

# การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ รีบาวิตไอโซต์ เอ และสติวไอโซต์ในน้ำหวาน ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

สุธาทิพย์ วิทย์ชัยวุฒิมงคล และ ศิริธร พุฒซ้อน

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

**บทคัดย่อ** รีบาวิตไอโซต์ เอ และสติวไอโซต์ เป็นสารในกลุ่มสติวออลไกลโคไซด์ที่สกัดได้จากหญ้าหวาน โดยทำหน้าที่เป็นสารให้ความหวานตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 418 พ.ศ. 2563 การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์รีบาวิตไอโซต์ เอ และสติวไอโซต์ โดยทดสอบความใช้ได้ของวิธีและประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ในน้ำหวานด้วยเครื่อง HPLC เครื่องตรวจวัดชนิดอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร คอลัมน์ Capcell pak C18 MG II วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นสารละลายผสมของ acetonitrile และ 10 mM โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต pH 2.6 อัตราส่วน 32:68 ผลการทดลองพบว่า ซีดจำกัดของการตรวจพบเท่ากับ 2.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณเท่ากับ 4.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ช่วงของการวัดและความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 2.0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าสัมประสิทธิ์การตัดลิ้นใจ ( $R^2$ ) เท่ากับ 1 ความแม่นยำของวิธีประเมินจากร้อยละของการคืนกลับที่ความเข้มข้น 4.0, 28 และ 140 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ของรีบาวิตไอโซต์ เอ อยู่ในช่วงร้อยละ 96.5-106.9 และสติวไอโซต์อยู่ในช่วงร้อยละ 96.0-109.8 ความเที่ยงของรีบาวิตไอโซต์ เอ และสติวไอโซต์มีค่าที่ยอมรับได้ ( $HORRAT < 2$ ) intermediate precision คำนวณจากผลการวิเคราะห์ตัวอย่างควบคุมคุณภาพของรีบาวิตไอโซต์ เอ และสติวไอโซต์ เท่ากับ 0.36 และ 0.45 ตามลำดับ สรุปได้ว่าวิธีนี้เหมาะสมที่จะใช้ในการตรวจวิเคราะห์รีบาวิตไอโซต์ เอ และสติวไอโซต์ในน้ำหวานในห้องปฏิบัติการ

**คำสำคัญ:** รีบาวิตไอโซต์ เอ, สติวไอโซต์, น้ำหวาน, วิธีโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

Corresponding author E-mail: [suthatip.v@dmsc.mail.go.th](mailto:suthatip.v@dmsc.mail.go.th)

Received: 26 January 2023

Revised: 2 June 2023

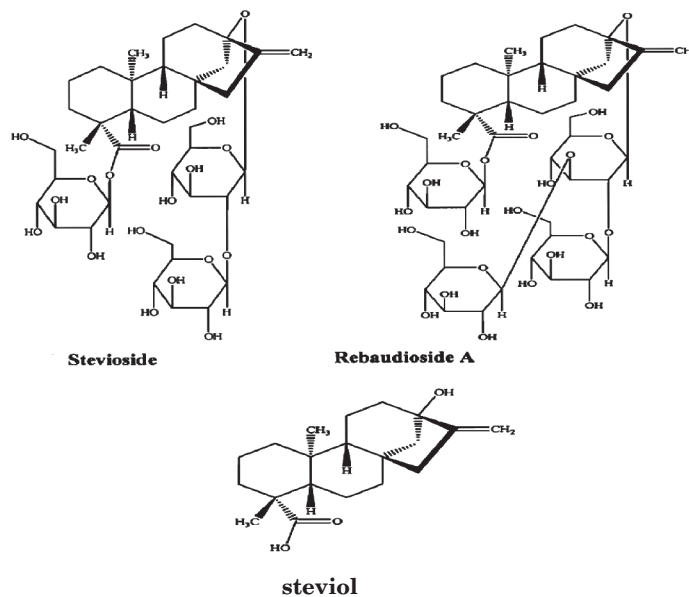
Accepted: 7 June 2023

## บทนำ

หญ้าหวานเป็นพืชพื้นเมืองของประเทศบราซิล และทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศปารากวัย ในทวีปอเมริกาใต้ หลายประเทศมีการบริโภคหญ้าหวาน มาเป็นเวลานาน สำหรับประเทศไทยมีการนำเข้าหญ้าหวาน มาปลูกในปี พ.ศ. 2518<sup>(1)</sup> สารสกัดจากใบหญ้าหวาน (*Stevia rebaudiana* Bertoni วงศ์ Asteraceae) เรียกว่า สตีวียอลไกลโคไซด์ เป็นสารประกอบไกลโคไซด์ ของสารกลุ่มไดเทอพีน ปี พ.ศ. 2528 มีรายงาน การศึกษาว่า สตีวียอลไกลโคไซด์ทำให้เกิดการ กลายพันธุ์ในหนูทดลอง องค์การอาหารและยาของ สหรัฐอเมริกา (US FDA) ประกาศว่าสารชนิดนี้ ไม่ปลอดภัย ห้ามใช้เป็นสารปรุงแต่งในอาหาร ส่ง ผลกระทบไปทั่วโลก รวมถึงประเทศไทย ต่อมา JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) และ EFSA (European Food Safety Authority) ของกลุ่มประเทศยุโรป มี

การทบทวนเอกสารวิชาการและประเมินความปลอดภัย ของสารดังกล่าวและเห็นร่วมกันว่า สตีวียอลไกลโคไซด์ ไม่ทำให้เกิดมะเร็ง (carcinogenic) การกลายพันธุ์ (genotoxic) หรือมีผลกระทบต่อระบบสืบพันธุ์ (reproductive/ developmental toxicity) จึงมีการอนุญาตให้ใช้ใน อาหาร โดยกำหนดค่า ADI (acceptable daily intake) ของสตีวียอลไกลโคไซด์ (แสดงในรูปสตีวียอล) (ADI for steviol glycosides, expressed as steviol equivalents) 0-4 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว (กิโลกรัม) ต่อวัน<sup>(2)</sup>

รีบาวดิโอไซด์ เอ และสตีวียโอไซด์ เป็นสารประกอบ ไกลโคไซด์ของสารกลุ่มไดเทอพีน เรียกว่า สตีวียอล ไกลโคไซด์ ได้จากการสกัดใบของต้นหญ้าหวานที่เป็น สารประกอบส่วนใหญ่และมีสารประกอบสตีวียอลไกล- โคไซด์อื่น ๆ อีกเล็กน้อย โครงสร้างสารประกอบไกลโคไซด์หลัก (รีบาวดิโอไซด์ เอ และสตีวียโอไซด์) และสตีวียอล (steviol)<sup>(3)</sup> ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 โครงสร้างของสตีวียโอไซด์ รีบาวดิโอไซด์ เอ และสตีวียอล<sup>(3)</sup>

