โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์วิตามินบี 12 ในผลิตภัณฑ์นมโดยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงสุด

Developed method for determination of Vitamin B_{12} by Ultra Performance Liquid Chromatography

ชื่อนิสิต นางสาวเนื้อแพร พรหมหิตร เลขประจำตัว 6033052823

ภาควิชา เคมี

ปีการศึกษา 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์วิตามินบี 12 ในผลิตภัณฑ์นม โดยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงสุด

Developed method for determination of Vitamin B12 by Ultra Performance Liquid Chromatography

โดย

นางสาวเนื้อแพร พรหมหิตร

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2563

โครงการ การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์วิตามินบี 12 ในผลิตภัณฑ์นมโดยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงสุด

โดย นางสาวเนื้อแพร พรหมหิตร

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

1. ศาสตราจารย์ ดร. สนอง เอกสิทธิ์	ประธานกรรมการ
2. รองศาสตราจารย์ ดร. นวลพรรณ จันทรศิริ	กรรมการ
3. รองศาสตราจารย์ ดร. สุรชัย พรภคกุล	อาจารย์ที่ปรึกษา

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร. สุรชัย พรภคกุล)

อาจารย์ที่ปรึกษา

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร. วรวีร์ โฮเว่น)

หัวหน้าภาควิชาเคมี

วันที่ 15 เดือน ธันวาคม พ.ศ. 2563

ชื่อโครงการ การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์วิตามินบี 12 ในผลิตภัณฑ์นมโดยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงสุด
ชื่อนิสิตในโครงการ นางสาวเนื้อแพร พรหมหิตร เลขประจำตัว 6033052823
ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. สุรชัย พรภคกุล
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี 2563

บทคัดย่อ

จากปัญหาที่พบคือ ค่าการวิเคราะห์วิตามินบี 12 ในผลิตภัณฑ์นมของบริษัทไม่สอดคล้องกับข้อกำหนดของผลิตภัณฑ์ และผลการวิเคราะห์ของตัวแทนจำหน่าย โดยเฉพาะใน polyvitamin premixes ที่มีค่าตามข้อกำหนดผลิตภัณฑ์ที่สูง อีกทั้งได้ผลการวิเคราะห์วิตามินบี 12 ไม่คงที่ งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นในการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์วิตามินบี 12 โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงสุด เริ่มจากหาขั้นตอนการสกัดวิตามินบี 12 ในสภาวะที่เหมาะสม ในผลิตภัณฑ์นมผง มีการใช้ alpha-amylase ในปริมาณเพิ่มขึ้นเพื่อให้มี enzyme activity อยู่ในช่วงที่กำหนด ส่วนสำหรับใน premixes ได้เพิ่มการละลายโดยใช้น้ำในปริมาณมากขึ้น และการเจือจางความเข้มข้น นอกจากนี้ทดลองเติมและไม่เติม NaCN ในการสกัดผลิตภัณฑ์นมผง พบว่ามีผลต่อการเปลี่ยนวิตามินบี 12 ในรูปแบบอื่นๆที่พบในธรรมชาติของนม ให้เป็น cyanocobalamin ส่วนใน premixes ยังไม่สามารถสรุปได้อย่างชัดเจน ต่อมาศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการจับกันระหว่าง monoclonal antibody และ cyanocobalamin เป็นเวลา 5, 10, 15 นาที พบว่าในผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาณวิตามินบี 12 น้อย เวลาไม่มีผลอย่างชัดเจน แต่ในผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาณวิตามินบี 12 มาก การใช้เวลาในการเขย่าเพิ่มขึ้น มีแนวโน้มได้ผลการทดลองที่ดีขึ้น รวมไปถึงตรวจสอบปริมาณเมทานอล สารที่ใช้ในการชะวิตามินบี 12 ออกจาก immunoaffinity gel column พบว่าการใช้เมทานอล 3 mLเพียงพอต่อการชะ และสุดท้ายตรวจสอบประสิทธิภาพของ immunoaffinity gel column ได้ %recovery เท่ากับ 98% เท่ากันเมื่อใช้สารมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น ต่ำ กลาง และสูง นอกจากนี้วิธีการวิเคราะห์วิตามินบี 12 ของบริษัท Mead Johnson Nutrition กับบริษัทตัวแทนจำหน่าย แตกต่างในขั้นตอนของการเตรียมตัวอย่าง และภาวะของเครื่องโครมาโทรกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ซึ่งอาจเป็นสาเหตุให้ค่าการวิเคราะห์ที่ได้ไม่สอดคล้องกัน จากการศึกษาหาสาเหตุที่ได้ผลวิเคราะห์ไม่สอดคล้องกันและได้ทำการพัฒนาขั้นตอนการวิเคราะห์ รวมทั้งการหาภาวะที่เหมาะสม ทำให้สามารถวิเคราะห์วิตามินบี 12 ได้ค่าที่ดีขึ้น ผลการวิเคราะห์สอดคล้องกับข้อกำหนดของผลิตภัณฑ์ และถูกต้องแม่นยำตามหลักเกณฑ์ของ AOAC

คำสำคัญ: การวิเคราะห์วิตามินบี 12, ไซยาโนโคบาลามิน, โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงสุด

Project Title Developed method for determination of Vitamin B_{12} by Ultra Performance Liquid Chromatography

Student Name Miss. Nuaprae Prommahit Student ID 6033052823

Advisor Name Associate Professor Dr. Surachai Pornpakakul

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic Year 2019

Abstract

The encountered problem was that the analyzed result of vitamin B_{12} in milk product did not comply with the specification of company's product, and the result from the supplier especially in polyvitamin premixes containing amount of vitamin B_{12}. This work, therefore, focused on the development for determining the amount of vitamin B_{12} by Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC). First, the appropriate condition for extraction of powdered milk products was invested. Also Alpha-amylase was used to maintain the enzyme activity within the desired range. For the premixes, solubility of vitamin B_{12} was elevated by increasing amount of water for extraction and lowing concentration of the premixes. In addition, when determining natural vitamin B_{12} forms in milk product, excess cyanide was added in order to convert the natural cobalamins into the cyano-form. However addition of cyanide in the extraction process of the premixes did not show the improvement. The appropriate time for the binding between monoclonal antibody and cyanocobalamin was studied for 5, 10, or 15 min. It was found that time for the binding in low-vitamin-B_{12} product did not significantly effect, whereas, the longer shaking time for the high-vitamin-B_{12} product trended to provide better result. The sufficient amount of methanol for eluting Vitamin B_{12} from immunoaffinity gel column was 3 mL and percent recovery of vitamin B_{12} from the efficiency of immunoaffinity gel column loading with low, medium, and high concentration of vitamin B_{12} standard was 98%. Since the protocol provided by Mead Johnson Nutrition gave lower vitamin B_{12} concentration than the supplier's protocol, this study has point out the causes of disagreement in analysis results and also led to the improvement in the analysis of vitamin B_{12} which related in more accuracy comply with AOAC and the better vitamin B_{12} specification.

Keywords: Determination of Vitamin B_{12}, Immunoaffinity Chromatography, Cyanocobalamin

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สุรชัย พรภคกุล อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการที่กรุณาให้ความสนับสนุน ความรู้ ความเมตตา คำแนะนำ และแนวทางในการดำเนินงานวิจัย อีกทั้งสละเวลาเพื่อให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ เป็นอย่างดียิ่งมาโดยตลอด ทำให้งานวิจัยและรายงานเล่มนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.สนอง เอกสิทธิ์ และ รองศาสตราจารย์อาจารย์ ดร.นวลพรรณ จันทรศิริ ที่กรุณาสละเวลาในการตรวจทานแก้ไขรายงานฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ตลอดจนให้คำแนะนำ และให้เกียรติมาเป็นคณะกรรมการในการสอบงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ คณะผู้บริหารจัดการในภาคส่วนปฏิบัติการเคมีตลอดจนพนักงานทุกท่านของบริษัท Mead Johnson Nutrition ที่ได้อำนวยความสะดวกในการทำปฏิบัติการ ดูแลให้ความรู้ต่างๆ อาทิเช่น การดูแลเครื่องมือ วิธีการทดลอง เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสารเคมีที่จำเป็น รวมทั้งให้ความช่วยเหลือในด้านการวิเคราะห์ข้อมูล ให้คำแนะนำ และคำปรึกษาที่ดีมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณ “โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์และโครงการสหกิจศึกษา” คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนสนับสนุนในการดำเนินงานวิจัยครั้งนี้ ขอขอบพระคุณ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ถ่ายทอดความรู้ให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการทำวิจัยครั้งนี้และต่อยอดการทำงานในอนาคตได้ และรวมถึงกำลังใจจาก พ่อ แม่ ครอบครัว คนสำคัญ และ เพื่อน พี่ น้อง ในภาควิชาเคมีทุกคน ที่ได้ช่วยเหลือจนงานวิจัยนี้ผ่านลุล่วงไปได้ด้วยดี

เนื้อแพร พรหมหิตร

สารบัญ

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ค

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ง

กิตติกรรมประกาศ ..... จ

สารบัญ ..... ฉ

สารบัญรูป ..... ซ

สารบัญตาราง ..... ฌ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความสำคัญและมูลเหตุจูงใจ 1

1.2 วัตถุประสงค์ 4

1.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 6

บทที่ 2 การทดลอง 7

2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ 7

2.2 สารเคมี 8

2.3 วิธีการทดลอง 9

2.3.1. การเตรียมตัวอย่าง 9

2.3.2. การสกัดแยกวิตามินบี 12 โดยใช้ Immunoaffinity gel column 9

2.3.3. ระเหยตัวทำลายออกและเก็บสารตัวอย่าง 10

2.3.4. หาปริมาณวิตามินบี 12 โดยใช้เครื่อง UHPLC 10

2.4 วิธีการคำนวณ 11

2.4.1 นมผง 11

2.4.2 Premixes 12

บทที่ 3 13

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง **13**

3.1 การเตรียมตัวอย่าง 13

3.1.1 การเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์วิตามินบี 12 ในนมผง 13

3.1.2 การเตรียมสารตัวอย่างสำหรับ Premixes 19

3.2 Immunoaffinity gel column 26

3.2.1 ตรวจสอบปริมาณของเมทานอลในการชะ Cyanocobalamin 26

3.2.2 ตรวจสอบประสิทธิภาพของ Immunoaffinity Gel Column 27

3.2.3 ระยะเวลาในการเขย่า Immunoaffinity gel column 29

บทที่ 4 ..... **31**

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ **31**

บรรณานุกรม **34**

ประวัติผู้วิจัย **37**

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 3.1 โครงสร้างหลักของวิตามินบี 12 (Cobalamin) 15

รูปที่ 3.2 โครงสร้างหลักของวิตามินบี 12 (Cobalamin)..... 15

รูปที่ 3.3 โครงสร้างของวิตามินบี 12 ในรูปแบบต่างๆ..... 16

รูปที่ 3.4 โครงสร้างของวิตามินบี 12 ในรูปแบบ Cyanocobalamin.....17

รูปที่ 3.5 ผลการตรวจวิเคราะห์วิตามินบี 12 ในรูปแบบ Cyanocobalamin ด้วยเครื่อง UHPLC DAD Detector เมื่อเติมและไม่เติมโซเดียมไซยาไนด์ในผลิตภัณฑ์ Premixes..... 20

รูปที่ 3.6 UV-Vis Spectra of CNCbl **1** in H_2O and $(CN)_2Cby(OMe)_7$ **25** in DCM..... 20

รูปที่ 3.7 การแยกด้วยเทคนิค แอฟฟินิตี โครมาโทกราฟี (Affinity chromatography)..... 27

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1.1 ผลการวิเคราะห์วิตามินบี 12 ของผลิตภัณฑ์ J7 และ J4 ซึ่งเป็น premixes ที่มีปริมาณวิตามินบี 12 สูง..... 2

ตารางที่ 1.2 Trend analysis of vitamin B12..... 3

ตารางที่ 2.1 Gradient table of UPLC..... 10

ตารางที่ 3.1 ผลการวิเคราะห์วิตามินบี 12 ในนมผงเมื่อใช้ alpha- amylase และ papain..... 13

ตารางที่ 3.2 โครงสร้างของวิตามินบี 12 ในรูปแบบต่างๆ..... 15

ตารางที่ 3.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 ในนมผง โดยใช้และไม่ใช้โซเดียมไซยาไนด์..... 17

ตารางที่ 3.4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 ใน premixes โดยใช้และไม่ใช้โซเดียมไซยาไนด์..... 19

ตารางที่ 3.5 ผลการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 ใน premixes โดยการเจือจาง..... 22

ตารางที่ 3.6 ผลการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 ใน premixes โดยใช้อุณหภูมิการละลายที่แตกต่างกัน..... 23

