

เอกสารผลงานที่เสนอประเมิน
เพื่อแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ 8ว

การตรวจสอบความถูกต้องของ
วิธีวิเคราะห์คอเลสเทอรอล
ในนมและผลิตภัณฑ์นม

นางสาวอารี ชูวิสิฐกุล
นักวิทยาศาสตร์ 7 ว

กลุ่มงานเทคโนโลยีอาหาร 1
กองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ
กรมวิทยาศาสตร์บริการ
กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม

บทคัดย่อ

วิธีวิเคราะห์ทดสอบที่มีความถูกต้อง แม่นยำและเป็นที่น่าเชื่อถือได้เป็นสิ่งที่สำคัญและจำเป็นที่สุดในห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ทดสอบทุกแห่ง ฉะนั้นการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีจึงเป็นขั้นตอนที่จำเป็นต้องนำมาปฏิบัติเพื่อตรวจสอบความถูกต้อง แม่นยำของวิธีวิเคราะห์ทดสอบที่ใช้ในแต่ละห้องปฏิบัติการ กองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ กรมวิทยาศาสตร์บริการ จึงได้ดำเนินการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบคอเลสเทอรอลในนมและผลิตภัณฑ์นมโดยใช้วิธีสะปอนนิฟิเคชันในหลอดแก้วทดลองและแยกสกัดคอเลสเทอรอลในหลอดแก้วด้วยเอ็น-เฮกเซนระเหยแห้ง เติรวอร์ไทเซชันและวิเคราะห์หาคอเลสเทอรอลโดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ ซึ่งเป็นวิธี in-house ที่พัฒนาขึ้นในกลุ่มงานเทคโนโลยีอาหาร 1 กองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ การขอรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 จำเป็นต้องตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ จึงได้ดำเนินการ ซึ่งได้ผลของ correlation coefficient = 0.99943 ผลของ %relative accuracy โดยใช้สารมาตรฐานอ้างอิงได้ค่าอยู่ในช่วง 90.2-99.5% การทำ repeatability หรือ precision หรือความแม่นยำซึ่งเป็นค่าที่แสดงความใกล้เคียงกันของผลการทดสอบจากการทำซ้ำหลายๆครั้งได้ค่า %RSD=1.37 ผลของการทำ%recovery โดยการเติมสารมาตรฐานที่รู้ปริมาณที่แน่นอนลงในตัวอย่างที่รู้ค่า (spiked sample) ที่มี matrix เดียวกันกับสารตัวอย่างที่วิเคราะห์ทดสอบได้ค่า 87.2-105.1% ความเข้มข้นระดับต่ำสุดหรือน้อยที่สุดของคอเลสเทอรอลที่วิธีนี้สามารถวิเคราะห์ได้ (MDL) ได้ค่า 0.543 มิลลิกรัม/100กรัม ความเข้มข้นระดับต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้และให้ค่าที่ถูกต้องและแม่นยำ (LOQ) ได้ค่า 1.81 มิลลิกรัม/100กรัม

ผลการวิเคราะห์ทดสอบหาปริมาณคอเลสเทอรอลในนมและผลิตภัณฑ์นมที่เป็นของเหลวและผง พบว่านมและผลิตภัณฑ์นมที่เป็นของเหลวมีคอเลสเทอรอลอยู่ในช่วง 2.7-16.1 มิลลิกรัม/100กรัม ส่วนนมและผลิตภัณฑ์นมที่เป็นผงมีคอเลสเทอรอลอยู่ในช่วง 22.6-87.8 มิลลิกรัม/100กรัม

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	i
สารบัญ	ii
สารบัญตาราง	iii
สารบัญรูปภาพ	iv
บทนำ	1
1. ความเป็นมาและปัญหา	1
2. วัตถุประสงค์	2
3. ประโยชน์ที่ได้รับ	2
4. ระยะเวลาดำเนินการ	2
วารสารปริทัศน์	3
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการ	9
ผลการศึกษาทดลอง	19
วิจารณ์ผล	31
สรุปผล	33
กิตติกรรมประกาศ	34
เอกสารอ้างอิง	35
ภาคผนวก	
แสดงโครมาโตแกรมของคอเลสเทอรอลและ	37
สารมาตรฐานภายในคอเลสเทน	

เลขหมู่ ๑๔ กข
๑๐ ๕๕
เลขทะเบียน 11554
วันที่ 16 / ๕.๑. / 46

ด้วยกนิหนนาการ
จาก
.....
จศ.

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงผลการหา % relative accuracy ของสารมาตรฐาน อ้างอิงคอเลสเทอรอล (SRM 1563-2, NIST)	21
ตารางที่ 2 แสดงผล precision ของวิธีวิเคราะห์คอเลสเทอรอล	22
ตารางที่ 3 แสดงค่า limit of detection หรือ instrument detection limit ของเครื่อง GC	23
ตารางที่ 4 แสดงผล % recovery ของ spiked sample ของการวิเคราะห์ คอเลสเทอรอลที่ระดับความเข้มข้น ต่ำ กลาง สูง	24
ตารางที่ 5 แสดงค่าของปริมาณคอเลสเทอรอลที่ได้จาก spiked sample ระดับความเข้มข้น ต่ำ กลาง สูง เพื่อหา MDL และ LOQ	25
ตารางที่ 6 แสดงผลการวิเคราะห์คอเลสเทอรอลใน control sample	27
ตารางที่ 7 แสดงผลการวิเคราะห์คอเลสเทอรอลในตัวอย่างนมและ ผลิตภัณฑ์นมที่เป็นของเหลว	29
ตารางที่ 8 แสดงผลการวิเคราะห์คอเลสเทอรอลในตัวอย่างนมและ ผลิตภัณฑ์นมที่เป็นผง	30

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 แสดงกราฟมาตรฐานของคอเลสเทอรอล	20
รูปที่ 2 แสดงกราฟของค่าคอเลสเทอรอลที่ระดับความเข้มข้น ต่ำ กลาง สูง เพื่อหาค่า SD_0	26
รูปที่ 3 แสดง control chart ของคอเลสเทอรอล	28