สารสกัดสตีวียอลไกลโคไซด์ใช้เป็นวัตถุเจือปน อาหารประเภทสารให้ความหวาน ลักษณะเป็นผงสีขาว ถึงสีเหลืองอ่อน ละลายได้ดีในน้ำ ให้ความหวานประมาณ 200-300 เท่าของน้ำตาล มีความคงตัวต่ออุณหภูมิและ การถูกไฮโดรไลซ์ จึงเหมาะกับการใช้ในอาหาร<sup>(4,5)</sup> ตาม

ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 418 พ.ศ. 2563 เรื่อง กำหนดหลักเกณฑ์ เงื่อนไข วิธีการใช้ และอัตราส่วน ของวัตถุเจือปนอาหาร (ฉบับที่ 2)<sup>(6)</sup> อนุญาตให้ใช้ สตีวียอลไกลโคไซด์ในเครื่องดื่มแต่งกลิ่นรส ปริมาณสูงสุด ที่อนุญาต 115 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีเงื่อนไขคำนวณ

เป็นสติวไฮโดรเจน ตามประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหาร และยา เรื่อง คำชี้แจงประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 418 พ.ศ. 2563<sup>(7)</sup>

การรองรับการให้บริการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จึงได้ศึกษาและทดสอบความถูกต้องของวิธีตรวจวิเคราะห์รีบาวดีไฮโดรเจน เอ และสติวไฮโดรเจนในน้ำหวาน เพื่อให้เหมาะสมกับห้องปฏิบัติการ และสามารถรองรับความต้องการของผู้รับบริการจากการตรวจวิเคราะห์ที่ผ่านมาพบสติวไฮโดรเจนโคโคไซด์ อื่นๆ ในปริมาณที่น้อยกว่า 1 เมื่อคำนวณเป็นสติวไฮโดรเจน ดังนั้นห้องปฏิบัติการจึงตรวจวิเคราะห์เพียงสาร 2 ชนิดนี้ โดยการเจือจางตัวอย่างด้วยน้ำ แล้วกำจัดสิ่งรบกวนตามหลักการ solid phase extraction (SPE) ของ Yoshimi Kitada, Michiko Sasaki and Yutaka Yamazoe<sup>(8)</sup> จากนั้นตรวจวัดปริมาณด้วยเครื่อง HPLC เครื่องตรวจวัดชนิด UV<sup>(9)</sup> และทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ตามแนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว<sup>(10)</sup>

### วัสดุและวิธีการ

**วัสดุ:** solid phase extraction, SPE (Bond Elute C18, 500 mg 3 ml) (Agilent Technologies, USA), ขวดปริมาตรขนาด 5, 10, 20, 50, 100 และ 1,000 มิลลิลิตร, กระจกตวงขนาด 200 มิลลิลิตร, ขวดขนาด 2 มิลลิลิตร, ตัวกรองชนิด regenerate cellulose (RC) 0.45 ไมครอน ขนาด 13 มิลลิเมตร

**เครื่องมือและอุปกรณ์:** HPLC (High Performance Liquid Chromatograph) (Waters, รุ่น Alliance 2695, USA) พร้อมด้วยเครื่องตรวจวัดชนิดยูวี (UV detector, รุ่น 2487) เครื่องชั่งความละเอียด 0.1 มิลลิกรัม (Mettler Toledo, รุ่น PG403-S, Switzerland) เครื่องชั่งความละเอียด 0.01 มิลลิกรัม (Mettler Toledo, รุ่น XS 205, Switzerland) vacuum pump (GAST, รุ่น DOA-P504-BN, USA) และ vacuum manifold

**สภาวะของเครื่อง HPLC:** คอลัมน์ Capcell pak C18 MG II (250 mm x 4.6 mm, 5 $\mu$ m, Shiseido

Co. Ltd, Japan) Lot No. A4AD11485 พร้อมด้วยการ์ดคอลัมน์ชนิดเดียวกัน ความยาวคลื่นของเครื่องตรวจวัดชนิดยูวีที่ 210 นาโนเมตร วัฏภาคเคลื่อนที่คือ acetonitrile และ 10 mM โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต pH 2.6 อัตราส่วน 32:68 อัตราการไหล 1.00 มิลลิลิตรต่อนาที ตู้อบคอลัมน์ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และปริมาตรที่ฉีด 5 ไมโครลิตร

**สารมาตรฐาน:** รีบาวดีไฮโดรเจน เอ (purity 99.3%) Lot No. TWK 6296 และสติวไฮโดรเจน (purity 100.0%) Lot No. ECH3470 (WAKO, Japan)

#### การเตรียมสารมาตรฐาน

**สารมาตรฐาน 1:** รีบาวดีไฮโดรเจน เอ ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมโดยชั่งสารมาตรฐาน รีบาวดีไฮโดรเจน เอ 0.0101 กรัม ใส่ขวดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย 30% acetonitrile

**สารมาตรฐาน 2:** สติวไฮโดรเจน ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมโดยชั่งสารมาตรฐาน สติวไฮโดรเจน 0.0100 กรัม ใส่ขวดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย 30% acetonitrile

**สารมาตรฐาน 3:** รีบาวดีไฮโดรเจน เอ และสติวไฮโดรเจน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมโดยปิเปตสารมาตรฐาน 1 และ 2 อย่างละ 2 มิลลิลิตร ใส่ขวดปริมาตรขนาด 20 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย 30% acetonitrile

**สารมาตรฐาน 4:** รีบาวดีไฮโดรเจน เอ และสติวไฮโดรเจน ความเข้มข้น 2, 5, 10, 20, 40, 60 และ 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมโดยปิเปตสารมาตรฐาน 3 ปริมาตร 100, 250, 500, 1,000, 2,000, 3,000 และ 4,000 ไมโครลิตร แยกใส่ขวดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย 30% acetonitrile

**สารเคมีและวิธีเตรียม:** acetonitrile (HPLC) (Supelco, China), methanol (HPLC) (Supelco, Germany), acetone (HPLC) (Honeywell, USA), 80% acetonitrile, 30% acetonitrile, 20% acetonitrile, โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (HPLC) (Sigma-Aldrich, Switzerland), กรดฟอสฟอริก (AR) (J.T.Baker, USA), น้ำ (น้ำมีความต้านทาน  $\geq$  10-18 m $\Omega$ .cm) และ 10 mM โพแทสเซียมไฮโดรเจน

ฟอสเฟต (ซังโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.2 กรัม ใส่ขวดปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำ แล้วปรับ pH เป็น 2.6 ด้วยกรดฟอสฟอริก)

ตัวอย่างที่ใช้ทดสอบวิธี: น้ำหวานเข้มข้น (เฮลซ์บลูบอย รุ่นการผลิต 01-12-2020) นำมาเจือจางตามฉลากระบุ น้ำหวาน 1 ส่วน ต่อ น้ำ 5 ส่วน โดยเตรียม 3 ลิตร

