

**A NOVEL SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR  
DETERMINATION OF MELAMINE**



**Sirirat Panich  
Woravith Chansuvarn**

**This Research is Funded by Rajamangala University  
of Technology Phra Nakorn**

ชื่อเรื่อง : การพัฒนาวิธีใหม่สำหรับการวิเคราะห์เมลามีนโดยวิธีสเปกโทโฟโตเมตรี

ผู้วิจัย : นางสาวสิริรัตน์ พานิช คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มทร.พระนคร

นายวรวิทย์ จันทรสุวรรณ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มทร.พระนคร

พ.ศ. : 2554

### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายในการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์เมลามีนในตัวอย่างนมพร้อมดื่มที่ใหม่ สะดวก ประหยัด เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม วิธีการวิเคราะห์ง่ายไม่ซับซ้อน ปฏิบัติง่ายที่นำมาใช้ เพื่อวิเคราะห์ปริมาณเมลามีนจะอาศัยหลักการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของเมลามีนกับอัลดีไฮด์ และคีโตน ซึ่งปฏิกริยานี้มีชื่อเรียกว่า “แมนนิช” ค่าการดูดกลืนแสงของสารประกอบเชิงซ้อนของ เมลามีนนี้จะถูกตรวจวัดโดยเทคนิคสเปกโทโฟเมตรีที่ความยาวคลื่น 236 นาโนเมตร ความถูกต้อง ของวิธีการวิเคราะห์ที่อยู่ในเกณฑ์ดี โดยความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานอยู่ในช่วง 0.1-2.5 พีพีเอ็ม ขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์คือ 0.08 พีพีเอ็ม ความเที่ยงของการวิเคราะห์อยู่ในเกณฑ์ดีคือมี ค่า %RSD น้อยกว่า 5% ในการวิเคราะห์ปริมาณเมลามีนในตัวอย่างนมพร้อมดื่มจะใช้เทคนิคการ เติมสารมาตรฐานลงไป ตัวอย่าง ซึ่งให้ค่าร้อยละการกลับคืนอยู่ในช่วง 76-91%

คำสำคัญ : วิธีใหม่, สเปกโทโฟโตเมตรี, เมลามีน



**Title** : A novel spectrophotometric method for determination of melamine.  
**Researcher** : Sirirat Panich, Faculty of Science and Technology, RMUTP  
Woravith Chansuvarn, Faculty of Science and Technology, RMUTP  
**Year** : 2011

### ABSTRACT

The aim of this research was to develop a novel convenient, low cost, environmental friendly and simply method for determination of melamine in milk samples. The chemical reaction of this method was based on the complexation of melamine, aldehyde and ketone, called "Mannich reaction". The absorption of the product complex was recorded by spectrophotometric technique at 236 nm. The method validation was good with linear range of 0.1-2.5 ppm and the limit of detection (LOD) was 0.08 ppm. The method revealed precision with %RSD values no greater than 5%. To quantify the amount of melamine in raw milk, standard addition was applied with recoveries in a range from 76-91%.

**Keywords** New method, Spectrophotometry, Melamine



## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่อง “การพัฒนาวิธีใหม่สำหรับการวิเคราะห์เมลามีนโดยวิธีสเปกโทโฟโตเมทรี”  
ประสบความสำเร็จได้ด้วยดีผู้วิจัยขอขอบคุณ

เงินทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

กลุ่มเคมี สาขาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ทำวิจัย และอุปกรณ์ต่าง ๆ

ผศ.สังเวช เสวกวิหารี สำหรับคำแนะนำต่าง ๆ ในการทำงานวิจัย

ดร. ชัชติญา บุญเพ็ญยศ ภาควิชาเคมีอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อภิชาติ อิมขัม ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับคำปรึกษาในการแก้ปัญหาต่าง ๆ ในงานวิจัย

นางสาวกฤษณา ปิวสาร ผู้ช่วยนักวิจัยสำหรับการช่วยเหลือในงานวิจัยอันดียิ่ง

ประโยชน์ใด ๆ จากงานวิจัยชิ้นนี้ คณะผู้วิจัยขอมอบแก่คณาจารย์ทุกท่านที่ได้ให้ความรู้แก่คณะผู้ทำการวิจัย และครอบครัวที่เข้าใจทำให้ผู้วิจัยสามารถสละเวลาส่วนตัวเพื่องานวิจัย และข้อผิดพลาดใด ๆ ที่เกิดขึ้นผู้วิจัยขอน้อมรับไว้เพื่อปรับปรุงในงานวิจัยครั้งต่อไป หากมีข้อสงสัยหรือคำติชมใด ๆ กรุณาส่งมาที่ [sirirat.pan@rmu.ac.th](mailto:sirirat.pan@rmu.ac.th) จักเป็นพระคุณอย่างยิ่ง

คณะผู้วิจัย

กันยายน พ.ศ. 2554



## สารบัญ

เรื่อง	หน้า
<b>บทที่ 1 บทนำ</b>	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย	2
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	4
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	4
1.4 กรอบแนวคิดของการวิจัย	4
1.5 ประโยชน์ของงานวิจัย	5
1.6 นิยามศัพท์เฉพาะ	5
<b>บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง</b>	
2.1 เมลามีน	7
2.2 การปนเปื้อนของเมลามีน	7
2.3 โทษของเมลามีน	8
2.3 เทคนิคการตรวจสอบเมลามีน	9
2.4 ปฏิกริยาของ Mannich	10
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	11
<b>บทที่ 3 วิธีดำเนินการทดลอง</b>	
3.1 อุปกรณ์และสารเคมี	13
3.2 วิธีการทดลอง	15
3.3 ขั้นตอนการทดลอง	15
3.4 การทดสอบหาเมลามีนในตัวอย่างนม	20
3.5 การวิเคราะห์หาปริมาณเมลามีน ในตัวอย่างน้ำนมด้วยเทคนิค Standard addition	21
3.6 การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณเมลามีนกับ Test-kit	22
3.7 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล	22
3.8 ระยะเวลาการทดลอง	23
3.9 สถานที่ทำการทดลอง	23
<b>บทที่ 4 ผลการทดลอง</b>	
4.1 ทดสอบหาปฏิกิริยาที่เหมาะสม	24
4.2 ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมจากปฏิกิริยาที่เลือกไว้	31
4.3 การทดสอบความถูกต้อง (Method validation)	32
4.4 การทดสอบหาเมลามีนในตัวอย่างนม	37

เรื่อง	หน้า
บทที่ 5 สรุปลผลการทดลอง อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	
5.1 สรุปลผลการทดลอง	40
5.2 อภิปรายผล	41
5.3 ข้อเสนอแนะ	41



## สารบัญรูป

เรื่อง	หน้า
รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างเมลามีน	2
รูปที่ 2 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยา Mannich	6
รูปที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของเมลามีนและอนุพันธ์ของเมลามีน	7
รูปที่ 4 ปฏิกิริยาของสารสามชนิดคือ เอมีน อัลดีไฮด์ และคีโตน	10
รูปที่ 5 การวิเคราะห์แบบ Standard addition จุดตัดแกน X แสดงค่าความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์	21
รูปที่ 6 สเปกตรัมของ Ace, Mel, For ผสมกับ Ace และสารประกอบของสารผลิตภัณฑ์ที่ปริมาณของเมลามีนในปริมาณต่าง ๆ กัน	25
รูปที่ 7 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเมลามีนและค่าการดูดกลืนแสงจากปฏิกิริยาระหว่าง Mel, Ace และ For	26
รูปที่ 8 สเปกตรัมของ Ace, Mel, Pyr และ สารประกอบจากผลิตภัณฑ์ที่ปริมาณของเมลามีนในปริมาณต่าง ๆ กัน	27
รูปที่ 9 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเมลามีนและค่าการดูดกลืนแสง จากปฏิกิริยาระหว่าง Mel, Ace และ Pyr	28
รูปที่ 10 สเปกตรัมของ Hap, Mel, Pyr และ สารประกอบเชิงซ้อนของผลิตภัณฑ์ของสารผลิตภัณฑ์ที่ปริมาณของเมลามีนในปริมาณต่าง ๆ กัน	29
รูปที่ 11 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเมลามีนและค่าการดูดกลืนแสงจากปฏิกิริยาระหว่าง Mel, Hap และ Pyr	30
รูปที่ 12 ภาพแสดงความแตกต่างกันของสเปกตรัมระหว่างปฏิกิริยาที่ศึกษาทั้ง 3 ปฏิกิริยา	31
รูปที่ 13 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเมลามีนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และค่าการดูดกลืนแสง	32
รูปที่ 14 กราฟมาตรฐานของเมลามีน	33
รูปที่ 15 แสดงสเปกตรัมของการดูดกลืนของสารประกอบเชิงซ้อนของผลิตภัณฑ์จำนวน 10 ครั้ง	34
รูปที่ 16 กราฟจากการวิเคราะห์เมลามีนด้วยเทคนิค Standard addition ของตัวอย่าง A โดยการ spike สารมาตรฐานเมลามีน 0.9 ppm	35
รูปที่ 17 กราฟจากการวิเคราะห์เมลามีนด้วยเทคนิค Standard addition ของตัวอย่าง B โดยการ spike สารมาตรฐานเมลามีน 1 ppm	35
รูปที่ 18 กราฟจากการวิเคราะห์เมลามีนด้วยเทคนิค Standard addition ของตัวอย่าง C โดยการ spike สารมาตรฐานเมลามีน 1 ppm	36

รูปที่ 19 การตกตะกอนโปรตีนของตัวอย่างนมพร้อมดื่มด้วยกรดทั้ง 5 ชนิด	37
รูปที่ 20 ผลการทดสอบตัวอย่างนมที่ได้จากการสกัดด้วย Test-kit	38
รูปที่ 21 ผลการทดสอบตัวอย่างนมด้วย Test-kit	39
รูปที่ 22 กลไกการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง Melamine กับ 4-hydroxyacetophenone และ 1-pyrene carboxaldehyde เป็นปฏิกิริยาที่เหมาะสมที่สุดในการวิเคราะห์หาปริมาณของเมลามีน	41



## สารบัญตาราง

เรื่อง	หน้า
ตารางที่ 1 ค่าการดูดกลืนแสงของสารประกอบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จากปฏิกิริยาระหว่าง Mel, Ace และ For	26
ตารางที่ 2 ค่าการดูดกลืนแสงของสารประกอบเชิงซ้อนของผลิตภัณฑ์ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จากปฏิกิริยาระหว่าง Mel , Ace และ Pyr	27
ตารางที่ 3 ค่าการดูดกลืนแสงของ สารประกอบเชิงซ้อนของผลิตภัณฑ์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จากปฏิกิริยาระหว่าง Mel, Hap และ Pyr	30
ตารางที่ 4 แสดงค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์และขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ	33
ตารางที่ 5 แสดงค่าการดูดกลืนของสารประกอบของผลิตภัณฑ์ 10 ครั้ง	34
ตารางที่ 6 ค่าร้อยละการกลับคืน	35
ตารางที่ 7 ผลการวิเคราะห์ปริมาณเมลามีนในตัวอย่างนมพร้อมดื่ม	37
ตารางที่ 8 ผลการวิเคราะห์ปริมาณเมลามีนในตัวอย่างนมพร้อมดื่ม โดยใช้ Test-kit	39



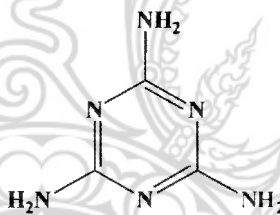
## บทที่ 1

### บทนำ

#### การพัฒนาวิธีใหม่สำหรับการวิเคราะห์เมลามีนโดยวิธีสเปกโทโฟโตเมทรี

##### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย

เมลามีนเป็นสารประกอบทางเคมีที่ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในโรงงานอุตสาหกรรมโดยใช้ผสมในการผลิตเม็ดพลาสติก พิจารณาจากโครงสร้างทางเคมีของเมลามีนแล้วจะพบว่าเมลามีนมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบถึง 66.67 % หรือคิดเป็นปริมาณโปรตีนได้ 416.66 % จึงถูกจัดเป็นพวก Non-Protein Nitrogen (NPN) แต่ไม่นิยมนำมาใช้เป็นอาหารสัตว์เพราะการ Hydrolysis ช้าและไม่สมบูรณ์เหมือนยูเรีย เมลามีนมีลักษณะเป็นผงสีขาว ละลายน้ำได้น้อย มีสูตรโครงสร้างทางเคมีคือ  $C_3H_6N_6$  (1,3,5-Triazine, 2,4,6-Triamine) ดังแสดงในรูปที่ 1 เมลามีนคุณภาพดีจะนำไปทำเม็ดพลาสติกเรียกว่า เม็ดเลซินเมลามีน ส่วนเมลามีนที่คุณภาพเลว (เศษที่เหลือ) จะถูกนำกลับไปทำเป็นของใช้ ซึ่งเมลามีนคุณภาพเลวมีราคาถูกและเกิดอนุพันธ์ของเมลามีนขึ้นหลายชนิด เรียกว่า เมลามีนอันนาล็อก ประกอบด้วย Ammeline, Ammelide และ Cyanuric acid แม้จะเป็นอนุพันธ์ของเมลามีนแต่ก็ยังมีโปรตีนสูงถึง 224.36 % จากการวิจัยในปี ค.ศ.1971 มีการนำเมลามีนมาผสมเป็นอาหารโค เพราะเป็นแหล่งของไนโตรเจน ต่อมาในปี ค.ศ. 1971-1976 มีการวิจัยพบว่าเมลามีนมีไนโตรเจนสูงกว่ายูเรีย แต่เมื่อสัตว์กระเพาะรวม เช่น โคเนื้อ โคนม แพะ แกะ กินเข้าไปแล้วจะไม่สามารถย่อยได้อย่างสมบูรณ์ ทำให้เกิดสารพิษตกค้างในสัตว์ได้



รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างเมลามีน

แต่เมื่อไม่นานมานี้เกิดปัญหาการปนเปื้อนของสารเมลามีนในผลิตภัณฑ์อาหารสัตว์ และในนมผงที่ผลิตในประเทศจีน จนกระทั่งลุกลามสู่ประเทศใกล้เคียง ทำให้ทารกเกิดอาการไตวาย สาเหตุของการปนเปื้อนนั้นมาจากการที่ผลิตภัณฑ์นมผงนั้นต้องมีการตรวจหาปริมาณของโปรตีนโดยเทคนิคที่ใช้คือเทคนิค Kjeldahl ซึ่งไม่ใช่การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยตรง แต่เป็นการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยอ้อมโดยการวัดปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (Total nitrogen) จึงเป็นช่องทางให้แก่ผู้ผลิตที่ต้องการลดต้นทุนการผลิต โดยการนำเมลามีนซึ่งมีราคาถูกมาปลอมปนให้ดู

เหมือนกับผลิตภัณฑ์นั้นมีปริมาณโปรตีนสูง แต่เนื่องจากความเป็นพิษของเมลามีนคือเมื่อได้รับจะเกิดการระคายเคือง เมื่อสูดดม สัมผัส ทำให้ตา และผิวหนังอักเสบ เมื่อรับประทานเข้าไปในร่างกาย ระบบสืบพันธุ์จะถูกทำลาย เกิดนิ่วในท่อปัสสาวะและไต เกิดมะเร็งที่ท่อปัสสาวะ หากสะสมเป็นจำนวนมากจะมีปัญหาท่อปัสสาวะล้มเหลว เกิดอาการเป็นนิ่วในไต ซึ่งเกิดจากการที่ตะกอนของเมลามีนเดินทางเข้าไปสู่ระบบการย่อยอาหาร อาจทำให้ไตวายอย่างเฉียบพลันและเสียชีวิตในที่สุด [1,2]

