

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบหาปริมาณซูคราโลสใน เครื่องดื่มโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง Method validation for determination of sucralose in beverage by high performance liquid chromatography

3

นันทิดา จิตแก้ว¹, สวรรินทร์ สินะวิวัฒน์¹Nantida Jitkaew¹, Savarin Sinaviwat¹

รับบทความ: 18 กุมภาพันธ์ 2565 แก้ไขบทความ: 31 พฤษภาคม 2565 ยอมรับตีพิมพ์: 13 มิถุนายน 2565

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทำการทดสอบความใช้ได้ของวิธี การทดสอบปริมาณซูคราโลสในเครื่องดื่มซึ่งดัดแปลงวิธีทดสอบจากวิธีมาตรฐาน BS EN 16155:2012 Foodstuffs- Determination of sucralose-High performance liquid chromatographic method ได้ทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี โดยมีการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของวิธีวิเคราะห์ พบว่ามีความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0-400 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าขีดจำกัดในการตรวจพบและขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณของการตรวจวัดเท่ากับ 4.0 และ 15.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ การศึกษาความแม่นยำและความเที่ยงของวิธีโดยใช้ตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐาน 3 ระดับความเข้มข้น (25, 250, 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม) พบว่ามีค่าร้อยละกลับคืนอยู่ในช่วงร้อยละ 92.0-101.6, 98.8-99.4 และ 98.0-99.8 ตามลำดับ และความเที่ยงประเมินจากค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่แสดงด้วยค่า %RSD, เท่ากับร้อยละ 3.799, 0.169 และ 0.586 ตามลำดับค่า HORRAT เท่ากับ 0.824, 0.052 และ 0.246 ตามลำดับ ซึ่งค่าร้อยละกลับคืน ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ และค่า HORRAT อยู่ในเกณฑ์การยอมรับและเป็นไปตามข้อกำหนดของ EURACHEM/CITAC Guide: 2012 รวมทั้งได้ประเมินค่าความไม่แน่นอนขยายของการทดสอบซูคราโลสในเครื่องดื่ม พบว่ามีค่าความไม่แน่นอนคิดเป็นร้อยละ 3.7 ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (k=2) นอกจากนี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างที่ขายในท้องตลาดจำนวน 30 ตัวอย่าง มาทำการทดสอบตามวิธีที่ผ่านการทดสอบ ความใช้ได้แล้ว พบว่า ตัวอย่างทั้งหมดนี้มีปริมาณซูคราโลส อยู่ในช่วงไม่พบหรือน้อยกว่า 4.0 ถึง 172.7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าวิธีการทดสอบนี้เหมาะสมกับการใช้งานตามวัตถุประสงค์

Abstract

The determination of sucralose in beverages was performed and validated by the modified standard method based on BS EN 16155:2012 Foodstuffs - Determination of sucralose - High performance liquid chromatographic method. The linear calibration curve was obtained in concentrations ranging from 0 to 400 mg/L. The limit of detection (LOD) and the limit of quantitation (LOQ) were 4.0 and 15.0 mg/kg, respectively. The precision and accuracy studies were performed by spiking 3 concentration levels in the samples (25, 250, and 2,000 mg/kg). The recoveries were obtained from 92.0 to 101.6%, 98.8 to 99.4% and 98.0 to 99.8%, respectively. The precision calculated as a relative standard deviation of repeatability (%RSDr) found good repeatability at 3.799%, 0.169%, and 0.586%. The HORRAT values were 0.824, 0.052 and 0.246, respectively. The percent recovery, precision, and HORRAT value were acceptable and complied with the requirement of EURACHEM/CITAC Guide: 2012. The percentage of expanded uncertainty was 3.7% at a 95% confidence interval (k=2). Moreover, thirty samples from local markets were analyzed following this validated method and found that sucralose concentration ranged from not detected or less than 4.0 to 172.7 mg/kg. The result of this study showed the modified methods were fit for the intended use.

คำสำคัญ: ซูคราโลส เครื่องดื่ม โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

Keywords: Sucralose, Beverage, High performance liquid chromatography

¹ กรมวิทยาศาสตร์บริการ

^{*} Corresponding author e-mail: nantida@dss.go.th

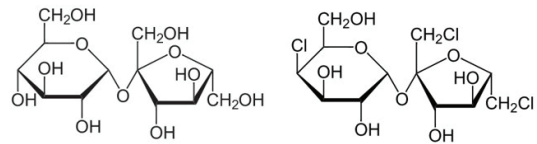
1. บทนำ (Introduction)

ปัจจุบันผู้บริโภคได้หันมาให้ความสนใจและให้ความสำคัญเรื่องสุขภาพกันมากขึ้น อีกทั้งพยายามหลีกเลี่ยงอาหารที่มีน้ำตาลในปริมาณมากซึ่งเชื่อว่าจะมีผลเสียต่อสุขภาพ จากสถิติการบริโภคน้ำตาลของคนไทย พบว่า มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจากการรับประทานอาหารที่มีการเติมน้ำตาล และเครื่องดื่มต่าง ๆ เช่น กาแฟ ชาเขียว น้ำอัดลม น้ำชา น้ำสมุนไพร และน้ำผลไม้ที่มีการใส่น้ำตาลในปริมาณมาก ทำให้ร่างกายได้รับพลังงานส่วนเกิน ก่อให้เกิดปัญหาด้านสุขภาพตามมา เช่น น้ำหนักเกิน โรคอ้วน โรคเบาหวาน โรคหัวใจ และโรคเรื้อรังอื่น ๆ [1]