ตารางที่ 3.7 ผลการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 ใน premixes โดยการละลายในน้ำอุณหภูมิ 40 องศา-เซลเซียสและน้ำอุณหภูมิห้อง..... 24

ตารางที่ 3.8 ผลการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 ใน premixes โดยเพิ่มระยะเวลาการละลายภายใต้คลื่นความถี่สูง..... 25

ตารางที่ 3.9 ผลการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 เมื่อตรวจสอบปริมาณของเมทานอลในการชะ cyanocobalamin ที่ยึดติดกับ monoclonal antibody..... 26

ตารางที่ 3.10 ผลการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 เมื่อตรวจสอบประสิทธิภาพของ immunoaffinity gel column..... 28

ตารางที่ 3.11 ผลการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 เปรียบเทียบระยะเวลาในการเขย่า immunoaffinity gel column..... 29

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและมูลเหตุจูงใจ

วิตามินบี 12 เป็นชื่อกลุ่มสำหรับสารที่ประกอบไปด้วย Co corrinoids หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า cobalamin (Cbl) มีคุณสมบัติละลายได้ในน้ำและในแอลกอฮอล์ ไม่ทนต่อสภาพความเป็นกรดและด่าง วิตามินบี 12 เมื่ออยู่ในร่างกายจะมีหลากหลายแบบ แต่ที่พบเป็นหลักในร่างกายจะประกอบด้วย cyanocobalamin, hydroxocobalamin, adenosylcobalamin และ methylcobalamin ซึ่งสองสารหลังมีหน้าที่เป็น active coenzyme [1]

วิตามินบี 12 มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการออกฤทธิ์ทางชีวภาพในร่างกายของสิ่งมีชีวิต อาทิเช่น มีส่วนช่วยในการเมทาบอลิซึมของ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน ทำให้ร่างกายได้รับพลังอย่างรวดเร็ว ทำหน้าที่เป็น coenzyme ช่วยเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ DNA เพื่อใช้ในการกระตุ้นให้เซลล์สร้างเม็ดเลือดแดงให้เกิดการแบ่งเซลล์ตามปกติ ช่วยในการสังเคราะห์เมไทโอนีน และโคลีน ซึ่งเป็นตัวการสำคัญในการป้องกันการสะสมไขมันในตับ (Lipotropic Factors) และช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตในเด็ก underdeveloped และ undernourished โดยจะเพิ่มความอยากอาหาร อีกทั้งมีส่วนช่วยในการทำงานของระบบและประสาทและสมอง วิตามินบี 12 จะพบมากใน เนื้อสัตว์ อาหารทะเล ไข่ และนิยมนำมาเป็นส่วนผสมในอาหารและเครื่องดื่มในชีวิตประจำวัน เช่น ซีเรียลอาหารเช้า อาหารเสริมวิตามินบีรวม และในนมสำหรับเด็กแรกเกิด [2]

วิตามินบี 12 ที่พบในอาหารและนมมักจะอยู่รวมตัวกับโปรตีนและไกลโคโปรตีน จึงต้องมีการแยกออกโดยจากโปรตีนโดยการใช้กรดหรือเอนไซม์ในการย่อยโปรตีนก่อนนำไปวิเคราะห์หาปริมาณในปัจจุบันได้มีวิธีการวิเคราะห์วิตามินบี 12 ในอาหารและนมโดยอาศัยเทคนิคทางเคมีอย่างหลากหลาย เช่น spectrophotometric, microbiological, chromatographic, radioassay or immunoassay methods จากงานวิจัย [3] ได้ทำการทดลองโดยใช้เทคนิค Microbiological assays ในการสกัดแยกโปรตีนก่อนนำไปวิเคราะห์วิตามินบี 12 สำหรับเทคนิคนี้มีความไว สูง แต่ไม่จำเพาะเจาจง และจำเป็นต้องเตรียมสารตัวอย่างด้วยความระมัดระวังเนื่องจากสามารถเกิดการปนเปื้อนได้ง่ายและใช้เวลาในการอบเชื้อ อย่างน้อย 24 ชั่วโมง เป็นอย่างต่ำ อีกทั้งการวิเคราะห์วิตามินบี 12 ใน biological matrices โดยใช้เทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC) ที่ความเข้มข้นต่ำทำได้ยาก เนื่องจากมีขีดจำกัดการจรวจวัดสูง ดังนั้นทางบริษัท Mead Jonhson nutrition จึงเลือกใช้วิธีการสกัดวิตามินบี 12 ในผลิตภัณฑ์นม โดยใช้

immunoaffinity column ก่อนนำไปวิเคราะห์หาปริมาณด้วยเครื่อง Ultra performance liquid chromatography (UPLC) เนื่องจากเป็นวิธีการที่สะดวก รวดเร็ว และมีความจำเพาะต่อวิตามินบี 12 ค่อนข้างสูง

สำหรับบริษัท Mead Jonhson nutrition ได้มีการตรวจสอบวิตามินบี 12 ในอาหารและนม โดยใช้ method MJN009 ซึ่งปรับมาจาก international AOAC method 2014.02 โดยการทดลองประกอบด้วยสามส่วนหลัก คือ การเตรียมตัวอย่างสำหรับผลิตภัณฑ์ นมผง นมน้ำ และ polyvitamin premixes, การสกัดวิตามินบี 12 โดยใช้ NaCN ร่วมด้วย และการทำให้วิตามินบี 12 มีความบริสุทธิ์โดย gel column immunoaffinity และตรวจหาปริมาณโดยเทคนิค Ultra performance liquid chromatography และตรวจวัดด้วย UV detector [4] ปัญหาที่พบคือ ค่าการวิเคราะห์วิตามินบี 12 ในผลิตภัณฑ์นมของไม่สอดคล้องกับข้อกำหนดของผลิตภัณฑ์ และผลการวิเคราะห์ของตัวแทนจำหน่าย และ ทางไมโครแลป โดยเฉพาะใน polyvitamin premixes ที่มีค่าตามข้อกำหนดผลิตภัณฑ์ที่สูง จะได้ผลการวิเคราะห์วิตามินบี 12 ไม่คงที่และส่วนใหญ่ไม่สอดคล้องกับข้อกำหนดของผลิตภัณฑ์ ดังแสดงในตารางที่ 1.1 [5]

ตารางที่ 1.1 ผลการวิเคราะห์วิตามินบี 12 ของผลิตภัณฑ์ J_7 และ J_4 ซึ่งเป็น premixes ที่มีปริมาณวิตามินบี 12 สูง

Vitamin B_{12} (µg/g)		
Sample	J_7	J_4
Initial	4.43	5.66
Retest 1	4.86	5.33
Retest 2	4.45	4.96
Retest 3	4.92	5.21
Average result of triplicate	4.74	5.17
Specification	6.30 - 8.10	6.18 - 7.82

ตารางที่ 1.2 Trend analysis of vitamin B_{12}

Sample	Result (µg/g)			
	MJN009	**Supplier**	**Micro Lab**	**Specification**
J_1	5.38	6.52	-	6.18 – 7.82
J_2	5.07	6.48	7.09	
J_3	5.38	6.47	-	6.18 – 7.82
J_4	5.17	6.62	7.23	
J_5	8.24	9.58	-	8.9 – 11.3
J_6	8.26	9.64	-	
J_7	4.74	6.69	7.89	6.30 – 8.10
J_8	6.17	7.14	6.33	
J_9	4.03	4.11	-	3.68 - 5.52
J_{10}	4.16	4.41	4.79	
J_{11}	0.83	0.77	-	0.64 – 0.96
J_{12}	2.90	3.29	-	2.64 – 3.96
J_{13}	2.78	3.17	-	
J_{14}	3.05	3.18	-	
J_{15}	3.04	3.21	-	

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นในการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์วิตามินบี 12 โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีที่พัฒนาและศึกษาเพิ่มเติมโดยมีพื้นฐานมาจาก method MJN009 ที่ทางบริษัทปรับมาจาก AOAC method 2014.02 เพื่อสามารถตรวจสอบวิตามินบี 12 ในนมให้มีค่าการวิเคราะห์ที่ดีขึ้น ให้ผลการวิเคราะห์สอดคล้องกับข้อกำหนดของผลิตภัณฑ์ ให้มีความถูกต้องแม่นยำตามหลักเกณฑ์ของ AOAC และสามารถตรวจสอบผลิตภัณฑ์นมครอบคลุมกับผลิตภัณฑ์ของบริษัทให้ได้มากที่สุด โดยจะทำการศึกษา กระบวนการในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง ทั้งในนมผง และ polyvitamin การสกัดวิตามินบี 12 และการตรวจวิเคราะห์ด้วย UPLC ที่จะเป็นสาเหตุทำให้ค่าการวิเคราะห์ต่ำกว่าเกณฑ์ไม่สอดคล้องกับข้อกำหนดของผลิตภัณฑ์และให้ผลการวิเคราะห์วิตามินบี 12 ไม่คงที่ พร้อมทั้งหาแนวทางแก้ไขปัญหา และประยุกต์ใช้แนวทางแก้ไขกับสารตัวอย่างและในผลิตภัณฑ์นมชนิดต่างๆของบริษัท

1.2 วัตถุประสงค์

1). สามารถหาสาเหตุของค่าการวิเคราะห์วิตามินบี 12 ไม่ตรงกับผลการวิเคราะห์ของตัวแทนจำหน่าย

2). ปรับปรุงวิธีทดสอบวิตามินบี 12 (MJN009) ให้สามารถทดสอบครอบคลุมกับผลิตภัณฑ์ของบริษัท

1.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในปี ค.ศ. 2006, Heudi และคณะ [1] วิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 ในอาหารและ premixes โดย reverse-phase HPLC UV detection ซึ่งวิตามินบี 12 ถูกสกัดออกจากอาหารด้วย 50 มิลลิลิตร ของสารละลายโซเดียมแอซิเตทบัฟเฟอร์ pH 4 ร่วมกับ NaCN ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส และใช้เอนไซม์ pepsin ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดให้วิตามินบี 12 ออกมาจากอาหารได้มากขึ้น วิตามินบี 12 ในรูปของ cyanocobalamin จะถูกทำให้บริสุทธิ์โดยจับกับ monoclonal antibody ใน immunoaffinity column และวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 โดย HPLC ด้วยตัวตรวจวัด UV ความยาวคลื่น 361 นาโนเมตร

ในปี ค.ศ. 2008, Campos และคณะ [3] วิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 ในอาหารจำพวกซีเรียล, นมผงสำหรับเด็กแรกเกิด, นมโกโก้, ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร และ premixes โดย reverse-phase LC UV detection ซึ่งวิตามินบี 12 ถูกสกัดออกจากผลิตภัณฑ์ด้วย 50 มิลลิลิตร ของสารละลายโซเดียมแอซิเตทบัฟเฟอร์ pH 4 ร่วมกับ NaCN ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส และใช้เอนไซม์ alpha-amylase สำหรับผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของแป้ง หรือ pepsin หรือ papain เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดให้วิตามินบี 12 ออกมาจากผลิตภัณฑ์ได้มากขึ้น ในส่วนของผลิตภัณฑ์ที่เป็น polyvitamin premixes วิตามินบี 12 ถูกสกัดออกจากผลิตภัณฑ์ด้วย 50 มิลลิลตร ของสารละลายโซเดียมแอซิเตทบัฟเฟอร์ pH 4 โดยไม่ใช้ NaCN และเอนไซม์ร่วมด้วย หลังจากนั้นวิตามินบี 12 ในรูปของ cyanocobalamin จะถูกทำให้บริสุทธิ์โดยจับกับ monoclonal antibody ใน immunoaffinity column และวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 โดย LC ด้วยตัวตรวจวัด UV ความยาวคลื่น 361 นาโนเมตร

ในปี ค.ศ. 2012, Ursula และคณะ [6] ซึ่งปรับมาจาก AOAC Official Method 2011.09 วิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 ในผลิตภัณฑ์นมสำหรับผู้ใหญ่และเด็กแรกเกิด โดย reverse-phase HPLC UV detection ซึ่งวิตามินบี 12 ถูกสกัดออกจากผลิตภัณฑ์ด้วยสารละลายโซเดียมแอซิเตทบัฟเฟอร์ ร่วมกับ KCN และใช้เอนไซม์ alpha-amylase หรือ pepsin เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดให้วิตามินบี 12 ออกมาจากผลิตภัณฑ์ได้มากขึ้น หลังจากนั้นผ่านวิตามินบี 12 ในรูปของ cyanocobalamin ที่ถูกเปลี่ยนรูปแบบแล้ว