บทนำ

1. ความเป็นมาและปัญหา

ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์/ทดสอบที่ดีควรใช้วิธีวิเคราะห์/ทดสอบและเครื่องมือที่เหมาะสม เพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์/ทดสอบที่มีความถูกต้อง แม่นยำและเชื่อถือได้ ดังนั้นการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์/ทดสอบจึงเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับห้องปฏิบัติการวิเคราะห์/ทดสอบทางเคมีทั่วไป ปัจจุบันประเทศต่างๆออกกฎหมายเกี่ยวกับการแสดงคุณค่าทางโภชนาการ ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่ง que แสดงคุณค่าทางโภชนาการบนฉลากโดยต้องแสดงค่าของคอเลสเทอรอลบนฉลากด้วย ทำให้ต้องการวิธีวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องแม่นยำในการวิเคราะห์หาปริมาณคอเลสเทอรอลในผลิตภัณฑ์อาหารชนิดต่างๆ วิธีของ AOAC Official Method 994.10⁽²⁾ ใช้วิธีวิเคราะห์ปริมาณคอเลสเทอรอลในอาหาร วิธีดังกล่าวใช้วิธีสะaponนิฟิเคชันโดยการรีฟลักซ์ (reflux) และแยกโดยใช้กรวยแยก ซึ่งใช้สารละลายจำนวนมากและการเตรียมอุปกรณ์ยุ่งยาก กลุ่มงานเทคโนโลยีอาหาร 1 กองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ จึงได้ทำการศึกษาทดลองหาวิธีวิเคราะห์คอเลสเทอรอลโดยใช้วิธีสะaponนิฟิเคชันและสกัดคอเลสเทอรอลในหลอดแก้วทดลอง (direct saponification)⁽⁵⁾ ที่สะดวกและรวดเร็วแทนวิธีรีฟลักซ์และแยกสกัดด้วยกรวยแยก(วิธีที่ใช้ใน AOAC 1995) ซึ่งมีความยุ่งยากและใช้เวลามากจึงจำเป็นต้องดำเนินการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี (validation)⁽³⁾⁽⁸⁾ เพื่อพิสูจน์ว่าวิธีวิเคราะห์ที่ดำเนินการอยู่มีความถูกต้องและเชื่อถือได้นอกจากนี้ข้อมูลจากการตรวจสอบความถูกต้องยังเป็นส่วนหนึ่งของการควบคุมคุณภาพ ซึ่งเป็นแนวความคิดเกี่ยวกับความสามารถในการทดสอบและขีดจำกัด ตลอดจนใช้ในการทวนสอบว่าวิธีทดสอบยังอยู่ในการควบคุมและใช้งานได้

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์คอเลสเทอรอล ได้ดำเนินการหาความถูกต้องโดยหา % relative accuracy และ % recovery ของ spiked sample ตรวจสอบความแม่นยำโดยหา % RSD จากการทำ repeatability และหาค่า linearity ของกราฟมาตรฐาน เพื่อแสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์ที่ใช้อยู่มีความถูกต้อง แม่นยำและเชื่อถือได้

นอกจากนี้ได้วิเคราะห์หาปริมาณคอเลสเทอรอลในนมและผลิตภัณฑ์นมซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เป็นที่นิยมบริโภคกันทั่วไป

2. วัตถุประสงค์

เพื่อให้ได้วิธีวิเคราะห์ทดสอบคอเลสเทอรอลที่มีความถูกต้อง แม่นยำตามหลักสถิติและเชื่อถือได้

3. ประโยชน์ที่ได้รับ

1. ได้วิธีวิเคราะห์คอเลสเทอรอลที่เชื่อถือได้ มีความถูกต้องและแม่นยำตามหลักสถิติ
2. ได้วิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์คอเลสเทอรอลในนมและผลิตภัณฑ์นม เพื่อการวิจัยและการควบคุมคุณภาพในการผลิตและงานวิเคราะห์ประจำ
3. ได้ข้อมูลเพื่อใช้ในการพัฒนาระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ทดสอบอาหาร

4. ระยะเวลาดำเนินการ

2 ปี (มกราคม 2543 -ธันวาคม 2544)

วารสารปริทัศน์

สิ่งสำคัญที่ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์/ทดสอบทุกแห่งต้องการ คือ ความถูกต้อง แม่นยำ และความน่าเชื่อถือของผลการวิเคราะห์/ทดสอบนั้นๆ ซึ่งขั้นตอนในการดำเนินการเพื่อให้ได้ความน่าเชื่อถือดังกล่าวได้ถูกกำหนดไว้ในมาตรฐานระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการ ISO/IEC 17025 ⁽⁴⁾

รายละเอียดของมาตรฐาน ISO/IEC 17025 แบ่งออกเป็น 2 ส่วนหลัก คือ ข้อกำหนดด้านการจัดการและข้อกำหนดด้านวิชาการ ข้อกำหนดส่วนแรกมีส่วนคล้ายคลึงกับข้อกำหนดมาตรฐาน ISO 9000 ส่วนข้อกำหนดวิชาการเป็นของใหม่ที่อาจจะไม่คุ้นเคยแต่นับเป็นหัวใจของมาตรฐาน เนื่องจากประกอบด้วยข้อกำหนดต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์ทดสอบ เพื่อให้ได้ผลที่ถูกต้องน่าเชื่อถือทั้งนี้มีการกำหนดไว้ว่าวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์ทดสอบต้องดำเนินการพิสูจน์หรือตรวจสอบความถูกต้อง(validation) ก่อนนำมาใช้วิเคราะห์/ทดสอบตัวอย่างจริงหรือก่อนนำไปปฏิบัติจริง

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทดสอบ⁽³⁾ หมายถึง กระบวนการตรวจสอบที่จัดทำขึ้นเพื่อพิสูจน์ว่าวิธีวิเคราะห์ทดสอบที่ดำเนินการอยู่ในหน่วยงานมีความถูกต้องน่าเชื่อถือและเหมาะสมกับวัตถุประสงค์ที่ตั้งขึ้น การทำการตรวจสอบความถูกต้อง แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ

1. การตรวจสอบความถูกต้องของเครื่องมือ หรือ instrument validation ได้แก่ การตรวจสอบความถูกต้องของเครื่องมือวิเคราะห์ทดสอบต่างๆที่ใช้ เช่น High Performance Liquid Chromatography (HPLC) , Gas Chromatograph (GC) รวมถึงซอฟต์แวร์ (software) ที่ใช้ควบคุมการทำงานของเครื่องด้วย การตรวจสอบความถูกต้องของเครื่องมือนี้จะดำเนินการเมื่อนำเครื่องมือนั้นมาใช้งานทดสอบเป็นครั้งแรกหรือก่อนนำเครื่องที่ผ่านการซ่อมแซมมาใช้งาน รวมถึงการปรับปรุงซอฟต์แวร์(update software) ควบคุมการทำงานของเครื่องมือ

2. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์/ทดสอบ(analysis method validation)เป็นการตรวจสอบความถูกต้องของขั้นตอนหรือวิธีการที่ใช้ทำการวิเคราะห์ทดสอบ การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทดสอบจะดำเนินการเมื่อต้องการพิสูจน์ความถูกต้องและความ

เหมาะสมของวิธีการวิเคราะห์ทดสอบก่อนนำมาใช้งานจริง ซึ่งรายละเอียดจะถูกกำหนดไว้ใน
มาตรฐาน ISO/IEC 17025

การทำการตรวจสอบความถูกต้องมีพารามิเตอร์ (parameter)^{(3) (6) (7)} ที่สำคัญดังนี้

- ความถูกต้อง (accuracy)
- ความแม่นยำ (precision)
- ขีดจำกัดของการตรวจวัด (limit of quantitation , LOQ)
- สภาพเชิงเส้น (linearity)
- Selectivity
- Ruggedness
- Range

ความถูกต้อง หมายถึง การวัดความใกล้เคียงระหว่างค่าที่วัดได้จากการวิเคราะห์ทดสอบ
กับค่ามาตรฐานหรือค่าจริง (true value) วิธีการหาความถูกต้องมีหลายวิธี เช่น

- การใช้สารอ้างอิงมาตรฐาน (standard reference material หรือ certified reference material) ผลวิเคราะห์ที่ได้ต้องอยู่ในช่วงที่กำหนด
- การเติมสารมาตรฐานที่รู้ปริมาณที่แน่นอนลงในตัวอย่างที่รู้ค่า (spiked sample) ที่มี matrix เดียวกับสารตัวอย่างที่วิเคราะห์ทดสอบ ดำเนินการแยกสกัดสารตัวอย่างแล้ววิเคราะห์โดยใช้เครื่องมือและหา % recovery

การหา % recovery ให้เติมสารมาตรฐานลงในตัวอย่างในระดับ 0.5 1 และ 2 เท่าของ
เกณฑ์ที่กำหนดในวิธีวิเคราะห์ทดสอบ แต่ละระดับความเข้มข้นให้ทำอย่างน้อย 6 ครั้ง แล้ว
คำนวณหา % recovery ได้ดังนี้

$$\begin{aligned} \% \text{ recovery} &= 100 \times (C_s - C_A) / C_A^* \\ \text{เมื่อ } C_s &= \text{ค่าความเข้มข้นของ spiked sample} \\ C_A &= \text{ค่าความเข้มข้นของตัวอย่าง} \\ C_A^* &= \text{ความเข้มข้นของสารละลายที่เติมลงในตัวอย่าง} \end{aligned}$$

ค่า recovery ที่ยอมรับได้จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ ความเข้มข้นของ
สาร 100 ppb – 1 ppm % recovery ควรอยู่ระหว่าง 80 – 100%

ความแม่นยำ หมายถึง ความใกล้เคียงกันของผลการทดสอบจากการทำซ้ำหลายๆครั้ง การหาความแม่นยำทำได้โดยการฉีดสารมาตรฐานซ้ำกันอย่างน้อย 6 ครั้ง หลังจากนั้นหาค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานของ retention time และ peak area กรณีแรกจะมีความสำคัญต่อ peak identification ส่วนกรณีหลังจะมีความสำคัญต่อการคำนวณหาปริมาณความแม่นยำเป็นตัวชี้การกระจายของข้อมูล โดยทั่วไปจะแสดง % relative standard deviation(% RSDหรือ % CV)หรือ การผันแปรของข้อมูล ข้อมูลที่มีการกระจายน้อยจะมีความแม่นยำสูง

ความแม่นยำเป็นค่าความแตกต่างระหว่างการวิเคราะห์แต่ละครั้ง จะแสดงโดยค่า standard deviation (SD) ความแม่นยำหรือ precision อาจจะแสดงแทนได้ด้วย repeatability ซึ่งเป็นการวิเคราะห์โดยวิธีเดียวกัน โดยนักวิเคราะห์คนเดียวกัน ส่วน reproducibility เป็นการวิเคราะห์โดยใช้เครื่องมือและห้องปฏิบัติการต่างกัน

$$\% \text{ RSD} = \frac{\text{SD} \times 100}{\bar{X}}$$

SD = standard deviation

\bar{X} = ค่าเฉลี่ย

สำหรับวิธีที่ต้องการความแม่นยำมากควรมี % RSD (% CV) ไม่เกิน 2%

Limit of detection (LOD) เป็นความเข้มข้นต่ำสุดหรือน้อยที่สุดที่สามารถวัดได้ โดยที่ LOD เป็นความเข้มข้นของสารที่ให้สัญญาณเป็น 2 เท่าของ standard deviation ของ blank เหนือค่าสัญญาณเฉลี่ยของ blank ส่วน MDL (method detection limit) เป็นความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ต้องการวิเคราะห์ทดสอบในตัวอย่างที่สามารถตรวจพบได้แต่ไม่ใช่ปริมาณที่วัดได้ เป็นความเข้มข้นสารที่ผ่านกระบวนการทดสอบแล้วให้สัญญาณด้วยความน่าจะเป็นไปได้ 99% การวิเคราะห์ตัวอย่างซ้ำๆ 7 ครั้งจะให้ค่าเป็น 3.14 ของ standard deviation ของ blank เหนือค่าสัญญาณเฉลี่ยของ blank

