
การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ ซูคราโลสในเครื่องดื่มโดยเทคนิค UPLC-ELSD

กิตติมา โสณะมิตร สุรชาติพิทย์ วิทย์ชัยวุฒิมวงศ์ และญาณิต หาญทวีทรัพย์

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ ซูคราโลสเป็นสารให้ความหวานแทนน้ำตาลที่อนุญาตให้ใช้ในอาหารและเครื่องดื่มตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 389) พ.ศ. 2561 การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณซูคราโลสในเครื่องดื่มด้วยเทคนิค UPLC-ELSD สกัดตัวอย่างด้วยเทคนิค Solid-phase extraction แยกสารโดยใช้คอลัมน์ C_{18} สารละลายตัวพาประกอบด้วย methanol, buffer และ acetone พบว่าวิธีมีความจำเพาะเจาะจง ถูกต้อง แม่นยำ และเป็นเส้นตรงในช่วง 50 ถึง 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) มากกว่า 0.9990 ชีตจำกัดการตรวจพบและขีดจำกัดการวิเคราะห์ปริมาณมีค่า 17 และ 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ความเที่ยงแสดงด้วยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD_r) มีค่าไม่เกิน 1.4% ความแม่นยำแสดงด้วยค่าเฉลี่ยของ % recovery อยู่ในช่วง 96.0 ถึง 100.8% และเทคนิค UPLC วิเคราะห์ได้รวดเร็วกว่าวิธี HPLC 4 เท่า

Corresponding author E-mail: kittima.s@dmasc.mail.go.th

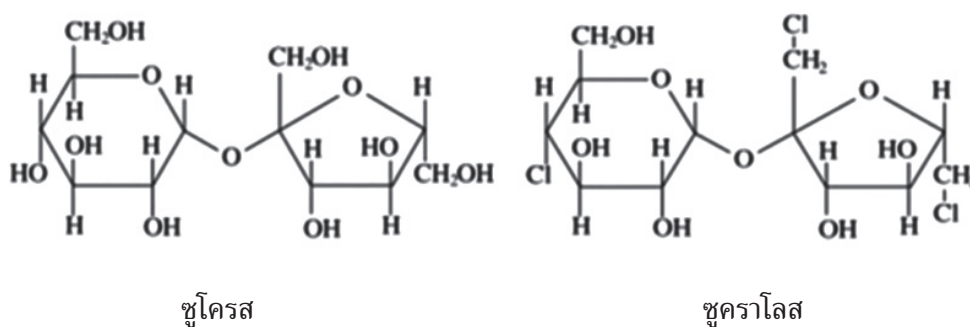
Received: 23 November 2018

Revised: 21 August 2019

Accepted: 13 September 2019

บทนำ

ซูคราโลส (sucralose) เป็นสารให้ความหวานแทนน้ำตาลที่ไม่ให้พลังงาน ปัจจุบันมีการนำมาใช้อย่างแพร่หลาย ในอาหารและเครื่องดื่มที่ต้องการจำกัดปริมาณน้ำตาล ถูกค้นพบเมื่อปี ค.ศ. 1976 วัตถุดิบเริ่มต้นคือน้ำตาลซูโครส (sucrose) ซึ่งผ่านกระบวนการพิเศษโดยแทนที่กลุ่มไฮดรอกซิลด้วยอะตอมคลอรีนที่ตำแหน่งคาร์บอนอะตอมที่ 4, 1 และ 6 ของซูโครส⁽¹⁾ ดังโครงสร้างโมเลกุลของซูโครส เมื่อเปรียบเทียบกับซูคราโลส (ภาพที่ 1) ซึ่งทำให้โครงสร้างของน้ำตาล เสียไป แต่รสชาติยังคงหวานเหมือนน้ำตาล และไม่มีรสขมติดลิ้น เมื่อรับประทานเข้าไปร่างกายจะถูกดูดซึมได้น้อยมาก และปริมาณที่ถูกดูดซึมจะถูกขับออกในรูปเดิมทางปัสสาวะ และปริมาณส่วนใหญ่ที่ไม่ถูกดูดซึมจะถูกขับออก ในรูปเดิมทางอุจจาระ⁽²⁾ และไม่พบอันตรายใด ๆ ในคนที่ได้รับสารซูคราโลส โดยจากข้อสรุปขององค์การอาหารและยา ของสหรัฐอเมริกา ซึ่งสรุปจากข้อมูลการศึกษาทั้งในคนและสัตว์ทดลองกว่า 110 ชิ้น ยืนยันความปลอดภัยของการใช้ ซูคราโลสเป็นสารให้ความหวานในอาหาร^(2,3) และในปี ค.ศ. 1990 คณะผู้เชี่ยวชาญจาก The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) และ United States Food and Drug Administration (US FDA) ได้ประกาศให้ซูคราโลสเป็นสารให้ความหวานแทนน้ำตาลที่มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค สามารถใช้ได้ตั้งแต่เด็ก สตรีมีครรภ์ ผู้ป่วยเบาหวาน และกำหนดค่า ADI ของซูคราโลสไว้ที่ 0-15 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน^(4,5) ประเทศที่รับรองและอนุญาตให้ใช้ซูคราโลส ได้แก่ แคนาดา นิวซีแลนด์ สหรัฐอเมริกา กลุ่มประเทศยุโรป บราซิล สาธารณรัฐประชาชนจีน อินเดีย ญี่ปุ่น รวมทั้งประเทศไทย