ประเทศสหรัฐอเมริกา สหภาพยุโรป และองค์การอนามัยโลกได้กำหนดค่าปนเปื้อนสูงสุดที่ร่างกายได้รับต่อวันโดยไม่ทำให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพ (Tolerable Daily Intake, TDI) ดังนี้ [3]

1. สหรัฐอเมริกา กำหนดไว้ที่ 0.63 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน
2. สหภาพยุโรป กำหนดไว้ที่ 0.50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน
3. องค์การอนามัยโลก กำหนดไว้ที่ 0.20 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน

การวิเคราะห์เมลามีนในปัจจุบันมีด้วยกันหลายวิธี โดยประเทศสหรัฐอเมริกา และ WHO International Food Safety Authorities Network (INNFOSAN) (US.FDA, 2009) ได้กำหนดวิธีการวิเคราะห์เมลามีนในอาหารและอาหารสัตว์ไว้ ดังนี้

1. วิธี Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS/MS) ปัจจุบันเป็นวิธีที่น่าเชื่อถือมากที่สุด เนื่องจากสามารถหาเมลามีนและอนุพันธ์ของเมลามีนในอาหารได้ทุกชนิดมีความไวและความจำเพาะสูง สามารถวิเคราะห์หาปริมาณเมลามีนได้ในระดับ 25-200 ppb ขึ้นกับชนิดของอาหาร
2. วิธี Enzyme-Linked Immunosorbent Assay เป็นวิธีที่สามารถใช้หาปริมาณเมลามีนในผลิตภัณฑ์บางประเภท เช่น นม นมผง โปรตีนจากแป้งข้าวสาลี สามารถวิเคราะห์หาปริมาณเมลามีนได้ในระดับ 0.1 -10 ppm ขึ้นกับชนิดของอาหาร
3. วิธี Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) เป็นวิธีที่สามารถหาเมลามีนและอนุพันธ์ของเมลามีนได้ในอาหารตัวอย่างทุกชนิด และสามารถวิเคราะห์หาปริมาณเมลามีนได้ในระดับ 2 ppm
4. วิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) เป็นวิธีที่สามารถใช้หาปริมาณเมลามีนในผลิตภัณฑ์บางประเภท เช่น เนื้อสัตว์ นม นมผง โปรตีนจากแป้งข้าวสาลี และอาหารสัตว์ สามารถวิเคราะห์หาปริมาณเมลามีนได้ในระดับ 25 ppb-100 ppm ขึ้นกับชนิดของอาหาร

วิธีการวิเคราะห์เมลามีนข้างต้นมีข้อจำกัดต่อการวิเคราะห์เมลามีนในตัวอย่างที่ส่งสัยการปนเปื้อนเช่น เครื่องมือและอุปกรณ์มีราคาแพงมาก ผู้วิเคราะห์ต้องมีความชำนาญในการใช้งานอย่างมาก ค่าใช้จ่ายต่อตัวอย่างค่อนข้างสูง เป็นต้น

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงพัฒนาวิธีการวิเคราะห์เมลามีนโดยใช้อาศัยเทคนิคสเปกโทโฟโตเมทรี ซึ่งจากการสืบค้นพบว่า มีเพียง 1 งานวิจัยที่อาศัยเทคนิคดังกล่าว (สืบค้นจากฐานข้อมูล Scienedirect

และ Scopus เดือนมีนาคม 2554) โดยอาศัยปฏิกิริยา Mannich reaction [4] ซึ่งเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเมลามีน ฟอรั่มัลดีไฮด์ และสารจำพวกคีโตนที่มีอะซิดิกโปรตอน แล้วทำการตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นช่วงยูวีที่ความยาวคลื่น 214 นาโนเมตรแม้จะพบว่าเป็นวิธีที่สะดวก แต่ความเป็นพิษของฟอรั่มัลดีไฮด์อาจมีผลกระทบต่อผู้วิเคราะห์ งานวิจัยนี้จึงมีความสนใจที่จะศึกษาปฏิกิริยาใหม่ในการวิเคราะห์หาปริมาณเมลามีนในตัวอย่างที่สนใจ โดยศึกษาสารที่จะเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ไม่เป็นอันตรายต่อผู้วิเคราะห์ และสามารถตรวจวัดโดยวิธีสเปกโทโฟโตเมทรี ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวก ไม่ยุ่งยาก ให้ผลการวิเคราะห์ที่มีความแม่นยำ และที่สำคัญเป็นเครื่องมือที่มีอยู่ตามห้องปฏิบัติการเคมีวิเคราะห์ทั่วไป โดยไม่ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพงอื่นเพิ่มเติมและไม่ต้องใช้ผู้ที่มีความชำนาญสูง ทั้งนี้เทคนิคดังกล่าวให้ผลการวิเคราะห์ที่แม่นยำเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานเช่น ใช้เทคนิค LC-MS, HPLC หรือ GC-MS และราคาวิเคราะห์ต่อตัวอย่างไม่แพงเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค HPLC หรือ GC-MS

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. พัฒนาวิธีใหม่สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณเมลามีนอย่างง่ายและแม่นยำ โดยใช้สารเคมีที่ไม่เป็นพิษต่อผู้ทำการวิเคราะห์และสิ่งแวดล้อมโดยใช้เทคนิคสเปกโทโฟโตเมทรี
2. เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณของเมลามีนในตัวอย่างนมได้แก่ นมพร้อมดื่ม

## 1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1. ศึกษาปฏิกิริยาเคมีของเมลามีนกับลิแกนด์ในการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่สามารถวัดการดูดกลืนแสงเพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณเมลามีนที่มีความแม่นยำสูง

## 1.4 กรอบแนวความคิดของการวิจัย

ปัจจุบันปัญหาการปนเปื้อนของนมผง และผลิตภัณฑ์จากนมด้วยเมลามีนกำลังเป็นปัญหาที่ก่อให้เกิดโทษแก่ผู้บริโภคซึ่งอาจถึงแก่ชีวิตได้ จากปัญหานี้ผู้ทำการวิจัยจึงเล็งเห็นความสำคัญในการที่จะพัฒนาวิธีใหม่ในการวิเคราะห์หาปริมาณเมลามีน โดยการพัฒนาปรับปรุงชนิดจำกัจากเทคนิคเดิม ๆ ที่ใช้วิเคราะห์เช่น LC-MS, HPLC หรือ GC เป็นวิธีใหม่ที่ยาง สะดวก และราคาถูกกว่า อีกทั้งไม่ต้องใช้ผู้ที่มีประสบการณ์ หรือความชำนาญในการใช้เครื่องมือในการวิเคราะห์ดังที่กล่าวมา สามารถทำการวิเคราะห์ได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป ไม่เป็นพิษต่อผู้ทำการวิเคราะห์และสิ่งแวดล้อม เทคนิคสเปกโทโฟโตเมทรีจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง เนื่องจากเป็นอุปกรณ์ที่มีตามห้องปฏิบัติการทั่วไปใช้งานง่าย และยังสามารถพัฒนาเป็นเครื่องมือในการวิเคราะห์แบบอัตโนมัติ

และพกพาได้ โดยอาศัยหลักการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของเมลามีนกับลิแกนด์ ซึ่งน่าจะเป็นทางเลือกใหม่ในการวิเคราะห์ปริมาณเมลามีน

## 1.5 ประโยชน์ของงานวิจัย

### 1. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ปฏิบัติการและวิธีการวิเคราะห์ปริมาณของเมลามีนแบบใหม่ที่ยืดหยุ่น สามารถนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการเคมีทั่วไป และไม่พัวพันกับผู้วิเคราะห์และสิ่งแวดล้อม โดยอาศัยหลักการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของเมลามีนและลิแกนด์ที่ทำการศึกษาสภาวะการทดลองที่เหมาะสมทำให้วิเคราะห์หาปริมาณของเมลามีนในตัวอย่างที่สนใจได้อย่างแม่นยำ ไม่ยุ่งยาก โดยใช้เครื่องมือที่มีอยู่แล้วในห้องปฏิบัติการคือเครื่อง ยูวี-วิสิเบิล-สเปกโทโฟโตเมทรี โดยวิธีใหม่สำหรับการวิเคราะห์เมลามีนนี้คาดว่าจะได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ และคาดว่าจะสามารถพัฒนาต่อยอดเป็นอุปกรณ์การวิเคราะห์แบบพกพาหรือการวิเคราะห์ห้มองด้วยตาเปล่า (Naked-eye detection) ต่อไป

### 2. หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร
2. สถาบันการศึกษาเกี่ยวกับสุขภาพและความปลอดภัยในอาหาร
3. หน่วยงานวิจัยเกี่ยวกับอาหาร

## 1.6 นิยามศัพท์เฉพาะ

### เมลามีน

สารประกอบอินทรีย์ที่ได้จากการสังเคราะห์มีลักษณะเป็นผงสีขาว ละลายน้ำได้เล็กน้อย มีสูตร โครงสร้างทางเคมี  $C_3H_6N_6$  (1,3,5 Triazine 2,4,6 Triamine) มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ 66% โดยมวล มีชื่อทางเคมีว่า 1, 3, 5-triazine-2, 4, 6-triamine

### สารประกอบเชิงซ้อน

เกิดจากการที่โมเลกุลหรือ ไอออนประจุลบมาสร้างพันธะกับไอออนโลหะหรืออะตอมของโลหะด้วยพันธะโคเวเลนต์แล้วเกิดเป็นสารที่ซับซ้อนกว่าเดิม สารนี้อาจเป็นสารประกอบที่เป็นกลางไม่มีประจุ เรียกว่าสารประกอบเชิงซ้อน ถ้ามีประจุบวกหรือลบเรียกว่า ไอออนเชิงซ้อน

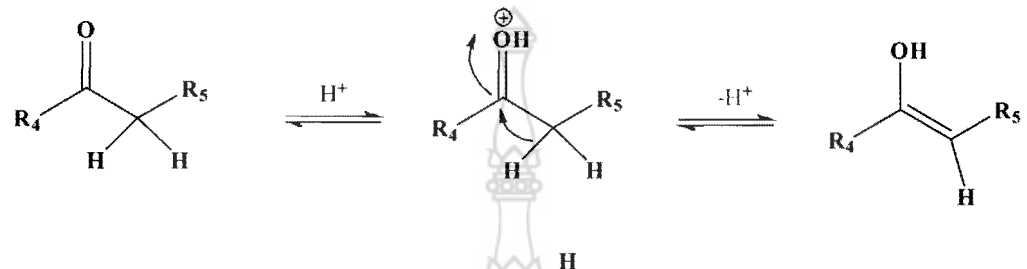
### วิธีสเปกโทโฟโตเมทรี

เป็นเทคนิคที่ใช้วัดการดูดกลืนแสงของสารในช่วงดูดกลืนแสงของสารที่ช่วงคลื่นค่าหนึ่ง ๆ ประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ คือ แหล่งกำเนิดแสง (Radiation source) หน่วยจำแนกคลื่นแสง (Monochromator) เซลล์สำหรับใส่สารละลาย (Absorption cell) และหน่วยตรวจวัด (Detector)

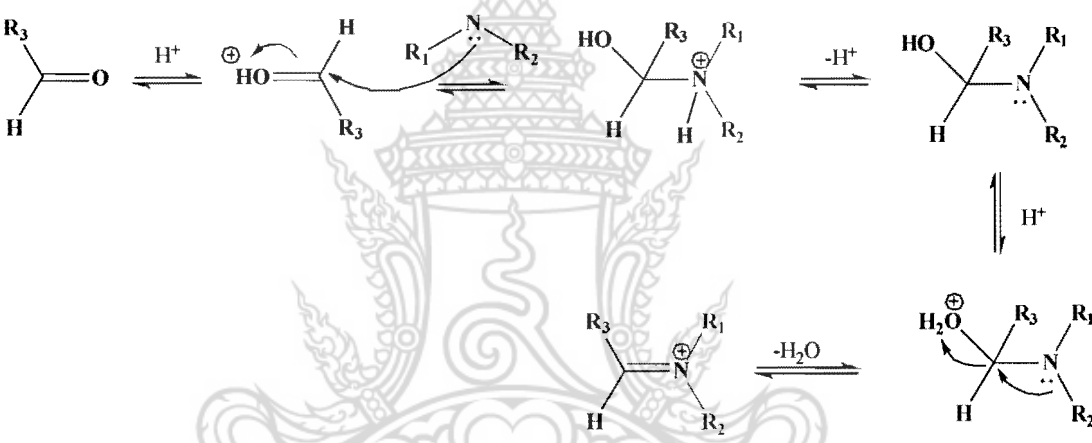
**ปฏิกิริยาแมนนิช (Mannich reaction)**

ปฏิกิริยาแมนนิชเป็นปฏิกิริยาเคมีอินทรีย์ของสาร 3 ชนิด คือ เอมีน อัลดีไฮด์ ชนิดที่ไม่สามารถเกิดรูปอินอลได้ และ คีโตนชนิดที่สามารถเกิดรูปอินอลได้ โดยเอมีนจะเข้าทำปฏิกิริยากับอัลดีไฮด์เกิดเป็นสารมัธยันต์ที่เรียกว่า “อิมิเนียม” จากนั้นคีโตนในรูปอินอลจะเข้าทำปฏิกิริยากับสารมัธยันต์ที่อยู่ในรูป อิมิเนียม นี้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนขึ้น อยู่ในรูป  $\beta$ -amino-carbonyl compound โดยแสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาดังนี้

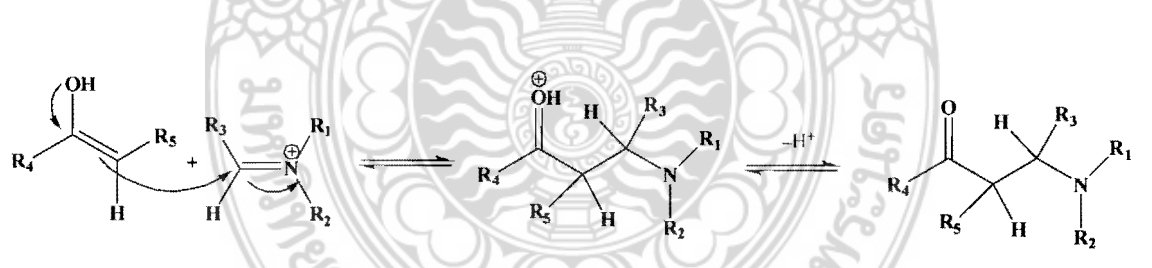
ขั้นที่ 1



ขั้นที่ 2



ขั้นที่ 3



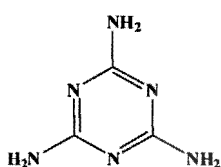
รูปที่ 2 กลไกการเกิดปฏิกิริยา Mannich

## บทที่ 2

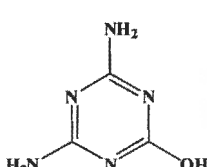
### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 เมลามีน

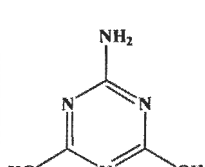
เมลามีนเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่ได้จากการสังเคราะห์ โดยถูกสังเคราะห์ขึ้นครั้งแรกโดย Liebig ในปี ค.ศ. 1834 มีลักษณะเป็นผงสีขาว ละลายน้ำได้เล็กน้อย มีสูตรโครงสร้างทางเคมีคือ  $C_3H_6N_6$  (1,3,5 Triazine 2,4,6 Triamine) มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ 66% โดยมวล มีชื่อทางเคมีว่า 1,3,5-triazine-2,4,6-triamine ซึ่งเมลามีนจะเกิดอนุพันธ์ขึ้นหลายชนิด เรียกว่า เมลามีนอันนาล็อก ประกอบด้วย ammeline, ammelide และ cyanuric acid แม้จะเป็นอนุพันธ์ของเมลามีนแต่ก็ยังมีโปรตีนสูงถึง 224.36 %