ลงใน immunoaffinity column ซึ่งประกอบด้วย antibody ที่มีความจำเพาะสูงมาจับกับ cyanocobalamin ชะออกจากคอลัมน์ด้วยเมทานอล และวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 โดย HPLC ด้วยตัวตรวจวัด UV ความยาวคลื่น 361 นาโนเมตร

สำหรับบริษัท Mead Johnson Nutrition ได้ใช้ method MJN009 ซึ่งปรับมาจาก AOAC Official Method 2014.02 [7] ในการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 ใน ผลิตภัณฑ์นมสำหรับผู้ใหญ่และเด็กแรกเกิด โดย reverse-phase UPLC ซึ่งวิตามินบี 12 ถูกสกัดออกจากผลิตภัณฑ์ด้วยสารละลายโซเดียมแอซิเตทบัฟเฟอร์ pH 4 ร่วมกับ NaCN และใช้เอนไซม์ alpha-amylase เพื่อให้แน่ใจว่าได้ทำการย่อยคาร์โบไฮเดรตในส่วนอื่นๆของผลิตภัณฑ์ออกจนหมด เหลือเพียงแค่โปรตีนที่วิตามินบี 12 เกาะอยู่ เพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดให้วิตามินบี 12 ออกมาจากผลิตภัณฑ์ได้มากขึ้น หลังจากนั้นวิตามินบี 12 ในรูปของ cyanocobalamin จะถูกทำให้บริสุทธิ์ โดยผ่านลงใน immunoaffinity column ซึ่งประกอบด้วย antibody ที่มีความจำเพาะสูงมาจับกับ cyanocobalamin ชะออกจากคอลัมน์ด้วยเมทานอล และวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 โดย UPLC ด้วยตัวตรวจวัด UV ความยาวคลื่น 361 นาโนเมตร

จากงานวิจัยดังที่กล่าวมาข้างต้น การวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินบี 12 ในผลิตภัณฑ์ วิตามินรวม และในนมผงสำหรับเด็กและผู้ใหญ่ จะใช้วิธีการเดียวกัน โดยมักจะผ่านหลายขั้นตอน เริ่มจากการที่วิตามินบี 12 ซึ่งส่วนใหญ่มักจะเกาะติดกับโปรตีน จะมีการใช้มีการใช้เอนไซม์เพื่อย่อยสารประกอบโปรตีนให้เล็กลงอีกทั้งเพื่อกำจัดคาร์โบไฮเดรตออกไป และวิตามินบี 12 จะถูกสกัดออกจากผลิตภัณฑ์ตัวอย่าง ในสารละลายโซเดียม-แอซิเตทบัฟเฟอร์ pH 4 ร่วมกับ NaCN ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เพื่อเปลี่ยนรูปแบบอื่นๆที่พบในธรรมชาติของนม ให้เป็นรูปแบบ cyanocobalamin หลังจากนั้นวิตามินบี 12 ในรูปของ cyanocobalamin จะถูกทำให้บริสุทธิ์โดยจับกับ monoclonal antibody ที่มีความจำเพาะกับ cyanocobalamin ใน immunoaffinity gel column และวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินบี 12 โดย UPLC ด้วยตัวตรวจวัด UV ความยาวคลื่น 361 นาโนเมตร เนื่องจากเป็นเครื่องมือแยกและวิเคราะห์สารที่อยู่ในรูปของเหลวที่สมรรถนะสูงกว่า HPLC โดยการเพิ่มแรงดันของของเหลว และการใช้คอลัมน์ขนาดเล็กลง การวิเคราะห์จึงใช้ระยะเวลาสั้นกว่าสิ้นเปลืองสารเคมีน้อยกว่าและยังให้ผลการแยกสารที่ดีกว่า HPLC

งานวิจัยนี้ได้สนใจที่จะพัฒนาขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์โดย เริ่มจากขั้นตอนการสกัดวิตามินบี 12 ในภาวะที่เหมาะสม เช่น ในผลิตภัณฑ์นมผงจะมีการศึกษาในส่วนของเอนไซม์ ระหว่าง alpha-amylase กับ papain ว่าเอนไซม์ตัวใดหรือใช้ปริมาณเท่าไรจึงมีส่วนทำให้ค่าการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินบี 12 เพิ่มสูงขึ้น ส่วนสำหรับใน premixes จะศึกษาการละลาย การเจือจางความเข้มข้น และศึกษาการเติมหรือไม่เติม NaCN ว่ามีผลต่อการเปลี่ยนวิตามินบี 12 ในรูปแบบอื่นๆที่พบในธรรมชาติของนม ให้เป็น cyanocobalamin ทั้งในผลิตภัณฑ์นมผง และ premixes นอกจากนี้ศึกษาในส่วนของ เวลาที่เหมาะสมในการ

จับกันของ monoclonal antibody และ cyanocobalamin รวมไปถึงตรวจสอบปริมาณเมทานอล สารที่ใช้ในการชะวิตามินบี 12 ออกจาก immunoaffinity gel column หรืออาจใช้สารชนิดอื่นมาชะแทนเมทานอล และสุดท้ายตรวจสอบประสิทธิภาพของ immunoaffinity gel column การศึกษาและพัฒนาขั้นตอนเหล่านี้เพื่อหาสาเหตุว่าทำไม ผลการวิเคราะห์ของทางบริษัทจึงไม่ตรงกับตัวแทนจำหน่าย อีกทั้งหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในขั้นตอนต่างๆ เพื่อให้ได้ค่าการวิเคราะห์ถูกต้องแม่นยำตามเกณฑ์ของ AOAC

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

วิธีที่ใช้ในการทดสอบวิตามินบี 12 ที่ได้รับการแก้ไขแล้วสามารถใช้ทดสอบกับผลิตภัณฑ์นมได้และให้ค่าถูกต้องแม่นยำตามเกณฑ์ของ AOAC

บทที่ 2

การทดลอง

2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) with Tunable Ultra Violet detector ยี่ห้อ Waters, Acquity

2. Data system ยี่ห้อ Atlas 8.2.3 Chromatography Data system

3. Analytical Column ยี่ห้อ Waters Acquity BEH C18 2.1 x 100 mm in diameter, 1.7 µm

4. Oven/Autoclave ยี่ห้อ Fisher Scientific Isotemp Oven Model 718F/Primus PSS500

5. Shaker Bath 37°C ยี่ห้อ G76D New Brunswick Sciencetific Co Inc.

6. Electronic digital pipette ยี่ห้อ Rainin, 1000 µL, 10 mL

7. Easi- Extract Column ยี่ห้อ RBR Product, Product Code: P88/88B

8. Rotary evaporator ยี่ห้อ Zymark Turbovap LV Evaporator P/N 43750/30

9. Filter paper ยี่ห้อ Whatman no. 2, 125 mm, Cat No 1002 125

10. Ultrasonic cleaner ยี่ห้อ Crest ultrasonics

11. Vortex mixer รุ่น Vortex- 2 Genie ยี่ห้อ Scientific Industries

2.2 สารเคมี

1. เมทานอล (Methanol, MeOH)

2. แอซิโตไนไตรล์ (Acetonitrile, ACN)

3. ไอโซโพรพานอล (Isopropanol, IPA)

4. ไตรฟลูออโรแอซิติก แอซิด (Trifluoroacetic acid, TFA)

5. เอทิลแอลกอฮอล์ (Ethyl Alcohol)

6. ไซยาโนโคบาลามิน (Cyanocobalamin, Cbl)

7. โซเดียมไซยาไนด์ (Sodium cyanide, NaCN)

8. สารละลายโซเดียมไซยาไนด์ (Sodium cyanide solution, NaCN 1%)

9. โพแทสเซียมไซยาไนด์ (Potassium cyanide, KCN)

10. สารละลายโพแทสเซียมไซยาไนด์ (Potassium cyanide solution, KCN 10%)

11. แอลฟาอะไมเลสจากตับอ่อนของหมู (Alpha-amylase from porcine pancreas)

12. โซเดียมแอซิเตทบัฟเฟอร์ (Sodium acetate buffer, NaOAC buffer)

13. ปาเปนจากยางมะละกอ (Papain Carica papaya)

14. สารตัวอย่าง QC นมผงสูตร State 1

15. สารตัวอย่าง A นมผงสูตร State 2

16. สารตัวอย่าง B นมผงสูตร State 2

17. สารตัวอย่าง C นมผงสูตร State 3

18. สารตัวอย่าง D นมผงสูตร State 3

19. สารตัวอย่าง E Polyvitamin Premixes high specification

20. สารตัวอย่าง F Polyvitamin Premixes low specification

2.3 วิธีการทดลอง

2.3.1. การเตรียมตัวอย่าง

2.3.1.1. การเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์วิตามินบี 12 ในนมผง

ละลายนมโดยชั่งนมผง 25 กรัม ลงในขวดสีชา เติมน้ำ 200 กรัม ชั่งนมที่ละลายแล้ว 60 กรัม เติมแอลฟาอะไมเลส 0.05 กรัม เติม 1% โซเดียมไซยาไนด์ 1 มิลลิลิตร ปิดฝาเขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่ม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในเครื่อง Autoclave เพื่อให้เอนไซม์ทำงาน เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลาย 0.4 M โซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ 25 มิลลิตร นำเข้าตู้อบอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรจนเป็น 100 มิลลิตร กรองเอาตะกอนออกด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 2

2.3.1.2.การเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์วิตามินบี 12 ใน Polyvitamin Premixes

ละลาย Premixes โดยชั่งนมผง 1 กรัม ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิตร เติมน้ำอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 50 มิลลิลิตร ละลายโดยแช่ลงในอ่างน้ำความถี่สูง (sonicate) 15 นาที และปรับปริมาตรจนถึง 100 มิลลิลิตร ปิเปต Premixes ที่ละลายแล้วมา 10 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 0.4 M โซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ 50 มิลลิตร และ 1% โซเดียมไซยาไนด์ 1 มิลลิลิตร นำเข้าตู้อบ อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรจนเป็น 100 มิลลิลิตร กรองเอาตะกอนออกด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 2

2.3.2. การสกัดแยกวิตามินบี 12 โดยใช้ Immunoaffinity gel column

เตรียม Easi- Extract columns โดยนำออกมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง เปิดฝาและปล่อยสารละลายออกจากคอลัมน์ หลังจากนั้นทำการโหลดสารตัวอย่างที่ได้จากขั้นตอนการเตรียม ลงในเจลคอลัมน์ ปิดฝาและเขย่าอย่างช้าๆ เพื่อให้วิตามินบี 12 จับกับเจลได้อย่างสมบูรณ์ เปิดฝาปล่อยสารออกจากคอลัมน์ ล้างคอลัมน์ด้วยน้ำปริมาณ 10 มิลลิลิตร ปล่อยน้ำออกจากคอลัมน์ กำจัดน้ำออกจากคอลัมน์ให้หมดโดยผ่านอากาศเข้าไปในคอลัมน์ หลังจากนั้นชะเก็บวิตามินบี 12 โดยเติมเมทานอลปริมาณ 2 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 5 นาที ปล่อยลงในหลอดทดลองสะอาด และเติมเมทานอลอีก 1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นผ่านลมเข้าสู่คอลัมน์เพื่อให้เมทานอลออกจากคอลัมน์จนหมด

2.3.3. ระเหยตัวทำลายออกและเก็บสารตัวอย่าง

นำสารตัวอย่างที่มีเมทานอลในหลอดทดลองที่ได้จากขั้นตอน 2.3.2 ไประเหยเอาเมทานอลออกโดยเข้าเครื่อง TURBOVAP Gas Nitrogen อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนแห้ง หลังจากนั้นละลายด้วย 90:10 Moblie Phase A/ Mobile Phase B ปริมาณ 0.3 มิลลิลิตร vortex 1 นาที และกรองเก็บใน vials

2.3.4. หาปริมาณวิตามินบี 12 โดยใช้เครื่อง UPLC

2.3.4.1.เตรียม Mobile Phase (MP)

MP A: 0.025% TFA in water โดย เติม TFA 0.25 มิลลิลิตร ลงในน้ำ 1 ลิตร

MP B: 0.025% TFA in Acetonitrile โดย เติม TFA 0.25 มิลลิลิตร ลงใน ACN 1 ลิตร

2.3.4.2. เตรียมสภาวะเครื่อง UPLC ดังต่อไปนี้

Column Temperature: 40 องศาเซลเซียส

Wash Solvent: Weak wash water: ACN 90:10

Strong wash ACN: MeOH: Water: IPA 40:40:10:10

Injection Volume: 0.05 µL

Flow: 0.250 mL/min

Gradient Table **ตารางที่ 2.1** Gradient table of UPLC

	Time	Flow rate	% MP A	% MP B
1	Initial	0.250	90.0	10.0
2	1.7	0.250	90.0	10.0
3	2.5	0.250	75.0	25.0
4	5.9	0.250	10.0	90.0
5	6.9	0.250	10.0	90.0
6	7.0	0.250	90.0	10.0
7	11.0	0.250	90.0	10.0

