

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์สีอิรีโทรซิน ในอาหารโดยเทคนิค HPLC

จันทร์เพ็ญ โตวิยานนท์ และสุรชาติ วิทยชัยวุฒิมงคล

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ อำเภอเมือง นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ สีอิรีโทรซินอยู่ในกลุ่มสีอินทรีย์สังเคราะห์ชนิดหนึ่ง เป็นสีที่มีความไวต่อแสงและความร้อน จัดเป็นวัตถุเจือปนอาหารตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 418 พ.ศ. 2563 ออกตามความในพระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 เรื่องกำหนดหลักเกณฑ์ เงื่อนไข วิธีการใช้ และอัตราส่วนของวัตถุเจือปนอาหาร (ฉบับที่ 2) การศึกษานี้ได้พัฒนาและปรับปรุงวิธีวิเคราะห์ปริมาณสีอิรีโทรซินในอาหารซึ่งเดิมใช้การสกัดด้วย 1-butanol แล้ววัดปริมาณด้วยเครื่อง spectrophotometer ซึ่งเหมาะสมสำหรับตัวอย่างอาหารที่ละลายน้ำเท่านั้น โดยเปลี่ยนมาเป็นการสกัดตัวอย่างแต่ละกลุ่มอาหาร (อาหารที่ละลายน้ำ, อาหารไม่ละลายน้ำ และอาหารประเภทที่มีไขมัน) แล้วใช้เทคนิค HPLC ในการตรวจวัดปริมาณ จากการทดสอบพบว่าวิธีมีความจำเพาะเจาะจง ถูกต้อง แม่นยำ และความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0.10 ถึง 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) มากกว่า 0.9995 แต่ละกลุ่มอาหารมีพารามิเตอร์ต่างๆ ดังนี้ ขีดจำกัดการตรวจมีค่า 0.06, 0.10 และ 0.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ขีดจำกัดการวิเคราะห์ปริมาณมีค่า 0.20, 0.20 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ความเที่ยงตรงแสดงด้วยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD_r) มีค่าไม่เกิน 1.5%, 4.5% และ 2.9% ตามลำดับ ความแม่นยำแสดงด้วยค่าเฉลี่ยของ %recovery อยู่ในช่วงร้อยละ 96.1 – 99.4, 92.1 – 95.1 และ 83.3 – 96.0 ตามลำดับ วิธีวิเคราะห์นี้สามารถใช้วิเคราะห์ปริมาณสีอิรีโทรซิน ครอบคลุมในทุกกลุ่มอาหารโดยมีความจำเพาะเจาะจง ถูกต้อง และแม่นยำ

คำสำคัญ: สีอิรีโทรซิน, อาหาร, เทคนิค HPLC

Corresponding author E-mail: janpen.t@dmsc.mail.go.th

Received: 27 October 2020

Revised: 31 May 2021

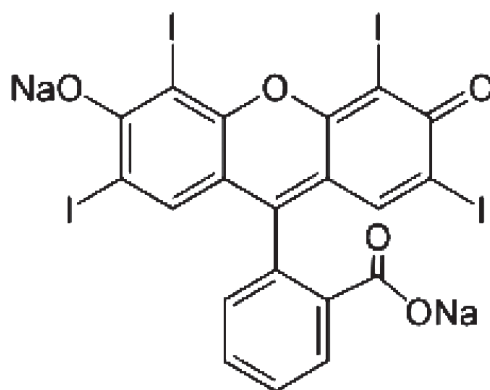
Accepted: 9 July 2021

บทนำ

HPLC หรือ High Performance Liquid Chromatography เป็นเครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์กลุ่มของสารประกอบอินทรีย์ที่ไม่ระเหย หรือกลุ่มสารประกอบอินทรีย์ที่สามารถระเหยได้ปานกลาง โดยตัวอย่างที่จะนำมาวิเคราะห์จะต้องพิจารณาถึงความสามารถในการละลายของสารที่ต้องการวิเคราะห์กับตัวทำละลายอินทรีย์ผสมที่ใช้ก่อน เพื่อป้องกันการไม่ละลายเข้าด้วยกัน หรือการตกตะกอนของตัวทำละลายผสม และไม่ให้เกิดการอุดตันในระบบ รวมทั้งพิจารณาค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของตัวทำละลายอินทรีย์ด้วย (UV cut-off)⁽¹⁾

เทคนิคการแยกองค์ประกอบของสารผสมของเครื่อง HPLC อาศัยความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ของแต่ละองค์ประกอบของสารผสมบนเฟสคงที่ (Stationary phase) ซึ่งอยู่ในคอลัมน์ ภายใต้การพาของเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) คือตัวทำละลายอินทรีย์ผสม เมื่อสารที่ต้องการวิเคราะห์ผ่านเข้าสู่เครื่อง HPLC สารดังกล่าวจะถูกพาเข้าสู่คอลัมน์โดยตัวทำละลายอินทรีย์ผสม เพื่อให้เกิดการแยกสาร (Separation) โดยอาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่างสารที่อยู่ภายในคอลัมน์ และความสามารถในการละลายของสารผสม

สีอิริโทรซิน ($C_{20}H_{14}I_4Na_2O_5$) ดังแสดงในภาพที่ 1 หรือ Food Red No.3 ตามการจัดกลุ่มสีของ US. FDA หรือ E 127 ตามการจัดกลุ่มสีของ European Food Safety Authority (EFSA) จัดอยู่ในกลุ่มของสีอินทรีย์สังเคราะห์ สามารถละลายได้ในน้ำและเอทานอล ไวต่อแสงและความร้อน มีเซตสีชมพูเชอร์รี่ถึงแดง⁽²⁾ ในปี ค.ศ. 1989 the EU Scientific Committee for Food (SCF) และ ปี ค.ศ. 1990 the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) ได้มีการประเมินและกำหนดค่า Acceptable Daily Intake (ADI) ของสีอิริโทรซิน เท่ากับ 0-0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อวัน ต่อมาปี ค.ศ. 2011 SCF และปี ค.ศ. 2018 JECFA มีการทบทวนค่า ADI โดยยังคงค่าเดิม⁽³⁾



ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของสีอิริโทรซิน

สีอิริโทรซินมีค่า ADI ต่ำ แม้ได้รับปริมาณน้อยอาจส่งผลต่อสุขภาพได้ มีรายงานถึงพิษภัยของสีชนิดนี้เนื่องจากโครงสร้างโมเลกุลของสีอิริโทรซินมีไอโอดีนเป็นส่วนประกอบอยู่ร้อยละ 57.6 โดยอาจมีผลกระตุ้นการทำงานของต่อมไทรอยด์ ซึ่งอาจส่งผลทำให้เกิดเนื้องอกที่ต่อมไทรอยด์ได้ หรือทำให้มีอาการไวต่อแสง (phototoxicity) อย่างไรก็ตามจากรายงานความคิดเห็นทางวิทยาศาสตร์ของ EFSA ซึ่งเป็นหน่วยงานของประเทศในกลุ่มสหภาพยุโรป ได้สรุปว่า สีอิริโทรซินถูกดูดซึมเข้าร่างกายได้เล็กน้อย ไม่มีการสะสม และไอโอดีนในสีอิริโทรซินไม่ได้ถูกสลายออกมา ซึ่งสีชนิดนี้นิยมใช้ในอาหารประเภทเชอร์รี่เชื่อม ลูกอม หมากฝรั่ง เป็นต้น สำหรับประเทศไทยอนุญาตให้ใช้ในอาหารไม่กี่ประเภท โดยชนิดอาหารและปริมาณที่ใช้ต้องเป็นไปตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 418) พ.ศ. 2563 ออกตามความในพระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 เรื่องกำหนดหลักเกณฑ์ เงื่อนไขการใช้ และอัตราส่วนของวัตถุเจือปนอาหาร (ฉบับที่ 2)⁽³⁾ ซึ่งอนุญาตให้ใช้ในหมวดอาหาร ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยมีเงื่อนไขดังนี้