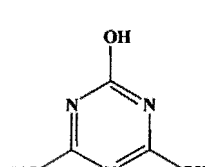
melamine



ammelene



ammelide



cyanuric acid

รูปที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของเมลามีนและอนุพันธ์ของเมลามีน

โดยปกติแล้วเมลามีนจะถูกนำไปใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมทางเคมีเพื่อใช้ในการผลิตสารจำพวกโพลีเมอร์ระหว่างเมลามีนและฟอร์มัลดีไฮด์ เพื่อใช้เป็นกาว หรือสารที่ใช้เคลือบต่างๆ นอกจากนี้เมลามีนยังถูกนำมาผลิตจานเมลามีน ถูพลาสติก หรือนำไปทำน้ำยาดับเพลิง น้ำยาทำความสะอาด และปุ๋ย เป็นต้น [1, 2]

#### 2.2 การปนเปื้อนของเมลามีน

สารเมลามีนเป็นของแข็งสีขาว ลักษณะคล้ายผงแข็ง เมื่อนำสารเมลามีนไปละลายน้ำหรือผสมในน้ำนม จะไม่สามารถแยกได้ด้วยตาเปล่าและไม่สามารถแยกออกจากกันได้ จากโครงสร้างของสารเมลามีนพบว่ามีปริมาณของไนโตรเจนสูง ทำให้มีการเติมสารเมลามีนลงไปผสมกับน้ำนมเพื่อเพิ่มปริมาณของไนโตรเจนในน้ำนมให้สูงขึ้น ซึ่งการจะตรวจว่าน้ำมนั้นมีคุณค่าทางอาหารมากน้อยเพียงใดนั้นจะทำการตรวจสอบที่ปริมาณของโปรตีนในน้ำนมว่าสูงหรือไม่ ซึ่งสามารถทำการวัดได้จากค่าของไนโตรเจน ดังนั้นถ้าผสมสารเมลามีนซึ่งมีไนโตรเจนสูงเข้าไปในน้ำนมจะถูกทำให้เข้าใจว่าน้ำนมมีโปรตีนสูงและเป็นน้ำนมคุณภาพดี นอกจากนี้ยังได้มีการนำเมลามีนไปผสมในวัตถุดิบที่ใช้ทำอาหารสัตว์เพื่อเป็นแหล่งโปรตีนและช่วยเพิ่มค่าไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีนที่แท้จริง

อีกด้วย (Non-protein nitrogen; NPN) ดังนั้นเมลามีนจึงเป็นสารที่ไม่ได้รับอนุญาตให้ใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์อาหาร

### 2.2.1 การปนเปื้อนเมลามีนในอาหารสัตว์

ในปี พ.ศ. 2550 ประเทศสหรัฐอเมริกาได้ตรวจพบการปนเปื้อนของเมลามีนในอาหารสัตว์ โดยอาหารสัตว์เหล่านั้นได้แก่ Wheat gluten ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่สำคัญในการผลิตอาหาร โดยส่วนมากแล้วจะมีการนำเข้ามาจากประเทศจีน ซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้สัตว์เกิดโรคไตวาย ประเทศไทยได้ออกประกาศกรมปศุสัตว์ไม่อนุญาตให้นำเข้า ผลิต ขยายอาหารสัตว์ และวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่มีส่วนผสมของสารเมลามีน

### 2.2.2 การปนเปื้อนของเมลามีนในอาหาร

เมื่อวันที่ 17 กันยายน 2551 ได้มีรายงานข่าวเกี่ยวกับอุบัติการณ์การป่วยเป็นจำนวนมาก เนื่องจากการบริโภคผลิตภัณฑ์นมสำหรับทารกและเด็กเล็กในประเทศจีน และเมื่อวันที่ 18 กันยายน 2551 องค์การอนามัยโลกได้แจ้งว่า กระทรวงสาธารณสุขของประเทศจีนได้รายงานว่ามีทารกและเด็กเล็กมากกว่า 6,240 รายป่วยด้วยโรคนี้ ซึ่งเป็นโรคที่พบได้ยากในทารกและเด็ก และเสียชีวิตจำนวน 3 ราย โดยมีสาเหตุจากการบริโภคผลิตภัณฑ์นมที่ปนเปื้อนสารเมลามีน นอกจากนี้บริษัท SANLU ยังได้แจ้งว่ามีผู้ร้องเรียนว่ามีการปนเปื้อนของเมลามีนมาตั้งแต่เดือนมีนาคม 2551 และจากการรายงานของเครือข่าย INFOSAN พบว่ามีประเทศอื่น ๆ ได้ตรวจพบสารเมลามีนในอาหาร ผลิตภัณฑ์นมและผลิตภัณฑ์ที่ใช้นมจากประเทศจีนเป็นส่วนผสมอีกจำนวนมาก

## 2.3 โทษของเมลามีน

เมื่อมีสารเมลามีนปนเปื้อนในอาหารที่รับประทาน เมลามีนจะถูกดูดซึมเข้าร่างกายได้ง่าย และเกิดการตกผลึกของสารเมลามีนในเนื้อไต อาการเจ็บป่วยที่สำคัญที่แสดงออกเมื่อได้รับสารเมลามีนในปริมาณที่มากเกินไปเช่น เกิดการระคายเคืองเมื่อสูดดมเข้าไป เมื่อสัมผัสจะทำให้ผิวหนังอักเสบ เมื่อรับประทานเข้าไปจะส่งผลให้ระบบสืบพันธุ์ถูกทำลาย เกิดนิ่วในท่อปัสสาวะและไต เกิดมะเร็งที่ท่อปัสสาวะ บางรายอาจมีปัญหาท่อปัสสาวะลึมหวมและตายในที่สุด

หน่วยงานความปลอดภัยด้านอาหาร ประจำสหภาพยุโรป (European food Safety Authority : EFSA) ได้มีการกำหนดค่าในการบริโภคเมลามีนต่อวันของมนุษย์และสัตว์ (Tolerable daily intake : TDI) ในระดับไม่เกิน 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวต่อวัน โดยค่า TDI ของเมลามีนทั้งคนและสัตว์ให้มีค่าเท่ากันเพราะยังไม่มีงานวิจัยในสัตว์ออกมา ส่วนค่าเมลามีนซึ่งจะถูกชะจากภาชนะจะปนมากับอาหารคนและสัตว์เกินกว่า 30 มิลลิกรัม/กิโลกรัม หรือ 30 ppm ได้

### ค่าความปลอดภัยของเมลามีน

สืบเนื่องจากอุบัติเหตุการปนเปื้อนเมลามีนในอาหารสัตว์ในประเทศสหรัฐอเมริกา USDA และ European Food Safety Agency (EFSA) ได้ทำการประเมินความเสี่ยงในปี ค.ศ. 2007 ดังนี้

(1) USDA ได้กำหนดค่าความปลอดภัยของเมลามีนและสารที่เกี่ยวข้อง (Tolerable daily intake (TDI) = 0.63 mg/kg.bw/day)

(2) EFSA ได้กำหนดค่าความปลอดภัยของเมลามีนและสารที่เกี่ยวข้อง (Tolerable daily intake (TDI) = 0.5 mg/kg.bw/day)

คณะกรรมการอาหารในการประชุม ครั้งที่ 7/2551 วันที่ 29 กันยายน 2551 เห็นชอบการประเมินความเสี่ยงต่อการได้รับสารเมลามีนจากการบริโภคนมและอาหารที่มีนมเป็นส่วนประกอบ โดยใช้ข้อมูลการบริโภคของประเทศไทย ซึ่งเป็นข้อมูลที่ประเมินบนพื้นฐานตามหลักการทางวิทยาศาสตร์ที่สอดคล้องกับสากล และกำหนดเกณฑ์ค่าความปลอดภัยของอาหารที่มีการปนเปื้อนสารเมลามีนและสารในกลุ่มเดียวกัน (Melamine and its analogues) ได้แก่ เมลามีน (Melamine) กรดไซยานูริก (Cyanuric acid) แอมมีไลด์ (Ammelide) และแอมมีลีน (Ammeline) เป็นดังนี้

(1) ไม่เกิน 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับนมผงทุกชนิด

(2) ไม่เกิน 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับผลิตภัณฑ์อาหารที่มีนมหรือองค์ประกอบของนมเป็นส่วนผสม [5]

## 2.4 เทคนิคการตรวจสอบเมลามีน [6]

### 2.4.1 เทคนิค Capillary Electrophoresis (CE)

Capillary Electrophoresis (CE) เป็นเทคนิคที่สามารถแยกและวิเคราะห์หาปริมาณของเมลามีนได้อย่างรวดเร็ว โดยอาศัยหลักการคือมีการให้กระแสไฟฟ้าแรงสูงเพื่อแยกโมเลกุลที่มีประจุแตกต่างกัน ขนาดและความมีขั้วจะเป็นตัวกำหนดเวลาที่สารจะถูกขับออกจากท่อ capillary ในปัจจุบัน CE ถูกนำมาวิเคราะห์เมลามีนโดยใช้ตัวตรวจวัดที่หลากหลายได้แก่ การดูดกลืนรังสี UV, ไดโอดอาร์เรย์ และ Mass spectrometry (MS) ตัวอย่างนมผงสามารถวิเคราะห์ได้โดยมีขีดจำกัดต่ำสุด 0.06 µg/ml จัดว่ามีความไวกว่าเทคนิคอื่น ๆ นอกจากนี้ยังสามารถวิเคราะห์ในไข่ อาหารสัตว์ โดยในการแยกจะใช้ 40 mM disodium hydrogen phosphate บัฟเฟอร์ pH 9

### 2.4.2 เทคนิค High-performance liquid chromatography (HPLC)

High-performance liquid chromatography (HPLC) เป็นเทคนิคพื้นฐานที่ใช้ในการตรวจสอบเมลามีน โดยสามารถตรวจสอบได้ทั้ง melamine, ammeline และ ammelide ในข้าว แป้ง ข้าวโพด โดยมีขีดจำกัดอยู่ที่ 5 ppm อย่างไรก็ตาม เทคนิคของ HPLC ไม่สามารถยืนยันโมเลกุล

## 2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. การพัฒนาวิธีสเปกโตรโฟโตเมตรีสำหรับการวิเคราะห์เมลามีน [4] โดยอาศัยการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของสารละลายผสมของฟอร์มัลดีไฮด์และสารหมู่ดีโตน ตามปฏิกิริยาที่เรียกว่า Mannich reaction สารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นถูกตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 214 นาโนเมตร วิธีที่พัฒนาขึ้นนำไปใช้ในการทดสอบหาเมลามีนในตัวอย่างอาหาร พบว่าให้ร้อยละการกลับคืนมาเท่ากับ 97 และขีดจำกัดการตรวจวัดเท่ากับ 0.063  $\mu\text{g}/\text{mg}$

2. การวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค Capillary electrophoresis ควบคู่กับการทำ on-line preconcentration ถูกพัฒนาขึ้น [7] เพื่อใช้ทดสอบหาปริมาณของเมลามีนที่มีความรวดเร็วในตัวอย่างนม โดยเปรียบเทียบการใช้เทคนิค stacking และ sweeping ในการเพิ่มความเข้มข้นของตัวอย่างในการวิเคราะห์หาปริมาณเมลามีน จากการทดลองขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค stacking อยู่ที่ 0.5 ng/mL และ 9.2 ng/mL สำหรับเทคนิค sweeping อย่างไรก็ตามสารรบกวนจะส่งผลต่อการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค sweeping มากกว่าดังนั้นเทคนิค stacking จึงมีความเหมาะสมมากกว่า Sweeping-Micellar Electrokinetic Chromatography (sweeping-MEKC) จึงถูกนำมาใช้วิเคราะห์หาปริมาณเมลามีน โดยสามารถวิเคราะห์ได้โดยใช้เวลาเพียง 6 นาที การเตรียมตัวอย่างจะเตรียมผ่าน solid phase extraction (SPE) ซึ่งมี RSD 4.8% ความแม่นยำของการวิเคราะห์ถูกทดสอบโดยการ spiking 0.5 และ 2  $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$  ของเมลามีนในตัวอย่างน้ำนม พบว่ามีร้อยละการกลับคืนที่  $93.4 \pm 0.5\%$

3. วิธีที่มีความไวและเจาะจงในการวิเคราะห์หาปริมาณเมลามีนถูกพัฒนาขึ้นอย่างกว้างขวางในงานทางด้านอาหาร โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์ที่ทำมาจากนม งานวิจัยนี้ [8] จึงทำการพัฒนาวิธีที่มีความเร็วโดยทำการสกัดตัวอย่างด้วยสารละลาย aqueous 1% trichloroacetic acid ก่อนวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) วิธีที่พัฒนาขึ้นมานี้ถูกนำไปวิเคราะห์หาปริมาณเมลามีนในตัวอย่าง ขนมันปิ้งกรอบ พาสต้า และผลิตภัณฑ์นม 4 ชนิด วิธีวิเคราะห์นี้มีร้อยละการกลับคืนอยู่ในช่วง 77%-100% และ RSD น้อยกว่า 5% ขีดจำกัดต่ำสุดอยู่ในช่วง 0.01 - 0.1 mg/kg

4. พัฒนาวิธีใหม่สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณเมลามีนในตัวอย่างนมโดยใช้เทคนิค Hollow Fiber Sorptive Extraction (HFSE) [9] โดยใช้ในการตรวจวัดด้วย Gas Chromatography-Mass Spectrometry เมลามีนในนมสดถูกสกัดโดย Hollow fiber ที่เคลือบด้วย Zirconia และวิเคราะห์โดยเทคนิค GC-MS พบว่ามีข้อดีคือมีความรวดเร็วอย่างมาก ไม่ต้องใช้สารละลาย (Free-solvent) สำหรับความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method validation) พบว่าการวิเคราะห์จะให้ช่วงความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0.001 - 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ขีดจำกัดต่ำสุดอยู่ในช่วง 0.001  $\mu\text{g}/\text{mL}$

5. การวิเคราะห์ปริมาณของอนุพันธ์ของเมลามีน 4 ชนิด [10] คือเมแลม (Melame) เมลิ้ม (Meleme) แอมเมลิน (Ammeline) และแอมเมไลด์ (Ammelide) โดยวิธี High-Performance Cation-Exchange Chromatography ที่มีบัฟเฟอร์ฟอสเฟตเป็นตัวชะทั้งในระบบ Isocratic และ Gradient และตรวจวัดด้วย Photodiode array UV-Vis โดยการแยกและการตรวจวัดเป็นแบบ Simultaneous พบว่าความเป็นเส้นตรงของ เมแลม, เมลามีน และเมลิ้ม อยู่ในช่วง 9.0–36.2 mM, 11.9–85.5 mM และ 2.8–10.6 mM ตามลำดับ

6. วิธีง่าย รวดเร็ว และสามารถวิเคราะห์นอกสถานที่ได้ [11] ถูกพัฒนาขึ้นในการวิเคราะห์หาปริมาณเมลามีน โดยการเกิดสีของอนุภาคของทองในระดับนาโน โดยเมลามีนจะเหนี่ยวนำให้เกิดการรวมตัวของอนุภาคของทองทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีจากสีแดงเป็นสีม่วง โดยในงานวิจัยนี้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณเมลามีนในตัวอย่างนม โดยขีดจำกัดต่ำสุดคือ 1.0 และ 4.2 ppm ภายใน 30 นาทีด้วยตาเปล่าโดยไม่ต้องใช้เครื่องมือพิเศษ