Run- time: 11นาที

Wavelength: Single mode 361 nm

2.4 วิธีการคำนวณ

2.4.1 นมผงคำนวณด้วยสูตรดังนี้

$$\frac{(\boldsymbol{A})(\boldsymbol{B})(\boldsymbol{F})\mathbf{0.3}}{(\boldsymbol{D})(\boldsymbol{E})\mathbf{9}}\boldsymbol{x}\,\mathbf{100} = \boldsymbol{Amount\ of\ vitamin}\ \boldsymbol{B}\mathbf{12}\ (\mu\boldsymbol{g}/\mathbf{100}\ \boldsymbol{g})$$

A = Instrument response (ppm or µg/mL)

B = Volume of sample (Always 100 mL)

F = Weight of slurry (g)

D = Weight of sample (g)

E = Weight of powder (g)

0.3 = Reconstituted volume (mL)

9 = Volume on the immunoaffinity column (mL)

2.4.2 Premixes คำนวณด้วยสูตรดังนี้

$$\frac{(\boldsymbol{A})(\boldsymbol{D1})(\boldsymbol{D2})\boldsymbol{0.3}}{(\boldsymbol{G})(\boldsymbol{P})\boldsymbol{9}} = \boldsymbol{Amount\ of\ vitamin\ B12}\ (\mu \boldsymbol{g/g})$$

A = Instrument response (ppm or µg/mL)

D1 = Dilute first time (mL) (Always 100 mL)

D2 = Dilute Second time (mL) (Always 100 mL)

G = Weight of sample (g)

P = Volume pipette (mL) (Always 10 mL)

0.3 = Reconstituted volume (mL)

9 = Volume on the immunoaffinity column (mL)

บทที่ 3

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

3.1 การเตรียมตัวอย่าง

3.1.1 การเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์วิตามินบี 12 ในนมผง

3.1.1.1 การเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์วิตามินบี 12 นมผง การใช้ alpha- amylase และ papain

เนื่องจาก Method MJN009 ได้มีการแนะนำ enzyme active ในช่วง 1000-1500 unit เพื่อให้ได้ค่าการวิเคราะห์ที่เหมาะสม ดังนั้นในการทดลองจึงได้ทำการศึกษาเอนไซม์ที่นำมาใช้ โดยทำการเปรียบเทียบปริมาณของ alpha- amylase ระหว่าง 0.05 กรัม (enzyme activity= 600) และ 0.1 (enzyme activity= 1200) กรัม นอกจากนี้ยังศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่าง 0.1 กรัม alpha- amylase และ 0.4 กรัม Papain (enzyme activity= 1200) ได้ผลการทดลองเป็นดังตารางที่ 3.1

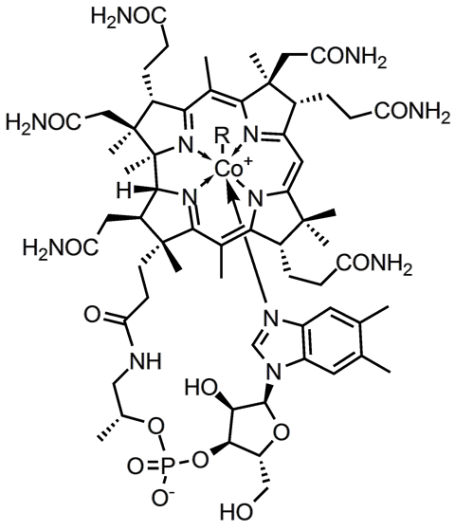
ตารางที่ 3.1 ผลการวิเคราะห์วิตามินบี 12 ในนมผงเมื่อใช้ alpha- amylase และ papain

sample	Result B12 (µg/100g)				Specification
	Test date:19/08/2020				
	Initial	0.05 Amylase	0.1 Amylase	0.4 Papain	
QC	-	2.35	2.42	2.37	2.21- 2.66
A	1.63	1.77	1.81	1.74	0.90 - 2.80
B	3.00	2.93	3.05	2.90	3.30 - 6.60
C	2.77	2.58	2.26	2.67	1.75 - 3.33
D	1.67	1.66	1.72	1.68	2.00 - 3.33

จากตารางที่ 3.1 พบว่า ในผลิตภัณฑ์ A B และ D การใช้ alpha- amylase 0.1 กรัม ให้ค่าการทดลอง เท่ากับ 1.81, 3.05 และ 1.72 µg/100g ผลการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 มีแนวโน้มสูงกว่า สำหรับผลิตภัณฑ์ C มีแนวโน้มต่ำกว่าการใช้ alpha- amylase 0.05 กรัม แต่จากตารางผลการทดลองพบว่าค่าการทดลองไม่ได้แตกต่างกันมาก การที่ ผลิตภัณฑ์ A B และ D มีแนวโน้มได้ค่าการวิเคราะห์เพิ่มขึ้น เพราะ การใช้ alpha- amylase มีจุดประสงค์ในการย่อยส่วนที่เป็นคาร์โบไฮเดรตออกจากผลิตภัณฑ์ เพื่อให้มั่นใจว่ามีเพียงโปรตีนที่มีวิตามินบี 12 ที่เกาะติด เท่านั้น ก่อนนำไปสกัดวิตามินบี 12 ด้วยสารละลายโซเดียมแอซิเตทร่วมกับโซเดียมไซยาไนด์ ดังนั้นการใช้ alpha-amylase 0.1 กรัม ซึ่งมีค่า enzyme active 1200 unit จึงมีส่วนในการย่อยคาร์โบไฮเดรตออกจากผลิตภัณฑ์ได้มากกว่า เมื่อเทียบกับการใช้ alpha- amylase 0.05 กรัม ซึ่งมีค่า enzyme active เพียง 600 unit เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ 0.1 กรัม alpha- amylase และ 0.4 กรัม papain ซึ่งมีค่า enzyme active 1200 unit เท่ากัน พบว่าเอนไซม์ทั้งสองมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกันสามารถใช้แทนกันได้

3.1.1.2 การเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 ในนมผง โดยใช้และไม่ใช้โซเดียมไซยาไนด์

ทำการศึกษาเปรียบเทียบระหว่าง การเติม 1% โซเดียมไซยาไนด์ 1 มิลลิลิตร และ การไม่เติม โซเดียมไซยาไนด์ ในสารตัวอย่างที่เป็นนมผง วิตามินบี 12 หรือเรียกรวมกันว่า cobalamin มีโครงสร้างหลักประกอบด้วย โคบอลท์ไอออนอยู่กึ่งกลางทำพันธะกับหมู่ฟังก์ชัน [8] ดังรูปภาพที่ 3.1



รูปที่ 3.1 โครงสร้างหลักของวิตามินบี 12 (Cobalamin) [8]

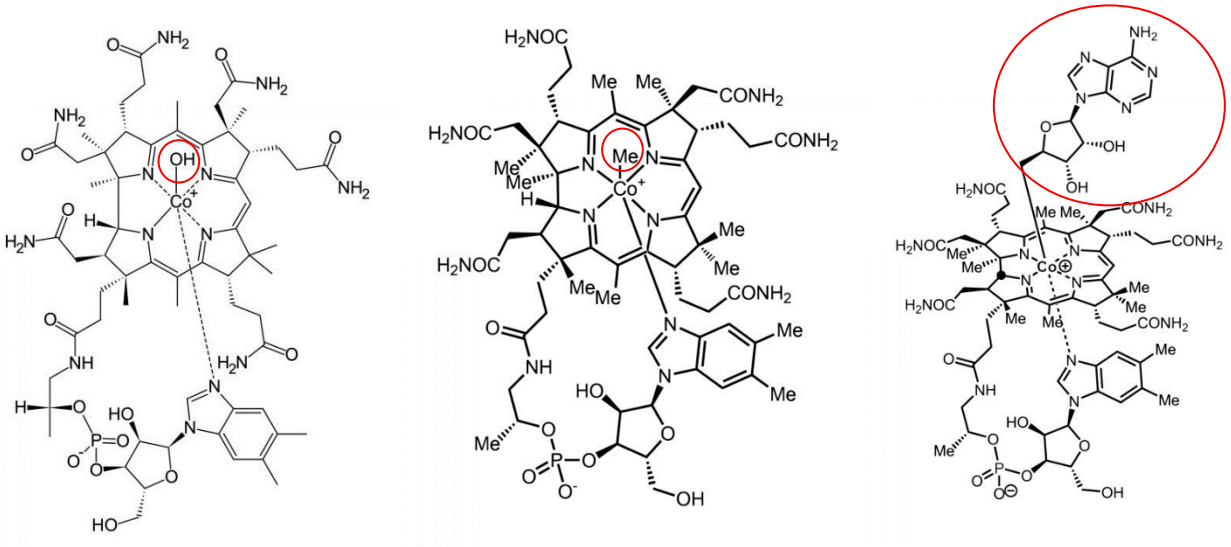
สำหรับวิตามินบี 12 ในรูปแบบต่างๆ เกิดจากลิแกนด์ชนิดต่างๆมาทำพันธะกับโคบอลท์ไอออน ซึ่งวิตามินบี 12 ที่พบในปัจจุบัน มี 4 รูปแบบหลักคือ hydroxocobalamin, adenosylcobalamin, methylcobalamin และ cyanocobalamin [9] ดังรูปภาพที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 โครงสร้างของวิตามินบี 12 ในรูปแบบต่างๆ [10]

Functional group	**Cobalamin form**
H_2O/ HO	Hydroxocobalamin
CH_3	Methylcobalamin
5’- deoxyadenosyl	Adenosylcobalamin
CN	Cyanocobalamin

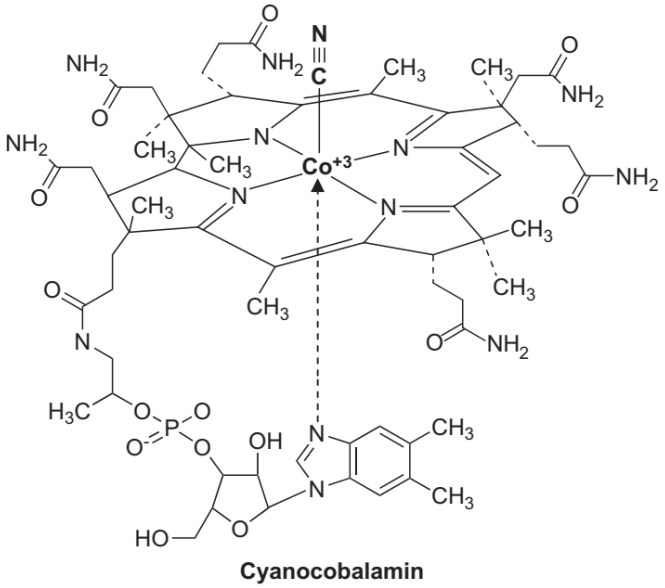
โดยวิตามินบี 12 ในรูปแบบของ hydroxocobalamin, methylcobalamin และ adenosylcobalamin สามารถพบเจอได้ในธรรมชาติ เช่นในร่างกาย หรือ แหล่งอาหารที่มีวิตามินบี 12 เช่น เนื้อ นม อาหารทะเล และ ไข่เป็นต้น [11]

hydroxocobalamin เป็นวิตามินบี 12 ที่ส่วนใหญ่ผลิตขึ้นโดยแบคทีเรียในลำไส้และยังใช้ในรูปแบบการฉีดเข้าสู่ร่างกายเนื่องจากคงทนอยู่ได้นาน เมื่อเข้าสู่ร่างกายจะถูกเปลี่ยนไปอยู่ในรูปแบบของ methylcobalamin และ adenosylcobalamin ซึ่งทั้งสองรูปแบบนี้ เป็นวิตามินบี 12 แบบออกฤทธิ์ (Bioactive coenzyme) สำหรับ Cyanocobalamin เป็นวิตามินบี 12 ชนิดสังเคราะห์ที่มีความเสถียรและไม่ไวต่อการเกิด Oxidation ในอากาศ จึงนำมาใช้กันมากที่สุดสำหรับเสริมในผลิตภัณฑ์อาหาร อีกทั้งเมื่อเข้าสู่ร่างกายจะถูกเปลี่ยนไปเป็น methylcobalamin และ adenosylcobalamin เพื่อให้สามารถออกฤทธิ์ได้และเข้าไปมีบทบาทในการทำงานของระบบต่างๆ ภายในร่างกาย [12,13]



Hydroxocobalamin Methylcobalamin Adenosylcobalamin

รูปที่ 3.3 โครงสร้างของวิตามินบี 12 ในรูปแบบต่างๆ [14]



รูปที่ 3.4 โครงสร้างของวิตามินบี 12 ในรูปแบบ Cyanocobalamin [9]

ในการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 ในผลิตภัณฑ์อาหารและเครื่องดื่ม ซึ่งไม่ได้ประกอบแค่เพียงในรูปแบบ cyanocobalamin เท่านั้น แต่ยังมีวิตามินบี 12 ในรูปแบบที่พบในธรรมชาติซึ่งเกาะติดอยู่กับโปรตีนอีกด้วย [3] ดังนั้นการเติม โซเดียมไซยาไนด์ อาจมีผลต่อการเปลี่ยนวิตามินบี 12 ในรูปแบบอื่นๆให้มาอยู่ในรูปแบบของ cyanocobalamin [15] จากการทดลองได้ผลดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 ในนมผง โดยใช้และไม่ใช้โซเดียมไซยาไนด์

Sample	Result B12 (µg/100g)							Specification
	Test date	5/08/2020		02/09/2020		22/09/2020		
	Initial	NaCN	No NaCN	NaCN	No NaCN	NaCN	No NaCN	
QC		2.49	1.76	2.24	1.81	2.23	1.74	2.21- 2.66
A	1.63	-	-	-	-	1.62	1.25	0.90 - 2.80
B	3.00	-	-	-	-	2.71	1.05	3.30 - 6.60
C	2.77	-	-	-	-	2.46	1.23	1.75 - 3.33
D	1.67	-	-	-	-	1.46	0.63	2.00 - 3.33

จากตารางผลการทดลอง พบว่า ในผลิตภัณฑ์ A B C และ D เมื่อเติมโซเดียมไซยาไนด์ค่าการวิเคราะห์ปริมาณวิตามิน 12 เท่ากับ 1.62 , 2.71, 2.46 และ 1.46 µg/ 100g ในขณะที่การไม่เติมโซเดียมไซยาไนด์ให้ผลการทดลองดังนี้ 1.25, 1.05, 1.23 และ 0.63 µg/ 100g รวมถึงตัวอย่าง QC ด้วยเช่นกัน จากผลการทดลองเห็นได้ชัดว่า การเติมโซเดียมไซยาไนด์ ทำให้ผลการวิเคราะห์ที่ดีกว่า สำหรับตัวอย่างที่เป็นนมผง เพราะ ผลิตภัณฑ์ของบริษัทที่ใช้ในการทดลอง มีวิตามินบี 12 ในรูปแบบ cyanocobalamin จาก polyvitamin premixes ซึ่งเป็นวัตถุดิบใส่ลงไปในผลิตภัณฑ์ และวิตามินบี 12 ในรูปแบบอื่นๆ ที่พบในธรรมชาติของผลิตภัณฑ์นม ดังนั้นการเติมโซเดียมไซยาไนด์ มีผลต่อการเปลี่ยนวิตามินบี 12 ในรูปแบบที่พบเจอในธรรมชาติให้มาอยู่ในรูปของ cyanocobalamin ในขณะที่การไม่เติมโซเดียมไซยาไนด์ ทำให้ค่าการวิเคราะห์น้อยกว่า จึงอนุมานได้ว่าปริมาณของการเติมโซเดียมไซยาไนด์ อาจมีผลต่อการเปลี่ยนรูปแบบให้สมบูรณ์เช่นกัน หากใส่ในปริมาณที่น้อย วิตามินบี 12 ในรูปแบบที่พบเจอในธรรมชาติ อาจเปลี่ยนเป็น cyanocobalamin ได้ไม่สมบูรณ์ และส่งผลให้ค่าการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 ต่ำ

3.1.2 การเตรียมสารตัวอย่างสำหรับ premixes

3.1.2.1 การเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์วิตามินบี 12 premixes โดยใช้และไม่ใช้โซเดียมไซยาไนด์

ทำการศึกษาเปรียบเทียบระหว่าง การเติม 1% โซเดียมไซยาไนด์ 1 มิลลิลิตร และ การไม่เติม โซเดียมไซยาไนด์ ในสารตัวอย่างที่เป็น premixes เนื่องจากวิตามินบี 12 ที่พบในวิตามินรวมหรือ premixes จะพบเพียงแค่รูปแบบ cyanocobalamin เท่านั้น ดังนั้นการเติมหรือไม่เติมโซเดียมไซยาไนด์ อาจไม่มีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 เนื่องจากไม่ต้องเปลี่ยนวิตามินบี 12 ในรูปแบบอื่นให้มาอยู่ในรูปของ cyanocobalamin จากผลการทดลองได้ผลดังตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 ใน premixes โดยใช้และไม่ใช้โซเดียมไซยาไนด์

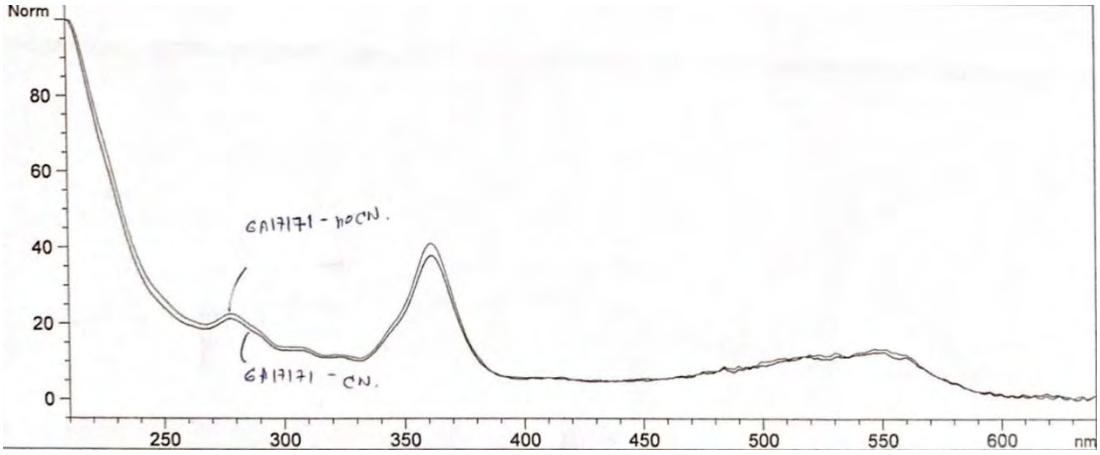
Sample	Result B12 (µg/g)							Specification
	Initial	Add NaCN			No NaCN			
		2/09/20	11/09/20	15/09/20	2/09/20	11/09/20	15/09/20	
E - 1	5.17	5.59	6.63	-	6.64	6.97	-	6.18-7.82
E - 2		-	6.30	-	-	6.88	-	
E- 3		-	6.36	-	-	6.92	-	
F - 1	2.78	3.09	-	3.45	3.28	-	3.50	2.64-3.96
F - 2		-	-	3.41	-	-	3.63	
F - 3		-	-	3.32	-	-	3.51	

จากตารางผลการทดลอง พบว่า ในผลิตภัณฑ์ E ซึ่งเป็น premixes ที่มีค่ากำหนดของผลิตภัณฑ์สูง ทำการทดลองซ้ำสามครั้ง เมื่อไม่เติมโซเดียมไซยาไนด์ค่าการวิเคราะห์ วิตามินบี 12 เท่ากับ 6.97, 6.88, 6.92 µg/g ซึ่งสูงกว่าการเติมโซเดียมไซยาไนด์ที่ได้ค่าการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 เท่ากับ 6.63, 6.30, 6.36 µg/g สำหรับในผลิตภัณฑ์ F ซึ่งเป็น premixes ที่มีค่ากำหนดของผลิตภัณฑ์ต่ำ ได้ผลการทดลองดังนี้ เมื่อไม่เติมโซเดียมไซยาไนด์ค่าการวิเคราะห์วิตามินบี 12 เท่ากับ 3.50, 3.63, 3.51 µg/g ซึ่งสูงกว่าการเติมโซเดียมไซยาไนด์ที่ได้ค่าการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 เท่ากับ 3.45, 3.41 และ 3.32 µg/g ซึ่งผลการทดลองในผลิตภัณฑ์ E และ F มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกันคือ การไม่เติมโซเดียมยาไนด์ให้ผลการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 ที่เพิ่มสูงขึ้น

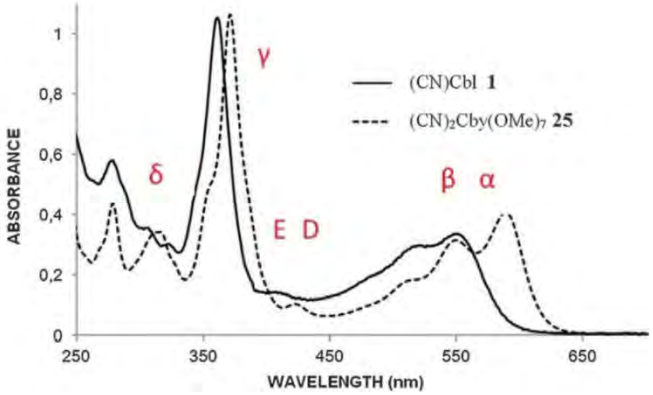
จากภาวะของเครื่อง UPLC ที่ใช้ DAD Wavelength 361 nm ซึ่งเป็นช่วงการดูดกลืนแสงของ Co^{2+} complex จากหลักการของ Spectrochemical series หากมี Ligand มาเกาะที่ Co^{2+} จะ

ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงเปลี่ยนไป [16] ทั้งนี้คาดว่าการที่เติม โซเดียมไซยาไนด์เข้าไป อาจทำให้หมู่ Ligand หรือ CN- มีมากเกินพอและเป็นเหตุให้ มีโอกาสที่ cyanocobalamin จะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปแบบอื่น ซึ่งทำให้ค่าการวิเคราะห์ลดต่ำลง เมื่อทำการตรวจสอบวิตามินบี 12 ที่เปลี่ยนแปลงอันเนื่องมาจากการเติมโซเดียมไซยาไนด์โดยการวิเคราะห์ด้วย UV-Vis Spectroscopy แต่เนื่องจากปริมาณวิตามินบี 12 ที่สกัดได้มีปริมาณน้อยมากจึงยังไม่สามารถยืนยันข้อสันนิษฐานการไม่เติมโซเดียมไซยาไนด์ มีผลทำให้ค่าการทดลองที่ดีกว่า

จากการตรวจวิเคราะห์วิตามินบี 12 ในรูปแบบ cyanocobalamin ด้วยเครื่อง UPLC DAD Detector จะเห็นพีกขึ้นชัดเจนแค่เพียงพีกเดียว คือช่วง 361 nm แต่ด้วยธรรมชาติของวิตามินบี 12 ในรูปแบบ cyanocobalamin จะพบการดูดกลืนทั้งหมด 3 แห่ง คือที่ λ_{max} 278, 361 และ 550 nm [17]



รูปที่ 3.5 ผลการตรวจวิเคราะห์วิตามินบี 12 ในรูปแบบ Cyanocobalamin ด้วยเครื่อง UPLC DAD Detector เมื่อเติมและไม่เติมโซเดียมไซยาไนด์ในผลิตภัณฑ์ Premixes



รูปที่ 3.6 UV-Vis Spectra of CNCbl **1** in H_2O and $(CN)_2Cby(OMe)_7$ **25** in DCM [17]

ซึ่งถ้าหากเปลี่ยนไปเป็นวิตามินบี 12 ในรูปแบบอื่น ที่ λ_{max} 361 nm จะไม่เลื่อน (Shift) หรือเลื่อนไปน้อยมาก แต่ที่ λ_{max} 278 และ 550 จะเลื่อนที่ไปค่อนข้างชัดเจน ยกตัวอย่างเช่น จากงานวิจัยของ Lester และคณะ [18] พบว่าหากวิตามินบี 12 ที่วิเคราะห์ได้อยู่ในรูปแบบของ hydroxocobalamin จะมี λ_{max} ที่เลื่อนไปทั้งหมด 2 แห่ง คือ λ_{max} 361 nm เลื่อนไปที่ λ_{max} 351 nm และ λ_{max} 550 จะเลื่อนไปที่ λ_{max} 525 nm ด้วยเหตุที่ในการศึกษาวิจัยนี้วิตามินบี 12 ที่สกัดได้มานั้นมีอยู่ในปริมาณต่ำกว่าที่จะตรวจวัดได้ด้วย UV spectroscopy ดังนั้นควรทำการศึกษาเพิ่มเติม โดยใช้วิธีการวิเคราะห์อื่นๆ เช่น LC-MS หรือ MS-MS ร่วมด้วย เป็นต้น

3.1.2.2 การเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์วิตามินบี 12 ใน premixes โดยการเจือจาง