ภาพที่ 1 สูตรโครงสร้างของซูคราโลส และซูโครส

ซูคราโลสให้ความหวานได้ถึง 600 เท่าของน้ำตาลทราย แต่ไม่ให้พลังงาน มีลักษณะเป็นผลึกแข็งสีขาว ร่วน ละลายน้ำได้ดี และคงตัวได้ดีในอาหาร มีเสถียรภาพดีในอุณหภูมิสูง นอกจากนี้ยังพบว่าซูคราโลสจะไม่เกิดปฏิกิริยาภายใน กับสารที่เป็นองค์ประกอบของอาหารชนิดใด ๆ⁽⁶⁾ ปัจจุบันนิยมเติมซูคราโลสในผลิตภัณฑ์อาหาร และเครื่องดื่มประเภทต่าง ๆ ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 389) พ.ศ. 2561 เรื่อง วัตถุเจือปนอาหาร⁽⁷⁾ เช่น กาแฟปรุงสำเร็จรูป น้ำอัดลม เครื่องดื่มชนิดต่าง ๆ เป็นต้น รวมถึงผลิตภัณฑ์อาหารเสริม ได้แก่ เวย์โปรตีน หรือเป็นสารให้ความหวานแทนน้ำตาลในอาหารสำหรับผู้ที่ต้องการควบคุมน้ำหนัก ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 121) พ.ศ. 2532⁽⁸⁾ วิธีวิเคราะห์ปริมาณซูคราโลสในอาหารและเครื่องดื่มมีความหลากหลาย ได้แก่ HPLC-ELSD⁽⁹⁾ LC/TOF-MS⁽¹⁰⁾ HPLC-MS⁽¹¹⁻¹³⁾ และ HPLC-UV⁽¹⁴⁻¹⁵⁾ ซึ่งแต่ละวิธีมีข้อจำกัดแตกต่างกันไป

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร เดิมวิเคราะห์ปริมาณซูคราโลสในเครื่องดื่มโดยวิธี HPLC-ELSD⁽⁹⁾ สกัดซูคราโลสด้วยเทคนิค solid-phase extraction (SPE) พบว่าใช้เวลานาน และมีปัญหาเรื่อง % recovery จึงปรับปรุงวิธีเป็น UPLC-ELSD และใช้ gradient program เพื่อลดระยะเวลาในการวิเคราะห์ ปรับชนิดของ SPE cartridge เพื่อให้ % recovery สูงขึ้น และทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์โดยหึ่งปฏิบัติการเดียวตาม Eurachem Guide⁽¹⁶⁾ ได้วิธีที่ถูกต้อง แม่นยำ สามารถวิเคราะห์ปริมาณซูคราโลสในเครื่องดื่มได้ และสามารถให้บริการได้อย่างรวดเร็วยิ่งขึ้น

วัสดุและวิธีการ

สารมาตรฐานและสารเคมี

สารมาตรฐาน: ซูโครโลส (Sigma-Aldrich, USA) ความบริสุทธิ์ 98.7%

สารเคมี: ทุกชนิดเป็น HPLC grade ได้แก่ methanol (Merck, Germany), acetone (RCI-Labscan, Thailand), formic acid 98% (Merck, Germany), triethylamine 99.5% (Fischer Scientific, UK), น้ำ Type I, ก๊าซไนโตรเจนความบริสุทธิ์ไม่น้อยกว่า 99.999%, buffer solution pH 4.5 เตรียมโดยเติม formic acid 1.6 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 4.5 ด้วย triethylamine

การเตรียมสารละลายมาตรฐานซูโครโลส

ซึ่งสารมาตรฐานซูโครโลส 0.1000 กรัม ละลายด้วย 50% methanol ในปริมาณเล็กน้อย ปรับปริมาตรด้วย buffer solution จนครบ 100 มิลลิลิตร ได้สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง, pH-meter, ultrasonic bath, กระดาษกรองชนิด cellulose acetate ที่มีรูพรุนขนาด 0.2 ไมโครเมตร ขนาด 47 มิลลิเมตร, syringe filter (PVDF ชนิด hydrophilic, 0.2 μ m, dia. 13 mm), vacuum manifold, SPE cartridges ชนิด Oasis HLB 200 mg/6 ml

เครื่อง UPLC (WATERS®), Column: Nucleodur C₁₈ Pyramid (1.8 μ m, 100 x 3.0 mm), Detector: Evaporative Light Scattering Detector (SEDEX LT-ELSD™)

การเตรียมตัวอย่าง

ใช้กาแฟผงสำเร็จ (ทรี่ อิน วัน) ที่ไม่มีซูโครโลสเป็น blank matrix โดยละลายกาแฟผงสำเร็จ (ทรี่ อิน วัน) 10 ช้อนชา ด้วยน้ำ 650 มิลลิลิตร

วิธีวิเคราะห์

ซึ่งสารละลายตัวอย่าง ปริมาณ 5 กรัม เติม buffer solution 15-20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ปรับปริมาตรจนครบ 50 มิลลิลิตร นำไปวางใน ultrasonic bath นาน 5-10 นาที กรองผ่านกระดาษกรอง สกัดด้วย SPE cartridge ที่ conditioning ด้วย methanol 3 มิลลิลิตร และ buffer solution 2 มิลลิลิตร 3 ครั้ง เติมสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ล้างด้วย buffer solution 3 มิลลิลิตร และ elute ด้วย methanol 2 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที แล้ว elute อีกครั้งด้วย methanol 2 มิลลิลิตร ถ่ายสารละลายที่ได้ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบด้วย buffer solution และกรองด้วย syringe filter ขนาด 0.2 ไมโครเมตร ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย UPLC-ELSD