7. การวิจัย [12] ได้พัฒนาวิธีที่ง่ายและรวดเร็วในการวิเคราะห์ปริมาณของเมลามีนในตัวอย่างนมโดยใช้อนุภาคของทองในระดับนาโน โดยใช้สภาวะที่เป็นกลาง เมลามีนสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตกตะกอนแล้วเกิดการเปลี่ยนแปลงสีของอนุภาคของทองจากสีแดงเป็นสีฟ้า โดยวิธีนี้สามารถวิเคราะห์ปริมาณของเมลามีนได้ด้วยตาเปล่าหรือเครื่อง UV-Vis ขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์คือ 0.4 mg/L ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย และสามารถวิเคราะห์ได้ภายใน 12 นาทีที่อุณหภูมิห้อง



### บทที่ 3

#### วิธีดำเนินการทดลอง

##### 3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

###### เครื่องแก้ว

- ขวดวัดปริมาตร
- หลอดทดลอง
- บีกเกอร์
- แท่งแก้วคนสาร
- ซ้อนตักสารเคมี

###### เครื่องมือ

- เครื่อง UV-VIS Spectrophotometer รุ่น UV-1700 ยี่ห้อ SHIMADZU
- เครื่องเขย่าสารเคมีในหลอดทดลอง (Vortex) รุ่น VM-300 ยี่ห้อ Gemmy Industrial
- เครื่องชั่งสารเคมี รุ่น GR-200 ยี่ห้อ Diethelm
- Ultrasonicate รุ่น 690D ยี่ห้อ CREST
- เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Centrifuge) รุ่น PLC-012E ยี่ห้อ K university Centrifuge
- Micropipette ยี่ห้อ Brand
- เครื่องทำน้ำปราศจากไอออน รุ่น TKA ยี่ห้อ TKA-GenPure
- เตอบรุ่น 100-800 ยี่ห้อ Hemmert



สารเคมี

ที่	ชื่อ IUPAC	Molecular formula	ยี่ห้อ
1.	1,3,5-Triazine-2,4,6-triamine	$C_3H_6N_6$	Fluka
2.	4-hydroxyacetophenone	$C_8H_8O_2$	Fluka
3.	1-pyrene carboxaldehyde	$C_{17}H_{10}O$	Fluka
4.	2-acetone-naphtone	$C_8H_8O_2$	Fluka
5.	Nitric acid	$HNO_3$	Labscan
6.	Ethanaol	$C_2H_5OH$	Labscan
7.	Acetronitrile	$HCN$	Labscan
8.	Hydrochloric acid	$HCl$	Labscan
9.	Acetic acid	$CH_3COOH$	Labscan
10.	Formaldehyde	$CH_2O$	Fluka
11.	Trichloro acetic acid	$CCl_3COOH$	Labscan
12.	Trifluoro acetic acid	$CF_3COOH$	Labscan
13.	Acetronitrile	$CH_3CN$	Labscan
14.	Sulfuric acid	$H_2SO_4$	Labscan



### 3.2 วิธีทดสอบ

#### การเตรียมสารเคมี

- **Stock solution ของ Melamine 6.3 ppm (Fluka, Mw=126.12)**  
ชั่ง Melamine 1.6 mg ปรับปริมาตรเป็น 250 ml ด้วยน้ำปราศจากไอออน ผสมสารละลายด้วยเทคนิคเทคนิคอัลตราโซนิกเป็นเวลา 10 นาที
- **Stock solution ของ 4-hydroxyacetophenone 6.3 ppm (Fluka, Mw=136.15)**  
ชั่ง 4-hydroxyacetophenone 1.6 mg ละลายด้วยเอทานอล 10 ml ปรับปริมาตรเป็น 250 ml ด้วยน้ำปราศจากไอออน ผสมสารละลายด้วยเทคนิคอัลตราโซนิกเป็นเวลา 5 นาที
- **Stock solution ของ 2-acetone-naphthone 6.3 ppm (Fluka, Mw=170.21)**  
ชั่ง 2-acetone-naphthone มา 1.6 mg ละลายด้วยเอทานอล 10 ml ปรับปริมาตรเป็น 250 ml ด้วยน้ำ ผสมสารละลายด้วยเทคนิคอัลตราโซนิกเป็นเวลา 5 นาที
- **Stock solution ของ 1-pyrene carboxaldehyde 6.3 ppm (Fluka, Mw=230.36)**  
ชั่ง 1-pyrene carboxaldehyde 1.6 mg ละลายด้วยเอทานอล 30 ml เติมกรดไนตริกเข้มข้น 10 ml ปรับปริมาตรเป็น 250 ml ด้วยน้ำปราศจากไอออน ผสมสารละลายด้วยเทคนิคอัลตราโซนิกเป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นบีบอัด Stock solution ของ 1-pyrene carboxaldehyde 1 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำเป็น 100 ml เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป
- **Stock solution ของ Formaldehyde 99% (Fluka)**  
เตรียมจาก Formaldehyde 99%
- **Stock solution ของ 10% Trifluoro acetic acid (TFA)**  
เตรียมจาก TFA 99.99% โดยบีบอัด TFA มา 10 ml ปรับปริมาตรเป็น 100 ml ด้วยน้ำ
- **Stock ของ 10% Trichloro acetic acid (TCA)**  
ชั่ง TCA 10 g ละลายน้ำและปรับปริมาตรเป็น 100 ml ด้วยน้ำปราศจากไอออน  
\*หมายเหตุ ตลอดการทดลองใช้น้ำปราศจากไอออน

### 3.3 ขั้นตอนการทดลอง

งานวิจัยชิ้นนี้เป็นการศึกษาหาปฏิกิริยาที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณของเมลามีน โดยสามารถแบ่งขั้นตอนการทดลองออกเป็น 4 ขั้นตอนได้แก่ ทดสอบหาปฏิกิริยาที่เหมาะสม ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมจากปฏิกิริยาที่เลือกไว้ การทดสอบความถูกต้อง (Method validation) และการวิเคราะห์ปริมาณเมลามีนในตัวอย่างนมพร้อมดื่ม

#### 1. ทดสอบหาปฏิกิริยาที่เหมาะสม

ปฏิกิริยาที่เลือกมาเพื่อใช้วิเคราะห์ปริมาณของเมลามีนมีชื่อว่า แมนนิช (Mannich reaction) เป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างสาร 3 ชนิด เอมีน อัลดีไฮด์ ชนิดที่ไม่สามารถเกิดรูป อินอลได้และคีโตนชนิดที่สามารถเกิดรูปอินอลได้

### 1.1 ปฏิกริยาระหว่าง Melamine (Mel) 2-acetone-naphtone (Ace) และ Formaldehyde (For)

#### วิธีการทดลอง

1. บันทึกลงสเปกตรัมของ Melamine (Stock solution ของ Mel 3.5 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำเป็น 5 ml), 2-acetone-naphtone (Stock solution ของ Ace 0.5 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำเป็น 5 ml) ในช่วงความยาวคลื่น 200-500 nm
2. ผสม 0.5 ml ของ Ace และ 1 ml ของ For และ Mel 0.5, 1, 1.5, 2 และ 3 ml ตามลำดับ ปริมาตรทั้งหมดเป็น 5 ml บันทึกลงสเปกตรัมในช่วงความยาวคลื่น 200-500 nm
3. เปรียบเทียบสเปกตรัมที่ได้จากข้อ 1 และ ข้อ 2 ซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น
4. หาความยาวคลื่นที่ สารประกอบเชิงซ้อนของสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นสามารถดูดกลืนแสงได้มากที่สุด
5. พล็อตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของสารประกอบเชิงซ้อนของสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นกับความเข้มข้นของเมลามีน

### 1.2 ปฏิกริยาระหว่าง Melamine (Mel) 2-acetone-naphtone (Ace) และ 1-pyrene carboxaldehyde (Pyr)

1. บันทึกลงสเปกตรัมของ Melamine (Stock solution ของ Mel 3.5 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำเป็น 5 ml), 2-acetone-naphtone (Stock solution ของ Ace 0.5 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำเป็น 5 ml) และ 1-pyrene carboxaldehyde (Stock solution ของ Pyr 100  $\mu$ l ปรับปริมาตรด้วยน้ำเป็น 5 ml) ในช่วงความยาวคลื่น 200-500 nm
2. ผสมสารทั้งหมดจาก Stock solution ดังตาราง

หลอดที่	Mel (ml)	1-pyr (ml)	Ace (ml)	H <sub>2</sub> O (ml)
1.	0.0	0.10	0.50	4.4
2.	0.5	0.10	0.50	3.9
3.	1.0	0.10	0.50	3.4
4.	1.5	0.10	0.50	2.9
5.	2.0	0.10	0.50	2.4
6.	2.5	0.10	0.50	1.9

3. บันทึกสเปกตรัม ในช่วงความยาวคลื่น 200-500 nm
4. เปรียบเทียบสเปกตรัมที่ได้จากข้อ 1 และ ข้อ 2 ซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น
5. หาคความยาวคลื่นที่สารประกอบของสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นสามารถดูดกลืนแสงได้มากที่สุด
6. พล็อตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของสารประกอบของสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นกับความเข้มข้นของเมลามีน

### 1.3. ปฏิกริยาระหว่าง Melamine (Mel) 4-hydroxyacetophenone (Hap) และ 1-pyrene carboxaldehyde (Pyr)

1. บันทึกสเปกตรัมของ Melamine (stock solution ของ Mel 3.5 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำเป็น 5 ml) 4-hydroxyacetophenone (stock solution ของ Hap 0.5 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำเป็น 5 ml) และ 1-pyrene carboxaldehyde (stock solution ของ Pyr 100  $\mu$ l ปรับปริมาตรด้วยน้ำเป็น 5 ml) ในช่วงความยาวคลื่น 200-500 nm

2. ผสมสารทั้งหมดดังตาราง

หลอดที่	Mel (ml)	Pyr (ml)	Hap (ml)	H <sub>2</sub> O (ml)
1.	0.0	0.10	0.50	4.4
2.	0.5	0.10	0.50	3.9
3.	1.0	0.10	0.50	3.4
4.	1.5	0.10	0.50	2.9
5.	2.0	0.10	0.50	2.4
6.	2.5	0.10	0.50	1.9

3. บันทึกสเปกตรัม ในช่วงความยาวคลื่น 200-500 nm
4. เปรียบเทียบสเปกตรัมที่ได้จากข้อ 1 และ ข้อ 2 ซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น
5. หาคความยาวคลื่น ( $\lambda_{max}$ ) ที่สารประกอบของสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นสามารถดูดกลืนแสงได้มากที่สุด
6. พล็อตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของสารประกอบเชิงซ้อนของสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นกับความเข้มข้นของเมลามีน
7. เลือกความยาวคลื่น ( $\lambda_{max}$ ) ที่ใช้ในการวิเคราะห์พิจารณาสเปกตรัมที่ได้เลือกความยาวคลื่นของผลิตภัณฑ์ที่ไม่ตรงกับรีเอเจนต์

## 2. ทดสอบสถานะที่เหมาะสมจากปฏิกิริยาที่เลือกไว้

เมื่อได้ปฏิกิริยาที่เหมาะสมแล้วทำการทดสอบโดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งทั้งภายในวันเดียวกันและต่างวันกัน

## 3. การทดสอบความถูกต้อง (Method validation)

เมื่อได้ปฏิกิริยาที่เหมาะสมแล้วทำการทดสอบความถูกต้องได้แก่ช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน ขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ (LOD) ขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (LOQ) ความเที่ยง (Precision) ความแม่นยำ (Accuracy) ร้อยละการกลับคืน (% Recovery)

### 3.1 ช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน

บันทึกสเปกตรัมของสารประกอบเชิงซ้อนของสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาที่เลือกไว้ที่ความเข้มข้นของเมลามีนที่แตกต่างกัน หลังจากนั้นพลอตกราฟระหว่างความเข้มข้นของเมลามีนและค่าการดูดกลืนแสงจนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่เลขช่วงที่เป็นเส้นตรง เลือกเฉพาะช่วงความเข้มข้นที่ได้กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรงโดยให้ค่า  $r^2$  มากกว่า 0.99

### 3.2 ขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ (Limit of Detection, LOD) และขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Limit of Quantification, LOQ)

ขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์คือ ความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่สามารถวิเคราะห์ได้โดยการลดความเข้มข้นของเมลามีนให้มากที่สุดโดยที่ยังสามารถทำการวิเคราะห์ได้ โดยในงานวิจัยนี้ขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์สามารถตรวจหาได้ด้วยการนำ Reagent blank มาวัดสัญญาณจำนวน 7 ซ้ำ หาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) คำนวณค่า LOD จากค่าเฉลี่ยของ reagent blank + 3SD และคำนวณค่า LOQ จากค่าเฉลี่ยของ reagent blank + 10SD

### 3.3 ความเที่ยง (Precision) (%RSD)

ความเที่ยงของวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์ถูกทดสอบโดยการวัดสเปกตรัมของสารผลิตภัณฑ์ที่ความเข้มข้นเดิมซ้ำหลาย ๆ ครั้งโดยทำการเปิด stock solution ของ Mel มา 1.5 ml Hap 0.5 ml Pyr 0.1 ml และน้ำ 2.9 ml บันทึกสเปกตรัมในช่วง 200-500 nm โดยทำการวิเคราะห์ซ้ำทั้งหมด 10 ครั้ง วัดความเที่ยงโดยดูจากค่า % RSD โดยจะต้องไม่เกิน 8%

จาก AOAC Agricultural Materials Task Force [13] ได้กำหนดไว้ว่า % RSD ควรอยู่ในช่วง 8%

### 3.4 ร้อยละการกลับคืน (% Recovery)

ร้อยละการกลับคืน (%Recovery) เป็นวิธีที่ใช้เพื่อวัดความแม่นยำ (Accuracy) ของวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์โดยทำการ Spike สารมาตรฐานเมลามีนลงไปในตัวอย่างก่อนทำการสกัดตามวิธีการสกัด และคำนวณตามสูตรดังต่อไปนี้

$$\text{สูตรการหา \% Recovery} = (C_{\text{spike}} - C_{\text{sample}}) * 100 / C_{\text{standard}}$$

โดยที่  $C_{\text{spike}}$  = ความเข้มข้นของสารที่สนใจซึ่งได้จากการทดสอบ spiked sample

$C_{\text{sample}}$  = ความเข้มข้นของสารที่สนใจในตัวอย่างที่ได้จากการทดสอบ

$C_{\text{standard}}$  = ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติม

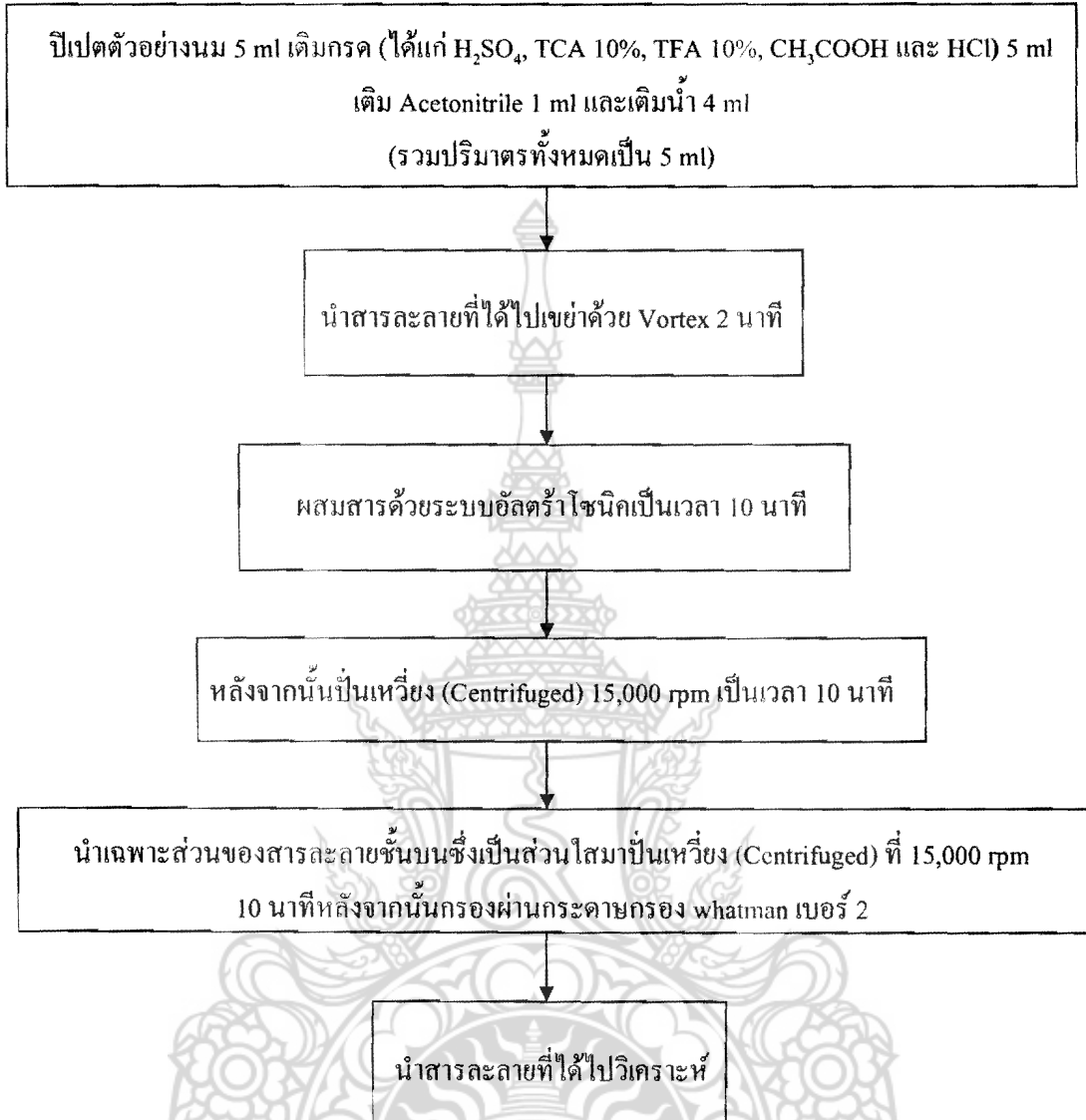
จาก AOAC Agricultural Materials Task Force [13] ได้กำหนดไว้ว่า % recovery ควรอยู่ในช่วง 75-110 %



## 3.4 การทดสอบหาเมลามินในตัวอย่งนม

## 1. การทดสอบกรดที่เหมาะสมในการตกตะกอนโปรตีนในตัวอย่งนมพร้อมดื่ม

กรดที่นำมาทดสอบมีทั้งหมด 5 ชนิดคือ  $H_2SO_4$ , 10%TCA, 10%TFA,  $CH_3COOH$  และ HCl โดยมีวิธีการสกัดดังนี้



### 3.6 การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณเมลามีนกับ Test-kit

#### วิธีการใช้ชุดทดสอบหาปริมาณเมลามีน (Melamine)

##### อุปกรณ์ที่ใช้และสารละลาย

1. หลอดหยด (Dropper)
2. จานผสมสีพลาสติกสีขาว
3. น้ำกลั่น
4. น้ำยาตรวจสอบ สารละลายซี
5. สารมาตรฐานเมลามีน 0.1 % (Standard Melamine 0.1 %)

##### ขั้นตอนการทดสอบ

1. หยดน้ำกลั่นจำนวน 10 หยดลงในหลุมที่ 1 ของจานผสมสี (กลุ่มควบคุมมาตรฐานลบ)
2. หยดสารละลายมาตรฐานเมลามีน 0.1 % จำนวน 10 หยดลงในหลุมที่ 2 (กลุ่มควบคุมมาตรฐานบวก)
3. หยดตัวอย่างจำนวน 10 หยดลงในหลุมที่ 3
4. หยดน้ำยาทดสอบสารละลายซี จำนวน 1-2 หยดลงในหลุมที่ ทดสอบทั้งหมด
5. หลุมที่ 1 เป็นหลุมควบคุมมาตรฐานลบ จะเกิดสีเหลือง
6. หลุมที่ 2 เป็นหลุมควบคุมมาตรฐานบวก (เมลามีน 0.1%) จะเกิดสีทึบแดง
7. เช็คลูกศรของตัวอย่างที่ทดสอบ (ตัวอย่างที่ 3) ถ้าเกิดสีเหลือง แสดงว่าไม่มีเมลามีน (ควบคุมมาตรฐานลบ) ถ้าเกิดสีทึบแดง เหมือนกับกลุ่มควบคุมมาตรฐานบวก ให้ดำเนินการทดสอบใหม่ โดยหยดตัวอย่างที่ทดสอบ 1 หยด แล้วตามด้วยน้ำกลั่นจำนวน 9 หยด เพื่อให้เจือจาง 10 เท่า (1:10) แล้วหยดน้ำยาทดสอบสารละลายซี จำนวน 1-2 หยด ถ้ายังเกิดสีทึบแดง แสดงว่ามีสารเมลามีนปนเปื้อนเกิดพิทักให้นำตัวอย่างส่งห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ เพื่อหาปริมาณที่ชัดเจนต่อ

หมายเหตุ ถ้าเป็นตัวอย่างเป็นผง ให้ชั่งตัวอย่างประมาณ 8 กรัมใส่ในบีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 100 ml เติมน้ำกลั่น 80 ml คนให้เข้ากันกับน้ำ ทิ้งให้ตกตะกอน แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.4 หรือชุดเอาน้ำส่วนใสมาทดสอบ

### 3.7 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

1. ค่าเฉลี่ย (Average,  $\bar{X}$ )
2. ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation, SD)
3. สัมประสิทธิ์การแปรปรวน (Relative standard deviation, %RSD)

### 3.8 ระยะเวลาการทดลอง

1 ตุลาคม 2553- 30 กันยายน 2554

### 3.9 สถานที่ทำการทดลอง

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร



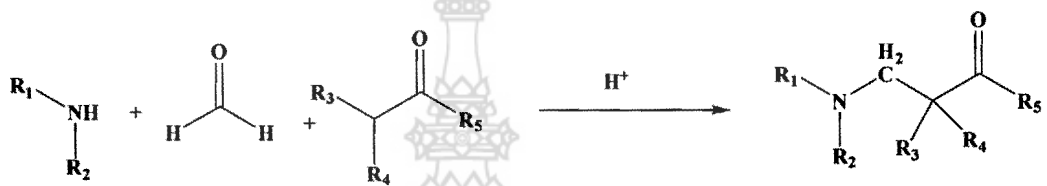
## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

จากการศึกษาหาปฏิกิริยาที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณของเมลามีน โดยในงานวิจัยนี้ได้แบ่งขั้นตอนการทดลองออกเป็น 4 ขั้นตอน ได้แก่ ทดสอบหาปฏิกิริยาที่เหมาะสม ทดสอบสถานะที่เหมาะสมจากปฏิกิริยาที่เลือกไว้ การทดสอบความถูกต้อง (Method validation) และการวิเคราะห์ปริมาณเมลามีนในตัวอย่างนมพร้อมดื่มผลการทดลองแสดงได้ดังนี้

#### 4.1 ทดสอบหาปฏิกิริยาที่เหมาะสม

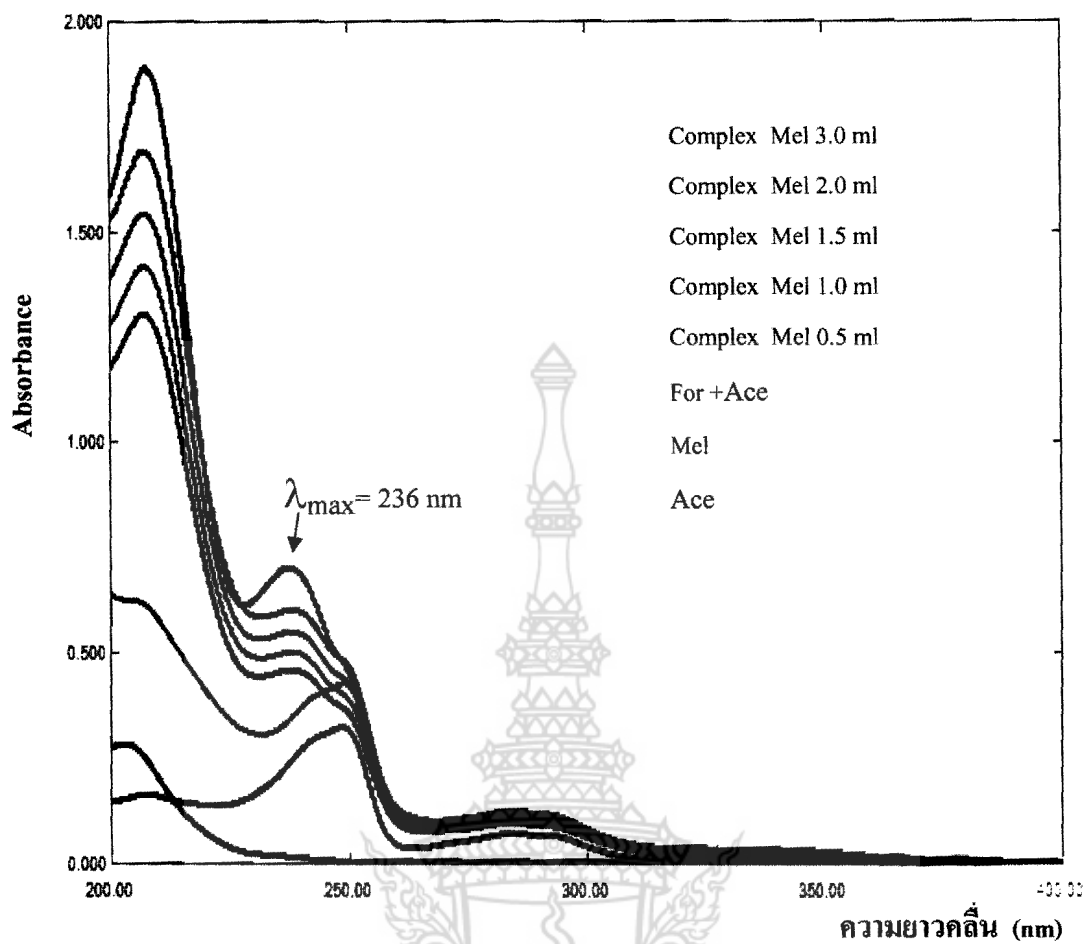
ปฏิกิริยาที่เลือกนำมาทดลองมีชื่อว่า Mannich เป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างสารสามชนิด คือ เอมีน อัลดีไฮด์ ชนิดที่ไม่สามารถเกิดรูปอินอลได้ และ คีโตนชนิดที่สามารถเกิดรูปอินอลได้โดยเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนดังนี้



จากปฏิกิริยาพบว่าสามารถนำมาใช้หาปริมาณของเมลามีน โดยหาชนิดของอัลดีไฮด์และคีโตนที่เหมาะสม โดยวัดสัญญาณที่เกิดขึ้นของสารประกอบเชิงซ้อนของสารผลิตภัณฑ์

#### 4.1.1 ปฏิกิริยาระหว่าง Melamine (Mel) 2-acetone-naphitone (Ace) และ Formaldehyde (For)

จากการทดลองการเกิดปฏิกิริยาระหว่างระหว่าง Mel กับ Ace และ For พบว่าสัญญาณของสารประกอบเชิงซ้อนของผลิตภัณฑ์ ที่เกิดขึ้นระหว่าง Mel, For และ Ace แสดงผลอย่างชัดเจนที่มีความยาวคลื่น 236 นาโนเมตร ซึ่งไม่ถูกรบกวนจากสัญญาณของเมลามีนและ Ace แต่ข้อเสียของการทดลองนี้คือใช้ปริมาณของ Ace และฟอร์มัลดีไฮด์ซึ่งเป็นสารที่มีความเป็นพิษในปริมาณที่สูงมาก ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อผู้ทำการทดลองโดยตรง จึงมีความพยายามที่จะทดลองเปลี่ยนสารเคมีชนิดอื่นมาทดแทนและเพื่อลดความเป็นพิษลง

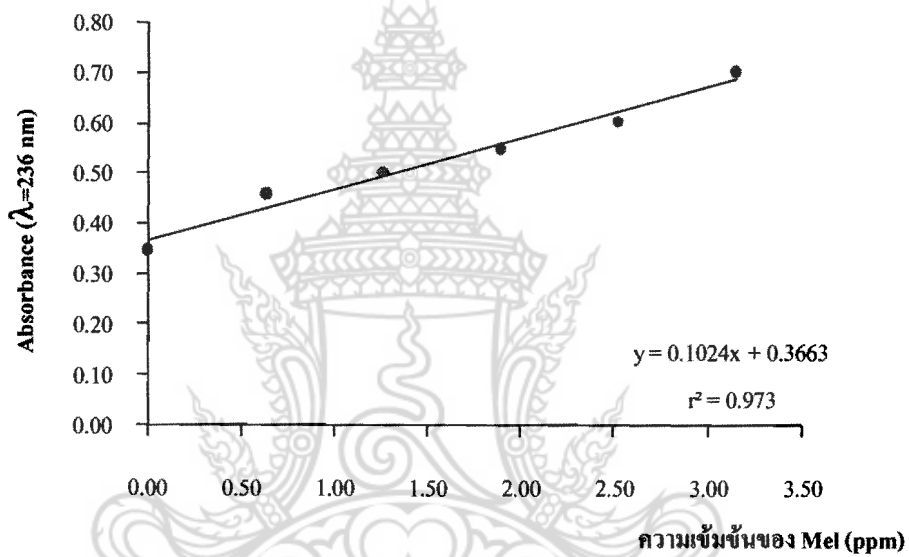


รูปที่ 6 สเปกตรัมของ Ace, Mel, For ผสมกับ Ace  
และสารประกอบของสารผลิตภัณฑ์ที่ปริมาณของเมลามีนในปริมาณต่าง ๆ กัน

เมื่อพลอตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเมลามีนกับค่าการดูดกลืนแสงของที่  
สารประกอบความยาวคลื่น 236 nm แสดงดังรูปที่ 6  
พบว่าสัญญาณของสารประกอบเกิดการรบกวนจากสัญญาณของ Ace

ตารางที่ 1 ค่าการดูดกลืนแสงของสารประกอบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จากปฏิกิริยาระหว่าง Mel, Ace และ For

