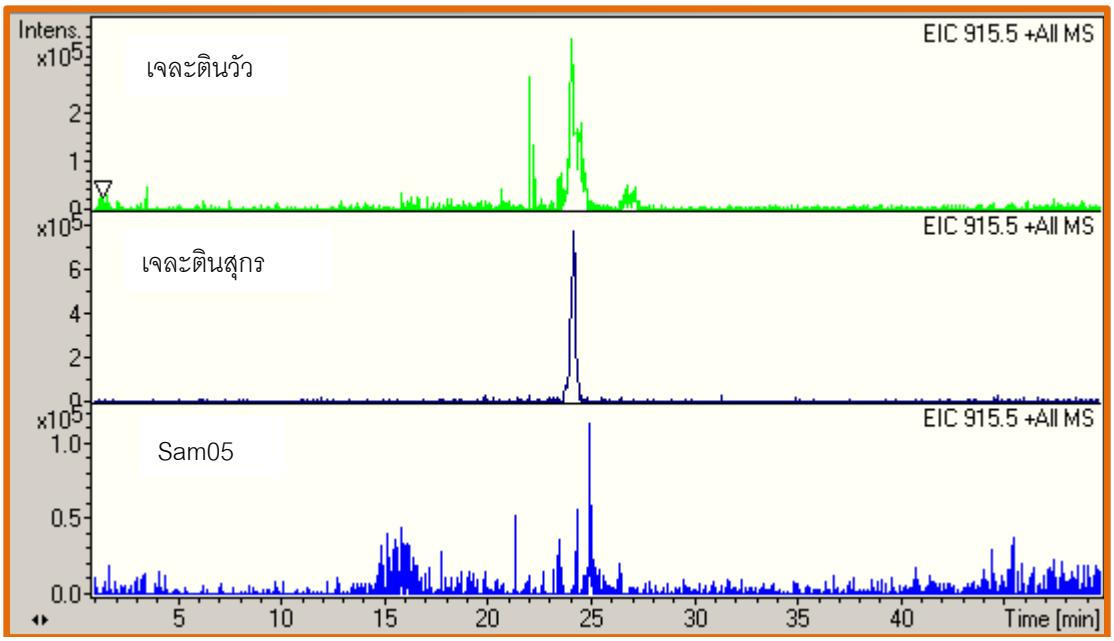
ภาพที่ ข.1.9 โครมาโทแกรมและสเปคตรัมของตัวอย่างที่ Sam04 (A) Extracted Chromatogram (บน) และ MS Spectrum (ล่าง) (B) Total Chromatogram (บน) และ MS/MS Spectrum



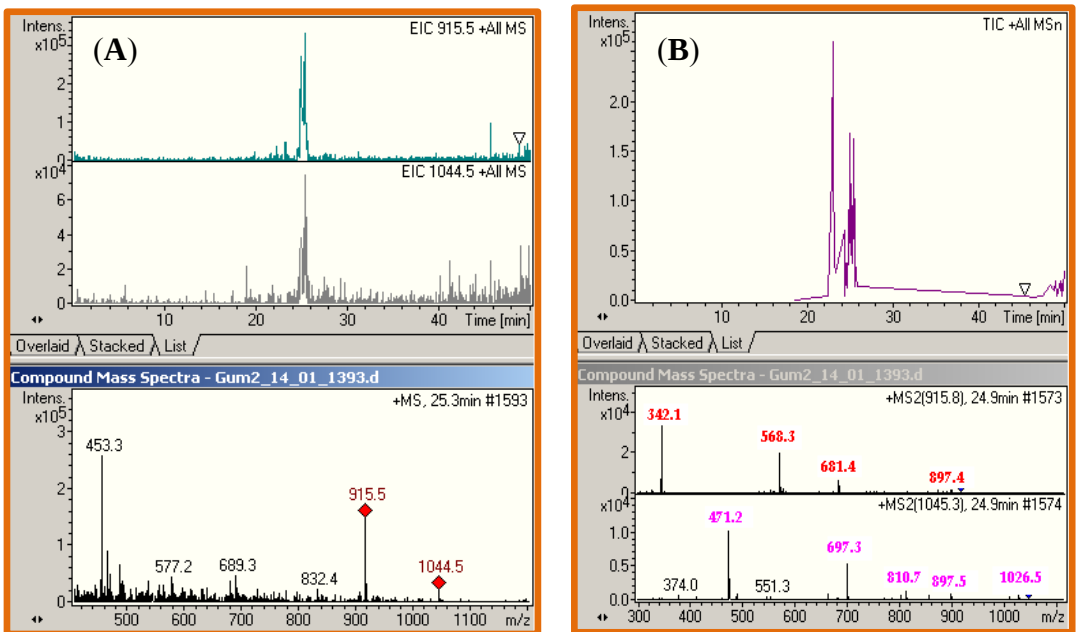
ภาพที่ ข.1.10 การเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของเจละตินสุกร วัว กับตัวอย่างที่ Sam04