สารให้ความหวานแทนน้ำตาล สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ ชนิดที่มีคุณค่าทางโภชนาการและให้พลังงาน ได้แก่ ฟรุคโทส (Fructose), มอลทิทอล (Maltitol), ซอร์บิทอล (Sorbitol), อิริทริทอล (Erythritol) และไซลิตอล (Xylitol) ซึ่งสารให้ความหวานกลุ่มนี้ ไม่เหมาะสำหรับผู้ที่ต้องการควบคุมน้ำหนัก และผู้ป่วยโรคเบาหวาน ส่วนอีกชนิดหนึ่ง คือ ชนิดที่ไม่มีคุณค่าทางโภชนาการและไม่ให้พลังงาน ได้แก่ ซูคราโลส (Sucralose) สตีเวียหรือสารสกัดจากหญ้าหวาน (Stevia or Stevia extract) แอสปาร์เทม (Aspartame) อะซิซัลเฟม-เค (Acesulfame-k) แซ็คคาริน (Saccharin) หรือซันทสกร โดยสารให้ความหวานกลุ่มนี้เหมาะสำหรับผู้ที่ต้องการควบคุมน้ำหนัก และผู้ป่วยโรคเบาหวาน [2]

ซูคราโลส เป็นสารให้ความหวานแทนน้ำตาล (Alternative sweetener) มีลักษณะเป็นผงผลึกสีขาวถึงขาวนวล ไม่มีกลิ่น ละลายได้ดีในน้ำ [3] ให้ความหวานสูงกว่าน้ำตาลทรายถึง 600 เท่า เมื่อเทียบระดับความหวานเดียวกันกับน้ำตาลจึงมีราคาที่ต่ำกว่า สามารถใช้ลดต้นทุนผลิตภัณฑ์ได้ อีกทั้งยังมีรสชาติที่คล้ายคลึงกับน้ำตาลทราย ทำให้ผู้บริโภคมีความคุ้นเคยมากกว่า ซูคราโลสถูกค้นพบในปี พ.ศ. 2519 วัตถุดิบเริ่มต้นคือ น้ำตาลซูโครส (Sucrose) ซึ่งผ่านกระบวนการพิเศษโดยแทนที่กลุ่มไฮดรอกซิลด้วยอะตอมคลอรีนที่ตำแหน่งคาร์บอนอะตอมที่ 1, 4 และ 6 ของซูโครส ดังโครงสร้างโมเลกุลของซูโครส เมื่อเทียบกับซูคราโลส (รูปที่ 1) ทำให้มีสูตรโครงสร้างคล้ายน้ำตาล โดยให้รสชาติหวานใกล้เคียงกับน้ำตาล ไม่ให้พลังงาน ไม่มีรสขมติดลิ้น แต่ร่างกายไม่สามารถย่อยได้ [1] ซึ่ง Sucralose ที่รับประทานเข้าไปนั้นจะถูกขับออกมาในปัสสาวะและอุจจาระ จึงสามารถใช้ Sucralose ทดแทนน้ำตาลเพื่อควบคุมพลังงานที่จะได้รับ ทั้งนี้ Sucralose ย่อยสลายเข้าไปสู่ร่างกายจะไม่ส่งผลต่อระดับน้ำตาลในเลือดและระดับอินซูลิน และไม่พบอันตรายใด ๆ จากการที่รับประทาน และในปี พ.ศ. 2541 สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา (US FDA) ได้ประกาศอนุญาตให้ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร 15 ชนิด และใช้ร่วมกับสารให้ความหวานชนิดอื่น ๆ ในอาหาร

ประเภทเครื่องดื่ม หมากรฝรั่ง ขนมหวานแช่แข็ง น้ำผลไม้และเจลลาติน จนกระทั่งปี พ.ศ. 2542 จึงประกาศ ให้ใช้ได้กับอาหารทุกชนิดโดยผ่านการทดสอบความปลอดภัยต่อการบริโภคมากกว่า 110 ครั้ง [1,4] โดยสามารถสังเกตได้จากฉลากของผลิตภัณฑ์ซึ่งจะแสดงเป็นเลขรหัสในระบบ International Numbering System for Food Additives คือ INS No. 955



Sucrose

Sucralose

รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างของซูโครสและซูคราโลส

ปี พ.ศ. 2533 คณะผู้เชี่ยวชาญจาก The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additive (JECFA) กำหนดค่า Acceptable Daily Intake (ADI) ของซูคราโลสไว้ที่ 0-15 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ในขณะที่ US FDA ระบุว่าซูคราโลสปลอดภัยสำหรับทุกคน รวมถึงสตรีมีครรภ์ปลอดภัยในระหว่างตั้งครรภ์และให้นมบุตร [3,5] และกำหนดค่า ADI ไว้ที่ 5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อ 1 วัน ในประเทศไทยนิยมเติมซูคราโลสในผลิตภัณฑ์อาหารและเครื่องดื่มประเภทต่าง ๆ โดยมีการกำหนดตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 389) พ.ศ. 2561 เรื่อง วัตถุเจือปนอาหาร (ฉบับที่ 5) [6] และประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 418) พ.ศ. 2563 ออกตามความในพระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 เรื่อง กำหนดหลักเกณฑ์เงื่อนไข วิธีการใช้ และอัตราส่วนของวัตถุเจือปนอาหาร (ฉบับที่ 2) เช่น เครื่องดื่มแต่งกลิ่นรส น้ำผัก ผลไม้ชนิดเนคต้า น้ำผัก ผลไม้เนคต้าเข้มข้น เครื่องดื่มที่มีนมเป็นส่วนประกอบหลัก (ปรุงแต่ง) ปริมาณสูงสุดที่อนุญาต 300 มิลลิกรัมต่อ กิโลกรัม [7]

ในปัจจุบันไม่มีรายงานเกี่ยวกับพิษในการบริโภควัตถุให้ความหวานชนิดนี้ แต่ยังมีเกณฑ์แนะนำในการบริโภค ดังนั้นเพื่อสร้างความมั่นใจในคุณภาพของสินค้าให้แก่ผู้ผลิตผลิตภัณฑ์ และเพื่อให้เกิดความปลอดภัยต่อผู้บริโภค กรมวิทยาศาสตร์บริการ กลุ่มงานความปลอดภัยในอาหาร ได้พัฒนาวิธีการทดสอบหาปริมาณซูคราโลสในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม โดยใช้วิธีทดสอบที่ดัดแปลงจากวิธีมาตรฐานและมีการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีด้วย