ตารางที่ 1 หลักเกณฑ์ เงื่อนไข วิธีการใช้ และอัตราส่วนของวัตถุเจือปนอาหารซึ่งอนุญาตให้ใช้ในหมวดอาหาร

หมวดอาหาร	ปริมาณสูงสุดที่อนุญาต (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	เงื่อนไข*
แยม เยลลี่ และมาร์มาเลด	200	TH61
ผลไม้แช่อิ่ม เชื่อม หรือเคลือบด้วยน้ำตาล	200	54
ผัก สาคู ห่วยทะเล ดอก	30	
หมากฝรั่ง	50	
ผลิตภัณฑ์ใช้เคลือบหรือแต่งหน้าขนมและซอสหวาน	100	
ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ทั้งชิ้นหรือตัดแต่ง และผ่านกรรมวิธี	30	4, 16, XS96, XS97
ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บดและผ่านกรรมวิธี	30	4, 290, XS88

เงื่อนไข*

- 4 = ใช้เฉพาะประทับตรา หรือทำเครื่องหมายบนผลิตภัณฑ์เท่านั้น
- 16 = ใช้สำหรับเคลือบหรือตกแต่งผิวในผักและผลไม้ เนื้อสัตว์หรือปลา
- 54 = ใช้สำหรับเชอร์รี่ค็อกเทลและเชอร์รี่ตกแต่งขนมเท่านั้น
- TH61 = สำหรับผลิตภัณฑ์ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 213) พ.ศ. 2543 เรื่อง แยม เยลลี่ และมาร์มาเลด ในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท เท่านั้น
- XS88 = ยกเว้นผลิตภัณฑ์ตาม Standard for Corned Beef (CODEX STAN 88-1981)
- XS96 = ยกเว้นผลิตภัณฑ์ตาม Standard for Cooked Cured Ham (CODEX STAN 96-1981)
- XS97 = ยกเว้นผลิตภัณฑ์ตาม Standard for Cooked Cured Pork Shoulder (CODEX STAN 97-1981)

ในอดีตสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร วิเคราะห์หาปริมาณสีอีริโทรซินในอาหารโดยใช้การสกัดตัวอย่างด้วย 1-butanol แล้วนำไปตรวจวัดปริมาณโดยเครื่อง spectrophotometer^(4, 5) ซึ่งวิธีดังกล่าวเหมาะกับตัวอย่างอาหารในกลุ่มที่ละลายน้ำ โดยอาหารกลุ่มอื่นๆ จะไม่สามารถตรวจวิเคราะห์หาปริมาณได้ และแม้ว่าเทคนิค spectrophotometer จะสามารถหาสีอีริโทรซินในตัวอย่างที่ละลายน้ำ แต่ถ้าในตัวอย่างอาหารชนิดนั้นมีการใช้สีอีริโทรซินร่วมกับสีอินทรีย์สังเคราะห์อื่น จะต้องทำการแยกแต่ละสีที่ผสมอยู่ในตัวอย่างให้เป็นสีเดี่ยวด้วยเทคนิค paper chromatography ก่อน แล้วจึงนำแถบสีที่แยกได้มาตรวจวัดปริมาณซ้ำด้วยเครื่อง spectrophotometer ทำให้เพิ่มระยะเวลาการตรวจวิเคราะห์ และใช้ทรัพยากรของห้องปฏิบัติการมากขึ้นไปอีก ดังนั้นทางห้องปฏิบัติการวัตถุเจือปนอาหารจึงพัฒนาและปรับปรุงวิธีการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสีอีริโทรซิน ด้วยเครื่อง HPLC⁽⁶⁾ ทำให้ลดระยะเวลาวิเคราะห์ ลดความยุ่งยากและซับซ้อนในกรณีที่ตัวอย่างมีสีอีริโทรซินร่วมกับสีอินทรีย์สังเคราะห์อื่น จากนั้นจึงทำการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ได้วิธีที่ถูกต้อง แม่นยำ สามารถวิเคราะห์ปริมาณสีอีริโทรซินในหลายกลุ่มอาหารที่เป็นตัวแทนครอบคลุมอาหารทุกประเภทได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ

วัสดุและวิธีการ

สารมาตรฐานและสารเคมี

สารมาตรฐาน : สีอีริโทรซิน (Sigma, USA) ความบริสุทธิ์ 92.4%

สารเคมี HPLC grade ได้แก่ acetonitrile (RCI-Labscan, Thailand), methanol (RCI-Labscan, Thailand) และ iso-propanol (RCI-Labscan, Thailand)

สารเคมี AR grade ได้แก่ ethanol 95% (RCI-Labscan, Thailand), petroleum ether (RCI-Labscan, Thailand), ammonia solution $\geq 25\%$ (Merck, Germany), diethyl ether (Merck, Germany), glacial acetic acid (GAA) $\geq 96\%$ (Merck, Germany), acetone (RCI-Labscan, Thailand), polyamide (Fluka, USA), sand (acid wash) (Sigma-Aldrich, USA), methanol (RCI-Labscan, Thailand), tetrabutyl ammonium hydroxide 30 hydrate (TBAH) purity $\geq 98.0\%$ (Sigma-aldrich, USA), buffer solution pH 5.0 เตรียมโดยเติม TBAH 8.00 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วย iso-propanol 100 มิลลิลิตร และเติมน้ำจนครบ 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 5.0 ด้วย GAA, eluting solution (methanol : น้ำ : ammonia solution อัตราส่วน 90 : 5 : 5), ethanolic solution (ethanol 95% : ammonia solution อัตราส่วน 95 : 5)

การเตรียมสารละลายมาตรฐานสีอิริโทรซิน

ซึ่งสารมาตรฐานสีอิริโทรซิน 0.1000 กรัม ละลายด้วย 50% ethanol เล็กน้อย ปรับปริมาตรด้วยน้ำในขวดวัดปริมาตรสีชา ขนาด 100 มิลลิลิตร ได้สารละลายมาตรฐาน 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องระเหยสุญญากาศ, เครื่องชั่งละเอียด 3 ตำแหน่ง และ 4 ตำแหน่ง, pH meter, ultrasonic bath, คอลัมน์แก้ว ขนาด $\varnothing 1.0 \times 25$ cm, กระดาษกรองชนิด cellulose acetate ที่มีรูพรุนขนาด 0.45 ไมโครเมตร ขนาด 47 มิลลิเมตร, syringe filter (Cellulose acetate, 0.45 μm , dia. 13 mm), ชุดกรองสารละลาย และ ชุดกรองตัวอย่าง เครื่อง HPLC (WATERS®), Column : Hypersil BDS C₁₈ (5 μm , 250 $\times$ 4.6 mm), Detector : UV/VIS