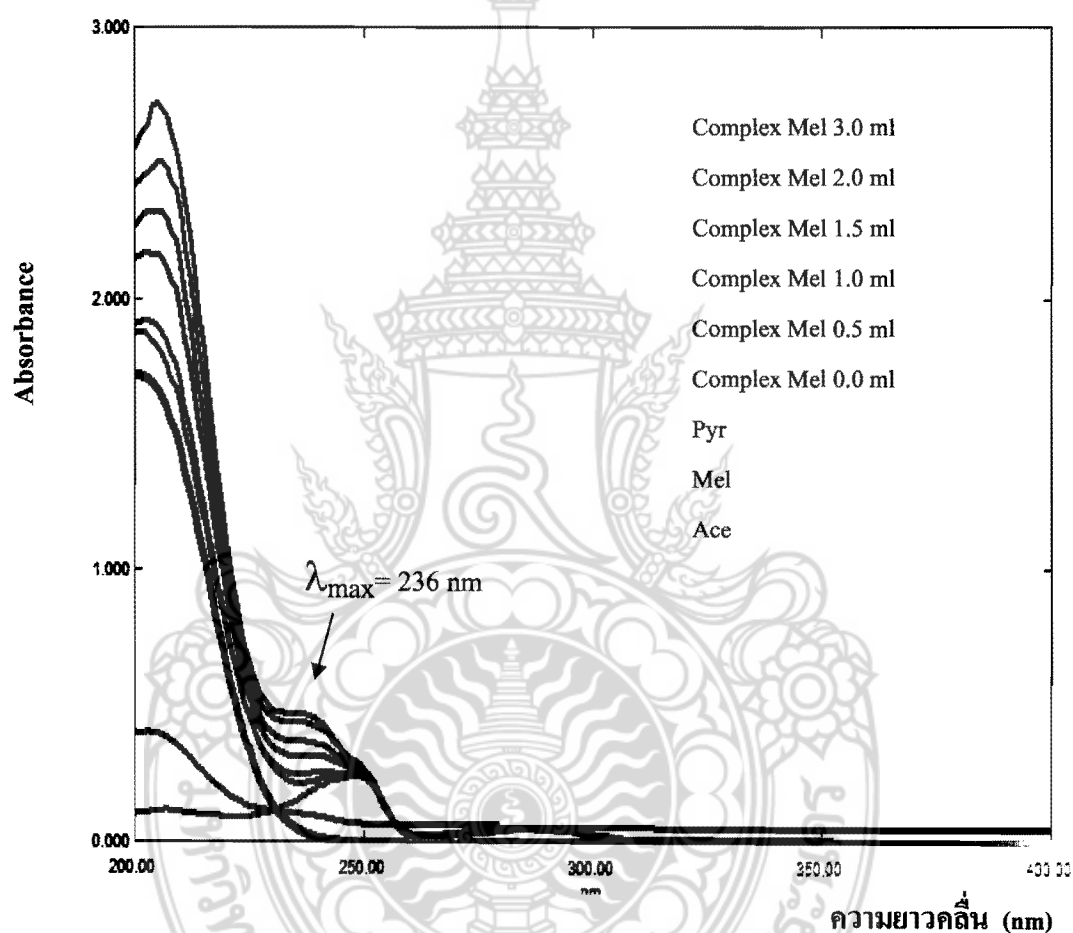
หลอดที่	Mel (ml)	[Me] ppm	$A_{\lambda=236}$
1	0.0	0.00	0.347
2	0.5	0.63	0.460
3	1.0	1.26	0.502
4	1.5	1.89	0.550
5	2.0	2.52	0.603
6	2.5	3.15	0.703



รูปที่ 7 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเมลามีนและค่าการดูดกลืนแสงจากปฏิกิริยาระหว่าง Mel, Ace และ For

#### 4.1.2 ปฏิกริยาระหว่าง Melamine (Mel) 2-acetone-naphtone (Ace) และ 1-pyrene carboxaldehyde (Pyr)

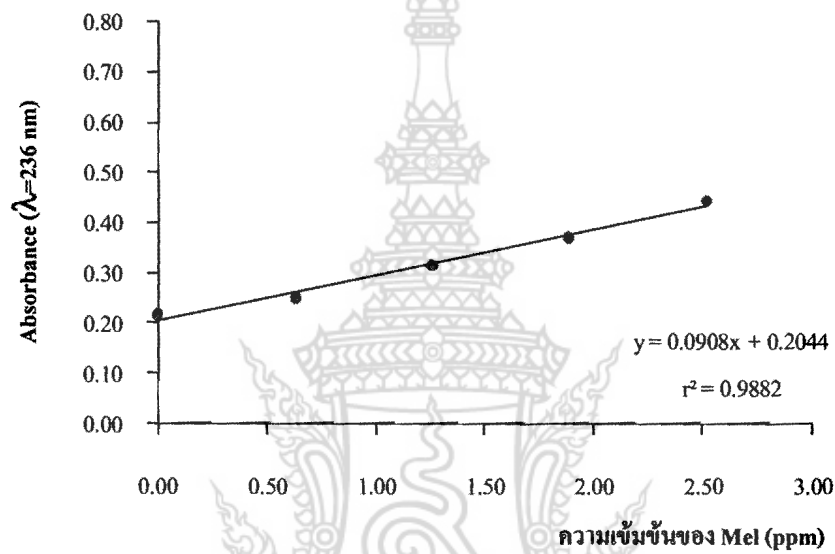
จากการทดสอบปฏิกริยาระหว่าง Mel กับ Ace และ Pyr เกิดขึ้นได้ดี ซึ่งจะเห็นการเปลี่ยนแปลงของสเปกตรัมที่  $\lambda=236$  nm ได้เช่นเดียวกับฟอร์มัลดีไฮด์ แต่ 1-pyrenecarboxaldehyde ไม่มีความเป็นพิษ อย่างไรก็ตาม 1-pyrene carboxaldehyde สามารถเห็น สัญญาณในช่วง UV จากสเปกตรัม พบว่าสัญญาณที่เกิดขึ้น ไม่ได้รบกวนกับสัญญาณ ของสารประกอบเชิงซ้อนของผลิตภัณฑ์แต่สัญญาณของ 2-acetone-naphtone ที่ 250 nm มีความใกล้เคียงกับสัญญาณของสารประกอบเชิงซ้อนของผลิตภัณฑ์ มากส่งผลให้ ไม่สามารถยืนยัน ได้ว่าสารประกอบเชิงซ้อนของผลิตภัณฑ์นั้นเกิดขึ้นจริง ๆ หรือเกิดเนื่องมาจากอาจเกิดการรบกวนโดยเกิด  $\pi$ - $\pi$  interaction ของ aromatic ring ใน 2-acetone-naphtone และ 1-pyrene carboxaldehyde จึงได้ทำการเปลี่ยนชนิดของคีโตนจาก 2-acetone-naphtone เป็นคีโตนชนิดอื่น



รูปที่ 8 สเปกตรัมของ Ace, Mel, Pyr และสารประกอบจากผลิตภัณฑ์  
ที่ปริมาณของเมลามีนต่าง ๆ กัน

ตารางที่ 2 ค่าการดูดกลืนแสงของสารประกอบเชิงซ้อนของผลิตภัณฑ์ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จาก  
ปฏิกิริยาระหว่าง Mel, Ace และ Pyr

หลอดที่	Mel (ml)	[Mel]	$A_{\lambda=236}$
1	0.0	0.00	0.216
2	0.5	0.63	0.250
3	1.0	1.26	0.316
4	1.5	1.89	0.370
5	2.0	2.52	0.442
6	3.0	3.78	0.475

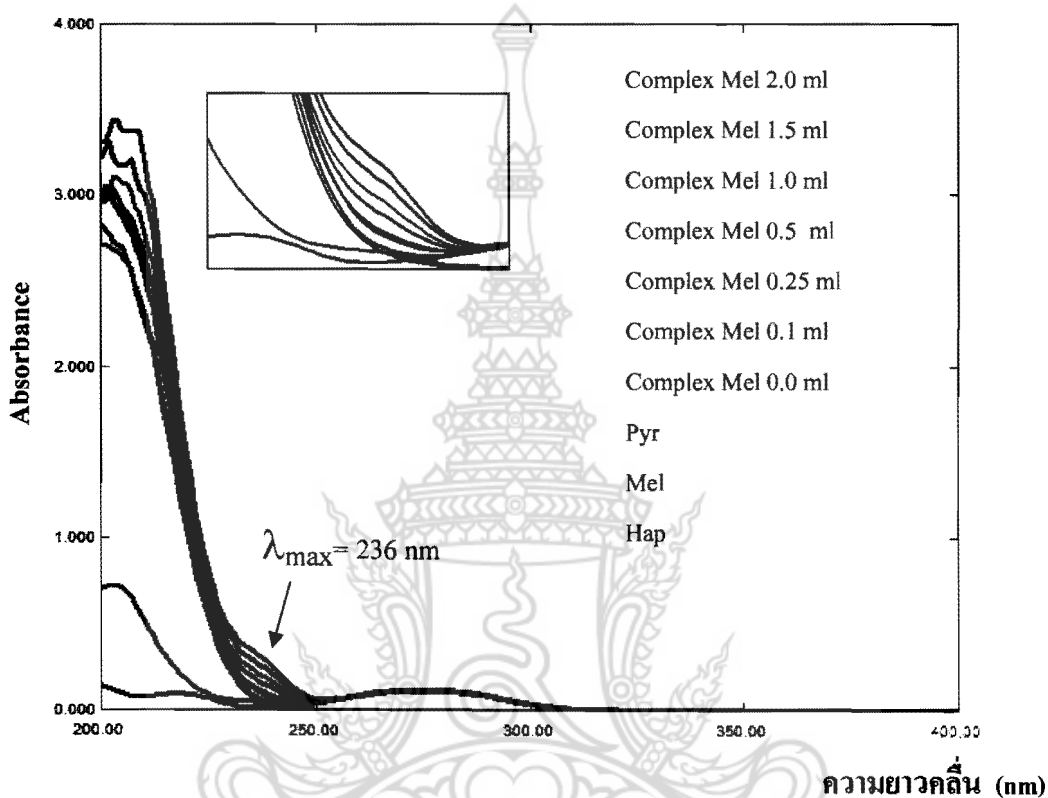


รูปที่ 9 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเมลามีนและค่าการดูดกลืนแสงจากปฏิกิริยา  
ระหว่าง Mel, Ace และ Pyr



#### 4.1.3. ปฏิกริยาระหว่าง Melamine (Mel) 4-hydroxyacetophenone (Hap) และ 1-pyrene carboxaldehyde (Pyr)

ปฏิกริยาระหว่างเมลามีนกับ 1-pyrene carboxaldehyde และ 4-hydroxyacetophenone เกิดขึ้นได้ดีซึ่งจะเห็นการเปลี่ยนแปลงของสเปกตรัมที่  $\lambda=236$  nm จากสเปกตรัมพบว่าสัญญาณของสารประกอบเชิงซ้อนของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นไม่ถูกรบกวนจากสัญญาณของ 4-hydroxyacetophenone และ 1-pyrene carboxaldehyde เป็นการยืนยันว่าเกิดสารประกอบจากผลิตภัณฑ์ระหว่างสารทั้งสามตัวอธิบายได้จากปฏิกริยาของ mannich จึงเลือก ปฏิกริยา ดังกล่าว เป็น สภาวะที่ดีที่สุดในการทดลอง

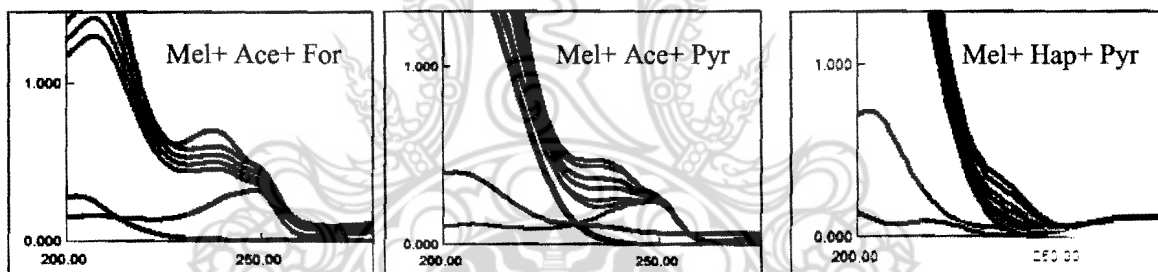


รูปที่ 10 สเปกตรัมของ Hap, Mel, Pyr และ สารประกอบเชิงซ้อนของผลิตภัณฑ์ที่เมลามีนในปริมาณต่าง ๆ กัน

#### 4.2 ทดสอบสถานะที่เหมาะสมจากปฏิกิริยาที่เลือกไว้

จากการศึกษาพบว่าปฏิกิริยาระหว่าง Melamine กับ 4-hydroxyacetophenone และ 1-pyrene carboxaldehyde เป็นปฏิกิริยาที่เหมาะสมที่สุดในการวิเคราะห์หาปริมาณของเมลามีน จากสเปกตรัมในรูปที่ 12 จะแสดงให้เห็นถึงสัญญาณที่เกิดขึ้นโดยจะพบว่าปฏิกิริยาของ Melamine กับ 4-hydroxyacetophenone และ 1-pyrene carboxaldehyde เกิดสารประกอบเชิงซ้อนของผลิตภัณฑ์ที่ไม่มีการรบกวนจากสัญญาณของสารอื่นๆ มากที่สุดเปรียบเทียบกับปฏิกิริยาของ Melamine กับ 2-acetone-naphthone และ Formaldehyde ซึ่งสัญญาณของสารประกอบเชิงซ้อนของผลิตภัณฑ์ถูกรบกวนจากสัญญาณของ 2-acetone-naphthone เป็นอย่างมาก นอกจากนี้ Formaldehyde ยังเป็นสารเคมีที่มีความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมและผู้ที่ทำการทดลอง จึงได้พยายามทดสอบกับสารอื่นได้แก่ 1-pyrene carboxaldehyde ส่วนปฏิกิริยาระหว่าง Melamine กับ 2-acetone-naphthone และ 1-pyrene carboxaldehyde สัญญาณของสารประกอบเชิงซ้อนของผลิตภัณฑ์ ถูกรบกวนจากสัญญาณของ 2-acetone-naphthone เป็นอย่างมากจึงได้พยายามลดสัญญาณการรบกวนของ 2-acetone-naphthone โดยการเปลี่ยนสารประกอบที่มีหมู่ฟังก์ชันเป็นคีโตนคือ 4-hydroxyacetophenone แทนพบว่าปฏิกิริยาที่เหมาะสมที่สุดเนื่องจากสัญญาณของสารประกอบเชิงซ้อนของผลิตภัณฑ์ไม่ถูกรบกวนจากสารประกอบอื่น ๆ

จึงทำการทดสอบโดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งทั้งภายในวันเดียวกัน และ ต่างวัน พบว่าค่าความชันที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยทำการทดสอบด้วย t-test : Two-Sample Assuming Equal Variance  $t \text{ Stat} = -0.50$  และ  $t \text{ Critical two-tail} = 2.78$  ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %



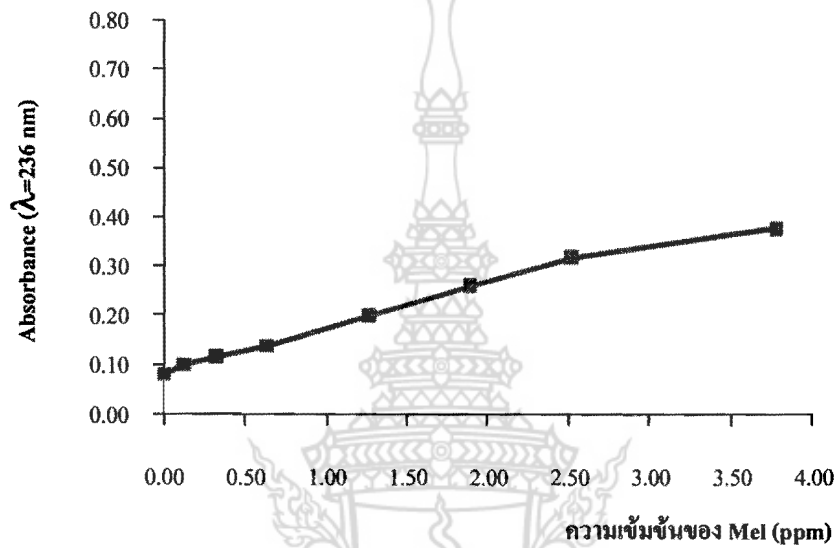
รูปที่ 12 ภาพแสดงความแตกต่างกันของสเปกตรัมระหว่างปฏิกิริยาที่ศึกษาทั้ง 3 ปฏิกิริยา จากสัญญาณที่ได้โดยการเปรียบเทียบที่ความยาวคลื่น 236 nm พบว่าในกรณีของปฏิกิริยาระหว่าง Mel+Ace+For ให้สัญญาณของสารประกอบเชิงซ้อนที่ชัดเจนแต่ก็มีบางส่วนที่มีสัญญาณของ Ace รบกวน ส่วนในกรณีของปฏิกิริยาระหว่าง Mel+Ace+Pyr พบว่ามีสัญญาณของ Ace รบกวนจะไม่สามารถยืนยันได้ว่าสัญญาณที่เกิดขึ้นเป็นสัญญาณของสารประกอบเชิงซ้อนของผลิตภัณฑ์จริง ในกรณีของ Mel+Hap+Pyr พบว่าสัญญาณของสารประกอบเชิงซ้อน ไม่เกิดการรบกวนจากสัญญาณของ Hap หรือ Pyr จึงเลือกปฏิกิริยาดัง กล่าวเป็นสภาวะมาตรฐาน ในการวิเคราะห์หาปริมาณเมลามีน