สภาวะของระบบโครมาโทกราฟี (UPLC):

Gradient program:

Time (min)	0	1	2.75	4.50	4.51
%mobile phase A	0	0	40	20	0
%mobile phase B	100	100	60	80	100

Mobile phase A: methanol: buffer solution: acetone = 69: 24: 7

Mobile phase B: methanol: buffer solution: acetone = 11: 82: 7

Flow rate: 0.8 ml/min

Detector: ELSD (Temperature 40°C, Nitrogen 3.0 bar, Gain 5)

Injection volume: 5 µl

การตรวจสอบความเหมาะสมของระบบ (System suitability):

ฉีดสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 5 ซ้ำ คำนวณ %RSD ของ peak area และ retention time (RT) โดยเกณฑ์การยอมรับคือ %RSD (peak area) ≤ 5 และ %RSD (RT) ≤ 1

การคำนวณ:

$$\text{ปริมาณซูคราโลส (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)} = \frac{C_0 \times 25}{w}$$

C_0 คือ ปริมาณซูคราโลสในสารละลายตัวอย่างที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐาน (µg/ml)

w คือ น้ำหนักตัวอย่าง (g)

การทดสอบความถูกต้องของวิธี**การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธี (Selectivity/Specificity)**

เตรียมสารละลาย mixed standard solution โดยใช้สารให้ความหวานชนิดอื่น ๆ ได้แก่ อะซีซัลเฟม-เค, ซัคคาริน, ซัยคลาเมต, และแอสปาแทม รวมกับซูคราโลสที่ความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์ด้วย UPLC-ELSD ตรวจสอบการแยกของซูคราโลสออกจากสารอื่น สารทั้งหมดต้องมีค่า retention time แยกจากกันชัดเจน

การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity and working range)

เตรียมสารละลายมาตรฐานซูคราโลส ความเข้มข้น 10, 20, 40, 80, 100, 160 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน buffer solution เตรียมความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ กรองผ่าน syringe filter ขนาด 0.2 ไมโครเมตร นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UPLC-ELSD ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น และพื้นที่ใต้พีค สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้น กับพื้นที่ใต้พีค โดยให้ความสัมพันธ์เป็นแบบ $\log_{10}$ คำนวณค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ซึ่งต้องมีค่าไม่น้อยกว่า 0.9990 และ residual plot ยืนยันความเป็นเส้นตรง

การทดสอบ *Matrix effect*

เตรียม spiked blank matrix ให้มีความเข้มข้นที่ระดับต่าง ๆ เหมือนกับสารละลายมาตรฐานที่ทำกราฟมาตรฐาน ความเข้มข้นละ 3 ขั้ว วิเคราะห์ด้วย UPLC-ELSD และคำนวณค่าความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐาน ประเมิน matrix effect โดยการ plot ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (แกน x) กับความเข้มข้นของ spiked blank matrix (แกน y) ทดสอบความเป็นเส้นตรงและทดสอบว่าช่วงของความเชื่อมั่น (confidential interval: CI) ของ slope กลุ่ม 1 หรือไม่ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ถ้ากลุ่ม แสดงว่าไม่มี matrix effect ซึ่ง CI ของ slope (b) คำนวณได้จากสมการที่ 1

$$CI_{\text{slope}} = b \pm t_{(n-2)} S_b \quad \dots\dots\dots \text{สมการที่ 1}$$

b คือ slope

S_b คือ standard deviation ของ slope คำนวณได้จากสมการที่ 2

t คือ ค่าที่ได้จากตาราง t (two-tailed ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และ (n-2) degree of freedom)

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad \dots\dots\dots \text{สมการที่ 2}$$

$S_{y/x}$ คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ y-intercept คำนวณได้จากสมการที่ 3

x_i คือ ค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน

$\bar{x}$ คือ ค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเฉลี่ย

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{(n-2)}} \quad \dots\dots\dots \text{สมการที่ 3}$$

y_i คือ ค่าสัญญาณที่อ่านได้จากเครื่องมือวัด

$\bar{y}$ คือ ค่าสัญญาณที่ควรเป็น คำนวณโดยใช้ method of least square (ได้จากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน)

การหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (*Limit of detection, LOD*) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (*Limit of quantitation, LOQ*)

วิเคราะห์ blank sample โดยเติมสารละลายมาตรฐานซูโคราโลสที่ระดับความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 10 ขั้ว คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (s) ของ spiked sample blank แล้วนำมาคำนวณค่า LOD และ LOQ จากสมการ $LOD = 3SD$ และ $LOQ = 10SD$

การยืนยันค่าขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (*LOQ*)

เติมสารละลายมาตรฐานซูโคราโลสลงในตัวอย่าง blank matrix ที่ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 10 ขั้ว คำนวณค่าร้อยละของการคืนกลับ (% recovery) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) เกณฑ์การยอมรับความแม่นยำ: recovery 90-107% และความเที่ยง: Horwitz's equation

การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision)