วิธีวิเคราะห์: ซังตัวอย่าง 35 กรัม ใส่ขวดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำผสมให้เข้ากัน ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร ใส่ใน SPE (การเตรียม SPE: ซะด้วยตัวทำละลายตามลำดับ ดังนี้ acetone 5 มิลลิลิตร methanol 5 มิลลิลิตร น้ำ 5 มิลลิลิตร และ 20% acetonitrile 10 มิลลิลิตร) จากนั้นล้าง SPE ด้วยน้ำ 3 มิลลิลิตร ตามด้วย 20% acetonitrile 10 มิลลิลิตร ซะสารที่ต้องการด้วย 80% acetonitrile 2 มิลลิลิตร ลงในขวดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำ แล้วกรองผ่านตัวกรองชนิด RC ตรวจวัดปริมาณด้วยเครื่อง HPLC

#### การคำนวณ

รีบาดิโอไซด์ เอ หรือสตีวิโอไซด์ (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) =  $\frac{C \times V}{W}$

C = ความเข้มข้นที่อ่านจากกราฟมาตรฐาน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

V = ปริมาตรที่ปรับ (มิลลิลิตร)

W = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

#### Performance characteristic ที่ใช้ทดสอบวิธี<sup>(10)</sup>

ช่วงของการวัดและความเป็นเส้นตรง (working range and linearity): ตรวจวัดสารมาตรฐาน 3 และ 4 แบบสุ่ม ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานและพื้นที่ใต้พีค คำนวณค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ ( $R^2$ ) เกณฑ์  $R^2$  มากกว่า 0.995

ขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection, LOD): เติมสารมาตรฐานในตัวอย่างที่ใช้ทดสอบวิธีให้ได้

ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตรวจวิเคราะห์ 10 ซ้ำ เกณฑ์ตรวจพบสัญญาณทุกตัวอย่างที่ทำซ้ำ (ประมาณค่า LOD โดยวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีการเติมสารมาตรฐาน ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 10 ซ้ำ คำนวณค่า standard deviation (SD) แล้วคำนวณค่า LOD จากสูตร  $LOD = 3SD$ )

ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ): เติมสารมาตรฐานในตัวอย่างที่ใช้ทดสอบวิธีให้ได้ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตรวจวิเคราะห์ 10 ซ้ำ เกณฑ์ร้อยละการกลับคืน (%recovery) อยู่ในช่วง 80-110% และ HORRAT น้อยกว่า 2 (ประมาณค่า LOQ โดยวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีการเติมสารมาตรฐาน ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 10 ซ้ำ คำนวณค่า SD แล้วคำนวณค่า LOQ จากสูตร  $LOQ = 10SD$ )

matrix effect: เตรียมสารมาตรฐานเช่นเดียวกับสารมาตรฐาน 3 และ 4 โดยใช้สารละลายที่สกัดจากตัวอย่างที่ใช้ทดสอบวิธีปรับปริมาตรแทนน้ำ ตรวจวัดความเข้มข้นละ 1 ซ้ำ เกณฑ์ confidence interval (CI) ของ slope กลุ่ม 1 และ CI ของ y-intercept กลุ่ม 0

ความแม่นยำ (accuracy) และความเที่ยง (precision): เติมสารมาตรฐานในตัวอย่างที่ใช้ทดสอบวิธีให้ได้ความเข้มข้น 28 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ 140 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตรวจวิเคราะห์ความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ เกณฑ์ร้อยละการกลับคืนอยู่ในช่วง 90-107% และ HORRAT น้อยกว่า 2

ความเฉพาะเจาะจง (selectivity): ฉีดสารมาตรฐานแอสพาแตม ซัคคาริน อะซีซัลเฟม-เค และซูคราโลส ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตรวจสอบว่า RT ไม่ตรงกัน

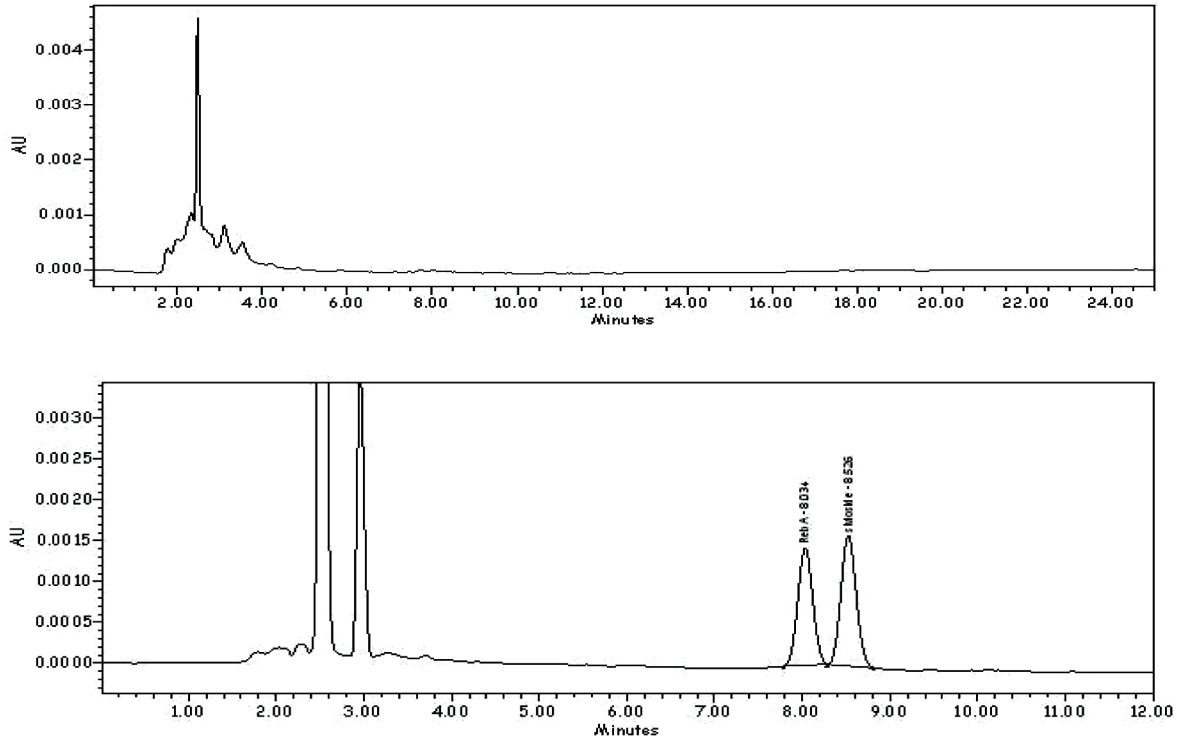
#### การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด (estimation of measurement uncertainty)<sup>(11)</sup>