เนื่องจากปัญหาใน premixes ที่มี specification สูงตั้งแต่ 5 µg/g ขึ้นไป ค่าของปริมาณวิตามินบี 12 ที่วัดได้น้อยกว่าค่ากำหนดของผลิตภัณฑ์ และผลการทดลองได้ค่าการทดลองที่ไม่ใกล้เคียงกัน อาจเป็นไปได้ว่าค่า capacity ของ immunoaffinity gel ซึ่งเท่ากับ 0.01- 0.5 µg/ml จึงสันนิษฐานว่า capacity ของเจลอาจมีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 เนื่องจากว่า ใน premixes ที่มี specification สูง มีปริมาณสารที่ต้องการวิเคราะห์ในปริมาณมากเกินกว่า capacity ของเจล จึงทำการเจือจาง เพื่อให้ความเข้มข้นของ premixes ลดลง โดยในขั้นตอนของการปิเปตจากปกติปิเปต 10 มิลลิลิตร เป็นปิเปต 5 มิลลิลิตร ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 3.5

ตารางที่ 3.5 ผลการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 ใน premixes โดยการเจือจาง

Sample	Result B12 (µg/g)								Specification
	Initial	Add CN Pipette 10 ml		Add CN (Dilute) Pipette 5 ml		No CN Pipette 10 ml		No CN (Dilute) Pipette 5 ml		
		2/09/20	11/09/20	2/09/20	11/09/20	2/09/20	11/09/20	2/09/20	11/09/20	
E - 1	5.17	5.60	6.63	6.36	6.63	6.46	6.97	6.69	7.09	6.18-7.82
E - 2		-	6.30	-	6.18	-	6.88	-	6.72	
E - 3		-	6.36	-	6.40	-	6.92	-	6.78	

จากตารางผลการทดลองพบว่าในสารตัวอย่าง E-1 ถึง E-3 ซึ่งเป็น premixes ที่มี specification มากกว่า 5 µg/g ผลการทดลองในกรณีที่ทำการเจือจาง พบว่าค่าการวิเคราะห์สูงขึ้น ซึ่งในความเป็นจริงหากค่า capacity ของเจลไม่ได้มีผล ค่าการทดลองควรได้เท่ากันในการทำทั้ง 3 ซ้ำ อย่างไรก็ดีผลการทดลองที่ได้เป็นเพียงแค่ข้อมูลชุดเดียว จึงไม่อาจสรุปได้แน่ชัดว่าการเจือจาง ส่งผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 สำหรับ premixes ที่มีค่า specification สูงหรือไม่ ดังนั้นควรทำการทดลองเพิ่มเติมสำหรับ premixes ที่มี specification มากกว่า 5 µg/g ในตัวอย่างอื่นๆต่อไป

3.1.2.3 การเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์วิตามินบี 12 ใน premixes โดยใช้อุณหภูมิการละลายที่แตกต่างกัน

3.1.2.3.1 การเตรียมสารตัวอย่างสำหรับ premixes โดยการละลายในปริมาณน้ำที่เพิ่มขึ้น

ทำการศึกษาการเพิ่มปริมาณน้ำในการละลาย premixes เพื่อพิสูจน์ว่าการละลายมีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 โดยทำการเปรียบเทียบระหว่างการชั่ง premixes 1 กรัม ละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตร และน้ำ 200 มิลลิลิตร ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 3.6

ตารางที่ 3.6 ผลการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 ใน premixes โดยใช้อุณหภูมิการละลายที่แตกต่างกัน

sample	Result B12 (µg/g)						Specification
	Initial	1 g. DI 100 ml			1 g. DI 200 ml		
		26/06/20	5/08/20	02/09/20	23/09/19	01/10/19	21/09/20	
E - 1	5.17	5.31	6.43	5.59	5.96	5.52	6.09	6.18-7.82
E - 2		5.48	-	-	6.20	5.75	6.08	
E - 3		5.54	-	-	-	-	6.28	
E - 4		6.23	-	-	-	-	-	
E - 5		5.74	-	-	-	-	-	
E - 6		5.31	-	-	-	-	-	

จากตารางผลการทดลองพบว่า เมื่อชั่ง premixes 1 กรัม ละลายในน้ำ 200 มิลลิลิตร ค่าการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 มีแนวโน้มสูงกว่า เมื่อใช้น้ำ 100 มิลลิลิตร จึงอนุมานได้ว่ามีความเป็นไปได้ที่ปริมาณวิตามินบี 12 ใน premixes มีปริมาณเพิ่มมากขึ้น จากการที่ละลายดีขึ้น เมื่อใช้น้ำในปริมาณที่มากกว่า ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่า การละลายมีผลต่อค่าการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 ในตัวอย่างที่เป็น premixes

3.1.2.3.2 การเตรียมสารตัวอย่างสำหรับ premixes โดยการละลายในน้ำอุณหภูมิ 40 องศา-เซลเซียสและน้ำอุณหภูมิห้อง

ทำการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างการละลาย premixes ในน้ำอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส กับ น้ำอุณหภูมิห้อง เนื่องด้วยที่อุณหภูมิสูงขึ้นวิตามินบี 12 สามารถละลายน้ำได้เพิ่มขึ้น เพื่อตรวจสอบว่า อุณหภูมิการละลายมีผลต่อค่าการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 หรือไม่ ผลการทดลองที่ได้เป็นดังแสดงไว้ตารางที่ 3.7

ตารางที่ 3.7 ผลการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 ใน premixes โดยการละลายในน้ำอุณหภูมิ 40 องศา-เซลเซียสและน้ำอุณหภูมิห้อง

Sample	Result B12 (µg/g)			Specification
	21/06/2020			
	Initial	40 C°	RT	
E	5.17	6.59	6.32	6.18-7.82

จากปัญหา ผลิตภัณฑ์ E ที่ initial ซึ่งเป็นผลการทดลองที่บริษัทได้จัดทำไว้ในปี ค.ศ. 2019 investigation report [5] ค่าการวิเคราะห์วิตามินบี 12 ไม่ตรงกับข้อกำหนดของผลิตภัณฑ์ ดังนั้นจึงทำการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างการละลาย premixes ในน้ำอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสกับ น้ำอุณหภูมิห้อง จากตารางผลการทดลองพบว่า การละลาย premixes ในน้ำ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ให้ค่าการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 เท่ากับ 6.59 µg/g ซึ่งมากกว่า การละลายในน้ำอุณหภูมิห้องได้ค่าการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 เท่ากับ 6.32 µg/g แต่อย่างไรก็ตามค่าการวิเคราะห์ไม่ได้แตกต่างกันมาก สำหรับการละลาย premixes ในน้ำ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ค่าการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 เพิ่มขึ้น เพราะ premixes ละลายได้ดีขึ้น เมื่อนำมาสกัดวิตามินบี 12 ด้วยโซเดียมแอซิเตทบัฟเฟอร์ร่วมกับโซเดียมไซยาไนด์ จึงสกัดออกมาได้ในปริมาณที่มากกว่า ส่งผลให้ค่าการวิเคราะห์มีวิตามินบี 12 มากขึ้น จากการทดลองทำให้อนุมานได้ว่า มีความเป็นไปได้ที่ผลการวิเคราะห์ในน้ำอุณหภูมิห้องมีค่าต่ำ อาจเป็นผลมาจากเมาจาก premixes ละลายได้ไม่หมด

3.1.2.3.3 การเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์วิตามินบี 12 ใน premixes โดยเพิ่มระยะเวลาการละลายภายใต้คลื่นความถี่สูง

ทำการศึกษาการละลายของ premixes โดยเพิ่มระยะเวลาในการละลายภายใต้คลื่นความถี่สูง ให้นานขึ้น โดยชั่ง premixes 1 กรัม ละลายในน้ำอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และทำการทดลองเปรียบเทียบระหว่างการ sonicate 15 นาที กับ 30 นาที ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 3.8

ตารางที่ 3.8 ผลการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 ใน premixes โดยเพิ่มระยะเวลาการละลายภายใต้คลื่นความถี่สูง

Sample	Result B12 (µg/g)			Specification
	Initial	15 min	30 min	
		21/09/20	21/09/20	
E - 1	5.17	5.77	5.83	6.18-7.82
E - 2		5.78	5.72	
E - 3		5.79	5.85	

จากตารางผลการทดลองพบว่า เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการละลายภายใต้คลื่นความถี่สูง จาก 15 นาที เป็น 30 นาที ผลการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 เพิ่มขึ้น เนื่องจากละลายภายใต้คลื่นความถี่สูงเป็นการทำเพื่อให้ premixes ละลายได้ดีขึ้นดังนั้นการเพิ่มระยะเวลาในการ ละลายภายใต้คลื่นความถี่สูงอาจส่งผลให้ premixes ละลายดีขึ้น ค่าการวิเคราะห์วิตามินบี 12 จะเพิ่มขึ้นเช่นกัน

3.2 Immunoaffinity gel column

3.2.1 ตรวจสอบปริมาณของเมทานอลในการชะ cyanocobalamin ที่ยึดติดกับ monoclonal antibody

ทำการศึกษาปริมาณของเมทานอลในการชะ cyanocobalamin ที่ยึดติดกับ monoclonal antibody ออกจาก immunoaffinity gel column เนื่องจาก ใน premixes ที่มีค่า specification สูง จะมีความเข้มข้นของปริมาณวิตามินบี 12 สูง แต่จากผลการทดลองก่อนหน้าพบว่า premixes ที่มีค่า specification สูง ค่าการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 ต่ำกว่า specification จึงมีความเป็นไปได้ว่าอาจจะชะออกจาก immunoaffinity gel ไม่หมด ส่งผลให้ค่าการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 ต่ำ จึงทำการทดลองโดยชะ cyanocobalamin ออกจาก immunoaffinity gel โดยใช้เมทานอลปริมาณ 3 มิลลิลิตร จำนวนสองครั้ง โดยครั้งที่หนึ่ง ใช้เมทานอลปริมาณ 3 มิลลิลิตร ชะเก็บในหลอดทดลองหลอดที่ 1 และ ครั้งที่สองใช้เมทานอลปริมาณ 3 มิลลิลิตร ชะเก็บเก็บในหลอดทดลองหลอดที่ 2 เพื่อพิสูจน์ว่า การใช้เมทานอล 3 มิลลิลิตร เพียงพอต่อการชะ cyanocobalamin ออกมาทั้งหมด ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 3.9

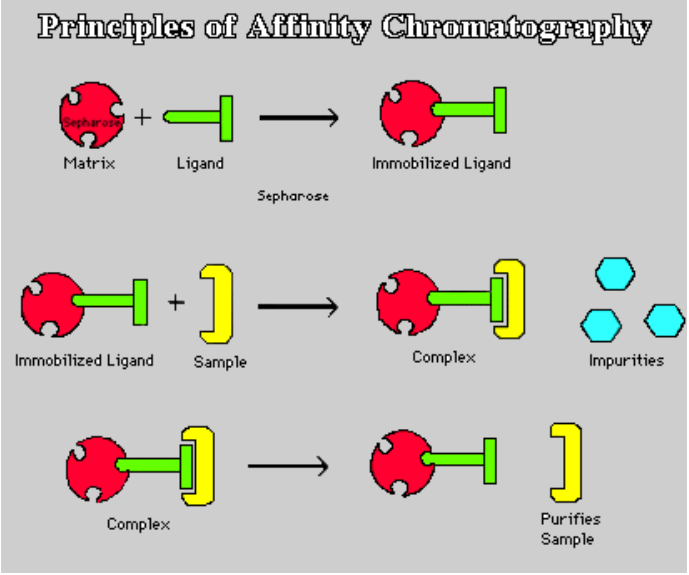
ตารางที่ 3.9 ผลการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 เมื่อตรวจสอบปริมาณของเมทานอลในการชะ cyanocobalamin ที่ยึดติดกับ monoclonal antibody

Sample	Result B12 (µg/g)		Specification
	13/07/2020		
	Tube 1	Tube 2	
E	5.98 (n=2)	0	6.18-7.82
F	3.02 (n=2)	0	3.60-5.40

จากตารางผลการทดลอง พบว่า ทั้งสารตัวอย่าง E และ F ซึ่งเป็น premixes ที่มี specification สูงและต่ำ ได้ค่าการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 เท่ากับ 5.98 µg/gและ 3.02 µg/g ตามลำดับ ซึ่งผลการทดลองไปในทิศทางเดียวกัน คือในหลอดที่ 2 เมื่อนำไปเข้าเครื่อง UPLC ไม่ พบ cyanocobalamin ที่ยังหลงเหลืออยู่ ทำให้ค่าการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 เท่ากับ 0 ดังนั้นการใช้ปริมาณเมทานอล 3 มิลลิลิตร เพียงพอต่อการชะ cyanocobalamin ออกจาก immunoaffinity gel