2. วิธีการวิจัย (Experimental methods)

2.1 เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์

2.1.1 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

(High performance liquid chromatography refractive index detector, HPLC-RID) รุ่น Alliance 2695 ยี่ห้อ Water

2.1.2 คอลัมน์สำหรับ HPLC-RID ชนิดเหล็กกล้าไร้สนิมขนาด 4.6 x 250 มิลลิเมตร บรรจุด้วย C18 ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร ยี่ห้อ Hichrom

2.1.3 เครื่องชั่งไฟฟ้า (Electronic analytical balance) รุ่น AE 240 ยี่ห้อ Mettler

2.1.4 เครื่องทำน้ำบริสุทธิ์ (Deionizer) รุ่น Smart2pure ยี่ห้อ Thermo scientific

2.1.5 อ่างน้ำอัลตราโซนิก (Ultrasonic bath) รุ่น LUC 40 5 ยี่ห้อ Power sonic

2.1.6 ชุดอุปกรณ์การกรองพร้อมแผ่นเมมเบรน (Membrane filter) ชนิดเมทิลเซลลูโลส (Methylcellulose, MCE) และชนิดพอลิเตตระฟลูออโรเอทิลีน (Polytetrafluoroethylene, PTFE) ขนาด 47 มิลลิเมตร ขนาดรูพรุน 0.22 ไมโครเมตร

2.1.7 หลอดฉีด (Syringe) ขนาด 10 มิลลิเมตร พร้อมตัวกรอง (Syringe filter) ชนิด MCE ขนาด 25 มิลลิเมตร, 0.22 ไมโครเมตร หรือตัวกรองชนิดอื่น ๆ ที่มีคุณสมบัติเหมือนกัน

2.1.8 ขวดแก้วขนาดเล็ก (Vial) ขนาด 2 มิลลิเมตร

2.1.9 กระดาษกรองวัดตัมแมนเบอร์ 2 (Whatman no.2) หรือเทียบเท่า

2.1.10 เครื่องแก้วต่าง ๆ เช่น ปิเปตต์ ขวดแก้ววัดปริมาตร บีกเกอร์ และกระบอกตวงขนาดต่าง ๆ

2.1.11 กรวยกรองชนิดแก้วหรือพลาสติก

2.2 สารมาตรฐาน สารเคมีและอื่น ๆ

2.2.1 สารมาตรฐานซูคราโลส (CAS No. 56038-13-2) ความบริสุทธิ์อย่างน้อยร้อยละ 99.0 ยี่ห้อ Sigma-Aldrich

2.2.2 เมทานอล ชั้นคุณภาพวิเคราะห์ HPLC ยี่ห้อ Merck

2.2.3 น้ำที่มีความบริสุทธิ์สูง มีค่าความต้านทานไฟฟ้าไม่น้อยกว่า 18.2 MΩ·cm

2.2.4 โพแทสเซียมเฟอร์โรไซยาไนด์ ($K_4[Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O]$) ชั้นคุณภาพวิเคราะห์ AR (carrez I) ยี่ห้อ Merck

2.2.5 ซิงค์ไนเตรท ($Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$) ชั้นคุณภาพวิเคราะห์ AR (carrez II) ยี่ห้อ Alfa aesar

2.2.6 สารละลายผสมเฟสเคลื่อนที่ (สารละลายเมทานอล ร้อยละ 20)

2.2.7 สารละลายมาตรฐานซูคราโลสความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.2.8 สารละลายมาตรฐานซูคราโลสช่วงใช้งานความเข้มข้น 0, 5, 10, 50, 100, 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.3 ตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ใช้ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีเป็นตัวอย่างเครื่องดื่มชนิดไม่มีแอลกอฮอล์ที่มีจำหน่ายตามท้องตลาด จำนวน 30 ตัวอย่าง ได้แก่ เครื่องดื่มน้ำตาล เครื่องดื่มน้ำตาลเติมวิตามิน เครื่องดื่มให้พลังงาน เครื่องดื่มว่านหางจระเข้ผสมกลีนิพิซ เครื่องดื่มผักผลไม้รวมรสสตอเบอรี่ เป็นต้น

2.4 การเตรียมตัวอย่าง [8]

ชั่งตัวอย่าง 20 ± 0.5 กรัม (ความละเอียดของการชั่งตัวอย่างคือ 0.0001 กรัม) ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นละลายผสมเฟสเคลื่อนที่ (ข้อ 2.2.6) ประมาณ 80 มิลลิลิตร แล้วเติม carrez I (ข้อ 2.2.4) และ carrez II (ข้อ 2.2.5) อย่างละ 1 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยสารละลายผสมเฟสเคลื่อนที่จนครบปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นนำไปกรองด้วยกระดาษกรองวัดตัมแมนเบอร์ 2 (ข้อ 2.1.9) นำสารละลายส่วนใสที่ได้ไปกรองผ่านหลอดฉีดพร้อมตัวกรอง 0.22 ไมโครเมตร ชนิด MCE ขนาด 25 มิลลิเมตร (ข้อ 2.1.7) ใส่ในขวดแก้วขนาดเล็ก (Vial) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร สำหรับใช้กับเครื่อง HPLC-RID (ข้อ 2.1.8) แล้ววัดหาปริมาณซูคราโลสโดยใช้เครื่อง HPLC-RID

2.5 การเตรียมสารมาตรฐาน

2.5.1 นำสารละลายมาตรฐานซูคราโลสที่มีความเข้มข้นระหว่าง 0 ถึง 400 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข้อ 2.2.8) กรองผ่านแผ่นเมมเบรน ขนาด 0.22 ไมโครเมตร ลงในขวดขนาดเล็ก ฉีดเข้าเครื่อง HPLC-RID ตามสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบซูคราโลส ดังนี้