การเตรียมตัวอย่าง

แบ่งตัวอย่างออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มตัวอย่างที่ละลายน้ำได้ : ใช้น้ำอัดก๊าซ (sparkling water) ที่ผ่านการทดสอบแล้วไม่พบสีอินทรีย์สังเคราะห์ เป็นตัวแทน sample blank, กลุ่มตัวอย่างที่ไม่ละลายน้ำ : ใช้น้ำมันดอก โดยปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องบดปั่นที่ผ่านการทดสอบแล้วไม่พบสีอินทรีย์สังเคราะห์ เป็นตัวแทน sample blank, กลุ่มตัวอย่างที่มีไขมันสูง : ใช้อูฐขึ้นหมู โดยปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น ที่ผ่านการทดสอบแล้วไม่พบสีอินทรีย์สังเคราะห์ เป็นตัวแทน sample blank

วิธีวิเคราะห์^(7, 8)

ตัวอย่างที่ละลายน้ำได้ : น้ำอัดก๊าซ ซึ่งตัวอย่างปริมาณ 10 กรัม ในบีกเกอร์ เติมน้ำ 50 มิลลิลิตร ปรับให้เป็นกรดด้วย glacial acetic acid นำไปผ่านคอลัมน์ที่บรรจุ polyamide ล้างคอลัมน์ด้วย น้ำ และ acetone จากนั้น elute สีอิริโทรซินออกด้วย eluting solution นำไประเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศให้เหลือปริมาตรประมาณ 2 มิลลิลิตร ถ่ายสารละลายลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำกลั่น กรองด้วย syringe filter ชนิด Cellulose Acetate ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

ตัวอย่างที่ไม่ละลายน้ำ : ใช้น้ำมันดอก ซึ่งตัวอย่างปริมาณ 10 กรัม ในบีกเกอร์เติม ethanol-ammonia solution (95 : 5) และน้ำ 150 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 1 คืน กรองตัวอย่างผ่านสำลีและทำการสกัดตัวอย่างซ้ำจนกว่าสีจากตัวอย่างจะออกหมดด้วยสารผสมเดิม นำตัวอย่างมาระเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ เพื่อไล่ ammonia ปรับให้เป็นกรดด้วย glacial acetic acid นำไปผ่านคอลัมน์ที่บรรจุ polyamide ล้างคอลัมน์ด้วยน้ำ และ acetone จากนั้น elute สีอิริโทรซินออกด้วย eluting solution นำไประเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ ให้เหลือปริมาตรประมาณ 2 มิลลิลิตร

ถ่ายสารละลายลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำกลั่น กรองด้วย syringe filter ชนิด Cellulose Acetate ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

ตัวอย่างที่มีไขมันสูง : ลูกชิ้นหมู ซึ่งตัวอย่างปริมาณ 10 กรัม ในบีกเกอร์ สกัดไขมันออกด้วย petroleum ether : diethyl ether (อัตราส่วน 1:1) 2-3 ครั้ง แล้วเททิ้ง นำส่วนของตัวอย่างมาเติม ethanol-ammonia solution (95 : 5) 150 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 1 คืน กรองตัวอย่างผ่านสำลีและทำการสกัดตัวอย่างซ้ำจนกว่าสีจากตัวอย่างจะออกหมดด้วยสารผสมเดิม นำตัวอย่างมาระเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ เพื่อไล่ ammonia ปรับให้เป็นกรดด้วย glacial acetic acid นำไปผ่านคอลัมน์ที่บรรจุ polyamide ล้างคอลัมน์ด้วยน้ำ และ acetone จากนั้น elute สีอีริโทรซินออกด้วย eluting solution นำไประเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ ให้เหลือปริมาตรประมาณ 2 มิลลิลิตร ถ่ายสารละลายลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำกลั่น กรองด้วย syringe filter ชนิด Cellulose Acetate ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

สภาวะของระบบโครมาโทกราฟี (HPLC)

Mobile phase : 0.01 M TBAH (pH 5.0) : acetonitrile = 45 : 55, Flow rate : 1 ml/min, Detector: UV/VIS ($\lambda = 537$ nm, Temperature 30°C), Injection volume : 20 μl

การตรวจสอบความเหมาะสมของระบบ (System suitability)

ฉีดสารมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 5 ซ้ำ คำนวณ %RSD ของ peak area และ retention time (RT) โดยเกณฑ์การยอมรับคือ %RSD (peak area) ≤ 2.5 และ %RSD (RT) ≤ 1

การคำนวณ : ปริมาณสีอีริโทรซิน (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) = $\frac{C \times V \times D}{W}$

โดย C = ความเข้มข้นของสีอีริโทรซิน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) จากกราฟมาตรฐาน

V = ปริมาตรที่ปรับ (มิลลิลิตร)

W = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

D = dilution factor

การทดสอบความถูกต้องของวิธี

การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธี (Selectivity/Specificity)

เตรียมสารละลาย mixed standard solution โดยใช้สีอินทรีย์สังเคราะห์ในกลุ่มสีแดง-ชมพู ได้แก่ สีแอลดูรา เรด เอซี, สีปองโซ 4 อาร์ ร่วมกับสีอีริโทรซิน ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์ด้วย HPLC ตรวจสอบการแยกของสีอีริโทรซินออกจากสีอื่น โดยสีทั้งหมดต้องมีค่า retention time แยกจากกันชัดเจน ซึ่งสีดังกล่าวเป็นสีประเภทสีแดง-ชมพูที่อนุญาตและมักจะถูกใช้ทดแทนสีอีริโทรซินในตัวอย่างอาหาร

การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity and working range)

เตรียมสารมาตรฐานสีอีริโทรซินที่มีความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 20 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ กรองผ่าน syringe filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้พีค ตรวจสอบความเป็นเส้นตรงโดยสร้าง regression line คำนวณค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ซึ่งต้องมีค่าไม่น้อยกว่า 0.9995 และทำ residual plots เพื่อยืนยันความเป็นเส้นตรง

การทดสอบ matrix effect

เตรียม spiked matrix blank (ทั้ง 3 กลุ่มตัวอย่าง) ให้มีความเข้มข้นที่ระดับต่าง ๆ เหมือนกับสารละลายมาตรฐานที่ทำกราฟมาตรฐาน ความเข้มข้นละ 3 ขั้ว วิเคราะห์ด้วย HPLC และคำนวณค่าความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐาน ประเมิน matrix effect โดยการ plot ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เติมลงไป matrix blank (แกน x) กับความเข้มข้นของ spiked matrix blank ที่อ่านได้จากกราฟ (แกน y) ทดสอบความเป็นเส้นตรงและทดสอบว่าช่วงของความเชื่อมั่น (confidence 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 = slope

S_b = standard deviation ของ slope คำนวณได้จากสมการที่ 2

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

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

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

x_i = ค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน

$\bar{x}$ = ค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเฉลี่ย

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

y_i = ค่าสัญญาณที่อ่านได้จากเครื่องมือวัด

$\hat{y}$ = ค่าสัญญาณที่ควรเป็น คำนวณโดยใช้ method of least square (ได้จากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน)

การหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of Detection, LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitative , LOQ)

วิเคราะห์ sample blank (ทั้ง 3 กลุ่ม) โดยเติมสารมาตรฐานสีอิริโทรีนที่ระดับความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 10 ขั้ว คำนวณค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (s) แล้วนำมาประมาณค่า LOD และ LOQ จากสมการ LOD = 3SD และ LOQ = 10SD

การยืนยันค่าขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ)