Limit of quantitation (LOQ) หรือ limit of report (LOR) คือ ปริมาณสารมาตรฐานที่ให้ response ประมาณ 10-20 เท่า ของ baseline noise ซึ่งจำกัดของการตรวจวัด หมายถึง ความเข้มข้นระดับต่ำสุดของสารที่ต้องการวิเคราะห์ในตัวอย่างด้วยวิธีวิเคราะห์ที่กำหนด โดยที่อุปกรณ์หรือเครื่องมือสามารถวิเคราะห์ได้และได้ค่าที่มีความถูกต้อง แม่นยำและ linearity ที่ยอมรับได้

ตามกำหนด detection limit ของอุปกรณ์ chromatography คือปริมาณสารมาตรฐานที่ให้ response เป็น 2 เท่าของ baseline noise

การหา LOQ ⁽⁹⁾ ให้ทำ method blank 3 ซ้ำ แล้วนำไปวิเคราะห์หาค่าอย่างน้อย 10 ค่า หาค่า SD หรือทำ spiked sample ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง วิเคราะห์หาค่าที่ต้องการ ความเข้มข้นละอย่างน้อย 10 ค่า plot graph หาค่า SD₀

$$\text{LOQ} = 10 \text{ SD}_0$$

$$\text{LOD} = 3 \text{ SD}_0$$

Linearity หมายถึง ค่าที่แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นและ response แสดงว่าค่าที่วิเคราะห์ได้โดยวิธีนั้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณที่มีอยู่จริง การหา linearity ทำได้โดยฉีดมาตรฐานที่มีความเข้มข้นระหว่าง 50-150% ของช่วงใช้งานอย่างน้อย 3 ค่า คำนวณ correlation coefficient วิธีวิเคราะห์ที่ดีควรมีค่า correlation coefficient มากกว่า 0.995 การแสดง linearity ควรระบุค่า range ควบคุมไปด้วย เพื่อให้ทราบว่าวิธีวิเคราะห์นี้ใช้ได้ผลดีในช่วงความเข้มข้นระดับใด

Selectivity หมายถึง ความสามารถในการแยก response (peak) ของสิ่งที่ต้องการ วิเคราะห์ออกจาก response ของ impurity อื่นๆ สำหรับ selectivity ในทาง chromatography หมายถึง การเลือกใช้ column และสภาวะต่างๆ เช่น อุณหภูมิ detector wave length และ mobile phase ที่เหมาะสม เพื่อให้เกิดการแยกที่ดีที่สุด

Ruggedness หมายถึง ความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะของการทดสอบ เช่น flow rate อุณหภูมิของ column wave length หรือ mobile phase การมีการเปลี่ยนแปลงพารามิเตอร์เหล่านี้แล้วยังทำให้ผลการทดสอบมีความถูกต้องและแม่นยำตามที่กำหนด แสดงว่า อุปกรณ์หรือวิธีดังกล่าวยังอยู่ใน ruggedness สิ่งที่นักวิเคราะห์ทดสอบต้องการมากที่สุด คือ ข้อมูลที่ได้ต้องมีความถูกต้องและแม่นยำ

Range ของวิธีวิเคราะห์ คือ ระดับต่ำสุดและระดับสูงสุดของสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่ยังให้ผลถูกต้อง แม่นยำและ linearity อยู่ในช่วงที่กำหนด

วิธีทดสอบ (test method) ⁽¹⁾

วิธีทดสอบที่ห้องปฏิบัติการใช้มีดังนี้

- วิธีมาตรฐานระดับระหว่างประเทศหรือระดับประเทศ

- วิธีมาตรฐานของชาติหรือจากเอกสารสิ่งตีพิมพ์ขององค์การทางวิชาการที่มีชื่อเสียงและเป็นที่ยอมรับ เอกสารหรือวารสารทางวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวข้อง
- วิธีที่ระบุโดยผู้ผลิตเครื่องมือ (manufacturer)
- วิธีที่ดัดแปลงจากวิธีมาตรฐาน (modified method) หรือ in-house method
- วิธีที่ห้องปฏิบัติการพัฒนาขึ้นเอง (in-house method)

หลักการเลือกวิธีทดสอบ มีดังนี้

- เป็นวิธีที่ยอมรับโดยองค์การระดับนานาชาติ
- เป็นวิธีที่มีการจัดทำเป็นเอกสาร เชื่อถือได้เนื่องจากได้ผ่านการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีแล้วโดยห้องปฏิบัติการต่างๆที่เข้าร่วมในการจัดทำวิธีทดสอบ
- เป็นวิธีที่เหมาะสมเนื่องจากมีการทดสอบหรือตรวจสอบความถูกต้องของวิธีที่ครอบคลุมช่วงการใช้งาน (concentration range) และสามารถใช้ได้กับตัวอย่างชนิดต่างๆ
- เป็นที่นิยมใช้ทั่วไป
- รวดเร็ว ง่ายและเสียค่าใช้จ่ายน้อย

วิธีวิเคราะห์/ทดสอบที่ควรจะทำ การตรวจสอบความถูกต้องของวิธี คือ

- วิธีใหม่
- วิธีที่ได้รับการปรับปรุงหรือพัฒนาขึ้น
- เมื่อผลการควบคุมคุณภาพแสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์/ทดสอบที่ดำเนินการอยู่มีการเปลี่ยนแปลง
- วิธีวิเคราะห์/ทดสอบที่ใช้ในห้องปฏิบัติการที่ต่างกันหรือวิเคราะห์โดยผู้วิเคราะห์คนละคนหรือเครื่องมือต่างกัน
- การเปรียบเทียบวิธีใหม่และวิธีมาตรฐานว่าเหมือนกันหรือให้ค่าใกล้เคียงกัน

Chromatography เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกสารต่างๆออกจากกัน โดยอาศัยการกระจายตัวของสารระหว่าง phase 2 phase โดยที่ phase หนึ่งจะเคลื่อนที่ (mobile phase) ผ่านอีก phase หนึ่ง (stationary phase) เครื่องมือที่ใช้หลักการดังกล่าวในการวิเคราะห์สาร คือ HPLC และ GC

เครื่องมือขั้นพื้นฐาน

Chromatograph ประกอบด้วย ส่วนฉีดตัวอย่าง (injection) ตู้อบที่มีคอลัมน์บรรจุอยู่ (column oven) ซึ่งเป็นส่วนที่สารถูกแยกออกจากกัน ส่วนตรวจวัด (detector) และระบบบันทึกและประมวลผล (data processing system)