คอลัมน์สำหรับเครื่อง HPLC-RID	ชนิดเหล็กกล้าไร้สนิม ขนาด 4.6 x 250 มิลลิเมตร บรรจุด้วย C18-coated spherical silicagel ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร ยี่ห้อ Hichrom พร้อม Guard column เมทานอล 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 80 มิลลิลิตรโดยบรรจุที่สาย A และปรับการไหลเป็น 100%
อัตราการไหล	1.0 มิลลิลิตรต่อนาที
ปริมาตรที่ฉีด	50 ไมโครลิตร
อุณหภูมิคอลัมน์	40 °C
อุณหภูมิเครื่องตรวจวัด	30 °C
เครื่องตรวจวัด	Refractive index detector (RID)
Sensitivity	+8
เวลาในการฉีด (Run time)	18 นาที
เวลาที่สารเคลื่อนที่	ประมาณ 13.8 นาที

2.5.2 ตรวจสอบสมรรถนะของเครื่อง HPLC-RID โดยการฉีดสารละลายมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวนอย่างน้อย 3 ซ้ำ เพื่อคำนวณค่า System suitability ตาม US Pharmacopoeia โดยมีเกณฑ์การยอมรับประกอบด้วย Theoretical plate > 2,000, Capacity factor (k') > 2, Resolution > 2, Tailing factor ≤ 2 , Relative standard deviation (RSD) of area < 2% และ RSD of RT < 2%

2.6 การคำนวณผลการทดสอบ

ปริมาณซูโครโลส (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) =

$$\frac{C \times V}{W} \quad (1)$$

เมื่อ C = ความเข้มข้นของซูโครโลสที่ได้จากกราฟมาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
V = ปริมาตรทั้งหมด (มิลลิลิตร)
W = น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้ (กรัม)

2.7 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ [9]

2.7.1 การตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธี (Selectivity/ specificity)

เตรียมสารละลายมาตรฐานผสม (Mixed standard solution) โดยใช้สารให้ความหวานชนิดอื่น ๆ ได้แก่ อะซีซัลเฟรม-เค, แซ็กคาริน, ซัคคาโลแมต และแอสพาร์เทม รวมกับซูโครโลสที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC-RID ตรวจสอบการแยกของซูโครโลสออกจากสารอื่น สารทั้งหมดต้องมีค่าเวลาที่สารเคลื่อนที่ (Retention time) ต่างกันและให้พีคที่ไม่ซ้อนทับกัน

2.7.2 ความเป็นเส้นตรง (Linearity) และช่วงของการใช้งาน (Working range)

2.7.2.1 ศึกษาความเป็นเส้นตรงของสารละลายมาตรฐานซูโครโลสที่ 7 ระดับความเข้มข้น ดังนี้ 0, 5, 10, 50, 100, 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดูความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานซูโครโลส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) กับพื้นที่ใต้กราฟของซูโครโลส จากค่าสัมประสิทธิ์การกำหนด (Coefficient of determination, R^2) โดยเกณฑ์การยอมรับได้อยู่ในช่วง 0.995-1.000 และยืนยันความสัมพันธ์ความเป็นเส้นตรงด้วยกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานซูโครโลสกับการตกค้าง (Residual)

2.7.2.2 ศึกษาช่วงของการใช้งานโดยการทดสอบสารละลายมาตรฐานซูโครโลสที่เติมลงในตัวอย่างเครื่องมือที่ 7 ระดับความเข้มข้น ดังนี้ 0, 25, 50, 250, 500, 1,000 และ 2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม วัดระดับความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ดูความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของซูโคร

โลสจากการวัด (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) กับความเข้มข้นของซูโครโลสที่เติมในตัวอย่าง (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) จากค่าสัมประสิทธิ์การกำหนด (Coefficient of determination, R^2) โดยเกณฑ์การยอมรับได้อยู่ในช่วง 0.995-1.000

2.7.3 ขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of detection, LOD) และขีดจำกัดในการวัดปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)

โดยวัดแบบลบล้างของตัวอย่าง (Sample blank) จำนวน 10 ซ้ำ และตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานซูโครโลส (Spiked sample) ที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานซูโครโลส 15.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 10 ซ้ำ คำนวณหาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S'_0) เพื่อหาค่า LOD และ LOQ คำนวณจาก

$$LOD = 3 \times S'_0 \quad (2)$$

$$LOQ = k_Q \times S'_0, k_Q = 10 \quad (3)$$

$$\text{เมื่อ } S'_0 = \frac{S_0}{\sqrt{n}} \quad (4)$$

S'_0 = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation) ที่ใช้คำนวณค่า LOD และ LOQ

S_0 = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation)

n = จำนวนของการวัดตัวอย่างซ้ำ

2.7.4 การยืนยันค่า LOQ

โดยวัดตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานซูโครโลสที่ระดับความเข้มข้นเดียวกับ ค่า LOQ จำนวน 10 ซ้ำ พิจารณาความแม่นยำ (Accuracy) โดยประเมินจากค่าร้อยละกลับคืน (%Recovery) และความเที่ยง (Precision) โดยประเมินจากการทวนซ้ำ (Repeatability) ที่แสดงด้วยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative standard deviation, %RSD_r) และ ค่า HORRAT (Horwitz's ratio) ที่คำนวณจากอัตราส่วนระหว่างค่า %RSD_r กับค่า %PRSD_r (Predicted relative standard deviation (%PRSD_r))

2.7.5 การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision)

โดยวัดตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานซูโครโลสที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ คือ ที่ 25, 250 และ 2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวนระดับละ 10 ซ้ำ โดยความเที่ยงประเมินจากการทวนซ้ำ (Repeatability) ที่แสดงด้วยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative standard deviation, %RSD_r) และ HORRAT และความแม่นยำประเมินโดยใช้ค่าร้อยละกลับคืน (%Recovery)