เติมสารมาตรฐานสีอิริโทรีนที่ระดับความเข้มข้น 0.20, 0.20 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในตัวอย่าง sample blank กลุ่มที่ 1 กลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 3 ตามลำดับ จำนวน 10 ขั้ว คำนวณค่าร้อยละของการกลับคืน (%recovery) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) เกณฑ์การยอมรับความแม่นยำ : recovery 80-110% และความเที่ยงตรง : Horwitz's equation

การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยงตรง (Precision)

ทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงตรงของวิธีโดยการวิเคราะห์ตัวอย่าง sample blank ที่เติมสารมาตรฐานสีอิริโทรีน ที่ 3 ระดับความเข้มข้น ซึ่งเป็นจุดต่ำสุด จุดกึ่งกลาง และจุดสูงสุดของช่วงใช้งาน วิเคราะห์ระดับละไม่น้อยกว่า

7 ขั้ว คำนวณหาค่าร้อยละการกลับคืน (%recovery) และ ค่าร้อยละของการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%relative standard deviation, %RSD_r) ที่แต่ละระดับความเข้มข้น โดยเกณฑ์ยอมรับความแม่นยำ : recovery 80–110% และ เกณฑ์ยอมรับความเที่ยงตรง : Horwitz's equation

กลุ่มที่ 1: ตัวอย่างที่ละลายน้ำได้ และ กลุ่มที่ 2 : ตัวอย่างที่ไม่ละลายน้ำ วิเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้น 0.20 (LOQ), 25 และ 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

กลุ่มที่ 3: ตัวอย่างที่มีไขมันสูง วิเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 (LOQ), 25 และ 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

การทดสอบความเที่ยงตรง Intermediate precision (%RSD_i) โดยวิเคราะห์ control sample ต่างวัน วันละ 2 ขั้ว จำนวน 14 วัน ในตัวอย่างกลุ่มที่ 2 : หน่อไม้ดอง และกลุ่มที่ 3 : ลูกชิ้นหมู ซึ่งเป็นตัวแทนของกลุ่มอาหาร ที่อนุญาตให้ใช้สีอีโรซินได้

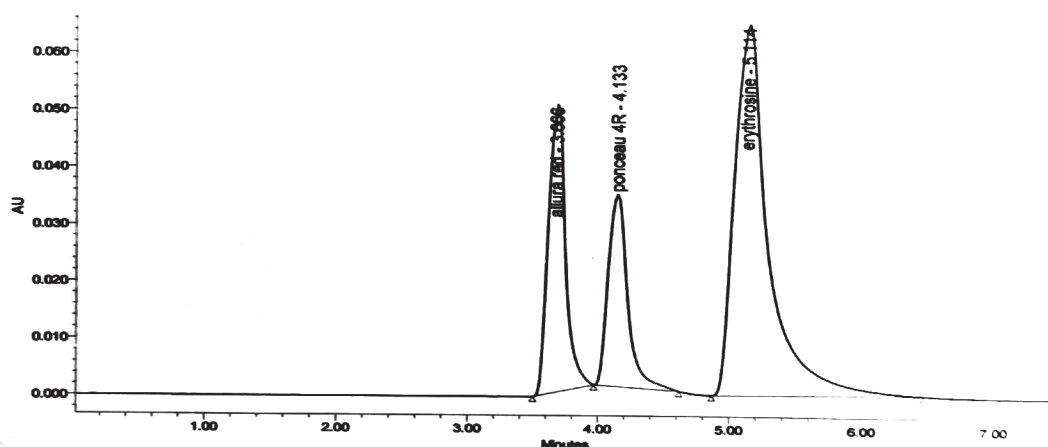
การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ (Measurement of uncertainty)

เพื่อให้ผลการวิเคราะห์ที่ได้ถูกนำไปใช้มีความน่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น และเป็นไปตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 ประเมินค่าความไม่แน่นอนของการตรวจวิเคราะห์ โดยคำนึงถึงแหล่งความไม่แน่นอนทุกแหล่ง และ เมื่อรวมค่าความไม่แน่นอนทั้งหมดแล้ว คำนวณค่าความไม่แน่นอนขยายที่ระดับความเชื่อมั่น 95%⁽⁸⁾

ผล

การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธี

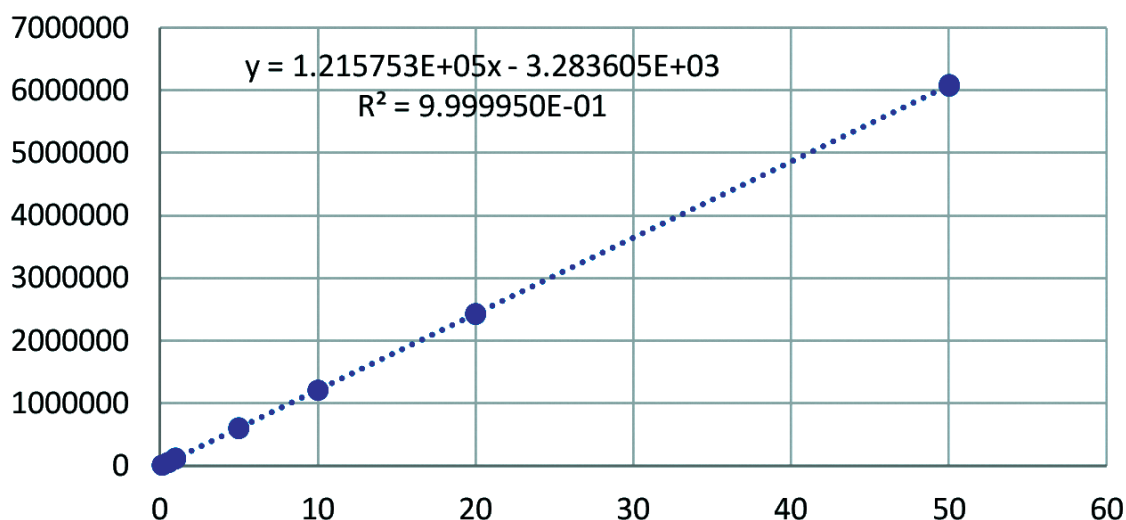
จากการฉีด mixed standard solution พบว่าสามารถแยกสีอีโรซินออกจากสีแอลลูรา เรด เอซี และ สีปองโซ 4 อาร์ ได้โดยไม่มีการรบกวน และมีค่า retention time ของสีแอลลูรา เรด เอซี, สีปองโซ 4 อาร์ และ สีอีโรซิน เท่ากับ 3.666, 4.133 และ 5.114 นาที ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐาน mix standard solution

การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity and working range)

ผลการฉีดสารละลายมาตรฐานสีอีโรซินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ 0.1 ถึง 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ระดับความเข้มข้นละ 3 ขั้ว พบความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้พีค ซึ่งคำนวณความเข้มข้น และพื้นที่ใต้พีค ได้ลักษณะของกราฟเป็นเส้นตรงตลอดช่วงที่ทดสอบ และมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.999995 และยืนยันความเป็นเส้นตรงด้วย Residual plot ดังแสดงในภาพที่ 3