ทดสอบความแม่นยำของวิธีโดยการวิเคราะห์สารละลายตัวอย่าง blank matrix ที่เติมสารละลายมาตรฐานซูคราโลส (spiked sample) ที่ 3 ระดับความเข้มข้น คือ 50, 400 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งเป็นจุดต่ำสุด จุดกึ่งกลาง และจุดสูงสุด ของช่วงใช้งาน วิเคราะห์ระดับละ 7 ซ้ำ หาค่าร้อยละของการคืนกลับ (% recovery) และ ค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% relative standard deviation, %RSD_r) ที่แต่ละระดับความเข้มข้น โดยเกณฑ์ยอมรับความแม่นยำ: recovery 90–107% และเกณฑ์ยอมรับความเที่ยง: Horwitz's equation

การทดสอบความเที่ยง Intermediate precision (%RSD_i) โดยวิเคราะห์ control sample (เครื่องดื่ม whey protein) ต่างวัน วันละ 2 ซ้ำ จำนวน 10 วัน

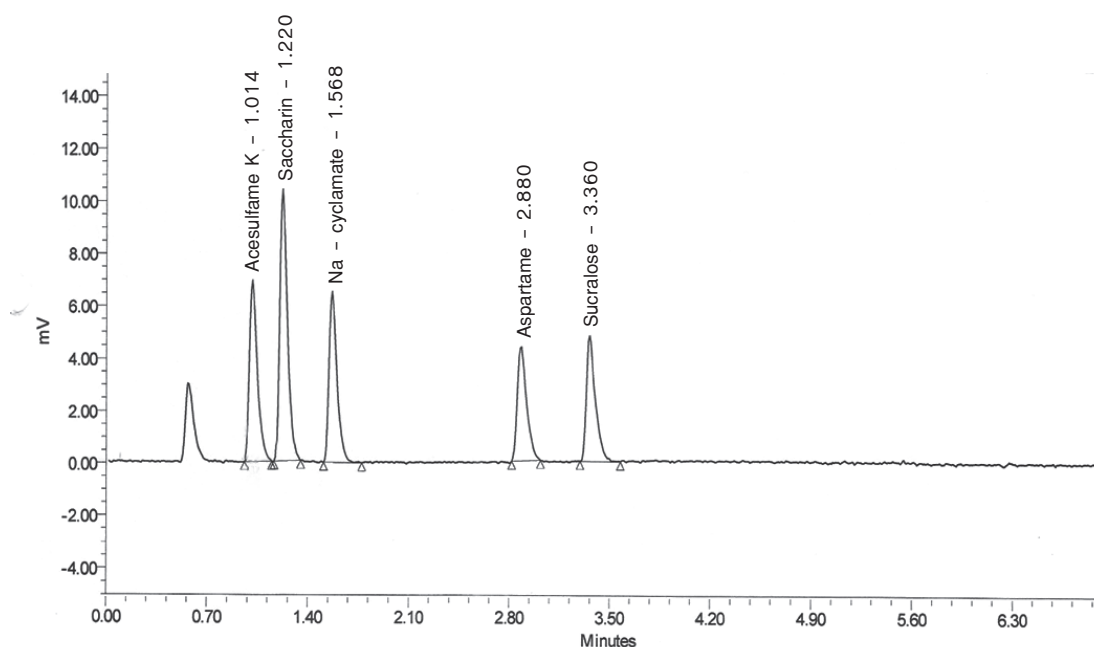
การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ (Measurement of uncertainty)

เพื่อให้เป็นไปตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 ประเมินค่าความไม่แน่นอนของการตรวจวิเคราะห์ โดยคำนึงถึงแหล่งความไม่แน่นอนทุกแหล่ง และเมื่อรวมค่าความไม่แน่นอนทั้งหมดแล้ว ค่าความไม่แน่นอนขยายที่ระดับความเชื่อมั่น 95%⁽¹⁷⁾

ผล

การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธี

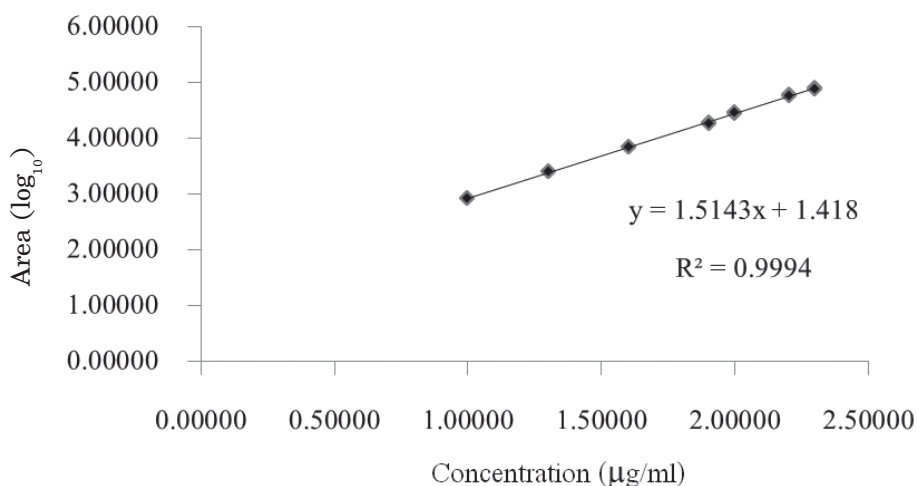
จากการฉีด mixed standard solution พบว่าสามารถแยกสารซูคราโลสออกจากสารให้ความหวานตัวอื่นๆ ได้โดยไม่มี การรบกวน และมีค่า retention time ของสารอะซีลเฟม-เค, ซัคคาริน, โซเดียมไซคลาเมต, แอสปาเทม และซูคราโลส เท่ากับ 1.01, 1.22, 1.56, 2.88 และ 3.36 นาที ตามลำดับ (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐาน mixed standard solution

การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity and working range)

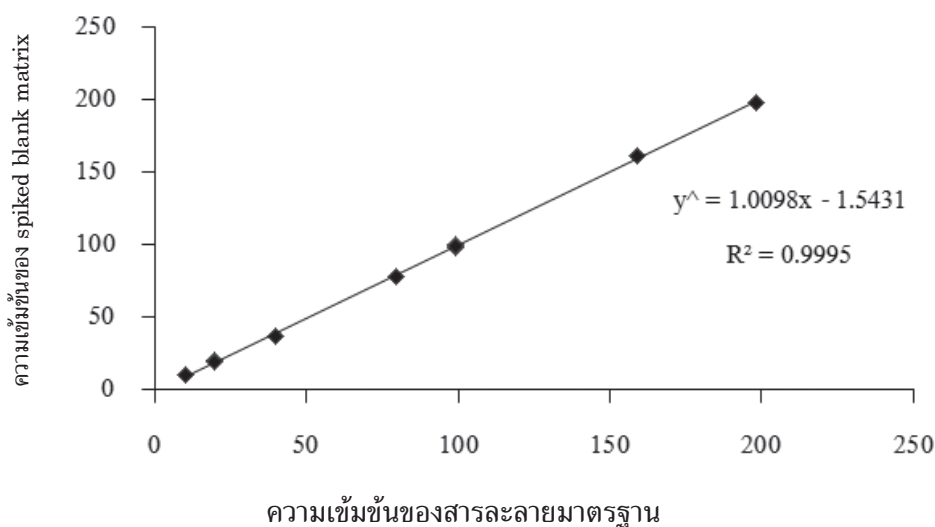
ผลการนิตสารละลายมาตรฐานซูโครโลสที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ 10 ถึง 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ระดับความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ พบความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้พีค ซึ่งคำนวณความเข้มข้น และพื้นที่ใต้พีค เป็นแบบ $\log_{10}$ ได้ลักษณะของกราฟเป็นเส้นตรงตลอดช่วงที่ทดสอบ และมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.9994 (ภาพที่ 3) และยืนยันความเป็นเส้นตรงด้วย Residual plot



ภาพที่ 3 ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานสำหรับซูโครโลส

การทดสอบ Matrix effect

พบว่าความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (แกน x) กับความเข้มข้นของ spiked blank matrix (แกน y) เป็นเส้นตรงตลอดช่วงที่ทดสอบ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.9995 (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานซูโครโลสกับความเข้มข้นของ spiked blank matrix

การทดสอบช่วงของความเชื่อมั่น (confidential interval: CI) ของ slope คำนวณจากสมการที่ 1 พบว่า slope มีช่วงของความเชื่อมั่นตั้งแต่ 0.99859 ถึง 1.02101 สรุปได้ว่า ไม่มี matrix effect

การหาขีดจำกัดของการตรวจพบ และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ

ผลวิเคราะห์ spiked blank matrix ที่ระดับความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 10 ซ้ำ คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (s) ได้เท่ากับ 5.826 คำนวณค่า LOD ได้เท่ากับ 17.478 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และค่า LOQ ได้เท่ากับ 58.26 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

การยืนยันค่าขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ

ผลการนิตสารละลายตัวอย่างที่มีการเติมสารละลายมาตรฐานซูคราโลสลงใน blank matrix ที่ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 10 ซ้ำ คำนวณค่าร้อยละของการคืนกลับ (% recovery) อยู่ในช่วง 95.09–99.31% และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) เท่ากับ 1.30

การทดสอบความแม่นยำ และความเที่ยง

ผลการนิตสารละลายตัวอย่างที่มีการเติมสารละลายมาตรฐานซูคราโลสที่ 3 ระดับความเข้มข้น คือ 50, 400 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ระดับความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ ภายใต้สภาวะ repeatability condition พบความแม่นยำที่ประเมินจาก % recovery ทั้ง 3 ระดับ อยู่ในช่วง 95.24–99.53%, 95.46–97.01% และ 98.55–102.07% ตามลำดับ ซึ่งผ่านเกณฑ์ % recovery 90–107 และความเที่ยง (%RSD_r) ได้เท่ากับ 1.39, 0.57 และ 1.14 ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ค่า % Recovery และ %RSD_r ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณซูคราโลสในกาแฟปรุงสำเร็จ (ทรี อิน วัน)

	ระดับความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)		
	50	400	1000
1	97.57	95.80	101.35
2	96.85	96.40	101.30
3	97.16	97.01	100.74
4	98.61	95.84	102.07
5	99.53	95.47	101.36
6	97.55	95.46	100.20
7	95.24	96.01	98.55
% Recovery เฉลี่ย	97.50	96.00	100.79
SD	1.35	0.55	1.15
%RSD _r	1.39	0.57	1.14
Predicted Horwitz	5.86	4.28	3.73
HORRAT	0.24	0.13	0.30

ผลการทดสอบ Intermediate precision ($\%RSD_i$) โดยทำการวิเคราะห์ control sample (เครื่องต้ม whey protein) ที่ระดับความเข้มข้น 1,470 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม วันละ 2 ซ้ำ 10 วัน นำมาวิเคราะห์ด้วยสถิติ one way anova⁽¹⁶⁾ พบว่ามีค่าเท่ากับ 5.96 ซึ่งผ่านเกณฑ์ HORRAT (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบ Intermediate precision ($\%RSD_i$): ทำการวิเคราะห์ต่างวัน วันละ 2 ซ้ำ