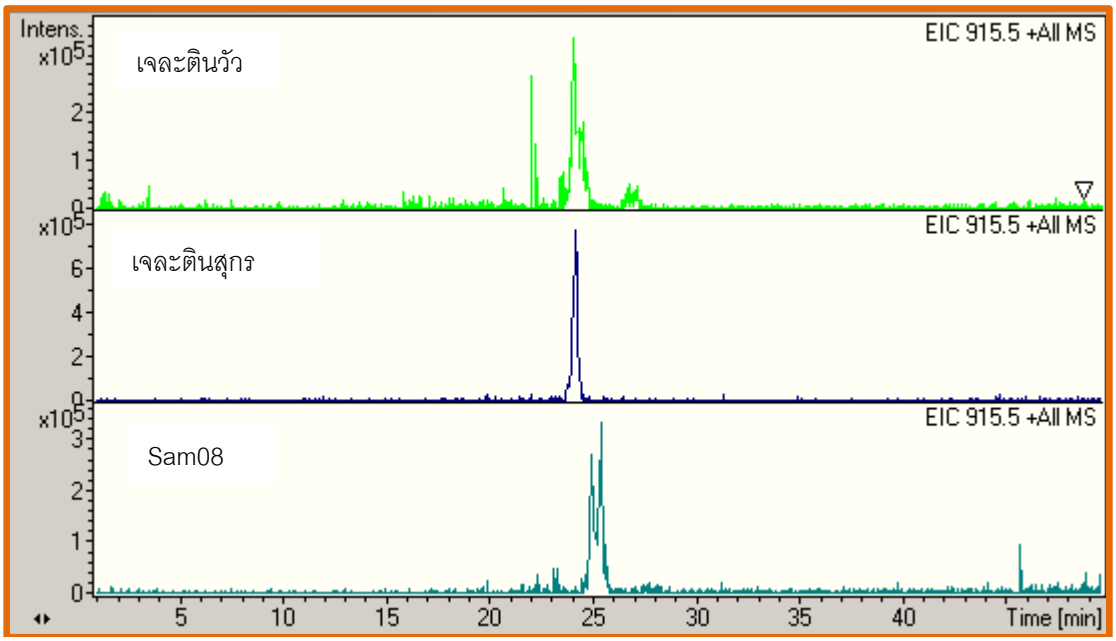
ภาพที่ ข.1.11 โครมาโทแกรมและสเปคตรัมของตัวอย่างที่ Sam06 (A) Extracted Chromatogram (บน) และ MS Spectrum (ล่าง) (B) Total Chromatogram (บน) และ MS/MS Spectrum