2.7.5.1 ความเที่ยง

ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative standard deviation, %RSD,) เกณฑ์การยอมรับ ดังตารางที่ 1 และ HORRAT น้อยกว่า 2

$$\% RSD_r = \frac{SD \times 100}{\bar{x}} \quad (5)$$

% RSD_r = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative standard deviation, %RSD)

SD = ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation)

$\bar{x}$ = ค่าเฉลี่ยของซูคราโลสในตัวอย่าง (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมหรือมิลลิกรัมต่อลิตร)

ตารางที่ 1 เกณฑ์การยอมรับของค่า % RSD_r ตามช่วงระดับ ความเข้มข้น [10]

ความเข้มข้นของซูคราโลส (%)	อัตราส่วนของซูคราโลส	หน่วย	เกณฑ์การยอมรับค่า % RSD _r
0.1	10 ⁻³	0.1%	3.7
0.01	10 ⁻⁴	100 ppm (mg/kg)	5.3
0.001	10 ⁻⁵	10 ppm (mg/kg)	7.3
0.0001	10 ⁻⁶	1 ppm (mg/kg)	11

และ HORRAT (Horwitz ratio) = %RSD_r/%PRSD_r
Horwitz equation : Predicted relative standard deviation (%PRSD_r)

Repeatability: %PRSD_r = 0.66 * 2^(1-0.5logC)

โดยที่ C = Concentration ratio

$$\text{HORRAT} = \frac{\% RSD_r}{\% PRSD_r} \quad (6)$$

2.7.5.2 ความแม่นยำ

ร้อยละกลับคืน จากตัวอย่างที่เดิม สารละลายมาตรฐาน 3 ระดับความเข้มข้น เกณฑ์การยอมรับ ดังแสดงตารางที่ 2

$$\% \text{ Recovery } (\%R') = \frac{\bar{x}' - \bar{x}}{x_{\text{spiked}}} \times 100 \quad (7)$$

โดยที่

$\bar{x}'$ = ความเข้มข้นของสารในตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานซูคราโลส (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม หรือ มิลลิกรัมต่อ ลิตร)

$\bar{x}$ = ความเข้มข้นของสารซูคราโลสในตัวอย่าง (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม หรือมิลลิกรัมต่อลิตร)

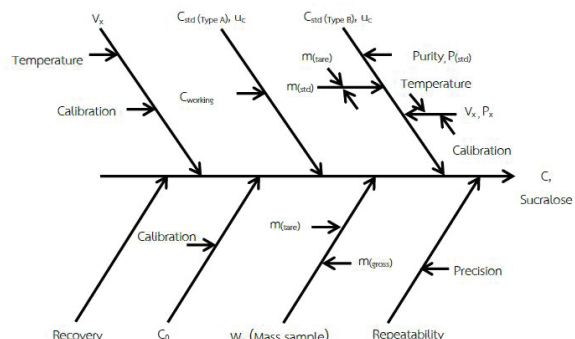
x_{spiked} = ความเข้มข้นของสารมาตรฐานซูคราโลสที่เติมลงในตัวอย่าง (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมหรือ มิลลิกรัมต่อลิตร)

ตารางที่ 2 เกณฑ์การยอมรับของค่า % Recovery ตามช่วงระดับความเข้มข้น [10]

ความเข้มข้นของซูคราโลส (%)	อัตราส่วนของซูคราโลส	หน่วย	เกณฑ์การยอมรับค่า % Recovery
0.1	10 ⁻³	0.1%	95-105
0.01	10 ⁻⁴	100 ppm (mg/kg)	90-107
0.001	10 ⁻⁵	10 ppm (mg/kg)	80-110
0.0001	10 ⁻⁶	1 ppm (mg/kg)	

2.8 การประมาณค่าความไม่แน่นอนของผลการวัด

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการทดสอบหาปริมาณซูคราโลสในเครื่องต้มโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงตาม EURACHEM/CITAC Guide: 2012 [11] โดยรวมแหล่งที่มาของค่าความไม่แน่นอนแสดงด้วยแผนภูมิแก๊งปลา รูปที่ 2 จากนั้นคำนวณหาค่าความไม่แน่นอนแต่ละแหล่งและ ค่าความไม่แน่นอนรวมและค่าความไม่แน่นอนขยายที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (k=2)

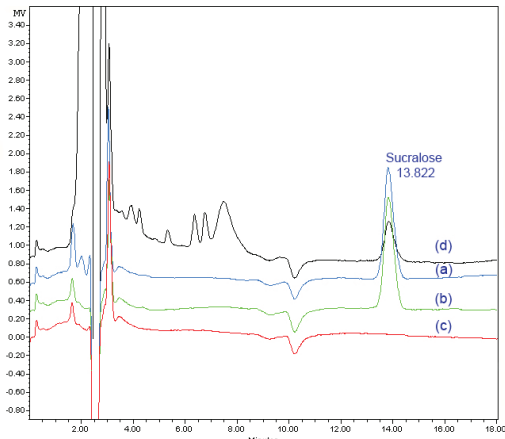


รูปที่ 2 แหล่งของความไม่แน่นอน

3. ผลและวิจารณ์ (Result and discussion)

3.1 การตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธี (Selectivity/ specificity)

จากการฉีดสารละลายมาตรฐานผสม (Mixed standard solution) ที่มีสารอะซีซัลเฟม-เค, แอ็กคาริน, ซัยคลาเมต, แอสพาร์เทม และซูคราโลส พบว่าสามารถแยกสารซูคราโลสออกจากสารให้ความหวานตัวอื่นๆ ได้โดยไม่มี การรบกวนของสารตัวอื่น วิธีการวิเคราะห์นี้มีความสามารถในการวัดที่จำเพาะกับซูคราโลส และเวลาที่ซูคราโลสเคลื่อนที่ (Retention time) เท่ากับ 13.822 นาที (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 โครมาโทแกรมของซูคราโลส