Gas Chromatograph เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการแยกสารที่อยู่ในสถานะแก๊ส โดยมี mobile phase เป็นแก๊ส สารที่วิเคราะห์ต้องอยู่ในสภาพแก๊สหรือเป็นไอและถูกพาโดย carrier gas (mobile phase) ให้ไหลไปตามคอลัมน์ (stationary phase) ทำให้เกิดการแยกของสารออกจากกัน ไหลเข้าสู่เครื่องตรวจวัด เข้าระบบบันทึกและประมวลผล แสดงผลของปริมาณสาร

การวิเคราะห์คอเลสเทอรอลในอาหารได้มีการศึกษาทดลองและใช้วิธีวิเคราะห์มากมายเช่น การสกัดด้วยตัวทำละลายที่เป็นสารอินทรีย์ สารที่สกัดได้จะถูกแยกด้วยวิธี Thin-layer chromatography และวิเคราะห์ด้วยวิธีต่างๆ เช่น สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ Liquid Chromatograph, Gas Chromatograph และการใช้เอนไซม์ วิธีวิเคราะห์ในสมัยแรกไม่มีขั้นตอนสะaponนิฟิเคชัน (saponification) ดังนั้นคอเลสเทอรอลเอสเทอร์และคอเลสเทอรอลอิสระที่มีอยู่ตามธรรมชาติจะถูกแยกออกมาขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการศึกษาทดลองว่าต้องการจะวิเคราะห์คอเลสเทอรอลเอสเทอร์หรือคอเลสเทอรอลอิสระหรือทั้งสองชนิด วิธีวิเคราะห์ในปัจจุบันได้เพิ่มขั้นตอนสะaponนิฟิเคชันก่อนการแยกสกัด ดังนั้นคอเลสเทอรอลเอสเทอร์ถูกไฮโดรไลซ์ระหว่างสะaponนิฟิเคชันเป็นคอเลสเทอรอลอิสระ สกัดแยกคอเลสเทอรอลทั้งหมดด้วยสารละลายอินทรีย์ซ้ำๆหลายครั้งหรือใช้วิธีผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟี การแยกสกัดต้องทำที่ละตัวอย่าง จึงใช้เวลามาก

วิธีวิเคราะห์คอเลสเทอรอลตาม AOAC Official Method (1995) ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณคอเลสเทอรอลในอาหาร เตรียมตัวอย่างโดยใช้วิธีสะaponนิฟิเคชันโดยการรีฟลักซ์และแยกสกัดคอเลสเทอรอลด้วย toluene โดยใช้กรวยแยก ซึ่งใช้สารละลายจำนวนมากและการเตรียมอุปกรณ์ยุ่งยาก ละเอียด ละเอียด เติร์เจอร์ไทเซชัน (derivatization) และใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีในการวิเคราะห์ปริมาณคอเลสเทอรอล กลุ่มงานเทคโนโลยีอาหาร 1 กองวิทยาศาสตร์ชีวภาพได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์คอเลสเทอรอลโดยวิธีสะaponนิฟิเคชันในหลอดแก้วทดลอง (direct saponification) และแยกสกัดคอเลสเทอรอลในหลอดแก้วด้วยเอ็น-เฮกเซน ละเอียด เติร์เจอร์ไทเซชันและหาปริมาณคอเลสเทอรอลโดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการ

1. ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาทดลอง

1.1 นม

1.2 ผลิตภัณฑ์นม

ตัวอย่างที่ทำการศึกษาดทดลองเป็นตัวอย่างของบริษัทเอกชนที่มีจำหน่ายในท้องตลาด

2. วิธีการ

2.1 สารเคมี

2.1.1 คอเลสเตอรอล (cholesterol)

ความบริสุทธิ์ไม่น้อยกว่า 99% ของบริษัท Sigma Chemical ใช้เป็น
สารมาตรฐาน

2.1.2 5 แอลฟา คอเลสเทน (5 α cholestane)

ความบริสุทธิ์ไม่น้อยกว่า 99% ของบริษัท Sigma Chemical ใช้เป็น
สารมาตรฐานภายใน

2.1.3 เฮกซะเมทิลไดซิลิแซน {hexamethyldisilazane (HMDS)}

ตามความบริสุทธิ์ของบริษัท Sigma Chemical

2.1.4 ไตรเมทิลคลอโรซิลิเลน {trimethylchlorosilane (TMCS)}

ตามความบริสุทธิ์ของบริษัท Sigma Chemical

2.1.5 ไดเมทิลฟอร์มามายด์ {n, n dimethylformamide (DMF)}

ความบริสุทธิ์ไม่น้อยกว่า 99.9% ของบริษัท Merck

2.1.6 โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (potassium hydroxide)

ชั้นคุณภาพวิเคราะห์ของบริษัท Merck

2.1.7 เอทานอล (ethanol) หรือแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ 95 ดีกรี

ของโรงงานสุราอยุธยา

2.1.8 เฮกซะน (n-hexane)

ชั้นคุณภาพวิเคราะห์ของบริษัท Merck

2.1.9 เอ็น-เฮปเทน (n-heptane)

ชั้นคุณภาพแก๊สโครมาโตกราฟของบริษัท Merck

2.1.10 ไสลอน ซีที (sylon CT) หรือ 5% ไดเมทิลไดคลอโรซิลีน (dimethyldichlorosilane (DMDCS)) ในโทลูอิน

ตามความบริสุทธิ์ของบริษัท Supelco

2.1.11 โทลูอิน (toluene)

ชั้นคุณภาพวิเคราะห์ของบริษัท Merck

2.1.12 เมทานอล (methanol)

ชั้นคุณภาพวิเคราะห์ของบริษัท Merck

2.1.13 สารมาตรฐานอ้างอิง (standard reference material), SRM 1563-2 ของ National Institute of Standard and Technology (NIST) ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.2 สารละลายที่ใช้ในการศึกษาทดลอง

2.2.1 สารละลายมาตรฐานคอเลสเทอรอล

2.2.1.1 Stock solution ของสารมาตรฐานคอเลสเทอรอล (1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ละลายสารมาตรฐานคอเลสเทอรอล 0.025 กรัม ด้วย DMF ในขวดแก้วปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย DMF