3.2.2 ตรวจสอบประสิทธิภาพของ immunoaffinity gel column

จากปัญหา polyvitamin premixes ที่มีค่าตามข้อกำหนดผลิตภัณฑ์ที่สูง ได้ผลการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 ไม่คงที่และส่วนใหญ่ไม่สอดคล้องกับข้อกำหนดของผลิตภัณฑ์ จากหลักการของ Affinity Chromatography ซึ่งเป็นเทคนิคในการแยกสาร โดยอาศัยความจำเพาะทางชีวภาพระหว่างโมเลกุลของสารที่ต้องการแยกกับตัวเชื่อมโยงที่เรียกว่าลิแกนด์ เนื่องจากธรรมชาติสารบางชนิดมีการจับกันอย่างจำเพาะเช่น การจับกันระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจน เอมไซม์กับซับเสตรท เป็นต้น จึงใช้คุณสมบัตินี้ในการแยกสารชีวโมเลกุลที่ต้องการด้วยระบบโครมาโทกราฟีแบบแอฟฟินิตี อีกทั้งเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแอฟฟินิตีเป็นการแยกสารชีวโมเลกุลที่มีประสิทธิภาพสูงมาก เป็นวิธีการทำให้สารบริสุทธิ์โดยใช้ขั้นตอนน้อย [19,20]



รูปที่ 3.7 การแยกด้วยเทคนิค แอฟฟินิตี โครมาโทกราฟี (Affinity chromatography) [21]

ทางบริษัทจึงมีข้อสงสัยว่า เป็นไปได้หรือไม่ที่ immunoaffinity gel column แต่ละคอลัมน์ มีผลทำให้ค่าการทดลองไม่คงที่ เนื่องมาจาก cyanocobalamin จับ monoclonal antibody ได้ไม่ดีพอ และ premixes ที่มีค่ากำหนดของผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาณวิตามินบี 12 สูง เกิน capacity ของเจล คือ 0.01 – 0.5 µg/mL จึงทำการศึกษาประสิทธิภาพของ Immunoaffinity gel column โดยทำการโหลด standard ให้มีความเข้มข้น ต่ำ กลาง สูง อยู่ในช่วง capacity เท่ากับ 0.01366, 0.2733 และ 0.4554 µg/mL ตามลำดับ ผ่าน immunoaffinity gel column 9 mL เมื่อนำไปคำนวณหาปริมาณวิตามินบี 12 ที่ควรได้ตามทฤษฎีจะได้ 0.04554, 0.09109 และ 0.151812 µg/mL จากผลการทดลองค่าการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 จากโครมาโทแกรม เท่ากับ 0.04457, 0.089697 และ

0.147815 µg/mL ตามลำดับ คำนวณ % recovery ของทั้งสามความเข้มข้นได้ 98 % เท่ากัน ซึ่งตรงกับใบ certification ของบริษัทจัดจำหน่าย immunoaffinity gel column อีกทั้งอยู่ในช่วงที่ยอมรับคือ 88 % - 110 % จึงพิสูจน์ได้เบื้องต้นว่า immunoaffinity gel column ที่ใช้ในการทดลองมีประสิทธิภาพเท่ากัน จากนั้นทำการพิสูจน์เพิ่มเติมโดยโหลดตัวอย่างที่ทำการสกัดวิตามินบี 12 แล้วจาก bulk เดียวกัน ลงใน immunoaffinity gel column จำนวน 3 คอลัมน์ ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 3.10

ตารางที่ 3.10 ผลการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 เมื่อตรวจสอบประสิทธิภาพของ immunoaffinity gel column

Sample	Result B12 (µg/g)			Specification
	21/09/2020			
	Initial	1 g. Di 100 ml	1 g. Di 200 ml	
E คอลัมน์ที่ 1	5.17	5.77	6.02	6.18-7.82
E คอลัมน์ที่ 2		5.78	5.91	
E คอลัมน์ที่ 3		5.79	6.00	

จากตารางผลการทดลอง เมื่อชั่ง premixes 1 กรัมละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตรก่อนนำไปสกัดวิตามินบี 12 หลังจากนั้นนำมาโหลดลงใน immunoaffinity gel column 9 mL จำนวน 3 คอลัมน์ พบว่าค่าการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 เท่ากับ 5.77, 5.78 และ 5.79 µg/g ตามลำดับ และ เมื่อชั่ง premixes 1 กรัมละลายในน้ำ 200 มิลลิลิตรก่อนนำไปสกัดวิตามินบี 12 หลังจากนั้นนำมาโหลดลงใน immunoaffinity gel column 9 mL จำนวน 3 คอลัมน์ พบว่าค่าการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 เท่ากับ 6.02, 5.91 และ 6.00 µg/g ตามลำดับ จากการทดลองจะเห็นได้ว่า ในผลิตภัณฑ์ชนิดเดียวจาก bulk เดียวกัน ให้ค่าการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 ในปริมาณใกล้เคียงกัน จึงสามารถพิสูจน์ได้ว่า immunoaffinity gel column มิได้มีปัญหาและมีประสิทธิภาพเหมาะกับการใช้วิเคราะห์วิตามินบี 12 ต่อไป

3.2.3 ระยะเวลาในการเขย่า immunoaffinity gel column

ทำการศึกษาระยะเวลาในการเขย่า immunoaffinity gel column เปรียบเทียบระหว่างการใช้เวลาในการเขย่า 5, 10 และ 15 นาที ตามลำดับ เพื่อพิสูจน์ว่าควรใช้ระยะเวลาเท่าใดในการเขย่า ที่จะทำให้ cyanocabalamin จับกับ monoclonal antibody ได้มาก และให้ค่าการวิเคราะห์วิตามินบี 12 ที่สูงขึ้น ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 3.11

ตารางที่ 3.11 ผลการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 เปรียบเทียบระยะเวลาในการเขย่า immunoaffinity gel column

sample	Result B12 (µg/g)				Specification
	25/08/2020				
	Initial	5 min	10 min	15 min	
QC	-	2.23	1.92	2.31	2.21- 2.66
A (mcg/100g)	1.63	1.54	1.66	1.66	0.90 - 2.80
B (mcg/100g)	3.00	2.84	2.83	2.99	3.30 - 6.60
E (mcg/g)	5.17	6.64	6.49	6.86	6.18-7.82
F (mcg/g)	2.78	3.14	3.03	3.09	2.64-3.96

จากทฤษฎี Affinity Chromatography ในขั้นตอนของการเขย่าเป็นไปเพื่อให้ cyanocabalamin จับกับ monoclonal Antibody [22] ดังนั้นหากมีการใช้เวลาในการเขย่าเพิ่มขึ้น มีแนวโน้มว่า cyanocabalamin จะจับกับ monoclonal Antibody ได้มากยิ่งขึ้น ส่งผลให้ค่าการวิเคราะห์วิตามินบี 12 เพิ่มขึ้น แต่จากผลการทดลองพบว่า ในผลิตภัณฑ์ A B และ F ซึ่งมีข้อกำหนดของผลิตภัณฑ์ของปริมาณวิตามินบี 12 ที่น้อย ได้ผลการทดลองดังนี้ ในการเขย่าด้วยระยะเวลา 5 นาที 10 นาที และ 15 นาที ในผลิตภัณฑ์ A ให้ค่าการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 เท่ากับ 1.54 , 1.66 และ 1.66 µg/100g ตามลำดับ ในผลิตภัณฑ์ B ให้ค่าการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 เท่ากับ 2.84 , 2.83 และ 2.99 µg/100g ตามลำดับ ในผลิตภัณฑ์ F ให้ค่าการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 เท่ากับ 3.14 , 3.03 และ 3.09 µg/g ตามลำดับ จากผลการทดลองพบได้ว่าค่าการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 ในผลิตภัณฑ์ชนิดเดียวกันค่าการวิเคราะห์ใกล้เคียงกันมากในระยะเวลาต่างๆ ดังนั้น เวลาในการเขย่าไม่มีผลอย่างชัดเจน สำหรับผลิตภัณฑ์ E ซึ่งมีข้อกำหนดของผลิตภัณฑ์ของปริมาณวิตามินบี 12 ที่สูง ได้ผลการทดลองดังนี้ 6.64 , 6.49 และ 6.86 µg/g ในการเขย่าด้วยระยะเวลา 5 นาที 10 นาที และ 15 นาที ตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่า การเขย่า immunoaffinity gel column ในระยะเวลา

15 นาที มีแนวโน้มให้ค่าการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 สูงกว่า 5 นาที และ 10 นาที แต่อย่างไรก็ตามจากผลการทดลอง ในช่วงเวลา 5 นาที และ 10 นาที ก็ยังให้ค่าการทดลองที่อยู่ใน specification อีกทั้งค่าการวิเคราะห์มีความใกล้เคียงกับการเขย่า 15 นาที ดังนั้นเพื่อให้การทดลองเป็นไปอย่างสะดวก รวดเร็ว และลดระยะเวลาในการทดลอง จึงควรเขย่า immunoaffinity gel column ประมาณ 10-15 นาที เพื่อให้ค่าการวิเคราะห์ที่ได้ยังอยู่ในเกณฑ์ที่ AOAC ยอมรับ

บทที่ 4

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้สนใจที่จะพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 โดยเทคนิคโครมาโทรกราฟีในขั้นตอนต่างๆ เริ่มจากขั้นตอนการสกัดวิตามินบี 12 ในภาวะที่เหมาะสม ในผลิตภัณฑ์นมผงได้ทำการทดลองเกี่ยวกับปริมาณและชนิดเอนไซม์ซึ่งมีส่วนช่วยในการย่อยคาร์โบไฮเดรตออกจากผลิตภัณฑ์และทำให้โปรตีนมีขนาดเล็กลง เพื่อให้วิตามินบี 12 ที่ยึดติดอยู่กับโปรตีน ถูกสกัดออกมาได้ง่าย จากผลการทดลองพบว่าการใช้ เอนไซม์ alpha- amylase ปริมาณ 0.1 กรัม (enzyme activity = 1200 unit) ค่าการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 สูงกว่า 0.05 กรัม (enzyme activity = 600 unit) และ การใช้ เอนไซม์ alpha-amylase ปริมาณ 0.1 กรัม (enzyme activity = 1200 unit) เปรียบเทียบกับ papain 0.4 กรัม (enzyme activity = 1200 unit) พบว่าค่าการวิเคราะห์วิตามินบี 12 ใกล้เคียงกัน สามารถใช้แทนกันได้แต่ไม่แนะนำเนื่องจากต้องใช้ papain ในปริมาณมาก

จากการทดลองเติมและไม่เติมโซเดียมไซยาไนด์ในการสกัดวิตามิบี 12 จากผลิตภัณฑ์นมผงและ polyvitamin premixes พบว่า ผลิตภัณฑ์นมผง ในขั้นตอนของการสกัดวิตามินบี 12 เมื่อไม่เติมโซเดียมไซยาไนด์ ค่าการวิเคราะห์วิตามินบี 12 จะต่ำกว่า เพราะ วิตามินบี 12 ในรูปแบบอื่นๆที่พบในธรรมชาติของนม ไม่เปลี่ยนรูปเป็น cyanocobalamin ทำให้เมื่อนำไปตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัด UV ความยาวคลื่น 361 nm ได้ค่าสัญญาณต่ำลง ในขณะที่ผลิตภัณฑ์ที่เป็น polyvitamin premixes การไม่เติมโซเดียมไซยาไนด์ให้ค่าการวิเคราะห์มากขึ้น จึงอนุมานว่า การที่เติมโซเดียมไซยาไนด์เข้าไป อาจทำให้หมู่ Ligand หรือ CN^- มีมากเกินพอและส่งผลให้มีโอกาสที่ cyanocobalamin จะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปแบบอื่นๆที่ไม่เสถียรหรือการดูดกลืนแสง UV ไม่ได้อยู่ที่ความยาวคลื่น 361 จึงเป็นเหตุให้ค่าการวิเคราะห์จึงลดต่ำลง และทำการตรวจสอบเพิ่มเติมโดยตรวจวัดปริมาณวิตามินบี 12 ที่อยู่ในรูปแบบอื่นอันเนื่องมาจากการเติมโซเดียมไซยาไนด์ด้วยเครื่อง UV-Vis spectroscopy พบว่าไม่สามารถตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงใดใดได้ซึ่งอาจเป็นเหตุมาจาก ปริมาณวิตามินบี 12 ในผลิตภัณฑ์ที่สกัดได้มีปริมาณน้อยมาก จึงทำให้ยังไม่สามารถยืนยันผลการตรวจสอบนี้ได้