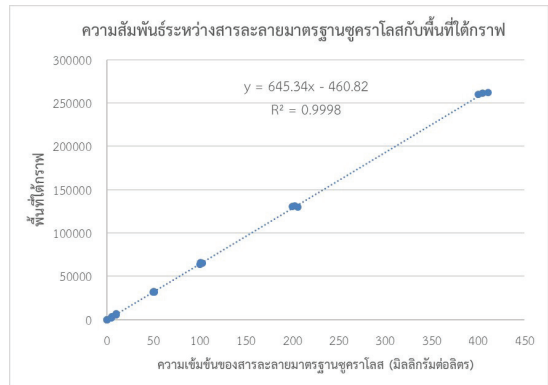
- (a) สารละลายมาตรฐานผสม (Mixed standard solution) ที่มีสารอะซีซัลเฟม-เค, แอ็กคาริน, ซัยคลาเมต, แอสพาร์เทม และซูคราโลส
- (b) สารละลายมาตรฐานซูคราโลส
- (c) แบลงค์ของสารละลาย (Solvent blank)
- (d) ซูคราโลสในตัวอย่างเครื่องดื่ม

3.2 ความเป็นเส้นตรง (Linearity) และช่วงของการใช้งาน (Working range)

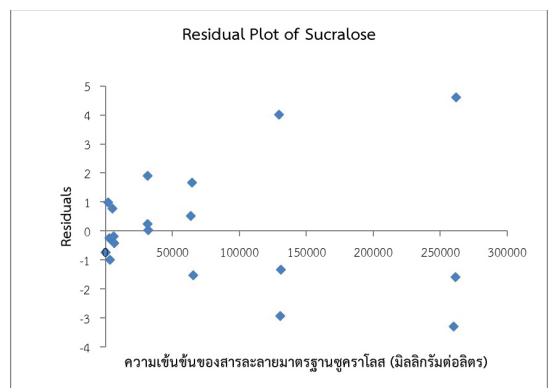
3.2.1 จากการศึกษาคือความเป็นเส้นตรง ที่ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานซูคราโลส ตั้งแต่ 0 ถึง 400 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ให้กราฟเส้นตรงสมการ $y = 645.34x + 460.82$ ค่า R^2 เท่ากับ 0.9998 ดังแสดงใน รูปที่ 4 และ ยืนยันความสัมพันธ์ความเป็นเส้นตรงของสารละลายมาตรฐานซูคราโลสด้วยกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานซูคราโลสกับการตกค้าง (Residual) ดังแสดงใน รูปที่ 5

3.2.2 จากการศึกษาคือช่วงของการวัดความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานซูคราโลสที่เติมลงในตัวอย่างเครื่องดื่ม ตั้งแต่ 0-2,000.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ให้กราฟเส้นตรงสมการ $y = 1.0011x - 0.7411$ ค่า R^2 เท่ากับ 1.0000 ดังแสดงในรูปที่ 6

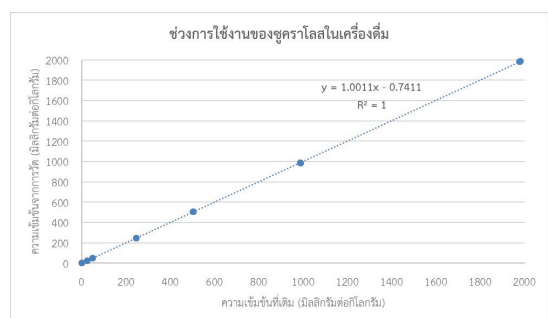
โดยที่งานวิจัย [12] ได้ศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ปริมาณซูคราโลสในเครื่องดื่มโดยเทคนิค UPLC-ELSD ซึ่งเทคนิคดังกล่าวจะแสดงผลของสารให้ความหวานอื่น ๆ ออกมาด้วยและมีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานอยู่ในช่วง 10-200 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่งานวิจัย [13] ได้ศึกษาการหาปริมาณซูคราโลสในเครื่องดื่มโดยเทคนิค HPLC-RID สามารถหาความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานได้ในช่วง 20-400 มิลลิกรัมต่อลิตร



รูปที่ 4 กราฟแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นของสารละลายซูคราโลสกับพื้นที่ใต้กราฟ ความเข้มข้น 0-400 มิลลิกรัมต่อลิตร



รูปที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานซูคราโลสกับการตกค้าง (Residual)



รูปที่ 6 กราฟแสดงช่วงการวัดและความเป็นเส้นตรงของซูคราโลสในตัวอย่างความเข้มข้น 0-2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

3.3 ขีดจำกัดของการตรวจหา (LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ)

ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานซูคราโลสระดับความเข้มข้น 15.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมจำนวน 10 ซ้ำ คำนวณค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S_0) ได้เท่ากับ 1.206 คำนวณ LOD ได้เท่ากับ 3.62 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และค่า LOQ ได้เท่ากับ 12.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

3.4 การยืนยันค่า LOQ

ผลการฉีดสารละลายตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานซูคราโลสลงไปทีละระดับความเข้มข้น 15.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 10 ซ้ำ คำนวณค่าร้อยละกลับคืน อยู่ในช่วงร้อยละ 97.3-102.0 และค่าร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เท่ากับ 1.373 และค่า HORRAT เท่ากับ 0.277 ซึ่งค่าที่ได้อยู่ในช่วงเกณฑ์การยอมรับได้

(ตามข้อ 2.8.5) ดังนั้นที่ความเข้มข้นระดับนี้ มีความแม่นยำ และ ความเที่ยงเหมาะสมกับการใช้งาน

3.5 การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision)

ผลการฉีดสารละลายตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานซูคราโลสที่ 3 ระดับความเข้มข้น คือ 25, 250 และ 2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวนระดับละ 10 ซ้ำ พบความแม่นยำที่ประเมินจากค่าร้อยละกลับคืนทั้ง 3 ระดับ อยู่ในช่วงร้อยละ 92.0-101.6, 98.8-99.4 และ 98.0-99.8 ตามลำดับ และความเที่ยงที่ประเมินจากค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ที่แสดงด้วยค่า %RSD, เท่ากับร้อยละ 3.799, 0.169, 0.586 ตามลำดับ และค่า HORRAT เท่ากับ 0.824, 0.052 และ 0.246 ตามลำดับ ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ค่าร้อยละการคืนกลับ (%Recovery), ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) และค่า HORRAT ของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณซูคราโลสในเครื่องต้ม

ลำดับที่	ระดับความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)							
	15		25		250		2,000	
	ค่าที่ได้ (มก./กก.)	ร้อยละการคืนกลับ (%)	ค่าที่ได้ (มก./กก.)	ร้อยละการคืนกลับ (%)	ค่าที่ได้ (มก./กก.)	ร้อยละการคืนกลับ (%)	ค่าที่ได้ (มก./กก.)	ร้อยละการคืนกลับ (%)
1	14.9	99.3	23.9	95.6	247.9	99.2	1,982.3	99.1
2	15.2	101.3	23.0	92.0	247.8	99.1	1,979.2	99.0
3	15.0	100.0	25.1	100.4	247.6	99.0	1,986	99.3
4	15.0	100.0	24.7	98.8	247.5	99.0	1,983.3	99.2
5	15.3	102.0	25.4	101.6	248.4	99.4	1,994.8	99.7
6	15.1	100.7	25.3	101.2	246.9	98.8	1,996.5	99.8
7	15.3	102.0	24.8	99.2	247.3	98.9	1,995.2	99.8
8	15.0	100.0	23.0	92.0	248.1	99.2	1,988.8	99.4
9	15.0	100.0	25.5	102	247.7	99.1	1,960	98.0
10	14.6	97.3	24.7	98.8	247.5	99.0	1,970.2	98.5
เฉลี่ย	15.0	100.3	24.5	98.2	247.67	99.1	1,983.6	99.2
SD	0.207		0.932		0.419		11.628	
%RSD _r	1.373		3.799		0.169		0.586	
%PRSD _r	4.965		4.612		3.257		2.318	
HORRAT	0.277		0.823		0.052		0.246	

3.6 การประมาณค่าความไม่แน่นอนของผลการวัด

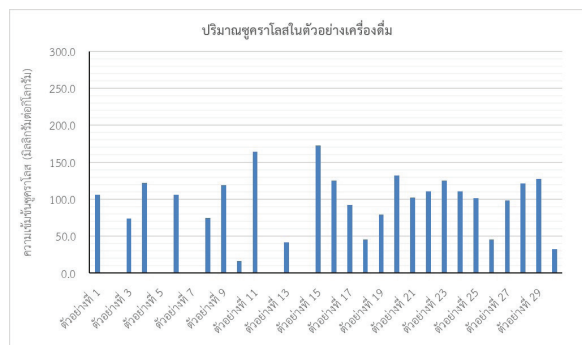
จากผลการทดลองสามารถประมาณค่าไม่แน่นอนของการทดสอบหาปริมาณซูโครสในเครื่องดื่มโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง มีค่าความไม่แน่นอนขยายที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($k=2$) ได้ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ค่าความไม่แน่นอนของการทดสอบหาปริมาณซูโครสในเครื่องดื่มโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

แหล่งที่มา	หน่วย	ปริมาณที่วัด, x_i	ความไม่แน่นอนมาตรฐาน, $u_{(xi)}$	ความไม่แน่นอนสัมพัทธ์, $u_{(xi)} / x_i$	ความไม่แน่นอนสัมพัทธ์, $(u_{(xi)} / x_i)^2$
1. สารมาตรฐาน					
-ความบริสุทธิ์ (P_{std})	ร้อยละ	99.0	2.89×10^{-1}	2.89×10^{-3}	8.35×10^{-6}
-น้ำหนัก (m_{std})	กรัม	0.05	9.19×10^{-6}	1.84×10^{-4}	3.39×10^{-8}
-ขวดวัดปริมาตร (V_x)	มิลลิลิตร	100	6.13×10^{-2}	6.13×10^{-4}	3.76×10^{-7}
-ปิเปตต์ (P_x)	มิลลิลิตร	5	3.26×10^{-3}	6.52×10^{-4}	4.25×10^{-7}
2. ตัวอย่าง					
-น้ำหนัก (m_s)	กรัม	20	6.20×10^{-5}	3.10×10^{-5}	9.61×10^{-7}
-ขวดวัดปริมาตร (V_s)	มิลลิลิตร	100	6.13×10^{-2}	6.13×10^{-4}	3.76×10^{-7}
3. ความเข้มข้นของซูโครสที่ได้จากกราฟ (C_0)	มิลลิกรัมต่อลิตร	49.7	8.98×10^{-1}	1.82×10^{-2}	3.26×10^{-4}
4. การทดสอบซ้ำ (RSD_r)	-	1	1.19×10^{-3}	1.19×10^{-3}	1.42×10^{-6}
5. ร้อยละกลับคืน	-	1.003	1.72×10^{-3}	1.71×10^{-3}	2.94×10^{-6}
ความไม่แน่นอนสัมพัทธ์รวม, (U_c/C)			= 0.0184		
ค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานรวม (U_c)			= 4.5577 ($c=247.7$ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)		
ค่าความไม่แน่นอนขยาย ($2 \times U_c$), $k=2$			= 9.1154 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม		
รายงานผล :			247.7 ± 9.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (คิดเป็นร้อยละ 3.7)		