2.2.1.2 Working solution ของสารมาตรฐานคอเลสเทอรอล ละลาย stock solution (ข้อ 2.2.1.1) ให้ได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 0.01-0.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ได้แก่ 0.01 0.05 0.1 และ 0.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) โดยปิเปตต์ stock solution ของสารมาตรฐานคอเลสเทอรอล (ข้อ 2.2.1.1) 1 มิลลิลิตร ลงในขวดแก้วปริมาตรขนาด 10 และ 100 มิลลิลิตร ตามลำดับ และปรับปริมาตรด้วย DMF จะได้สารละลายมาตรฐานคอเลสเทอรอลเข้มข้น 0.1 และ 0.01 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ปิเปตต์ stock solution ของสารมาตรฐานคอเลสเทอรอล (ข้อ 2.2.1.1) 2 และ 5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดแก้วปริมาตรขนาด 10 และ 100 มิลลิลิตร ตามลำดับ และปรับปริมาตรด้วย DMF

จะได้สารละลายมาตรฐานคอเลสเทอรอลเข้มข้น 0.2 และ 0.05 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

2.2.2 สารละลายมาตรฐานภายในคอเลสเทน

2.2.2.1 Stock solution ของสารมาตรฐานภายในคอเลสเทน (1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ละลายสารมาตรฐานภายในคอเลสเทน 0.050 กรัมด้วย เอ็น-เฮปแทนในขวดแก้วปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย เอ็น-เฮปแทน

2.2.2.2 Working solution ของสารมาตรฐานภายในคอเลสเทน บีเบตต์ stock solution ของสารมาตรฐานภายใน (ข้อ 2.2.2.1) 5 มิลลิลิตร ลงในขวดแก้วปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย เอ็น-เฮปแทน ได้สารละลายมาตรฐานภายในคอเลสเทนเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

2.2.3 สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 50

ละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 500 กรัม ด้วยน้ำกลั่นในขวดแก้วปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

2.3 เครื่องมือและอุปกรณ์

2.3.1 เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas Chromatograph, GC) ยี่ห้อ Hewlett Packard รุ่น 6890 plus ใช้เครื่องตรวจวัดแบบเปลวไฟไอออไนเซชัน (flame ionization detector, FID)

2.3.2 ตู้อบไฟฟ้า

2.3.3 เครื่องอ่างน้ำ (water bath)

2.3.4 แท่นควบคุมอุณหภูมิ (heating block)

2.3.5 เครื่องชั่งชนิดละเอียด ยี่ห้อ Sartorius ชั่งได้ละเอียด 0.0001 กรัม

2.3.6 เครื่องระเหยแห้งสุญญากาศ (vacuum evaporator)

2.3.7 เครื่องเขย่า (vortex)

2.3.8 ขวดแก้วระเหยแห้ง (evaporating flask) ก้านกลม ขนาด 100 มิลลิลิตร

2.3.9 บีเบตต์แบบอ่านออกเป็นตัวเลข (pipettor)

- 2.3.10 เครื่องแก้ว เช่น ขวดแก้วปริมาตร (volumetric flask) หลอดแก้วมีฝาเกลียว ปิเปตต์ บีกเกอร์
- 2.3.11 แก๊สไนโตรเจน ยูเอชพีเกรด ความบริสุทธิ์ 99.999% ของบริษัท ไทยอินดัสเตรียลแก๊ส จำกัด (มหาชน)
- 2.3.12 อากาศอัด (air zero) ตามความบริสุทธิ์ของบริษัท ไทยอินดัสเตรียลแก๊ส จำกัด (มหาชน)
- 2.3.13 เครื่องผลิตแก๊สไฮโดรเจน (hydrogen generator) ยี่ห้อ Peak Scientific รุ่น HG 1200

2.4 วิธีซิลานไนซ์หลอดแก้ว (silanized test tube)

- 2.4.1 เคลือบผิวของหลอดแก้วทดลองที่มีฝาเกลียวขนาด 15x150 มิลลิลิตร ด้วย ไสลอน ซีที 10-15 วินาที เติมน้ำละลายทิ้ง
- 2.4.2 ล้างด้วยโทลูอิน 2 ครั้ง
- 2.4.3 ล้างด้วยเมทานอล จนกระทั่ง pH เป็นกลาง
- 2.4.4 ทำให้แห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน หรือตู้อบไฟฟ้า

2.5 วิธีเคราะห์หาปริมาณคอเลสเทอรอล⁽²⁾⁽⁵⁾

- 2.5.1 ชั่งตัวอย่าง 0.3-1.8 กรัม ในหลอดแก้วทดลองที่มีฝาเกลียว ขนาด 20x150 มิลลิเมตร
- 2.5.2 เติมน้ำละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (ข้อ 2.2.3) 1 มิลลิลิตรและเอทานอล 4 มิลลิลิตรทำให้ร้อนด้วยแท่นให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นเติมน้ำ 2.5 มิลลิลิตร
- 2.5.3 สกัดด้วยเอ็น-เฮกเซน 5 มิลลิลิตร 4 ครั้ง รวบรวมสารที่สกัดได้ในขวดระเหยแห้งและนำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศ
- 2.5.4 ละลายสารที่แห้ง (ข้อ 2.5.3) ด้วยไดเมทิลฟอร์มาไมด์ 3 มิลลิลิตร ปิเปตต์ 1 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดแก้วที่ผ่านการซิลานไนซ์แล้ว (ตามข้อ 2.4) เติมน้ำ HMDS 0.2 มิลลิลิตร และ TMCS 0.1 มิลลิลิตร ปิดจุก เขย่าอย่างแรงด้วยเครื่องเขย่า (vortex) เป็นเวลา 30 วินาที ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที เติมน้ำ

ละลายมาตรฐานภายในคอเลสเทน 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ข้อ 2.2.2.2) จำนวน 1 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรง ตั้งทิ้งไว้ ถ่ายชั้นเฮปแทนลงในขวดแก้วขนาดเล็กที่มีฝาปิดสนิท (vial) ขนาด 2 มิลลิลิตร