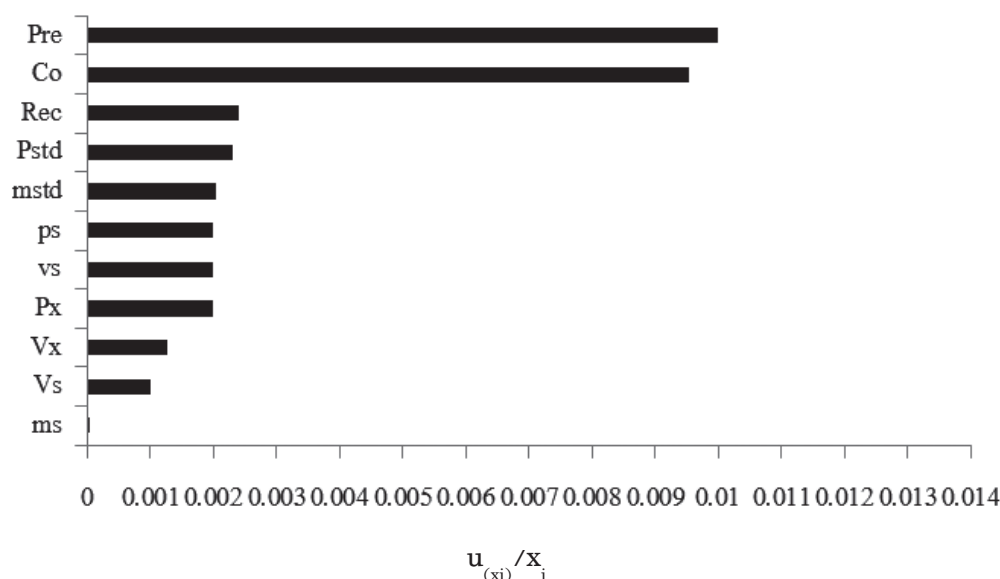
วันที่	ปริมาณซูคราโลส (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	
	1	2
1	1484	1474
2	1470	1479
3	1496	1492
4	1474	1474
5	1470	1473
6	1471	1470
7	1458	1452
8	1435	1442
9	1470	1468
10	1469	1465
N=	20	
$\%RSD_i$	5.96	
Expected $\%RSD$	5.34	
HORRAT	1.12	
เกณฑ์ยอมรับ HORRAT ≤ 2	pass	

การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์

ประเมินค่าความไม่แน่นอนของวิธีวิเคราะห์จากค่ารวมของผลกระทบทั้งหมดที่มีต่อผลทดสอบที่เป็นเชิงปริมาณ ได้แก่ ความไม่แน่นอนจากความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐาน การสอบเทียบเครื่องชั่ง เครื่องแก้วที่ใช้เตรียมสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง ความเข้มข้นของสารที่อ่านได้จากเครื่อง UPLC-ELSD การวิเคราะห์ซ้ำจากค่าร้อยละของการคืนกลับ ($\% recovery$) ของการทดสอบความถูกต้องของวิธี นำมาคำนวณค่าความไม่แน่นอนรวม (combined uncertainty, u_c) ซึ่งผลการคำนวณค่าความไม่แน่นอนขยาย (expanded uncertainty, U) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้ค่า coverage factor (k) เท่ากับ 2 คือ 21 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ตารางที่ 3) และแสดงแหล่งของความไม่แน่นอนในสัดส่วนที่ต่างกัน (ภาพที่ 5)

ตารางที่ 3 การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ปริมาณซูคราโลสในตัวอย่างกาแฟผงปรุงสำเร็จ (ทรี อิน วัน)

components	value, x_i	unit	$u_{(xi)}$	$u_{(xi)}/x_i$	สัดส่วนแหล่ง ความไม่แน่นอน (%)
1. Standard					
- P_{std} (purity)	100	%	0.23	2.30×10^{-3}	6.65
- m_{std} (weight)	0.1001	g	2.05×10^{-4}	2.05×10^{-3}	5.92
- V_x (volumetric flask)	1 x 100	ml	0.08	8.00×10^{-4}	
	1 x 50	ml	0.05	1.00×10^{-3}	
				$1.28 \times 10^{-3} (V_x)$	3.70
- P_x (pipette)	5	ml	0.01	2.00×10^{-3}	5.78
2. Sample					
- m_s (weight)	5.0007	g	2.05×10^{-4}	4.10×10^{-5}	0.12
- v_s (final volume)	5	ml	0.01	2.00×10^{-3}	5.78
- V_s (volumetric flask)	50	ml	0.05	1.00×10^{-3}	2.89
- p_s (pipette)	2 x 5	ml	0.01	2.00×10^{-3}	5.78
3. C_0 read from curve	2.0960	$\mu\text{g/ml}$	0.02	9.54×10^{-3}	27.56
4. Precision (%RSD)	1	-	0.01	0.01	28.89
5. Recovery	100	%	0.24	2.40×10^{-3}	6.93
Combined standard uncertainty (u_c/c) = 0.017 (c = 624 mg/kg)					
Standard uncertainty (u_c) = $0.017 \times 624 = 10.61 \text{ mg/kg}$					
Expanded uncertainty (U), k=2 = $10.61 \times 2 = 21.22 \text{ mg/kg}$					
Reported value: $624 \pm 21 \text{ mg/kg}$					