### 4.3 การทดสอบความถูกต้อง (Method validation)

ทำการทดสอบความถูกต้องได้แก่ช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน ขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ (LOD) ขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (LOQ) ความเที่ยง (Precision) ร้อยละการกลับคืน (% Recovery) ผลการทดลองเป็นดังแสดง

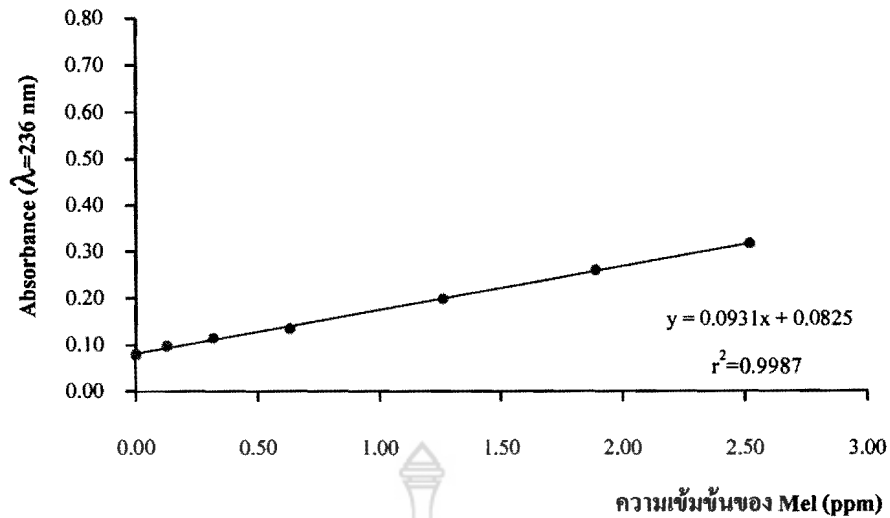
#### 4.3.1 ช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน

จากการบันทึกสเปกตรัมของสารประกอบเชิงซ้อนของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาที่เลือกไว้ที่ความเข้มข้นของเมลามีนที่แตกต่างกันตั้งแต่ 0.1-4.0 ppm พบว่าช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานอยู่ในช่วง 0.1-2.5 ppm โดยมีค่า  $r^2$  เท่ากับ 0.9987



รูปที่ 13 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเมลามีนที่ความเข้มข้นต่างๆ และค่าการดูดกลืนแสง





รูปที่ 14 กราฟมาตรฐานของเมลามีน

#### 4.3.2 ขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ (LOD) (ppm)

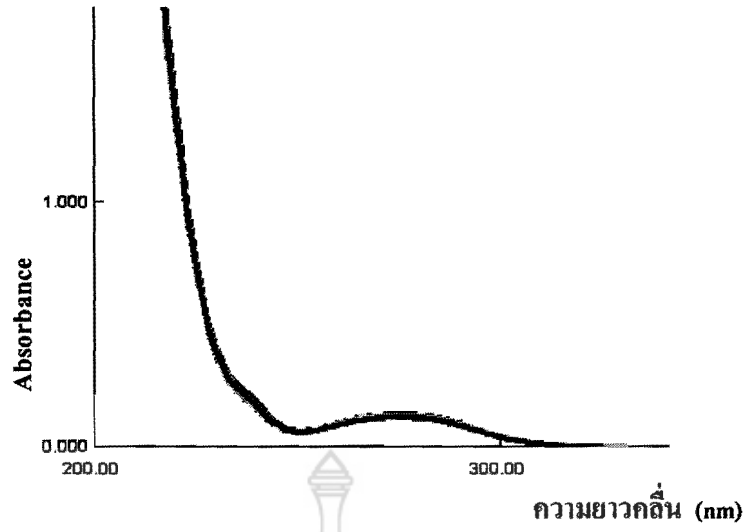
งานวิจัยนี้ขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์สามารถตรวจหาได้ด้วยการนำ Reagent blank มาวัดสัญญาณจำนวน 7 ซ้ำ หาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) คำนวณค่า LOD จากค่าเฉลี่ยของ reagent blank + 3SD และคำนวณค่า LOQ จากค่าเฉลี่ยของ reagent blank + 10SD ผลการทดลองเป็นดังแสดง

ตารางที่ 4 แสดงค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ และขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ

LOD (ppm)	0.08
LOQ (ppm)	0.14

#### 4.3.3 ความเที่ยง (Precision) (%RSD)

ความเที่ยงของวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์ถูกทดสอบโดยการวัดสเปกตรัมของสารผลิตภัณฑ์ที่ความเข้มข้นเดิมซ้ำหลาย ๆ ครั้งโดยทำการปิเปต stock solution ของ Mel มา 1.5 ml Hap 0.5 ml Pyr 0.1 ml และน้ำ 2.9 ml บันทึกสเปกตรัมในช่วง 200-500 nm โดยทำการวิเคราะห์ซ้ำทั้งหมด 10 ครั้ง วัดความเที่ยงโดยดูจากค่า % RSD โดยจะต้องไม่เกิน 8% โดยจากการทดลองพบว่าเมื่อทดลองวิเคราะห์ซ้ำ 10 ครั้ง % RSD เท่ากับ 4.97 ซึ่งถือว่าอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานดังตารางที่ 5



รูปที่ 15 สเปกตรัมของการดูดกลืนของสารประกอบเชิงซ้อนของผลิตภัณฑ์จำนวน 10 ครั้ง  
 ตารางที่ 5 แสดงค่าการดูดกลืนของสารประกอบของผลิตภัณฑ์ 10 ครั้ง

ครั้งที่	$A_{\lambda=236}$
1	0.206
2	0.220
3	0.205
4	0.219
5	0.231
6	0.231
7	0.231
8	0.221
9	0.208
10	0.207
เฉลี่ย	0.22
SD	0.01
%RSD	4.97

#### 4.3.4 ร้อยละการกลับคืน (% Recovery)

ร้อยละการกลับคืน (% Recovery) เป็นวิธีที่ใช้เพื่อวัดความแม่นยำของวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์ โดยทำการ Spike สารมาตรฐานเมลามินลงไปในตัวอย่างก่อนทำการสกัดตามวิธีการสกัด และคำนวณตามสูตรดังต่อไปนี้

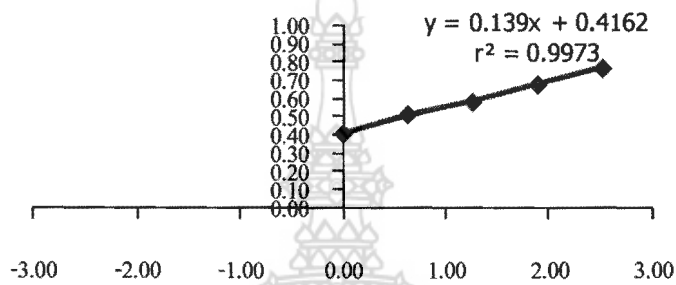
$$\text{สูตรการหา \% Recovery} = (C_{\text{spike}} - C_{\text{sample}}) * 100 / C_{\text{standard}}$$

โดยที่  $C_{\text{spike}}$  = ความเข้มข้นของสารที่สนใจซึ่งได้จากการทดสอบ spiked sample

$C_{\text{sample}}$  = ความเข้มข้นของสารที่สนใจในตัวอย่างที่ได้จากการทดสอบ

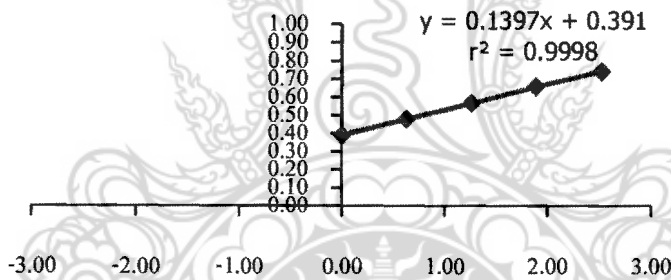
$C_{\text{standard}}$  = ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เดิม

จากการทดลองได้ทำการศึกษาหาร้อยละการกลับคืนของตัวอย่างทั้ง 3 ตัวอย่างผลการทดลองเป็นแสดงในตารางที่ 6



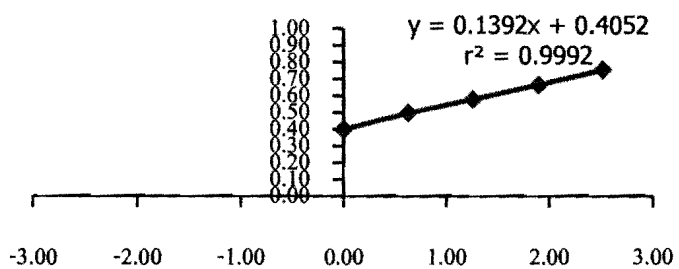
รูปที่ 16 กราฟจากการวิเคราะห์เมลามินด้วยเทคนิค Standard addition ของตัวอย่าง A โดย

การ spike สารมาตรฐานเมลามิน 1 ppm



รูปที่ 17 กราฟจากการวิเคราะห์เมลามินด้วยเทคนิค Standard addition ของตัวอย่าง B โดย

การ spike สารมาตรฐานเมลามิน 0.9 ppm



รูปที่ 18 กราฟจากการวิเคราะห์เมลามีนด้วยเทคนิค Standard addition ของตัวอย่าง C โดยการ spike สารมาตรฐานเมลามีน 0.9 ppm

ตารางที่ 6 ค่าร้อยละการกลับคืน

ตัวอย่าง	ค่าร้อยละการกลับคืน
A	76.67±2.52
B	91.11±7.78
C	78.52±5.48

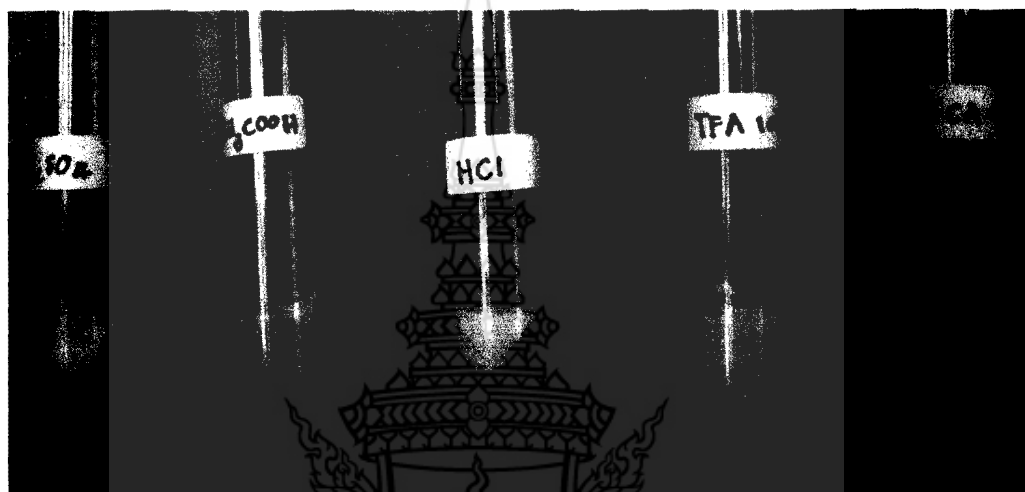


#### 4.4 การทดสอบหาเมลามีนในตัวอย่างนม

เมื่อได้วิธีการทดลองและปฏิกิริยาที่เหมาะสมแล้ว จึงทำการวิเคราะห์ปริมาณของเมลามีนในตัวอย่างนมพร้อมดื่ม 3 ชนิดผลการทดลองเป็นดังแสดง

##### 4.4.1 การทดสอบกรดที่เหมาะสมในการตกตะกอนโปรตีนในตัวอย่างนม

กรดที่นำมาทดลองเพื่อใช้ในการตกตะกอนโปรตีนมีทั้งหมด 5 ชนิดคือ  $H_2SO_4$ ,  $HCl$ ,  $CH_3COOH$ , 10% TFA, 10% TCA ตามลำดับซึ่งจากการทดลองพบว่า 10% TCA เป็นกรดที่สามารถตกตะกอนโปรตีนได้ดีที่สุดซึ่งสามารถสังเกตได้จากรูปที่ 16 จะเห็นว่าเมื่อใช้ 10% TCA ตกตะกอนโปรตีนสามารถตกตะกอน โปรตีนได้ทั้งหมด และได้สารละลายส่วนบนที่ใสมากที่สุดสอดคล้องกับผลการวิจัยของ [6]



รูปที่ 16 การตกโปรตีนของตัวอย่างนมพร้อมดื่มด้วยกรดทั้ง 5 ชนิด

##### 4.4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณเมลามีนในตัวอย่างนมด้วยเทคนิค Standard addition

Standard addition เป็นเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์ทางปริมาณโดยมีการเติมสารมาตรฐานชนิดเดียวกันกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ลงไปในตัวอย่างไม่ทราบแน่นอน แล้วจึงคำนวณปริมาณสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่มีอยู่ในตัวอย่างเริ่มต้นจากความเข้มของสัญญาณที่เพิ่มขึ้นอย่างสัมพันธ์กับปริมาณของสารมาตรฐานที่เติมลงไป ซึ่งเป็นเทคนิคที่เหมาะสมกับการวิเคราะห์หาปริมาณเมลามีนในตัวอย่างนมพร้อมดื่มเนื่องจากตัวอย่างมีส่วนประกอบหรือเมทริกซ์ที่ซับซ้อนทำให้ไม่ทราบชนิดที่แน่นอน

จากการทดลองใช้ตัวอย่างนมพร้อมดื่ม (รายละเอียดของตัวอย่างแสดงในภาคผนวก) ซึ่งซื้อมาจากร้านสะดวกซื้อในจังหวัดกรุงเทพมหานคร 3 ชนิด ผลการทดลองเป็นดังตารางที่ 7

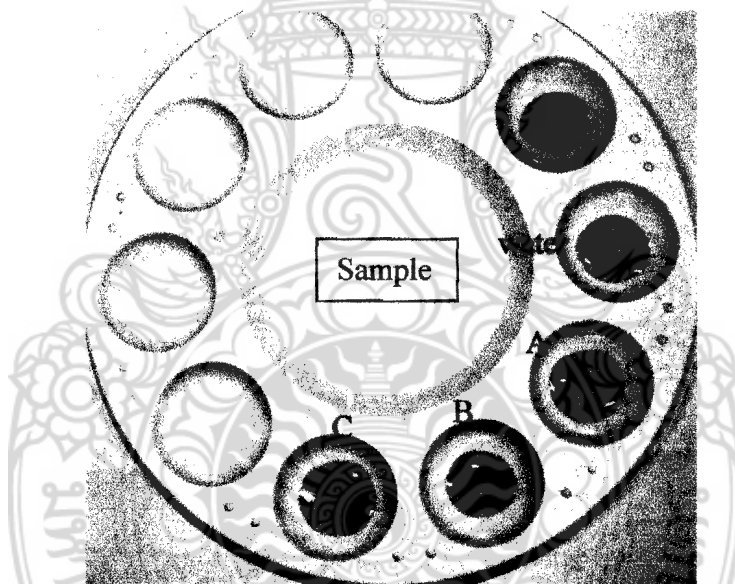
ตารางที่ 7 ผลการวิเคราะห์ปริมาณเมลามีนในตัวอย่างนมพร้อมดื่ม