2.5.5 ฉีดสารที่ได้ (ข้อ 2.5.4) 1 ไมโครลิตร เข้าเครื่อง GC ลักษณะโครมาโตแกรมที่ได้ดังแสดงไว้ใน ภาคผนวก

สภาวะของเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟที่ใช้

อุณหภูมิตู้อบคอลัมน์

190 องศาเซลเซียส ตั้งไว้ 2 นาที

เพิ่มอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสต่อนาทีให้ได้อุณหภูมิ 230

องศาเซลเซียส ตั้งไว้ 3 นาที

เพิ่มอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสต่อนาทีให้ได้อุณหภูมิ 255

องศาเซลเซียส ตั้งไว้ 25 นาที

อุณหภูมิส่วนฉีดสาร (injector) 250 องศาเซลเซียส

Split ratio 50:1

Split flow 30 มิลลิลิตร/นาที

แก๊สพา (carrier gas) ไฮโดรเจน

อัตราไหล (flow rate) 2.0 มิลลิลิตร/นาที

Combined flow 30 มิลลิลิตร/นาที

(constant column + auxilliary make-up gas)

อุณหภูมิเครื่องตรวจวัดชนิด FID 300 องศาเซลเซียส

ไฮโดรเจน 40 มิลลิลิตร/นาที

อากาศอัด 400 มิลลิลิตร/นาที

เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ 32.70 นาที

Capillary column

HP-5 {(5%-phenyl)-methylpolysiloxane}}

ความยาว 30 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.32 มิลลิเมตร ความหนา 0.25 ไมโครเมตร

2.5.6 กราฟมาตรฐาน

ปิเปตต์สารละลายมาตรฐานคอเลสเทอรอล (ข้อ 2.2.1.2) ความเข้มข้น 0.01 0.05 0.1 และ 0.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดแก้วที่ผ่านการสिलाไนซ์แล้ว (ข้อ 2.4) ตามลำดับ และทำตามข้อ 2.5.4. และ 2.5.5 (หลังข้อความเติม HMDS 0.2 มิลลิลิตรเป็นต้นไป) สร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve)

2.5.7 การคำนวณ

คอเลสเทอรอล มิลลิกรัม/100กรัม = $\frac{\text{ค่าที่ได้จากกราฟ} \times \text{ปริมาณ DMF ที่ใช้} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$

2.6 การทดสอบความถูกต้องของวิธี

2.6.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานคอเลสเทอรอลและตัวอย่างสารละลายนม (sample blank)

2.6.1.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานคอเลสเทอรอล ความเข้มข้น 0.01 0.02 0.05 0.1 0.2 0.3 และ 0.6 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

2.6.1.1.1 สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 0.01 0.05 0.1 และ 0.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เตรียมตาม ข้อ 2.2.1 เพื่อทำกราฟมาตรฐานและหา linearity (ข้อ 2.6.2.1)

2.6.1.1.2 สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 0.02 0.3 และ 0.6 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เพื่อทำ %recovery MDL และ LOQ (ข้อ 2.6.2.5 และ 2.6.2.6) เตรียมดังนี้

- ชั่งสารมาตรฐานคอเลสเทอรอล 0.0200 กรัมในขวดแก้วปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (DMF) ได้สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปิเปตต์สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 5

มิลลิลิตร ใส่ในขวดแก้วปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย DMF ได้สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

- ชั่งสารมาตรฐานคอเลสเทอรอล 0.0300 กรัม ในขวดแก้วปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย DMF ได้สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
- ชั่งสารมาตรฐานคอเลสเทอรอล 0.0600 กรัม ในขวดแก้วปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย DMF ได้สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 0.6 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

2.6.1.2 เตรียมตัวอย่างสารละลายนม (ใช้นมผงขาดมันเนยชนิดละลายได้ทันที)

2.6.1.2.1 เตรียมตัวอย่างความเข้มข้นร้อยละ 15 (sample blank)

ให้มีปริมาณมากพอที่จะทำการวิเคราะห์ได้อย่างน้อย 40 หลอดทดลอง (หลอดทดลองละ 1 มิลลิลิตร) โดยชั่งนมผง 30 กรัม ถ่ายใส่ขวดแก้วปริมาตรขนาด 200 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นประมาณ 150 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่า ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

2.6.1.2.2 Spiked standard solutions ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ ต่ำ กลาง สูง ลงในตัวอย่าง sample blank (รวมความเข้มข้นทั้งหมดในแต่ละตัวอย่างต้องอยู่ในช่วงของกราฟมาตรฐาน

- เติมความเข้มข้น 0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 10 หลอดทดลอง (sample blank)

- เติมความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 10 หลอดทดลอง (spiked sample ความเข้มข้นต่ำ)
- เติมความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 10 หลอดทดลอง (spiked sample ความเข้มข้นกลาง)
- เติมความเข้มข้น 0.6 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 10 หลอดทดลอง (spiked sample ความเข้มข้นสูง)

2.6.1.2.3 วิเคราะห์ตัวอย่างตาม ข้อ 2.5

2.6.2 การวัดและการคำนวณ

2.6.2.1 ทดสอบหาคอเลสเตอรอลของสารละลายมาตรฐานคอเลสเตอรอล

(2.6.1.1.1) ตามข้อ 2.5.6 สร้างกราฟมาตรฐาน หา linearity ค่า R square ต้องมากกว่าหรือเท่ากับ 0.995

2.6.2.2 ทดสอบหาคอเลสเตอรอลในสารมาตรฐานอ้างอิง(SRM) จำนวน 6

หลอดทดลองตามข้อ 2.5 เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของวิธีหาค่า
 $\% \text{ relative accuracy} = (\text{ค่าที่วัดได้} / \text{ค่ารับรอง}) \times 100$

ซึ่งค่า $\% \text{ relative accuracy}$ ต้องอยู่ในช่วง 90–110%

2.6.2.3 วิเคราะห์ตัวอย่างนมผง 1 ตัวอย่าง วิเคราะห์หาคอเลสเตอรอล

ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ 7 ครั้ง (repeatability) ตามข้อ 2.5
 หาค่า $\% \text{RSD}$

$$\% \text{ RSD} = (SD / \bar{X}) \times 100$$

SD เป็นค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน

\bar{X} เป็นค่าความเข้มข้นเฉลี่ย

$$\% \text{ RSD} \text{ ต้องมีค่า } \leq 10\%$$

2.6.2.4 วิเคราะห์ตัวอย่างสารละลายมาตรฐาน 0.01 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