ประเมินค่าความไม่แน่นอนของการตรวจวิเคราะห์เพื่อให้เป็นไปตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 โดยคำนึงถึงแหล่งความไม่แน่นอนทุกแหล่ง เมื่อรวมค่าความไม่แน่นอนทั้งหมด คำนวณค่าความไม่แน่นอนขยายที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

## ผล

ตัวอย่างที่ใช้ทดสอบวิธีไม่พบสัญญาณของรีบาดิโอไซด์ เอ และสติวโอไซด์ เมื่อฉีดสารมาตรฐานผสม พบการแยกของพีคของรีบาดิโอไซด์ เอ และ

สติวโอไซด์ (peak resolution = 1.62) ดังแสดงในภาพที่ 2 ส่วนการทดสอบการรบกวนของสารให้ความหวานชนิดอื่น ได้แก่ แอสพาแตม ซัคคาริน อะซีซัลเฟม-เค และซูคราโลส ที่อาจมีการเติมในผลิตภัณฑ์ร่วมกับสารรีบาดิโอไซด์ เอ และสติวโอไซด์ ดังแสดงในภาพที่ 3

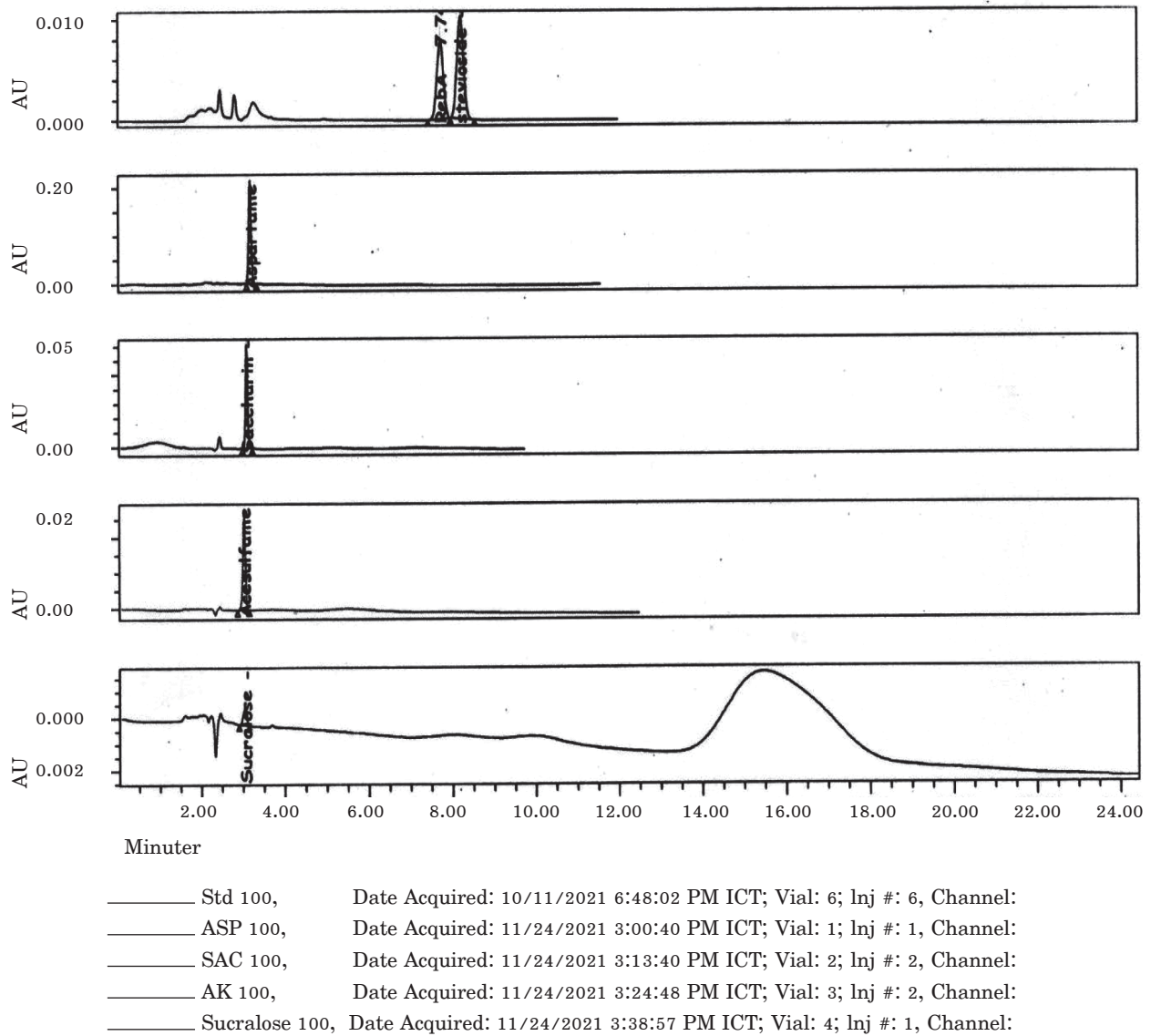


ภาพที่ 2 Chromatogram ของตัวอย่างที่ใช้ทดสอบวิธี (ภาพบน) และ chromatogram ของสารมาตรฐานรีบาดิโอไซด์ เอ และสติวโอไซด์ ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพล่าง)

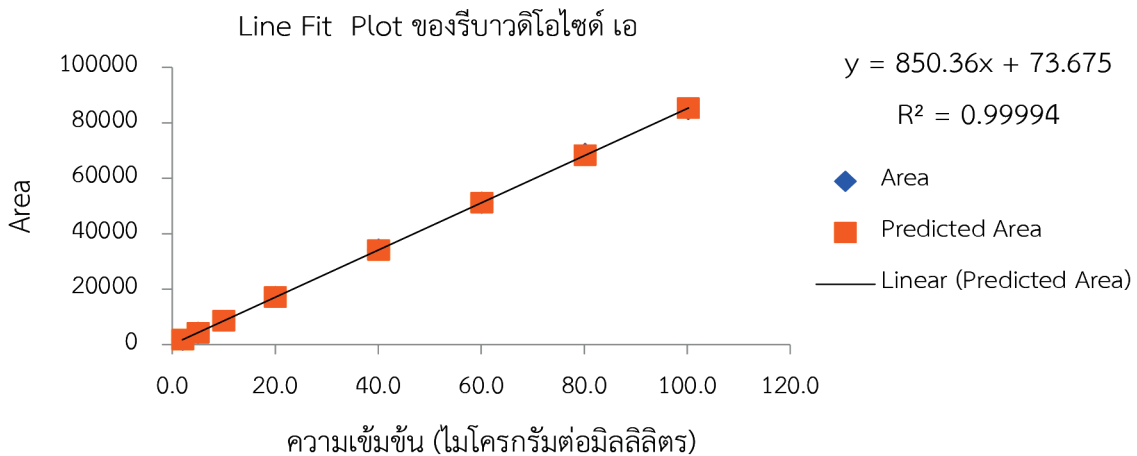
จากการตรวจวัดสารมาตรฐาน 8 ระดับ ที่ความเข้มข้น 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบช่วงของการวัดและความเป็นเส้นตรงของรีบาดิโอไซด์ เอ และสติวโอไซด์ ดังแสดงในภาพที่ 4 และ 5 Residual plot ของรีบาดิโอไซด์ เอ และสติวโอไซด์ ดังแสดงในภาพที่ 6 และ 7

ผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างที่ใช้ทดสอบวิธีที่เติมสารมาตรฐานความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (LOD) ตรวจพบทุกการวิเคราะห์ 10 ซ้ำ ความแม่นยำและความเที่ยงของวิธี ความแม่นยำของการวิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 4.0 (LOQ) มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้น 28 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และความเข้มข้น 140 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ค่าเฉลี่ยและ SD ของร้อยละการกลับคืนของรีบาดิโอไซด์ เอ เท่ากับ  $101.5 \pm 3.10\%$ ,

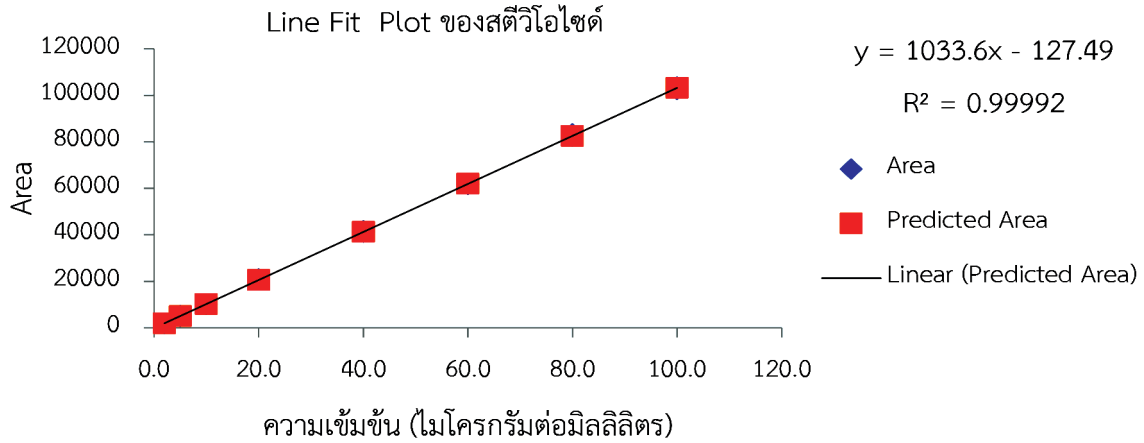
$99.8 \pm 0.72\%$  และ  $98.5 \pm 1.41\%$  ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยและ SD ของร้อยละการกลับคืนของสติวโอไซด์ที่ความเข้มข้น 4.0 (LOQ) มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้น 28 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และความเข้มข้น 140 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เท่ากับ  $107.1 \pm 2.72\%$ ,  $99.0 \pm 1.55\%$  และ  $99.6 \pm 1.71$  ตามลำดับ ความเที่ยงของการวิเคราะห์คำนวณค่า HORRAT ของรีบาดิโอไซด์ เอ ที่ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม 28 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ 140 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เท่ากับ 0.36, 0.12 และ 0.28 ตามลำดับ ค่า HORRAT ของสติวโอไซด์ที่ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม 28 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ 140 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เท่ากับ 0.30, 0.24 และ 0.34 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1



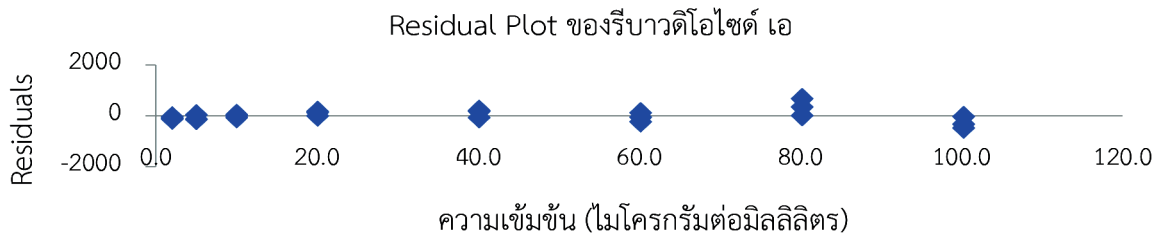
ภาพที่ 3 Chromatogram ของสารมาตรฐานรีบาวิตไอไซด์ เอ และสติวไอไซด์ (Std 100) แอสพาแตม (ASP 100) ซัคคาริน (SAC 100) อะซีซัลเฟม-เค (AK 100) และซูคราโลส (Sucralose 100)



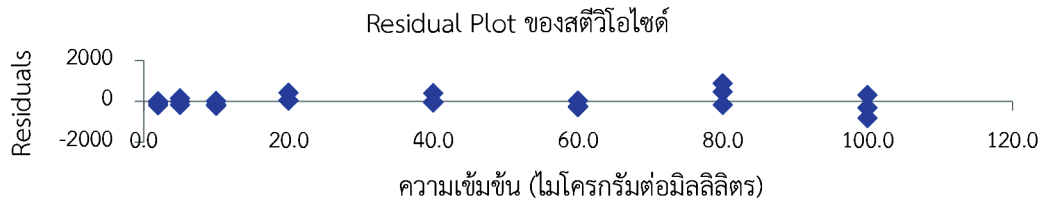
ภาพที่ 4 ช่วงและความเป็นเส้นตรงของรีบาวิตไอไซด์ เอ



ภาพที่ 5 ช่วงและความเป็นเส้นตรงของสติวิโอไซด์



ภาพที่ 6 Residual plot ของรีบาวติโอไซด์ เอ



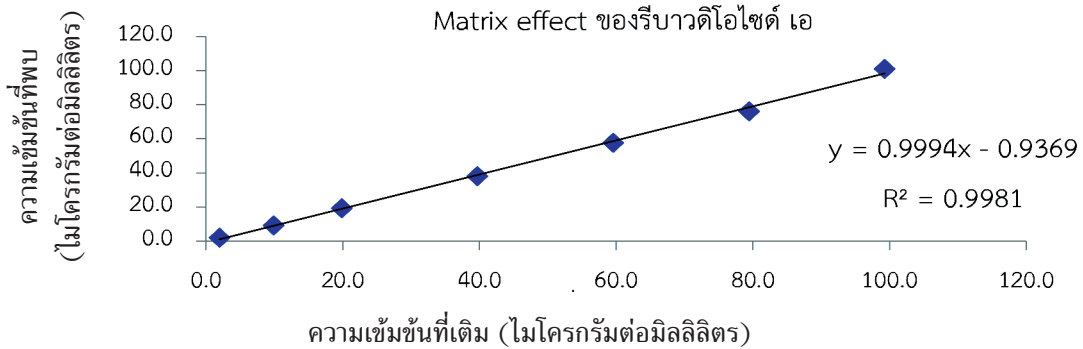
ภาพที่ 7 Residual plot ของสติวิโอไซด์

ตารางที่ 1 %recovery, %RSD และ HORRAT ของรีบาวติโอไซด์ เอ และสติวิโอไซด์ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ

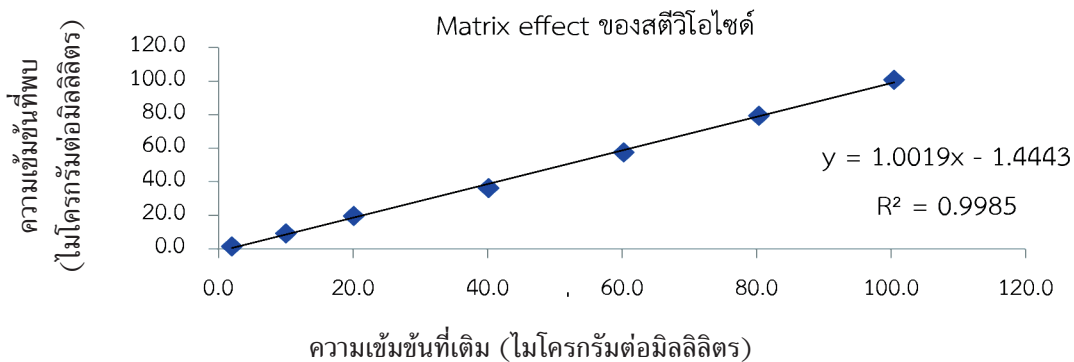
	ความเข้มข้นที่เติม (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	%recovery ค่าเฉลี่ย±SD	%RSD	HORRAT
รีบาวติโอไซด์ เอ	4.0 (LOQ)	101.5±3.10	3.04	0.36
	28	99.8±0.72	0.72	0.12
	140	98.5±1.41	1.43	0.28
สติวิโอไซด์	4.0 (LOQ)	107.1±2.72	2.54	0.30
	28	99.0±1.55	1.57	0.24
	140	99.6±1.71	1.71	0.34

ผลการทดสอบ matrix effect ของรีบา-  
ดิโอไซด์ เอ และสตีวิโอไซด์ ดังแสดงในภาพที่ 8 และ 9  
ตามลำดับ เมื่อทดสอบช่วงความเข้มข้นของ slope และ  
intercept พบว่าค่า CI ของ slope ของรีบา-ดิโอไซด์ เอ

เท่ากับ 0.95 และ 1.05 CI ของ y-intercept ของ  
รีบา-ดิโอไซด์ เอ เท่ากับ -3.74 และ 1.87 ค่า CI ของ  
slope ของสตีวิโอไซด์ เท่ากับ 0.96 และ 1.05 CI ของ  
y-intercept ของสตีวิโอไซด์ เท่ากับ -3.97 และ 1.09



ภาพที่ 8 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานรีบา-ดิโอไซด์ เอ ที่เติมและความเข้มข้นที่พบ



ภาพที่ 9 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานสตีวิโอไซด์ที่เติมและความเข้มข้นที่พบ

เมื่อนำข้อมูลตัวอย่างควบคุมคุณภาพ (quality control sample; QC sample) ซึ่งเป็นตัวอย่างน้ำหวานที่มีการเติมสารมาตรฐานความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยเตรียมไว้ประมาณ 1.2 ลิตร และนำมาตรวจวิเคราะห์ 2 ซ้ำ ทุกรอบการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างที่เข้ามา

ในห้องปฏิบัติการ เพื่อเป็นการควบคุมคุณภาพการตรวจวิเคราะห์แต่ละรอบ ดังแสดงในตารางที่ 2 ข้อมูลดังกล่าวใช้คำนวณค่า intermediate precision ( $s_I$ ) โดยใช้สถิติ One way ANOVA<sup>(12)</sup> คำนวณ  $s_I$  ด้วยสมการดังนี้

Intermediate precision,  $s_I = \sqrt{s_r^2 + s_{\text{between}}^2}$  .....สมการที่ 1

Within-group variance,  $s_r = \sqrt{MS_w}$  .....สมการที่ 2

Between group variance,  $s_{\text{between}} = \sqrt{(MS_b - MS_w)/n}$  .....สมการที่ 3

โดย  $MS_w$  = within-group mean square

$MS_b$  = between group mean square

พบว่า  $s_I$  ของรีบา-ดิโอไซด์ เอ และสตีวิโอไซด์ เท่ากับ 0.36 และ 0.45 ตามลำดับ

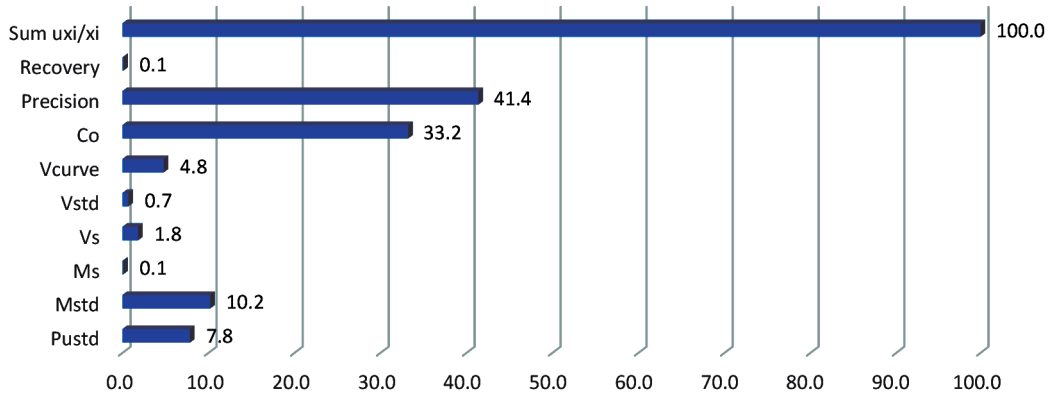


ตารางที่ 2 Intermediate precision ผลวิเคราะห์ตัวอย่างควบคุมคุณภาพของรีบาดิโอไซด์ เอ และสตีวิโอไซด์