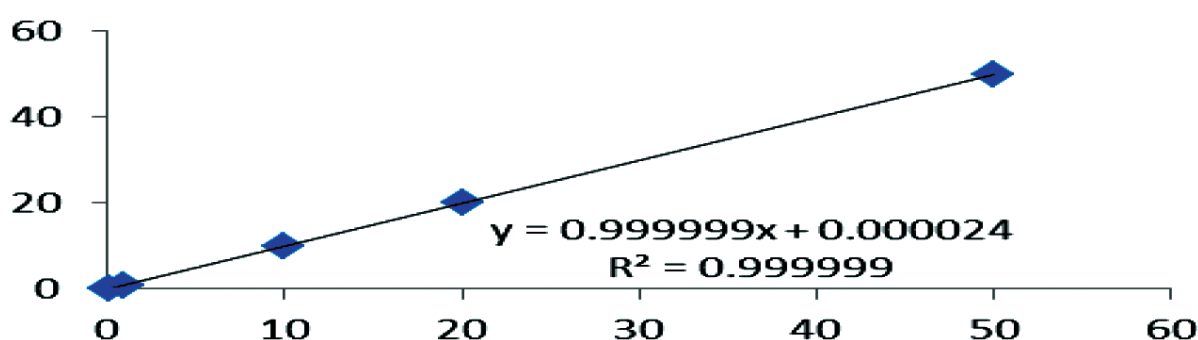


ภาพที่ 3 ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานสีอิรีโทรซิน

การทดสอบ Matrix effect

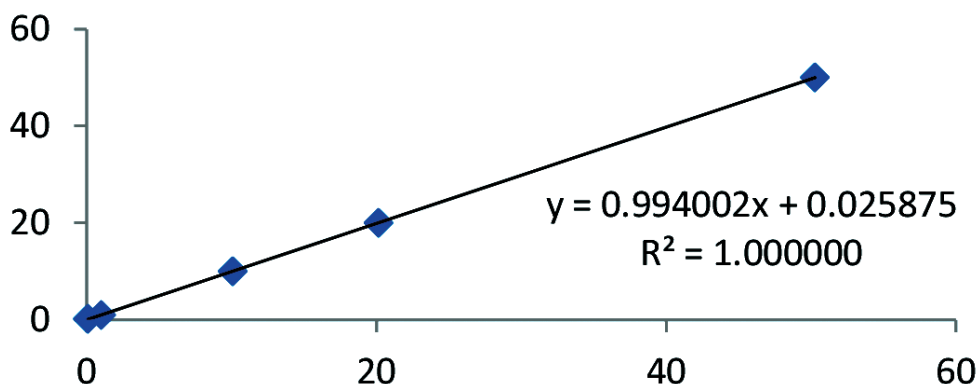
พบความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เติมลงไป matrix blank (แกน x) กับความเข้มข้นของ spiked matrix blank ที่อ่านได้จากกราฟ (แกน y) เป็นเส้นตรงตลอดช่วงที่ทดสอบ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.999999, 1.000000 และ 0.999999 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4- 6

Matrix effect สี Erythrosine กลุ่มที่ 1



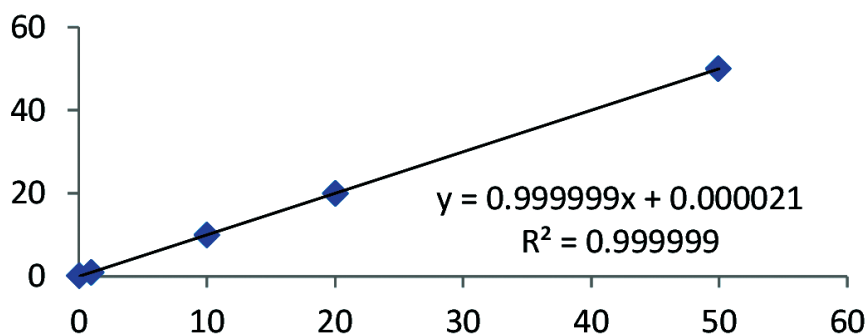
ภาพที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานสีอิรีโทรซินกับความเข้มข้นของ spiked matrix blank ของตัวอย่างที่ละลายน้ำได้: น้ำอัดก๊ากซ์

การทดสอบช่วงของความเชื่อมั่น (confidential interval: CI) ของ slope พบว่า slope มีช่วงของความเชื่อมั่นตั้งแต่ 0.9980 ถึง 1.0018 สรุปได้ว่า ไม่มี matrix effect

Matrix effect สี Erythrosine กลุ่มที่ 2

ภาพที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานสีอีริโทรซินกับความเข้มข้นของ spiked matrix blank ของตัวอย่างที่ไม่ละลายน้ำ: หน่อไม้ดอง

การทดสอบช่วงของความเชื่อมั่น (confidential interval: CI) ของ slope พบว่า slope มีช่วงของความเชื่อมั่นตั้งแต่ 0.9710 ถึง 1.0166 สรุปได้ว่า ไม่มี matrix effect

Matrix effect สี Erythrosine กลุ่มที่ 3

ภาพที่ 6 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานสีอีริโทรซินกับความเข้มข้นของ spiked matrix blank ของตัวอย่างที่มีไขมันสูง: ลูกชิ้นหมู

การทดสอบช่วงของความเชื่อมั่น (confidential interval: CI) ของ slope พบว่า slope มีช่วงของความเชื่อมั่นตั้งแต่ 0.9980 ถึง 1.0018 สรุปได้ว่า ไม่มี matrix effect

การหาขีดจำกัดของการตรวจพบ และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ

ผลวิเคราะห์ spiked sample blank ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 10 ซ้ำ คำนวณค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (s) ในตัวอย่างกลุ่มที่ 1 กลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 3 ได้เท่ากับ 0.016, 0.018 และ 0.024 ตามลำดับ คำนวณค่า LOD ได้เท่ากับ 0.049, 0.055 และ 0.071 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และค่า LOQ ได้เท่ากับ 0.164, 0.183 และ 0.237 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ

การยืนยันค่าขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ)

ผลการวิเคราะห์ sample blank ที่มีการเติมสารมาตรฐานสีอิรีโทซินในตัวอย่าง กลุ่มที่ 1 กลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.20, 0.20 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ จำนวน 10 ซ้ำ คำนวณค่าร้อยละของการกลับคืน (%recovery) อยู่ในช่วง 94.50–97.50%, 88.00–101.00% และ 81.60–84.40% และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) เท่ากับ 0.991, 4.325 และ 1.078 ตามลำดับ

การทดสอบความแม่นยำ และความเที่ยงตรง

ผลการวิเคราะห์ sample blank ที่มีการเติมสารมาตรฐานสีอิรีโทซินในตัวอย่าง กลุ่มที่ 1 คือ 0.2, 25 และ 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม กลุ่มที่ 2 คือ 0.2, 25 และ 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และกลุ่มที่ 3 คือ 0.25, 25 และ 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ระดับละ 7 ซ้ำ โดยวิเคราะห์ในสภาวะ repeatability condition พบความแม่นยำที่ประเมินจาก %recovery ทั้ง 3 ระดับ กลุ่มที่ 1 คือ 94.50–97.50%, 94.77–99.46% และ 98.78–99.71% ตามลำดับ, กลุ่มที่ 2 คือ 88.00–101.50%, 93.04–96.33% และ 92.61–96.10% ตามลำดับ กลุ่มที่ 3 คือ 82.00–84.40%, 93.32–97.12% และ 90.07–98.16% ตามลำดับ ซึ่งผ่านเกณฑ์ %recovery 80–110 และความเที่ยงตรง (%RSD_r) กลุ่มที่ 1 คือ 0.890, 1.457 และ 0.276 ตามลำดับ กลุ่มที่ 2 คือ 4.473, 1.012 และ 1.125 ตามลำดับ กลุ่มที่ 3 คือ 0.984, 1.223 และ 2.881 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2– 4