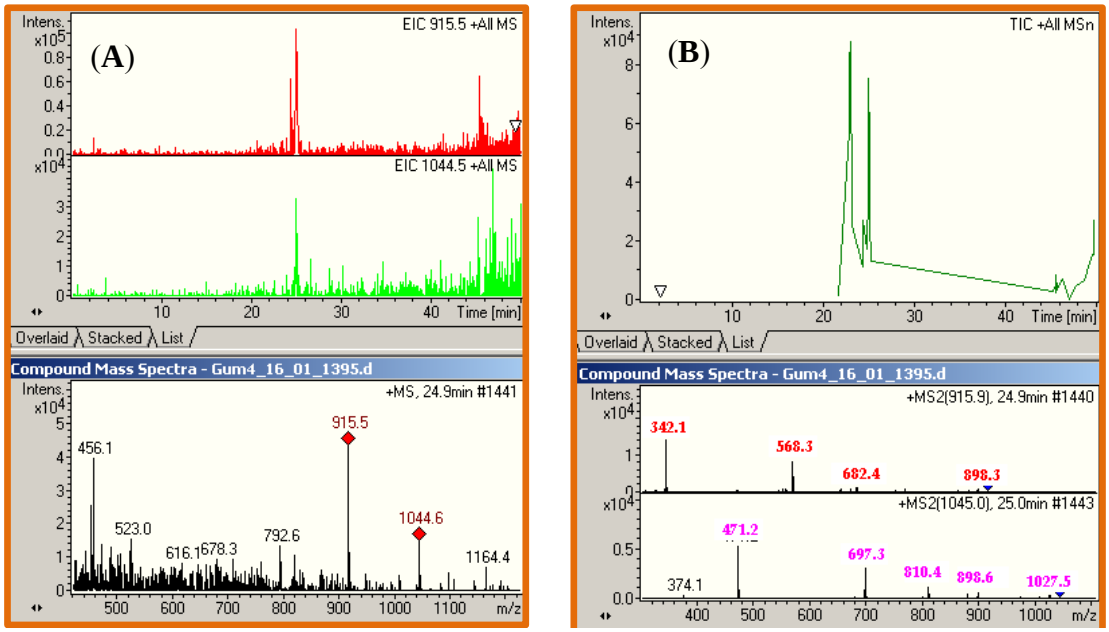
ภาพที่ ข.1.12 การเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของเจละตินสุกร วัว กับตัวอย่างที่ Sam06



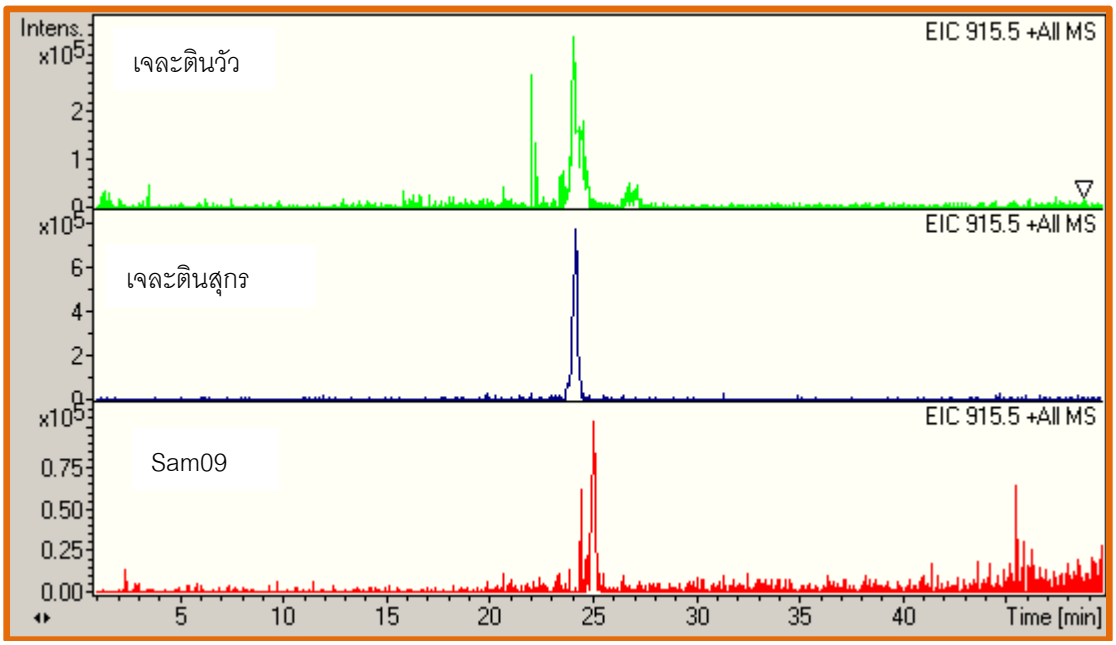
ภาพที่ ข.1.13 โครมาโทแกรมและสเปคตรัมของตัวอย่างที่ Sam08 (A) Extracted Chromatogram (บน) และ MS Spectrum (ล่าง) (B) Total Chromatogram (บน) และ MS/MS Spectrum