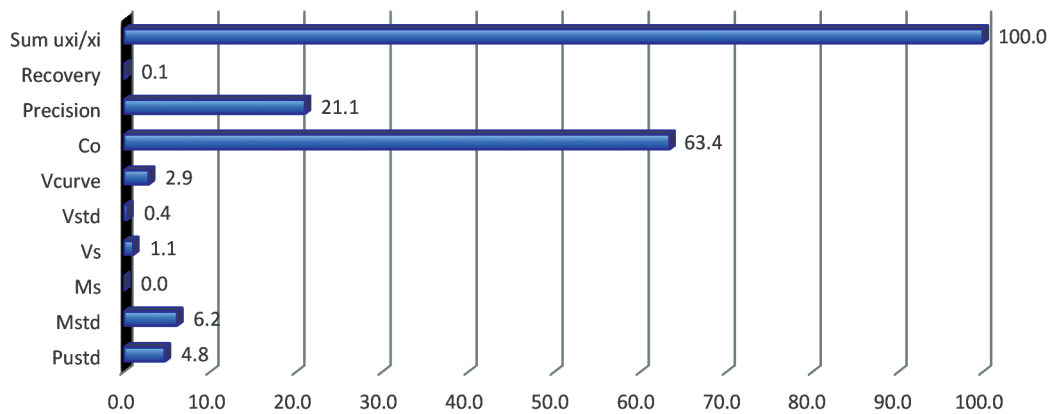
วันที่วิเคราะห์	รีบาดิโอไซด์ เอ (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)		สตีวิโอไซด์ (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	
	No. 1	No. 2	No. 1	No. 2
9/2/2564	18.854	18.998	19.261	19.207
18/2/2564	18.415	18.409	19.352	19.543
16/3/2564	17.272	17.206	19.519	19.412
23/3/2564	18.508	18.520	18.147	18.096
29/3/2564	18.799	18.758	17.792	18.280
7/5/2564	18.219	18.496	17.979	18.849
27/5/2564	18.111	17.987	18.136	19.051
3/6/2564	18.084	17.880	19.066	18.734
14/6/2564	17.753	17.572	18.185	18.904
12/7/2564	17.964	17.980	18.694	18.712
18/8/2564	19.120	19.380	19.258	19.387
31/8/2564	18.730	18.560	16.794	16.946
27/9/2564	17.910	16.389	16.183	16.106
12/10/2564	18.061	18.431	16.652	17.034
7/12/2564	18.215	18.444	18.407	19.545
ค่าเฉลี่ย	18.234		18.374	
Intermediate precision ( $s_I$ )	0.36		0.45	
%RSDr (Horwitz equation)	6.815		6.810	
HORRAT = $s_I$ /%RSDr	0.05		0.07	
HORRAT < 2	ผ่าน		ผ่าน	
จำนวนข้อมูล	30		30	

การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด ประเมินจากค่ารวมของผลกระทบทั้งหมดที่มีต่อผลการวิเคราะห์ ได้แก่ ความไม่แน่นอนจากความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐาน การสอบเทียบเครื่องชั่ง เครื่องแก้วที่ใช้เตรียมสารมาตรฐานและตัวอย่าง ความเข้มข้นที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐาน การวิเคราะห์ซ้ำจากค่าร้อยละของการคืนกลับ (%recovery) ของการทดสอบความถูกต้องของวิธี นำมาคำนวณค่าความไม่แน่นอนรวม (combined uncer-

tainty; uc) และค่าความไม่แน่นอนขยาย (expanded uncertainty; U) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้ค่า coverage factor (k) เท่ากับ 2 ได้ค่า U ของรีบาดิโอไซด์ เอ เท่ากับ 3.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ U ของสตีวิโอไซด์ เท่ากับ 2.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ร้อยละของแหล่งความไม่แน่นอนของการวัดของรีบาดิโอไซด์ เอ และสตีวิโอไซด์ ดังแสดงในภาพที่ 10 และ 11



ภาพที่ 10 ร้อยละของแหล่งความไม่แน่นอนของการวัดของรีบาวิตไอไซด์ เอ



ภาพที่ 11 ร้อยละของแหล่งความไม่แน่นอนของการวัดของสตีวิโอไซด์

### วิจารณ์

เนื่องจากห้องปฏิบัติการของสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหารต้องมีการตรวจวิเคราะห์ assay ของวัตถุเจือปนอาหารกลุ่มสตีวียอลไกลโคไซด์ ซึ่งสภาวะ HPLC ที่กำหนดในวิธีตรวจวิเคราะห์คุณลักษณะของสารนี้ตาม FAO JECFA Monograph 10, 2010<sup>(9)</sup> จากการศึกษาเบื้องต้น พบว่าเมื่อใช้ HPLC คอลัมน์ชนิด C18 หลายยี่ห้อได้แก่ Shimpack CLC ODS(M), Nucleodur C18 Gravity, Alphabond C18, Lichrosorb RP18, Atlantis dC18 ทดลองใช้ตรวจวิเคราะห์สารมาตรฐานรีบาวิตไอไซด์ เอ และสตีวิโอไซด์ พบว่า peak ของรีบาวิตไอไซด์ เอ และสตีวิโอไซด์แยกจากกันไม่ดี ค่า resolution น้อยกว่า 1 และตามวิธีของ Fayaz S<sup>(13)</sup> ที่ใช้คอลัมน์ Agilent ZORBAX C18 แต่การแยกไม่ดีเช่นกัน จึงใช้คอลัมน์

Capcell pak C18 MG II ที่มีราคาสูงกว่าตามวิธีที่ระบุใน specification ของ steviol glycosides; JECFA 2010 ซึ่งพบว่าการแยกดีกว่า โดยที่คอลัมน์ชนิด MG II มี packing เป็น silicones polymer บนผิวของ silica ทำให้มีความเสถียรมากกว่าชนิดของ silica ทั่วไป การตรวจสอบการรบกวนจากสารให้ความหวานชนิดอื่นที่อาจมีการเติมในน้ำหวาน เพื่อดูการรบกวนการตรวจวิเคราะห์ พบว่า peak ของอะซีซัลเฟม-เค, ซัคคาริน, แอสพาแตม และซูคราโลสไม่รบกวน peak ของรีบาวิตไอไซด์ เอ และสตีวิโอไซด์ ดังแสดงในภาพที่ 3 พบว่าวิธีที่ใช้ไม่มี matrix effect โดยค่า CI ของ slope กลุ่ม 1 และ y-intercept ของกราฟมาตรฐานผ่าน 0 ผลการทดสอบความเที่ยงที่ความเข้มข้น LOQ จุดกลาง จุดสูง และผล intermediate precision ของรีบาวิตไอไซด์ เอ และสตีวิโอไซด์ ผ่าน โดยมีค่า HORRAT น้อยกว่า 2 ค่าความไม่แน่นอนของการวัด

เมื่อคำนวณค่า U ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% k เท่ากับ 2 ได้ค่า U ของรีบาวิตไอโซต์ เอ และสติวไอโซต์ เท่ากับ 3.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ 2.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ โดยค่าความไม่แน่นอนขยายคำนวณจาก %RSDr (Horwitz's)  $\times 2^{(11)}$  ไม่ควรเกิน 11.6 และ 13.6 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ

ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 418 พ.ศ. 2563 กำหนดให้รายงานค่าสติวออลไกลโคไซด์ โดยคำนวณเป็นสติวออล ตามประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่อง คำชี้แจงประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 418 พ.ศ. 2563 ระบุชนิด สติวออลไกลโคไซด์ดังนี้ สติวไอโซต์, รีบาวิตไอโซต์ เอ, รีบาวิตไอโซต์ บี, รีบาวิตไอโซต์ ซี, รีบาวิตไอโซต์ ดี, รีบาวิตไอโซต์ เอฟ, รีบาวิตไอโซต์ เอ็ม, ตัลโคไซด์ เอ, รูบูโซไซด์, สติวออลไบโอไซด์ และสติวออลไกลโคไซด์ ชนิดอื่นๆ จากการตรวจวิเคราะห์ที่ผ่านมาพบสติวออลไกลโคไซด์อื่นๆ น้อยกว่า 1 เมื่อคำนวณเป็นสติวออล นอกจากนี้สารมาตรฐานของสติวออลไกลโคไซด์ เหล่านี้ราคาสูง จึงทดสอบความถูกต้องของการตรวจวิเคราะห์เพียงสาร 2 ชนิดนี้ ในอนาคตอาจมีการใช้สารสกัดสติวออลไกลโคไซด์ ซึ่งมีสารหลักเป็นรีบาวิตไอโซต์ เอ็ม, รีบาวิตไอโซต์ ดี หรือสติวออลไกลโคไซด์อื่น ดังนั้นห้องปฏิบัติการอาจต้องเตรียมการ เพื่อรองรับความต้องการตรวจวิเคราะห์สารสติวออลไกลโคไซด์ชนิดอื่นๆ ต่อไป

## สรุป

ผลการทดสอบวิธีวิเคราะห์รีบาวิตไอโซต์ เอ และ สติวไอโซต์ในน้ำหวานตามพารามิเตอร์ต่างๆ ข้างต้น พบว่าวิธีนี้มีขีดจำกัดของการตรวจพบ เท่ากับ 2.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ 4.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ช่วงของการวัดและความเป็นเส้นตรง อยู่ในช่วง 4.0-140 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีความแม่นยำและความเที่ยงเหมาะสมที่จะใช้ตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คุณจันทร์เพ็ญ โทเวียนนท์ สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ที่ให้คำแนะนำการเขียนบทความและการคำนวณทางสถิติ

## เอกสารอ้างอิง

1. เมตไทย (Medthai). ญ่้าหวาน สรรพคุณและประโยชน์ของญ่้าหวาน 14 ข้อ. [ออนไลน์]. 2563; [สืบค้น 4 เม.ย. 2565]; [4 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://medthai.com/ญ่้าหวาน/>.
2. EFSA J 2010; Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS). Scientific opinion on the safety of steviol glycosides for the proposed uses as a food additive. EFSA Journal 2010; 8(4): 1537. (84 pages).
3. Carakostas MC, Curry LL, Boileau AC, Brusick DJ. Overview: the history, technical function and safety of rebaudioside A, a naturally occurring steviol glycoside, for use in food and beverages. Food Chem Toxicol 2008; 46(Suppl 7) : S1-10.
4. Food and Agricultural Organization of the United Nations. Steviol glycosides-69th JECFA-Chemical and Technical Assessment (CTA). [online]. 2008; [cited 2022 Apr 4]; [7 screens]. Available from: URL: <https://www.fao.org/3/at966e/at966e.pdf>.
5. Food and Agricultural Organization of the United Nations. Steviol glycosides-82nd JECFA-Chemical and Technical Assessment (CTA). [online]. 2016; [cited 2022 Apr 4]; [10 screens]. Available from: URL: <https://www.fao.org/3/br566e/br566e.pdf>.
6. 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).

7. ประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่อง คำชี้แจงประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 418) พ.ศ. 2563 ออกตามความในพระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 เรื่อง กำหนดหลักเกณฑ์ เงื่อนไข วิธีการใช้ และอัตราส่วนของวัตถุเจือปนอาหาร (ฉบับที่ 2). [ออนไลน์]. 2563; [สืบค้น 4 เม.ย. 2565]; [210 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: [http://food.fda.moph.go.th/law/data/announ\\_fda/418\\_FoodAdditives.pdf](http://food.fda.moph.go.th/law/data/announ_fda/418_FoodAdditives.pdf).
8. Kitada Y, Sasaki M, Yamazoe Y, Nakazawa H. Simultaneous determination of stevioside, rebaudioside A and C and dulcoside A in food by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1989; 474: 447-51.
9. 73<sup>rd</sup> meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Steviol glycosides. Rome: FAO/JECFA Monograph; 2010.
10. ทิพวรรณ นิ่งน้อย. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดี่ยว. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2549.
11. สุวรรณ จารุณูช, และคณะ. แนวปฏิบัติการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดทางเคมี. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2550.
12. Eurachem Guide. The Fitness for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics. 2<sup>nd</sup> ed. [online]. 2014; [cited 2022 Jan 1]; [70 screens]. Available from: URL: [https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV\\_guide\\_2nd\\_ed\\_EN.pdf](https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_EN.pdf).
13. Fayaz S, Sharma R, Rajput YS, Mann B, Lata K. Estimation of steviol glycosides in food matrices by high performance liquid chromatography. *J Food Sci Technol*. 2018; 55(8): 3325-34.

---

# Method Validation of Rebaudioside A and Stevioside Determination in Syrup by High Performance Liquid Chromatography

---

**Suthatip Vitchaivutivong and Sirithorn Putsorn**

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

**ABSTRACT** Rebaudioside A and stevioside are steviol glycosides extracted from *Stevia rebaudiana* Bertoni. According to the Notification of Ministry of Public Health No. 418 (B.E. 2020), both are allowed to use as sweetener. The objective of this study was to develop the suitable method to analyze rebaudioside A and stevioside in syrup using HPLC. The condition consisted of Capcell pak C18 MG II column as solid phase, ultraviolet detector at wavelength 210 nm and the mixture of acetonitrile and 10 mM potassium hydrogen phosphate pH 2.6 (32:68) as mobile phase. The results showed that limit of detection (LOD) at 2.0 mg/kg, limit of quantitation (LOQ) at 4.0 mg/kg, linearity and range were detected from 2.0 to 100 µg/ml ( $R^2 = 1$ ). The %recovery of the concentration at 4.0, 28 and 140 mg/kg, of rebaudioside A and stevioside 96.5-106.9% and 96.0-109.8% respectively. Precision of rebaudioside A and stevioside were acceptable (HORRAT < 2). Intermediate precision calculated from analytical results of quality control samples of rebaudioside A and stevioside were equal to 0.36 and 0.45, respectively. In conclusion, this method is suitable for analyze rebaudioside A and stevioside in syrup in the laboratory.

**Keywords:** Rebaudioside A, Stevioside, Syrup, HPLC