ภาพที่ 5 ค่าความไม่แน่นอนจากแหล่งต่างๆ ในความไม่แน่นอนรวม

Pre: Precision, Co: Concentration read from curve, Rec: Recovery, Pstd: Purity of standard, mstd: weight of standard, ps: pipette of sample, vs: final volume of sample, Px: pipette of standard, Vx: volumetric flask of standard, Vs: volumetric flask of sample, ms: weight of sample

วิจารณ์

วิธีตรวจวิเคราะห์ปริมาณซูโครโลสในเครื่องต้มมีหลายวิธี ซึ่งแต่ละวิธีมีข้อดี ข้อเสียแตกต่างกัน LC/MS เป็นเครื่องมือราคาแพง และมีความไวสูง สามารถวิเคราะห์ปริมาณที่ระดับต่ำได้ จึงอาจไม่เหมาะสำหรับห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์ทั่วไป อีกทั้งกฎหมายอนุญาตให้ใช้ซูโครโลสในปริมาณค่อนข้างสูง (300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) HPLC เป็นเทคนิคที่ใช้เวลานาน วิธี UPLC ที่ได้พัฒนาโดยศึกษาคอลัมน์ที่จะใช้ ปริมาณสารที่ฉีดเข้าคอลัมน์ให้เหมาะสมกับเครื่อง ปรับระบบ gradient ของ mobile phase ปรับอัตราการไหลเพื่อให้การแยกของซูโครโลสออกจากสารอื่นดีขึ้น สามารถลดการใช้ mobile phase และระยะเวลาในการวิเคราะห์ โดย retention time ลดลงเป็นประมาณ 4 เท่า เหลือ 3.5 นาทีต่อการฉีดหนึ่งตัวอย่าง การตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัดชนิด ELSD ซึ่งเป็นเครื่องตรวจวัดที่ใช้ได้กว้างขวางเช่นเดียวกับเครื่องตรวจวัดชนิด reflective index แต่สามารถใช้กับระบบ gradient ได้ และให้ baseline ที่นิ่งและเรียบ ส่วนการเลือก SPE ในการสกัด พบว่า oasis HLB ให้ผลดีกว่า SPE ชนิดอื่น

เมื่อได้วิธีที่เหมาะสมแล้วจึงดำเนินการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว⁽¹⁸⁾ พบว่าไม่มีการรบกวนจากสารให้ความหวานชนิดอื่นรวมถึงคาเฟอีนในผลิตภัณฑ์ ส่วนเครื่องมืออื่น ๆ ได้แก่ น้ำผลไม้หรือน้ำอัดลมที่ผสมสารกันเสีย (กรดเบนโซอิก หรือกรดซอร์บิก) พบว่าไม่มีการรบกวนจากสารดังกล่าวเช่นกัน แสดงถึงความจำเพาะเจาะจงของวิธี ซึ่งแต่ละสารสามารถแยกจากกันอย่างชัดเจน ความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 10–200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร วิธีนี้ไม่มีผลกระทบจาก matrix effect LOD เท่ากับ 17 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ LOQ เท่ากับ 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จากการเติมสารมาตรฐาน 3 ระดับความเข้มข้น พบความแม่นยำและความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์ โดย % recovery อยู่ในช่วง 90–107% และค่า HORRAT น้อยกว่า 2 การตรวจวิเคราะห์ control sample ต่างวัน พบว่า intermediate precision มีค่า HORRAT น้อยกว่า 2 เช่นกัน การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด

เป็นเครื่องวัดระดับคุณภาพของผลการทดสอบ การแสดงค่าความไม่แน่นอนทำให้ค่าที่รายงานนั้นมีความครบถ้วน สมบูรณ์และน่าเชื่อถือ จากการประเมินความไม่แน่นอนของผลการทดสอบหาปริมาณซูคราโลสในกาแฟผงสำเร็จ (ทรี อิน วัน) พบค่าความไม่แน่นอนขยายเท่ากับ 21 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ที่ระดับความเข้มข้น 624 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 นอกจากนี้ห้องปฏิบัติการได้ใช้วิธีนี้เข้าร่วมทดสอบความชำนาญซูคราโลสในเครื่องดื่ม พบว่าผลวิเคราะห์อยู่ในเกณฑ์ Z-score เท่ากับ -0.67 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่น่าพอใจ

อย่างไรก็ตาม การวิเคราะห์ด้วย UPLC ควรใช้ความระมัดระวัง เนื่องจากคอลัมน์มีขนาดอนุภาคเล็กมาก ประมาณ 2 ไมโครเมตร ต่างจากคอลัมน์ที่ใช้ในระบบ HPLC ทั่วไป ที่มีขนาดประมาณ 5-10 ไมโครเมตร และสายที่ใช้ต่อ ในระบบมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเล็กมาก ทำให้ต้องระวังเรื่องการอุดตันตามสายต่าง ๆ การเตรียม mobile phase หรือ สารละลายตัวอย่างที่จะฉีดเข้าระบบ UPLC จึงต้องกรองด้วย syringe filter ที่มีขนาด 0.2 ไมโครเมตร นอกจากนี้ ควรเลือกใช้สารเคมีที่เป็นเกรด HPLC เพื่อลด noise และก๊าซที่ใช้ต้องมีความบริสุทธิ์ไม่น้อยกว่า 99.999%