การศึกษาการเจือจางความเข้มข้นสำหรับ premixes ที่มีข้อกำหนดปริมาณวิตามินบี 12 สูง จากการทดลอง พบว่าได้ค่าการวิเคราะห์สูงขึ้น ซึ่งในความเป็นจริงหากค่า capacity ของเจลไม่ได้มีผล ค่าการทดลองควรได้เท่ากัน อย่างไรก็ดีผลการทดลองที่ได้เป็นเพียงแค่ข้อมูลชุดเดียว จึงไม่อาจสรุปได้แน่ชัดว่าการเจือจาง ส่งผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 ควรศึกษาต่อไป จากผลการทดลองการเจือจางความเข้มข้น จึงได้ศึกษาในส่วนของประสิทธิภาพ immunoaffinity gel column โดยเปรียบเทียบ % recovery

ของ STD ที่ความเข้มข้น สูง กลาง ต่ำ พบว่า ในทุกความเข้มข้น % recovery เท่ากับ 98 % ทุกคอลัมน์ ซึ่งอยู่ในช่วงที่ตัวแทนจำหน่ายยอมรับคือ 88% - 105 % นอกจากนี้ยังทำการทดลองเพิ่มเติม โดยใช้สารตัวอย่างจาก bulk เดียวกัน 3 ซ้ำ พบว่าค่าการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 ใกล้เคียงกัน จึงสรุปได้ว่า immunoaffinity gel มีประสิทธิภาพในการใช้งาน

การศึกษาการละลายของผลิตภัณฑ์ premixes โดยใช้อุณหภูมิของน้ำที่ละลายต่างกัน พบว่า การใช้น้ำอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ทำให้ premixes ละลายได้ดีกว่า การใช้น้ำที่อุณหภูมิห้องในการละลาย

การศึกษาการละลายของผลิตภัณฑ์ premixes โดยใช้ตัวทำลายคือน้ำในปริมาณมากขึ้น พบว่าปริมาณวิตามินบี 12 ที่วิเคราะห์ได้จากการละลาย premixes ในน้ำปริมาตร 200 มิลลิลิตรมีแนวโน้มสูงกว่าการใช้น้ำปริมาตร 100 มิลลิลิตร

การศึกษาการละลายของ premixes โดยเพิ่มระยะเวลาในการแช่ลงในอ่างน้ำความถี่สูง (sonicate) ผลการทดลองทั้งสามซ้ำ พบว่า เมื่อเพิ่มระยะเวลาจาก 15 นาที เป็น 30 นาที ผลการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น

การศึกษาปริมาณของเมทานอลในการชะ cyanocobalamin ที่ยึดติดกับ monoclonal antibody ออกจาก immunoaffinity gel column พบว่าการใช้เมทานอลปริมาณ 3 มิลลิลิตรเพียงพอต่อการชะ cyanocobalamin ออกมาได้ทั้งหมด

การศึกษาระยะเวลาในการเขย่า immunoaffinity gel column เปรียบเทียบระหว่างการใช้เวลาในการเขย่า 5, 10 และ 15 นาที ตามลำดับ พบว่าในผลิตภัณฑ์ที่มีข้อกำหนดของผลิตภัณฑ์ของปริมาณวิตามินบี 12 น้อย ค่าการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 ในผลิตภัณฑ์ชนิดเดียวกันใกล้เคียงกันมากที่ระยะเวลาต่างๆ ดังนั้น เวลาในการเขย่าไม่มีผลอย่างชัดเจน ส่วนผลิตภัณฑ์ที่มีข้อกำหนดของผลิตภัณฑ์ของปริมาณวิตามินบี 12 มาก การเพิ่มระยะเวลาในการเขย่ามีแนวโน้มว่าจะได้ค่าการวิเคราะห์เพิ่มขึ้น

ข้อเสนอแนะ

1. ควรทำการวิจัยเกี่ยวกับผลของการเติมโซเดียมไซยาไนด์ที่มีโอกาสทำให้ cyanocobalamin เปลี่ยนไปอยู่ในรูปแบบอื่นๆที่ไม่เสถียรหรือการดูดกลืนแสง UV ไม่ได้อยู่ที่ความยาวคลื่น 361 nm. ด้วยเครื่องมือที่สามารถตรวจวัดวิตามิน บี12 ที่มีอยู่ในปริมาณต่ำ เช่น LC-MS หรือ LC-MS-MS.
2. ควรศึกษาเพิ่มเติม ว่าการใช้น้ำที่มีอุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส จะทำให้ได้ค่าการวิเคราะห์วิตามินบี 12 จะสูงขึ้นหรือไม่. เนื่องด้วยวิตามินบี 12 สามารถทนความร้อนได้สูงถึง 120 องศาเซลเซียส ดังนั้นหากใช้น้ำที่อุณภูมิสูงแต่ไม่เกิน 120 องศาเซลเซียส การละลายของ premixes จะดีขึ้นและค่าการวิเคราะห์วิตามินบี 12 ควรมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น
3. การใช้น้ำในการสกัดมากกว่า 200 ml (โดยสารสกัดยังคงมีวิตามิน บี 12 อยู่ ในช่วง 0.01-0.5 µg/mL ของ capacity immunoaffinity gel อาจทำให้ premixes ละลายได้ดีขึ้น

อย่างไรก็ตามผลจากการศึกษาวิจัยเบื้องต้นนี้แสดงให้เห็นว่า สามารถที่จะหาสาเหตุในขั้นตอนของการวิเคราะห์วิตามินบี 12 ต่างๆได้ นอกจากนี้ยัง สามารถพิสูจน์ได้ว่า immunoaffinity gel ทุกคอลัมน์มีประสิทธิภาพเท่ากัน และประยุกต์ใช้การแก้ไขได้ตามเป้าหมายเบื้องต้นที่ตั้งใจไว้ แต่เนื่องด้วยมีข้อจำกัดของระยะเวลาในการทำงานวิจัยมาเกี่ยวข้องดังนั้นยังต้องศึกษาเพิ่มเติมในอีกหลายอย่าง และจากปัญหาที่พบคือค่าการวิเคราะห์วิตามินบี 12 ในผลิตภัณฑ์นมของไม่สอดคล้องกับข้อกำหนดของผลิตภัณฑ์ และผลการวิเคราะห์ของตัวแทนจำหน่าย โดยเฉพาะใน polyvitamin premixes ที่มีปริมาณวิตามินบี 12 สูง ได้ผลการวิเคราะห์วิตามินบี 12 ไม่คงที่ ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจาก การใช้วิธีการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 ของทางบริษัท Mead Johnson Nutrition กับ บริษัทตัวแทนจำหน่าย แตกต่างกัน ในขั้นตอนของการเตรียมตัวอย่าง การสกัดวิตามินบี 12 โดยใช้สารเคมีที่แตกต่างกัน อีกทั้งสภาวะของเครื่องโครมาโทรกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ซึ่งใช้ flowrate, เฟสเคลื่อนที่ ต่างกัน และตรวจวัดที่คนละความยาวคลื่น จึงทำให้ค่าการวิเคราะห์ของทั้งสองบริษัทไม่สอดคล้องกัน

ทั้งนี้คาดว่าหากสามารถพัฒนาวิธีการตรวจสอบปริมาณวิตามินบี 12 ได้และหาสภาวะของขั้นตอนต่างๆได้อย่างเหมาะสม จะสามารถตรวจสอบปริมาณวิตามินบี 12 ในผลิตภัณฑ์นมได้ครอบคลุมกับผลิตภัณฑ์ของบริษัทได้อย่างมากที่สุด ให้มีค่าการวิเคราะห์ที่ดีขึ้น อีกทั้งให้ผลการวิเคราะห์สอดคล้องกับข้อกำหนดของผลิตภัณฑ์ ได้อย่างถูกต้องแม่นยำตามหลักเกณฑ์ของ AOAC

บรรณานุกรม

[1] O. Heudi, T. Kilinc, E. Marley, Determination of Vitamin B12 in food products and in premixes by reversed-phase high performance liquid chromatography and immunoaffinity extraction, *Journal of Chromatography and Immunoaffinity Extraction*, 2006, 1101, 63-68

[2] Vitamin B_{12}, Micronutrient Information Center, Linus Pauling Institute, OregonState University. Retrieved from https://lpi.oregonstate.edu/mic/vitamins/vitamin-B_{12} (access 15.06.2563).

[3] E. Campos, P. Fontannaz, M. Trisconi, T. Kilinc, C. Gimenez, P. Andrieux, Determination of vitamin B_{12} in food products by liquid chromatography/UV detection with immunoaffinity extraction: single-laboratory validation, *Journal of AOAC international*, 2008, 91, 786-793

[4] Mead Johnson Nutrition 009, General Method for Determination of Vitamin B_{12} by Ultra Performance Liquid Chromatography UV detection

[5] K. Sunanta, W. Siripan, Investigation report of vitamin B_{12}, MJN009, Chemical laboratory, Mead Jonhson nutrition, 2019

[6] K. Ursula, D. Kathrina, R. Guenther, Determination of vitamin B_{12} in infant formula and adult nutritionals using HPLC after purification on an immunoaffinity Column: First Action 2001.09, *Journal of AOAC int*ernational, 2012, 95, 933 - 936

[7] 2019 AOAC INTERNATIONAL, AOAC Official Method 2014.02 Vitamin B_{12} in infant formula and adult/pediatric nutritional formula liquid chromatography – ultraviolet detection: First action 2014 – Final action 2017, in: *AOAC Official method of analysis*, 2019, Chapter 50, 96 – 99

[8] Structural Details for Vitamin B_{12}, The Centre for Computational Chemistry, University of Bristol, Retrieved from http://www.chm.bris.ac.uk/motm/vitaminb12/structure.html (access 15.11.2563).

[9] C. Gerald, M. James, Vitamin B_{12} in The Vitamins, Chapter 18, Academic Press, New York, USA, 2017

[10] R. Obeid, S. Fedosov, E. Nexo, Cobalamin coenzyme forms are not likely to be superior to cyano- and hydroxyl-cobalamin in prevention or treatment of cobalamin deficiency, *Molecular Nutrition & Food Research*, 2015, 59, 1364-1372

[11] วิตามินบี12 (Vitamin B_{12}), Pharma Nord, Thailand. Retrieved from https://www.pharmanordsea.co.th/วิตามินบี12 (access 15.11.2563).

[12] Vitamin B_{12}, Fact Sheet for Health Professionals, National Institute of Health, Department of Health & Human Services, USA. Retrieved from https://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminB_{12}-HealthProfessional/#ref (access 15.11.2563).

[13] Vitamin B12 forms, Website B12-vitamin.com, the Dr Schweikart publisher and the Association for the Promotion of Holistic Health. Retrieved from https://www.b12-vitamin.com/forms/ (access 15.11.2563).

[14] M. Cara, Different faces of vitamin B_{12} – characteristics of individual forms, MZ Blog. Retrieved from https://www.mz-store.com/blog/different-faces-of-vitamin-b12-characteristics-of-individual-forms/ (access 16.11.2563).

[15] L. Paul, An Evaluation of Procedures for the Determination of Vitamin B_{12} in Foods, Supplements and Premixes using HPLC and UHPLC after selective extraction with immunoaffinity cartridges, A Government Chemist Programme Report, LGC Limited, 2011, 171, 1-12

[16] Lab 6: Co^{3+} complexes: Determination of Delta-Octahedral, Characterization of Geoisomer, and Rate of Aquation, Inorganic Chemistry Laboratory Manual, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chualalongkorn University, 2019, 27-31

[17] P. Keith, M. Giedyk, D. Gryko, Vitamin B_{12} : Chemical modifications, Chemical Society Reviews, 2013, 42, 6605-6619

[18] E. Lester, J. Martin, R. Gregory, W. Shaw, Standardisation of Hydroxocobalamin, *Royal Society of Chemistry*, 1962, 87, 183-186

[19] ลินดา บุหงาเรือง, ปฏิบัติการชีวเคมี 2 บทที่ 7: โครมาโทคราฟีแบบแอฟฟินิตี, ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง, สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง, กรุงเทพฯ

[20] Affinity Chromatography Principles and Methods, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden, 2007

[21] การแยกด้วยเทคนิค แอฟฟินิตี โครมาโทกราฟี (Affinity chromatography), สำนักเครื่องมือวิทยาศาสตร์และการทดสอบ, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 2557

[22] Easi-Extract Vitamin B_{12} (LGE), R- Biopharm Rhone LTD, P88, V14, 2018

ประวัติผู้วิจัย

นางสาวเนื้อแพร พรหมหิตร เกิดเมื่อวันที่ 21 เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2540 ที่จังหวัด พิษณุโลก สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียน เฉลิมขวัญสตรี จังหวัด พิษณุโลก เมื่อปีการศึกษา 2559 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2560 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ บ้านเลขที่ 888 หมู่ 7 ตำบล สมอแข อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก รหัสไปรษณีย์ 65000 อีเมล nuaprae1.5@hotmail.com