3.7 การตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่าง

ตัวอย่างเครื่องดื่มชนิดไม่มีแอลกอฮอล์ที่เก็บจากการจำหน่ายตามท้องตลาด จำนวน 30 ตัวอย่าง นำมาวิเคราะห์ตามวิธีทดสอบที่ได้ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีแล้ว พบว่า ตัวอย่างทั้งหมดนี้มีปริมาณซูคราโลสอยู่ในช่วงไม่พบหรือน้อยกว่า 4.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ถึง 172.7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ดังแสดงในรูปที่ 7 ซึ่งเป็นไปตามพระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 418 (พ.ศ. 2563) ที่ให้มีได้สูงสุด 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม



รูปที่ 7 ปริมาณของซูคราโลสในตัวอย่างเครื่องดื่มชนิดไม่มีแอลกอฮอล์ที่เก็บจากการจำหน่ายตามท้องตลาด

4. สรุป (Conclusion)

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบหาปริมาณซูคราโลสในเครื่องดื่ม โดยการดัดแปลงวิธีจากวิธีมาตรฐาน BS EN 16155:2012 Foodstuffs-Determination of sucralose-High performance liquid chromatographic method ตามคุณลักษณะเฉพาะต่าง ๆ ได้แก่ ความจำเพาะเจาะจงของวิธี (Selectivity/ specificity), ความเป็นเส้นตรง (Linearity) และช่วงของการใช้งาน (Working range), ขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of detection, LOD) และขีดจำกัดในการวัดปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ), การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision), การประมาณค่าความไม่แน่นอนของผลการวัด พบว่าเป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับที่กำหนด แสดงว่าวิธีทดสอบนี้เหมาะกับการใช้งานตามวัตถุประสงค์และสามารถนำไปทดสอบผลิตภัณฑ์ และเก็บตัวอย่างเครื่องดื่มที่มีจำหน่ายในท้องตลาดมาตรวจวิเคราะห์หาค่าปริมาณซูคราโลสอยู่ในช่วงต่ำกว่า 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 418 (พ.ศ.2563)

5. กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

ขอขอบคุณผู้บังคับบัญชาและบุคลากรกองผลิตภัณฑ์อาหารและวัสดุสัมผัสอาหาร กรมวิทยาศาสตร์บริการ ที่ช่วยให้คำแนะนำ ทำให้การดำเนินงานในครั้งนี้สำเร็จตามวัตถุประสงค์

6. เอกสารอ้างอิง (Reference)

- [1] Sucralose สารให้ความหวานที่มีรสชาติคล้ายน้ำตาลที่สุด [ออนไลน์]. พฤศจิกายน 2563. เข้าถึงจาก: <https://www.tinnakorn.com/articles/sucralose-sweetener> [อ้างถึงวันที่ 24 มกราคม 2565].
- [2] ซูคราโลส [ออนไลน์]. 2560. เข้าถึงจาก: <https://www.disthai.com/17268970/%E0%B8%8B%E0%B8%B9%E0%B8%84%E0%B8%A3%E0%B8%B2%E0%B9%82%E0%B8%A5%E0%B8%AA> [อ้างถึงวันที่ 24 มกราคม 2565].
- [3] THE JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVE (JECFA). Sucralose [online]. 1990. Available from: https://www.fao.org/fileadmin/user_upload/jecfa_additives/docs/Monograph1/Additive-444.pdf [viewed 2021-10-21].
- [4] RODERO A.B, L.S. RODERO, and R. AZOUBEL. Toxicity of sucralose in humans: a review. *International Journal of Morphology*. 2009, 27(1), 239-244.
- [5] AMERICAN PREGNANCY ASSOCIATION. Artificial sweetener and pregnancy [online]. 2015. Available from: <https://americanpregnancy.org/healthy-pregnancy/is-it-safe/artificial-sweeteners-and-pregnancy> [viewed 2022-01-24].
- [6] กระทรวงสาธารณสุข. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 389 (พ.ศ. 2561) เรื่อง วัตถุเจือปนอาหาร (ฉบับที่ 5). *ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 135 ตอนพิเศษ 178 ง* (วันที่ 25 กรกฎาคม 2561). หน้า 521-523.
- [7] กระทรวงสาธารณสุข. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 418 (พ.ศ. 2563) เรื่อง กำหนดหลักเกณฑ์ เงื่อนไข วิธีการใช้ และอัตราส่วนของวัตถุเจือปนอาหาร (ฉบับที่ 2). *ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 137 ตอนพิเศษ 237 ง* (วันที่ 8 ตุลาคม 2563). หน้า 534-536.
- [8] BRITISH STANDARD INSTITUTION (BSI). BS EN 16155:2012. Foodstuffs-Determination of sucralose-High performance liquid chromatographic method. London, UK: British Standard Institution (BSI), 2012. 16 p.

- [9] EURACHEM. *The fitness for purpose of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics*. 2nd ed. [online]. 2014. Available from: https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_EN.pdf [viewed 2021-10-21].
- [10] ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *Appendix F: Guidelines for standard method performance requirements*. [online]. 2016. Available from: http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf [viewed 2021-10-29].
- [11] ELLISON S.L.R. and A. WILLIAMS. *EURACHEM/CITAC Guide CG4: Quantifying uncertainty in analytical measurement*. 3rd ed. [online]. 2012. Available from: https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/QUAM2012_P1.pdf [viewed 2021-11-10].
- [12] กิตติมา โสณะมิตร, สุรชาติพิทยวิทย์ชัยวุฒิมังค์ และญาณิตหาญทวีทรัพย์. การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณซูคราโลสในเครื่องดื่มโดยเทคนิค UPLC-ELSD. *วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์*. 2562, 61(3), 107-120.
- [13] SANG, L. Optimization of determination of sucralose in drink by HPLC. *Journal of Economic Science Research* [online]. 2019, 2(3), 50-54. Available from: <http://doi.org/10.30564/jesr.v2i3.1023> [viewed 2021-11-10].