ตารางที่ 2 ค่า %recovery และ %RSD_r (ค่า LOQ) วิธีวิเคราะห์ปริมาณสีอิรีโทซินในกลุ่มอาหาร
กลุ่มที่ 1 : ตัวอย่างที่ละลายน้ำได้

ครั้งที่	กลุ่ม 1: น้ำอัดก๊าซ		
	ระดับความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)		
	0.2	25	50
1	94.50	94.77	99.24
2	96.00	99.01	98.78
3	97.00	98.92	99.17
4	96.00	98.95	99.55
5	97.50	98.88	99.42
6	96.50	99.42	99.71
7	95.50	99.46	99.60
%recovery เฉลี่ย	96.143	98.490	99.354
SD	0.856	1.435	0.274
%RSD _r	0.890	1.457	0.276
Predicted Horwitz	13.451	6.504	5.860
HORRAT	0.044	0.148	0.031

ตารางที่ 3 ค่า %recovery และ %RSD_r (ค่า LOQ) วิเคราะห์ปริมาณสีอีริโทรซินในกลุ่มอาหาร
กลุ่มที่ 2 : ตัวอย่างที่ไม่ละลายน้ำ

ครั้งที่	กลุ่ม 2: หน่อไม้แดง		
	ระดับความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)		
	0.2	25	50
1	91.50	93.04	92.61
2	88.00	94.54	94.36
3	101.50	95.70	95.60
4	90.00	96.33	96.10
5	95.00	95.30	95.96
6	90.00	95.98	94.64
7	88.50	94.71	95.60
%recovery เฉลี่ย	92.071	95.083	94.982
SD	4.119	0.962	1.068
%RSD _r	4.473	1.012	1.125
Predicted Horwitz	13.451	6.504	5.860
HORRAT	0.333	0.156	0.192

ตารางที่ 4 ค่า %recovery และ %RSD_r (ค่า LOQ) วิเคราะห์ปริมาณสีอีริโทรซินในกลุ่มอาหาร
กลุ่มที่ 3 : ตัวอย่างที่มีไขมันสูง

ครั้งที่	กลุ่ม 3: ลูกชิ้นหมู		
	ระดับความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)		
	0.25	25	50
1	84.00	96.66	97.99
2	82.00	96.34	97.05
3	83.20	93.32	98.16
4	82.40	95.50	97.80
5	83.20	97.12	93.79
6	84.40	96.63	90.07
7	84.00	96.11	96.72
%recovery เฉลี่ย	83.314	95.956	95.940
SD	0.820	1.174	2.764
%RSD _r	0.984	1.223	2.881
Predicted Horwitz	13.007	6.504	5.860
HORRAT	0.076	0.188	0.492

ผลการทดสอบ Intermediate precision ($\%RSD_i$) โดยทำการวิเคราะห์ control sample (ในตัวอย่างหน่อไม้ดองและลูกชิ้นหมู ซึ่งเป็นกลุ่มตัวอย่างที่อนุญาตให้ใช้สีอิรีโรซิน) ที่ระดับความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม วันละ 2 ซ้ำ จำนวน 14 วัน นำมาวิเคราะห์ด้วยสถิติ one way anova⁽⁹⁾ พบมีค่าเท่ากับ 1.32 และ 1.16 ตามลำดับ และค่า HORRAT เท่ากับ 0.195 และ 0.171 ตามลำดับ ซึ่งผ่านเกณฑ์ HORRAT ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบ Intermediate precision ($\%RSD_i$): ทำการวิเคราะห์ต่างวัน วันละ 2 ซ้ำ

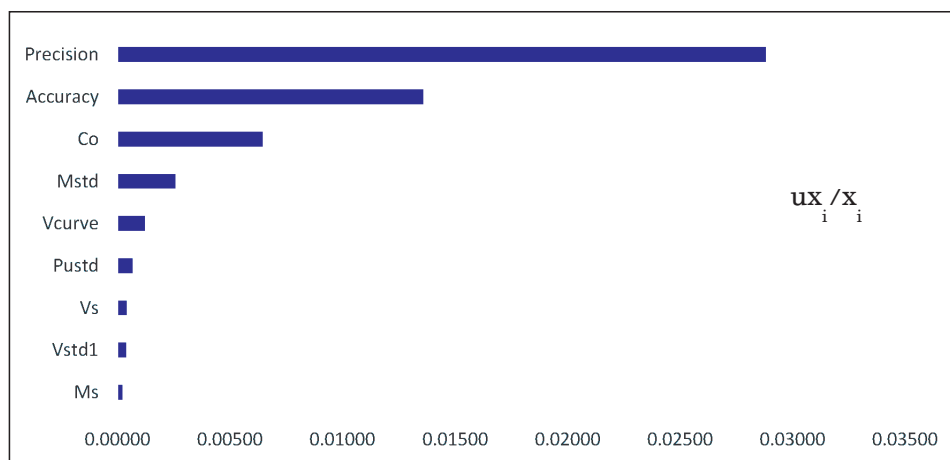
วันที่	ปริมาณสีอิรีโรซิน (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)			
	กลุ่ม 2: หน่อไม้ดอง		กลุ่ม 3: ลูกชิ้นหมู	
	1	2	1	2
1	28.219	28.330	28.938	28.794
2	28.502	28.479	28.780	28.994
5	28.848	29.030	29.323	28.560
6	28.460	29.096	29.035	29.189
7	29.067	28.943	28.940	29.139
8	29.070	29.129	28.826	29.121
9	29.161	29.141	28.614	29.037
12	28.724	28.027	28.614	28.198
13	28.309	29.298	29.259	29.574
14	28.938	28.451	28.514	29.358
N =	20		20	
$\%RSD_i$	1.32		1.16	
Expected $\%RSD$	6.779		6.779	
HORRAT	0.195		0.171	
เกณฑ์ยอมรับ HORRAT ≤ 2	Pass		Pass	

การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์

ประเมินค่าความไม่แน่นอนของวิธีวิเคราะห์จากค่ารวมของผลกระทบทั้งหมดที่มีต่อผลทดสอบที่เป็นเชิงปริมาณ ได้แก่ ความไม่แน่นอนจากความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐาน การสอบเทียบเครื่องชั่ง เครื่องแก้วที่ใช้เตรียมสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง ความเข้มข้นของสารที่อ่านได้จากเครื่อง HPLC การวิเคราะห์ซ้ำจากค่าร้อยละของการคืนกลับ ($\%recovery$) การทดสอบความถูกต้องของวิธี นำมาคำนวณค่าความไม่แน่นอนรวม (combined uncertainty, uc) ซึ่งผลการคำนวณค่าความไม่แน่นอนขยาย (expanded uncertainty, U) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้ค่า coverage factor (k) เท่ากับ 2 คือ 0.684 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ดังแสดงในตารางที่ 6 และแสดงแหล่งของความไม่แน่นอนในสัดส่วนที่ต่างกัน ดังแสดงในภาพที่ 7

ตารางที่ 6 การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์สีอีริโทรซินในอาหาร^(10, 11)