ภาพที่ ข.1.14 การเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของเจละตินสุกร วัว กับตัวอย่างที่ Sam08



ภาพที่ ข.1.15 โครมาโทแกรมและสเปคตรัมของตัวอย่างที่ Sam09 (A) Extracted Chromatogram (บน) และ MS Spectrum (ล่าง) (B) Total Chromatogram (บน) และ MS/MS Spectrum



ภาพที่ ข.1.16 การเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของเจละตินสุกร วัว กับตัวอย่างที่ Sam09

ตารางที่ ข.1.22 รายละเอียดตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารทางการค้า

ลำดับที่	ชื่อตัวอย่าง	ประเภทตัวอย่าง	ปริมาณเจละติน/คอลลาเจน	ได้รับเครื่องหมายฮาลาล	จังหวัดที่ผลิต	ผลการวิเคราะห์เจละติน
1	Sam 01	เจละตินแผ่น	100%	-	กทม. (นำเข้า)	Mammalian*
2	Sam 02	คอลลาเจนปลา	100%	/	กทม.	Fish
3	Sam 03	นมถั่วเหลืองผสมคอลลาเจน	0.05%	/	ปราจีนบุรี	Fish
4	Sam 04	เครื่องดื่มเยลลี่คาราจีแนนผสมคอลลาเจน	0.4%	-	สมุทรสาคร	Mammalian
5	Sam 05	เครื่องดื่มผสมคอลลาเจน	7.9%	/	นนทบุรี	Mammalian
6	Sam 06	เครื่องดื่มผสมคอลลาเจน	8.2%	/	นนทบุรี	Mammalian
7	Sam 07	เครื่องดื่มผสมคอลลาเจน	8.3%	/	นนทบุรี	Mammalian
8	Sam 08	เยลลี่เจละติน	7.5%	-	กทม. (นำเข้า)	Mammalian
9	Sam 09	เยลลี่เจละติน	9%	-	กทม.	Mammalian
10	Sam 10	วุ้นเจละติน	11%	/	กทม.	Mammalian

*หมายเหตุ mammalian หมายถึง เจละตินจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ในที่นี้คือ สุกรหรือวัว

เครื่องหมาย / หมายถึง ได้รับการรับรองฮาลาล , เครื่องหมาย - หมายถึง ไม่ได้รับการรับรองฮาลาล

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวนูรีซัน สามาลูกา เกิดเมื่อวันที่ 13 เมษายน พ.ศ.2526 ที่จังหวัดยะลา สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิตจาก สาขาวิชาเทคโนโลยีการอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ เมื่อปีการศึกษา 2548

เสนอผลงานทางวิชาการ ภาคบรรยาย เรื่อง การพัฒนาวิธีการสกัดเจลละตินจากผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อตรวจยืนยันด้วยเทคนิค Liquid Chromatography Mass Spectrometry ในงานการประชุมวิชาการโภชนาการแห่งชาติ ครั้งที่ 5 วันที่ 5-7 กันยายน พ.ศ.2554 ณ ศูนย์นิทรรศการและการประชุมไบเทค กรุงเทพมหานคร