ตัวอย่าง	ระดับของเมลามีน (ppm)
A	ต่ำกว่า LOD
B	ต่ำกว่า LOD
C	ต่ำกว่า LOD

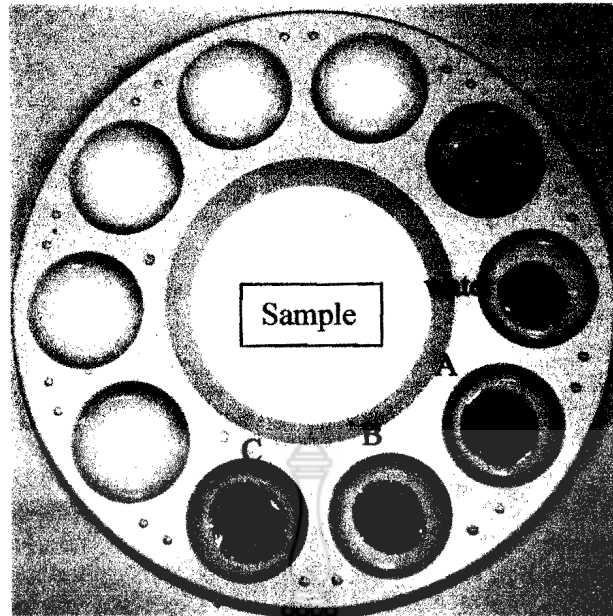
จากการทดลองพบว่าตัวอย่างนมพร้อมดื่มทั้ง 3 ชนิดไม่มีการปนเปื้อนของเมลามีนหรือมีในระดับที่น้อยมากหรือต่ำกว่าขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ (LOD)

**4.4.3 การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณเมลามีนกับ Test-kit**

เมื่อทำการทดสอบตัวอย่างที่ได้จากการสกัดด้วย Test-kit พบว่าตัวอย่างทั้ง 3 ตัวอย่างไม่มีการปนเปื้อนของเมลามีนสอดคล้องกับผลการทดลองการทดสอบด้วยปฏิกิริยาที่ได้จากการวิจัยในครั้งนี้ หลังจากนั้นลองทดสอบปริมาณเมลามีน โดยใช้เป็นตัวอย่างนมพร้อมดื่มซึ่งจากผลการทดลองก็พบว่าตัวอย่างทั้ง 3 ตัวอย่าง ไม่มีการปนเปื้อนของเมลามีนเช่นเดียวกัน



รูปที่ 17 ผลการทดสอบตัวอย่างนมที่ได้จากการสกัดด้วย Test-kit



รูปที่ 18 ผลการทดสอบตัวอย่างนมด้วย Test-kit

ตารางที่ 8 ผลการวิเคราะห์ปริมาณเมลามีนในตัวอย่างนมพร้อมดื่ม โดยใช้ Test-kit

ตัวอย่าง	ระดับของเมลามีน (ppm)
A	ไม่พบ
B	ไม่พบ
C	ไม่พบ

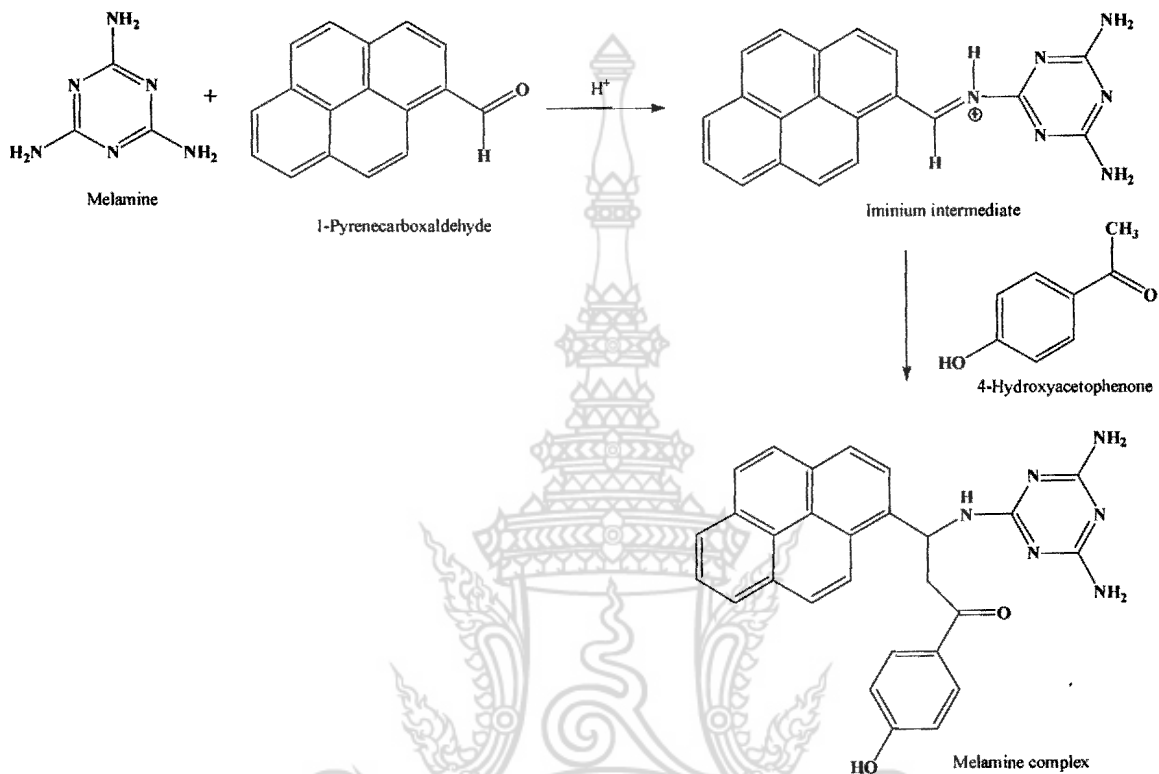


## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลอง อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองการวิเคราะห์หาปริมาณของเมลามีนในตัวอย่างนมพร้อมดื่มโดยใช้ปฏิกิริยา “แมนนิช” ระหว่าง Melamine กับ 4-hydroxyacetophenone และ 1-pyrene carboxaldehyde เป็นปฏิกิริยาที่เหมาะสมที่สุดในการวิเคราะห์หาปริมาณของเมลามีน โดยกลไกการเกิดปฏิกิริยาเป็นดังแสดงในรูปที่ 22



รูปที่ 22 กลไกการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง Melamine กับ 4-hydroxyacetophenone และ 1-pyrene carboxaldehyde เป็นปฏิกิริยาที่เหมาะสมที่สุดในการวิเคราะห์หาปริมาณของเมลามีน

โดยปฏิกิริยาของสารทั้ง 3 ชนิดที่เลือกมานี้พบว่าเหมาะสมที่สุดเนื่องจากให้สัญญาณของสารประกอบของผลิตภัณฑ์ที่ชัดเจน และไม่ถูกรบกวนจากสัญญาณของสารอื่น ๆ อีกทั้งยังไม่เป็นพิษกับสิ่งแวดล้อม และผู้ทำการวิเคราะห์ เทคนิคที่นำมาใช้ตรวจวัดคือเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรี โดยทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารประกอบของผลิตภัณฑ์ที่ความยาวคลื่น 236 nm นับว่าเป็นเทคนิคที่ง่าย สามารถวิเคราะห์ได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป

จากการวิเคราะห์หาปริมาณเมลามีนในตัวอย่างนมพร้อมดื่มพบว่าตัวอย่างนมพร้อมดื่มทั้ง 3 ชนิดไม่มีการปนเปื้อนของเมลามีน

## 5.2 อภิปรายผล

การพัฒนาวิธีใหม่สำหรับการวิเคราะห์เมลามีนประสบความสำเร็จ โดยใช้เทคนิคสเปกโทโฟโตเมทรี ปฏิกริยาที่นำมาทดสอบมีชื่อว่า Mannich โดยจากการทดลองพบว่าเป็นเทคนิคที่ง่าย สะดวก และรวดเร็ว ใช้อุปกรณ์ที่มีตามห้องปฏิบัติการทั่วไป มีความน่าเชื่อถือ โดยช่วงความเป็นเส้นตรงในช่วง 0.1–2.5 ppm ชีดจำกัดค่าสุดของการวิเคราะห์คือ 0.08 ppm เมื่อทดลองวิเคราะห์หาปริมาณเมลามีนในตัวอย่างพบว่าตัวอย่างนมพร้อมดื่มทั้ง 3 ชนิดไม่พบว่าเป็นเปื้อนหรือมีปริมาณของเมลามีนในระดับที่ต่ำกว่าขีดจำกัดค่าสุดของการวิเคราะห์ เมื่อทดลอง spike สารมาตรฐานเมลามีนลงไป ในตัวอย่างพบว่าให้ค่าร้อยละการกลับคืนอยู่ในช่วง 76-91% ซึ่งผลการวิเคราะห์เมลามีนในตัวอย่างนมทั้ง 3 ชนิดนี้สอดคล้องกับการวิเคราะห์โดยใช้ Test-kit ซึ่งจำหน่ายโดยบริษัทไฮเออร์

## 5.3 ข้อเสนอแนะ

1. วิธีการเตรียมตัวอย่างก่อนข้างยุ่งยากจะต้องมีการสกัดตัวอย่างด้วยกรดก่อน ซึ่งทำให้เสียเวลาในการวิเคราะห์ จึงควรมีขั้นตอนในการลดวิธีการเตรียมตัวอย่างต่อไป



## เอกสารอ้างอิง

1. ยุกา ชาญวกรัย และดร. นพ. ประสงค์ เทียนบุญ. "Melamine". หน่วยโภชนศาสตร์และศูนย์วิจัยโภชนาการ ภาควิชาโภชนาการและวิทยาศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. วารสารคลินิกอาหารและโภชนาการ (วคอกภ). 4(2) : 2553.
2. รศ.ดร.เขาวมาลัย คำเจริญ. ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ "รอบรู้เรื่องเมลามีน": วารสารสารสนเทศ & สุนทร. 5(52) : 2550.
3. <http://www.who.int/foodsafety/en/>
4. J. Rima, M. Abourida, T.Xu, I. K. Cho and S. Kyriacos (2009). New spectrophotometric method for the quantitative determination of melamine using Mannich reaction. **Journal of Food Composition and Analysis**, In Press, Accepted Manuscript, Available online 22 April 2009.
5. [www.dmsc.moph.go.th/webroot/udonthani/web/เมลามีน.doc](http://www.dmsc.moph.go.th/webroot/udonthani/web/เมลามีน.doc)
6. E. Sun, W. Ma, L. Xu, Y. Zhu, L. Liu, C. Peng, L. Wang, H. Kuang, C. Xu Analytical methods and recent developments in the detection of melamine. **Trends in Analytical Chemistry** 29 (2010): 1239-124.
7. I-Lin Tsai, Shao-Wen Sun, Hsiao-Wei Liao, Shu-Chiao Lin, Ching-Hua Kuo, Rapid analysis of melamine in infant formula by sweeping-micellar electrokinetic chromatography **Journal of Chromatography A**, In Press, Corrected Proof, Available online 9 June 2009.
8. H. Miao, S. Fan, Y-N. Wu, L. Zhang, P-P. Zhou, H.-J. Chen, Y-F. Zhao and J-G. Li. Simultaneous determination of melamine, ammeline, and cyanuric acid in milk and milk products by gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Biomedical and Environmental Sciences** 22 (2009): 87-94.
9. J. Li, H-Y. Qi and Y-P. Shi. Determination of melamine residues in milk products by zirconia hollow fiber sorptive microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A** 1216 (2009): 5467-5471.

10. M. Ibanez, J. V. Sancho and F. Hernández. Determination of melamine in milk-based products and other food and beverage products by ion-pair liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta** 649 (2009): 91-97.
11. Liangqia Guo, Jianhai Zhong, Jinmei Wu, FengFu Fu, Guonan Chen, Xiaoyan Zheng, Song Lin. Visual detection of melamine in milk products by label-free gold nanoparticles. **Talanta** 82 (2010): 1654–165.
12. Li Li, Baoxin Li, Di Cheng, Lihui Mao. Visual detection of melamine in raw milk using gold nanoparticles as colorimetric probe. **Food Chemistry** 122 (2010): 895–900.
13. AOAC Agricultural Materials Task Force. Sub-Committee on Feed Additives and Contaminants First Draft. September 12, 2006. Project: A method for the determination of total minerals in animal feed, feed ingredients, forage, grain and pet food. Method Needs Statement and Validation Criteria



## คำย่อ

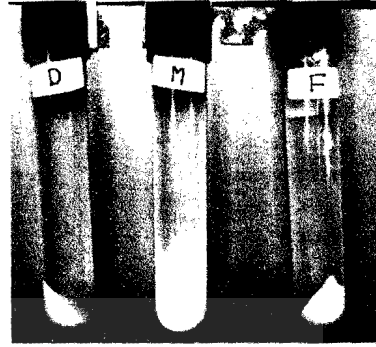
Ace	2-acetone-naphthone
Hap	4-hydroxyacetophenone
Mel	Melamine
Pyr	1-pyrene carboxaldehyde
ppm	part per million
ml	mililiter
LOD	limit of detection
LOQ	limit of quatitation



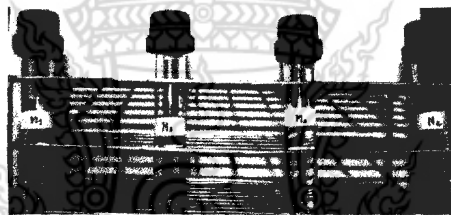
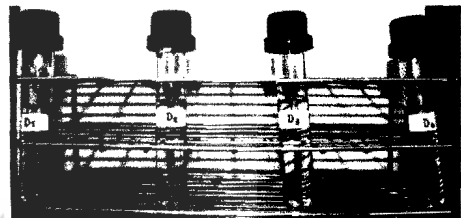
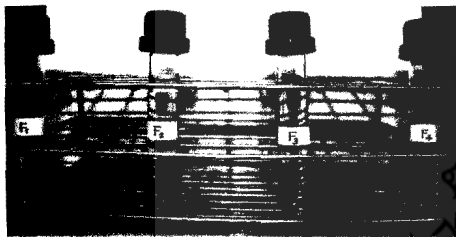
ภาคผนวก



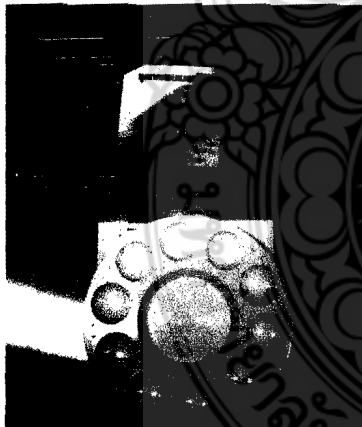
# ประมวลภาพถ่ายระหว่างการวิเคราะห์



ระหว่างการเตรียมตัวอย่าง



ตัวอย่างที่ได้จากการสกัดนมพร้อมดื่มทั้ง 3 ชนิด



การทดสอบด้วย Test-kit

รายละเอียดตัวอย่างนมพร้อมดื่ม

ตัวอย่าง	รายละเอียด
A	นมพร้อมดื่มขาดมันเนย พาสเจอร์ไรส์ 0% ไม่มีไขมัน ไม่มีโคเลสเตอรอล
B	นมสดพาสเจอร์ไรส์
C	นมรสจืด ยูเอชที ผลิตจากน้ำนมโคสด