	Value, x_i	Unit	u_{x_i}	u_{x_i}/x_i	สัดส่วนแหล่ง ความไม่แน่นอน (%)
1. Standard					
Pu_{std}				0.00067312722	0.04
$-V_{Pu}$	50	ml	0.0190000000	0.00038000000	
$-P_{Pu}$	0.25	ml	0.0001389020	0.00055560800	0.01
$-V_{std1}$	50	ml	0.0190000000	0.00038000000	0.63
$-M_{std}$	0.0739	g	0.0001909190	0.00258347767	0.14
$-V_{curve}$				0.00121730728	
$-V_{std2}$	50	ml	0.0190000000	0.00038000000	
$-V_{std3-6}$	10	ml	0.0079881162	0.00079881162	
$-P_{std1,4-5}$	5	ml	0.0032198098	0.00064396196	
$-P_{std2}$	0.1	ml	0.0000375932	0.00037593220	
$-P_{std3}$	1	ml	0.0003785829	0.00037858288	
2. Sample					
$-M_s$	10	g	0.0021213200	0.00021213200	0.01
$-V_s$	10	ml	0.0041036569	0.00041036569	0.02
3. C_o read from curve	10.480	ug/ml	0.0676416310	0.00645435410	3.91
4. Precision (%RSD)	1	-	0.0288100000	0.02881000000	77.94
5. Recovery	100	%	1.3574898520	0.01357489852	17.30
relative combined standard uncertainty (uc/c) = 0.03263310820 (c = 10.474 mg/kg)					
Standard uncertainty (uc) = 0.03263310820 $\times$ 10.474 mg/kg = 0.34 mg/kg					
Expanded uncertainty (U), = 0.34 $\times$ 2 = 0.68 mg/kg					
k = 2 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%					
Reported value: 10.47 $\pm$ 0.68 mg/kg					



ภาพที่ 7 ค่าความไม่แน่นอนจากแหล่งต่างๆ ในความไม่แน่นอนรวม

วิจารณ์

การวิเคราะห์ปริมาณสีอิรีโทซินในอาหาร แต่เดิมมีการวิเคราะห์ปริมาณโดยใช้เครื่อง spectrophotometer และสกัดสีในตัวอย่างโดยใช้ 1-Butanol ซึ่งในการวิเคราะห์ด้วยวิธีดังกล่าวมีข้อจำกัดหลายประการ เช่น การใช้ 1-butanol ในการสกัดสีออกจากตัวอย่าง วิธีนี้ตัวอย่างจะต้องอยู่ในสถานะที่ละลายน้ำจึงจะสามารถสกัดสีอิรีโทซินออกจากตัวอย่างได้หมด แต่ตัวอย่างบางประเภท เช่น ผลไม้เชื่อมแห้ง หรือเนื้อสัตว์แปรรูป การจะละลายสีอิรีโทซินออกมา จำเป็นต้องมีสารละลายแอลกอฮอล์ผสมกับสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการดึงสีดังกล่าวออกจากผลิตภัณฑ์ ซึ่งถ้าสารสกัดมีแอลกอฮอล์ผสมอยู่ เมื่อเติม 1-butanol เพื่อแยกส่วนของสี สารละลายจะรวมเป็นเนื้อเดียวกันไม่สามารถแยกกันได้ ประกอบกับ 1-butanol เป็นสารละลายที่มีกลิ่นฉุนและมีราคาค่อนข้างสูง และจุดอ่อนอีกประการหนึ่งของการวัดโดยเครื่อง spectrophotometer คือเหมาะกับการหาปริมาณสีที่เป็นสีเดียว ๆ เท่านั้น ในกรณีที่ตัวอย่างมีสีผสมมากกว่า 1 สี การตรวจวิเคราะห์สีอิรีโทซินจะมีความซับซ้อนและยุ่งยากมากขึ้น โดยจะต้องนำตัวอย่างดังกล่าวไปทำการแยกผ่าน paper chromatography จากนั้นทำการตัดเฉพาะส่วนที่เป็นสีอิรีโทซินมาละลายและระเหยแห้งในถ้วยระเหยจากนั้นจึงนำมาปรับปริมาตรในปริมาณที่แน่นอน ดังนั้นเพื่อลดปัญหาดังกล่าวไม่ว่าจะเป็นด้านการสกัดตัวอย่างสีอิรีโทซินออกจากตัวอย่าง ปัญหาด้านกลิ่นของสารละลาย ปัญหาเรื่องราคา หรือการสกัดสีออกจากตัวอย่างในกรณีที่ตัวอย่างนั้นมีสีสังเคราะห์ผสมอยู่มากกว่า 1 ตัว และมีสีอิรีโทซินร่วมด้วย สามารถทำการสกัดด้วยวิธีข้างต้นเพียงครั้งเดียวและนำมาฉีดกับเครื่อง HPLC ในอัตราส่วนของสีผสมที่อยู่ในตัวอย่างชนิดนั้น ได้มีการหาสภาวะที่เหมาะสมของ HPLC โดยปรับอัตราส่วนของ mobile phase เพื่อไม่ให้พีคของสีอิรีโทซินถูกรบกวนโดยสีอื่น จนได้อัตราส่วนที่เหมาะสม เนื่องจากสีอิรีโทซินมีความไวต่อแสงและความร้อน จึงปรับเปลี่ยนวิธีการโดยใช้วิธีการระเหยโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศแทนการระเหยบนอ่างน้ำร้อน และใช้เครื่องแก้วสีชาหรือทำการป้องกันแสงโดยวิธีอื่น ๆ เช่น การห่อหุ้มภาชนะในการวิเคราะห์ด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ระหว่างขั้นตอนการวิเคราะห์ เพื่อป้องกันการสลายตัวของสีดังกล่าว

สีอิรีโทซินนิยมใช้ในอาหารประเภทเชอร์รี่เชื่อม ลูกอม หมากฝรั่ง เป็นต้น สำหรับประเทศไทยอนุญาตให้ใช้ในอาหารไม่กี่ประเภท ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 418) พ.ศ. 2563 ประกอบกับทางสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหารร่วมกับสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ได้ทำการเฝ้าระวังอาหารในกลุ่มที่ยังไม่อนุญาตให้ใช้สีอิรีโทซินโดยเก็บตัวอย่างส่งตรวจวิเคราะห์อย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะตัวอย่างในส่วนอายุเด็กกักกันจากการตรวจพบการใช้สีอิรีโทซินที่ผ่านมา และเมื่อได้วิธีที่เหมาะสมแล้วจึงดำเนินการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว⁽¹²⁾ ซึ่งได้ทำการทดสอบในตัวอย่างทั้ง 3 กลุ่มตัวอย่าง คือ ตัวอย่างที่ละลายน้ำได้ ตัวอย่างที่ไม่ละลายน้ำ และตัวอย่างที่มีไขมันสูง เพื่อให้เป็นตัวแทนครอบคลุมอาหารทุกชนิด และทดสอบพบว่าวิธีมีความจำเพาะเจาะจง ถูกต้อง แม่นยำ และความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0.10–50.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) มากกว่า 0.9995 วิธีนี้ไม่มีผลกระทบจาก matrix effect และแต่ละกลุ่มอาหารมีค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ดังนี้ ค่า LOD เท่ากับ 0.06, 0.10 และ 0.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ค่า LOQ เท่ากับ 0.20, 0.20 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ความแม่นยำและความเที่ยงตรงอยู่ในเกณฑ์โดย %recovery อยู่ในช่วง 80–110% และค่า HORRAT น้อยกว่า 2 การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดเป็นเครื่องวัดระดับคุณภาพของผลการทดสอบ การแสดงค่าความไม่แน่นอนทำให้ค่าที่รายงานนั้นมีความครบถ้วนสมบูรณ์และน่าเชื่อถือ จากการประเมินความไม่แน่นอนของผลการทดสอบสีอิรีโทซินพบค่าความไม่แน่นอนขยายเท่ากับ 0.68 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ที่ระดับความเข้มข้น 10.47 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 คิดเป็น relative uncertainty = 6.5% ดังนั้นวิธีวิเคราะห์ดังกล่าวนี้สามารถใช้วิเคราะห์ปริมาณสีอิรีโทซิน ครอบคลุมในทุกกลุ่มอาหารโดยมีความจำเพาะเจาะจง ถูกต้อง และแม่นยำ