สรุป

ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ สรุปได้ว่าวิธีมีความถูกต้อง แม่นยำ เหมาะสมที่จะใช้ในการตรวจหาปริมาณซูคราโลสในเครื่องดื่มมีความรวดเร็ว ลดระยะเวลาในการวิเคราะห์ได้ถึง 4 เท่า สามารถรองรับงานการตรวจวิเคราะห์ได้เพิ่มมากขึ้นและสามารถนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณนางสาวสุวรรณี อธิภาพธรรมกุล อดีตนักวิทยาศาสตร์การแพทย์เชี่ยวชาญ จากสำนักคุณภาพ และความปลอดภัยอาหาร ที่ให้คำแนะนำปรึกษาในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการวัตถุ เจริญอาหารทุกท่าน ที่มีส่วนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Rodero AB, Rodero LS, Azoubel R. Toxicity of sucralose in humans: a review. *Int J Morphol* 2009; 27(1): 239-44.
2. วรณคล เชื้อมงคล. สารให้ความหวาน: การใช้และความปลอดภัย. วารสารไทยเภสัชศาสตร์และวิทยาการสุขภาพ 2551; 3(1): 161-8.
3. American Dietetic Association. Position of the American Dietetic Association: use of nutritive and nonnutritive sweeteners. *J Am Diet Assoc* 2004; 104(2): 255-75.
4. The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Sucralose. [online]. 1990; [cited 2016 Dec 31]. Available from: URL: http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecval/jec_2206.htm.
5. American Pregnancy Association. Artificial sweetener and pregnancy. [online]. 2015; [cited 2016 Oct 18]; [3 screens]. Available from: URL: <http://americanpregnancy.org/pregnancy-health/artificial-sweeteners-and-pregnancy/>.
6. บทที่ 2 ซูคราโลส (Sucralose). ใน: ฉวีวรรณ จิตยพันธุกุล. เอกสารวิชาการเรื่อง ซูคราโลส วัตถุให้ความหวานจัดชนิดใหม่. นนทบุรี: กองควบคุมอาหาร สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา; 2540. หน้า 23-29.

7. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 389 (พ.ศ. 2561) เรื่องวัตถุเจือปนอาหาร (ฉบับที่ 5). ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 135 ตอนพิเศษ 178 ง (วันที่ 25 กรกฎาคม 2561).
8. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 121 (พ.ศ. 2532) เรื่องอาหารสำหรับผู้ที่ต้องการควบคุมน้ำหนัก. ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 106 ตอนที่ 103 (วันที่ 1 กรกฎาคม 2532).
9. Wasik A, McCourt J, Buchgraber M. Simultaneous determination of nine intense sweeteners in foodstuffs by high performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection--development and single-laboratory validation. *J Chromatogr A* 2007; 1157: 187-96.
10. Ferrer I, Thurman EM. Analysis of sucralose and other sweeteners in water and beverage samples by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2010; 1217: 4127-34.
11. Koyama M, Yoshida K, Uchibori N, Wada I, Akiyama K, Sasaki T. Analysis of nine kinds of sweeteners in foods by LC/MS. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 2005; 46(3): 72-8.
12. Yang DJ, Chen B. Simultaneous determination of nonnutritive sweeteners in foods by HPLC/ESI-MS. *J Agric Food Chem* 2009; 57(8): 3022-7.
13. Hatano K, Nakao A. Determination of sucralose in foods by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 2002; 43(5): 267-72.
14. Yamabe T, Takemura M, Kawaguchi Y, Kimura Y, Nishiguchi S, Kitada Y. Determination of sucralose in foods by HPLC using derivatization. *Jpn J Food Chem Safety* 2012; 19(1): 54-8.
15. Lawrence JF, Charbonneau CF. Determination of seven artificial sweeteners in diet food preparations by reverse-phase liquid chromatography with absorbance detection. *J Assoc Off Anal Chem* 1988; 71(5): 934-7.
16. Eurachem Guide. The Fitness for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics. 2nd ed. Torino: Eurachem; 2014.
17. Ellison SLR, Williams A. Eurachem/CITAC guide: quantifying uncertainty in analytical measurement. 3rd ed. Teddington, UK: Eurachem/CITAC; 2012.
18. ทิพวรรณ นิ่งน้อย. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2549.

Method Validation for Determination of Sucralose in Soft Beverages by UPLC-ELSD

Kittima Sonamit Suthatip Vitchaivutivong and Yanit Harntaweessup

Bureau of Quality and Safety of Food, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000, Thailand

Abstract Sucralose is used as sweetener in foods and soft beverages, according to the Notification of the Ministry of Public Health (No.389) B.E. 2561 (2018). The method was validated for the determination of sucralose in soft beverages using UPLC-ELSD. The method utilized solid-phase extraction for sample clean-up. The separation was performed on a C₁₈ column by gradient elution with a mixture of methanol, buffer and acetone. The method proved to be specific, accurate, precise and linear between 50–1,000 mg/kg with coefficient of determination greater than 0.9990. Limit of detection and Limit of quantification were 17 and 50 mg/kg, respectively. The precision (%RSD_r) was within 1.4% and accuracy as expressed by % recovery was ranged from 96.0 to 100.8%. The proposed UPLC method was 4 times faster than the previous HPLC method.

Keywords: Sucralose, UPLC-ELSD, Solid-phase extraction, Soft beverages