สีอิรีโทซินจัดอยู่ในกลุ่มสีอินทรีย์สังเคราะห์ ซึ่งทางสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหารได้ทำการทดสอบความชำนาญกับ FAPAS อย่างต่อเนื่อง แต่ในระยะเวลาหลายปีที่เข้าร่วมทำการทดสอบความชำนาญยังไม่พบว่ามี

การเติมสีอีริโทรซินลงในตัวอย่างที่ทำการทดสอบความชำนาญ ดังนั้นทางผู้วิเคราะห์จึงทำการทดสอบ blind sample ร่วมกับผู้วิเคราะห์คนอื่นอีก 2 คน รวมเป็น 3 คน และนำมาวิเคราะห์ด้วยสถิติ one way anova พบว่าค่าที่ได้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ และมีความถูกต้องมากกว่า 95%

อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ควรใช้ความระมัดระวัง เนื่องจากคอลัมน์มีขนาดอนุภาคเล็ก ประมาณ 5-10 ไมโครเมตร ดังนั้นเพื่อป้องกันการอุดตันในระบบ การเตรียม mobile phase หรือ สารละลายตัวอย่างที่จะฉีดเข้าเครื่อง HPLC จึงจำเป็นต้องกรองด้วย filter ที่มีขนาด 0.45 ไมโครเมตร นอกจากนี้ควรเลือกใช้สารเคมีที่เป็นเกรด HPLC เพื่อลดผลกระทบที่เกิดขึ้น และกรณีที่ใช้ degasser ด้วยก๊าซฮีเลียม ก๊าซที่ใช้ต้องมีความบริสุทธิ์ ไม่น้อยกว่า 99.999%

สรุป

การศึกษานี้ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์สีอีริโทรซินในอาหารโดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ด้วย HPLC แล้วนำไปทดสอบความถูกต้องของวิธีให้ครอบคลุมทั้งการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธี การทดสอบความเป็นเส้นตรง รวมถึงการทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงตรง โดยผลการทดสอบที่ได้ผ่านเกณฑ์ยอมรับทั้งหมด สรุปได้ว่าวิธีนี้มีความถูกต้อง แม่นยำ เฉพาะเจาะจง เหมาะสมที่จะใช้ในการตรวจหาปริมาณสีอีริโทรซินในทุกกลุ่มอาหาร และการวิเคราะห์สีอีริโทรซินโดยวิธี HPLC ยังมีความสะดวก ช่วยลดขั้นตอนในการทำงาน ทำให้ลดระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์ จึงมีความเหมาะสมและสามารถนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการได้จริง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณนางสาวสุธาทิพย์ วิทย์ชัยวุฒิมงคล หัวหน้าฝ่ายวัตถุเจือปนอาหาร สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ที่ให้คำแนะนำปรึกษาในการศึกษาวิจัยและเขียนผลงานครั้งนี้ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการวัตถุเจือปนทุกท่านที่มีส่วนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. High performance liquid chromatography, HPLC. [ออนไลน์]. [สืบค้น 31 ส.ค. 2562]; [3 หน้า]. เข้าถึงได้ที่ : URL : <http://www.env.eng.chula.ac.th/?q=content/high-performance-liquid-chromatography-hplc>.
2. Wikipedia, the free encyclopedia. Erythrosine. [online]. [cited 2019 Aug 31]; [4 screens]. Available from : URL : <https://en.wikipedia.org/wiki/Erythrosine>.
3. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 418 (พ.ศ. 2563) เรื่อง กำหนดหลักเกณฑ์ เงื่อนไข วิธีการใช้ และอัตราส่วนของวัตถุเจือปนอาหาร (ฉบับที่ 2). ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 137 ตอนพิเศษ 237 ง (วันที่ 9 ตุลาคม 2563). หน้า 18.
4. ทศนีย์ จุฬามรกต. วิธีวิเคราะห์ปริมาณสีอีริโทรซินอย่างง่ายในขนมหวาน. ว กรรมวิทย์ พ 2534; 33(2) : 65-9.
5. Lehmann G, Collet P, Hahn HG, Asworth MRF. Rapid method for detection and identification of synthetic water-soluble coloring matters in foods and drugs. J Assoc Off Anal Chem 1970; 53(6) : 1182-9.
6. Lawrence JF, Lancaster FE, Conacher HB. Separation and detection of synthetic food colors by ion-pair high-performance liquid chromatography. J Chromatogr 1981; 210(1) : 168-73.

7. Manuals of food quality control 7. Food analysis : general techniques, additives, contaminants and composition. Rome, Italy : Food and Agriculture Organization (FAO); 1986. p. 76-79, 91-92.
8. Department of Medical Sciences and National Bureau of Agriculture Commodity and Food Standards. Compendium of methods for food analysis. Bangkok, Thailand : DMSc. & AFCS; 2003. p.1-55.
9. Magnusson B, Örnemark U, editors. Eurachem guide : the fitness for purpose of analytical methods - a laboratory guide to method validation and related topics. 2nd ed. Torino : Eurachem; 2014.
10. Ellison SLR, Williams A. EURACHEM/CITAC guide : quantifying uncertainty in analytical measurement. 3rd ed. Teddington, UK : EURACHEM/CITAC; 2012.
11. สุวรรณจารุนุช และคณะ. แนวปฏิบัติการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดทางเคมี. นนทบุรี : กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2550.
12. ทิพวรรณ นิ่งน้อย. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. นนทบุรี : กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2549.

Method Validation for Determination of Erythrosine in Food by HPLC Technique

Janpen Towiyanon and Suthatip Vitchaivutivong

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

ABSTRACT Erythrosine is one of organic synthetic color, sensitive to light and heat. It is food additive according to the Notification of Ministry of Public Health (No.418) B.E. 2563 issued by virtue of the Food Act B.E.2522 Re: prescribing the principle, conditions, methods and proportion of food additives (No.2). This study developed and improved erythrosine determination in food from 1-butanol extraction and quantified by spectrophotometer which only suitable for water soluble food. We changed the extraction process for 3 groups of food (water soluble food, non-water soluble food and fatty food) then quantified by HPLC. The method proved to be specific, accurate, precise and linearity and range was 0.10 – 50 mg/kg with coefficient of determination (R^2) greater than 0.9995. Validated parameters of each food groups were shown as following: limit of detection (LOD) were 0.06, 0.10 and 0.10 mg/kg respectively, while limit of quantification (LOQ) were 0.20, 0.20 and 0.25 mg/kg respectively. Precision expressed as relative standard deviation ($\%RSD_r$) were within 1.5%, 4.5% and 2.9% respectively. Accuracy expressed as %recovery ranged from 96.1–99.4, 92.1–95.1 and 83.3–96.0 respectively. The method suitable for erythrosine analysis in all food groups which proved to be specific, accurate and precise.

Keywords: Erythrosine, Food, HPLC Technique