จำนวน 7 หลอดทดลอง ตามข้อ 2.5 หาค่า signal to noise ratio

ของตัวอย่างโดยที่ค่า signal to noise ratio ≤ 3 แสดงค่า IDL (instrument detection limit) ของเครื่องมือวิเคราะห์

2.6.2.5 วิเคราะห์ตัวอย่าง sample blank และ spiked sample ความเข้มข้น สูง กลาง ต่ำ ตามลำดับ ทำตาม ข้อ 2.5 คำนวณ % recovery ต้องอยู่ในช่วงที่กำหนด 75-110 %

$$\% \text{ recovery} = \frac{\{[(\text{สารตัวอย่าง}) + (\text{สารมาตรฐานที่เติม})] - (\text{สารตัวอย่าง})\} \times 100}{\text{สารมาตรฐานที่เติม}}$$

2.6.2.6 รวบรวมค่าผลการวิเคราะห์คอเลสเทอรอล ความเข้มข้น สูง กลาง ต่ำ (ข้อ 2.6.2.5) หาค่า standard deviation(SD) ของแต่ละความเข้มข้น หาค่า MDL (method detection limit) ตามวิธีของ John Keenan Taylor⁽⁹⁾ สร้างกราฟระหว่างค่าความเข้มข้นและ SD ของแต่ละความเข้มข้น โดยมีแกน X เป็นค่าความเข้มข้นและแกน Y เป็นค่า SD ลากเส้นต่อไปตัดแกน Y เพื่อหาค่า SD_0

$$\text{MDL} = 3 \text{ เท่าของ } SD_0$$

$$\text{LOQ} = 10 \text{ เท่าของ } SD_0$$

2.6.2.7 Control chart

2.6.2.7.1 วิเคราะห์คอเลสเทอรอลใน control sample จำนวน 10 ครั้ง ตามข้อ 2.5

2.6.2.7.2 หาค่าคอเลสเทอรอลเฉลี่ยและ SD

2.6.2.7.3 ทำ control chart โดยสร้างกราฟให้แกน Y เป็นค่าความเข้มข้นของคอเลสเทอรอล มีหน่วยเป็น มิลลิกรัม/100 กรัม แกน X เป็นแกนเวลาในช่วง 1ปี ตั้งแต่เดือน มกราคม-ธันวาคม

2.6.2.7.4 ใช้ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นคอเลสเทอรอลเป็นคึ่งกลางของกราฟแล้วลากเส้นกึ่งกลางนี้

2.6.2.7.5 นำค่าความเข้มข้นเฉลี่ยบวกด้วยค่า 2 เท่าของ SD ใช้เป็นตัวเลขสำหรับแนวเส้นระดับควบคุม upper control limit (UCL) ลากเส้นนี้บนกราฟ

2.6.2.7.6 นำค่าความเข้มข้นเฉลี่ยลบด้วยค่า 2 เท่าของ SD ใช้เป็นตัวเลขสำหรับแนวเส้นระดับควบคุม lower control limit (LCL) ลากเส้นนี้บนกราฟ

2.6.2.7.7 วิเคราะห์และแปลผล

ค่าคอเลสเตอรอลของ control sample ต้องอยู่ระหว่าง UCL และ LCL ถ้าวิเคราะห์ control sample แล้วได้ค่าเหนือเส้น UCL หรือต่ำกว่า LCL ให้ทำการวิเคราะห์ใหม่

2.7 ทดสอบหาปริมาณคอเลสเตอรอลในตัวอย่างนมและผลิตภัณฑ์นม

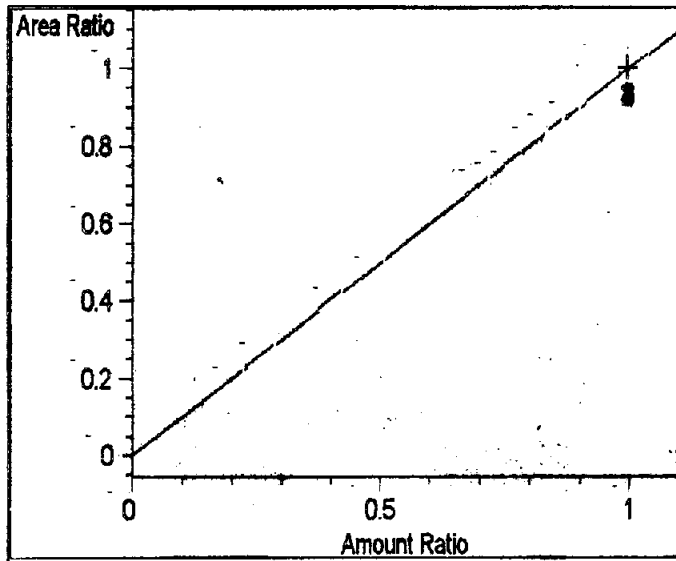
ชั่งตัวอย่างนมหรือผลิตภัณฑ์นมที่เป็นของเหลวและผง 0.3-1.8 กรัม ลงในหลอดแก้วทดลอง ดำเนินการตามวิธีข้อ 2.5

ผลการศึกษาทดลอง

1. จากการทำกราฟมาตรฐานของคอเลสเทอรอล แสดงผลไว้ในรูปที่ 1 ได้ค่า correlation coefficient 0.99943
2. จากการวิเคราะห์ %relative accuracy ของสารมาตรฐานอ้างอิงคอเลสเทอรอล (SRM 1563-2, จาก National Institute of Standard and Technology (NIST) , ประเทศสหรัฐอเมริกา) ได้แสดงผลการวิเคราะห์ไว้ในตารางที่ 1
3. จากการวิเคราะห์ค่า precision ของวิธีวิเคราะห์คอเลสเทอรอล ได้แสดงผลการวิเคราะห์ไว้ในตารางที่ 2
4. จากการวิเคราะห์ค่า instrument detection limit ของเครื่อง GC แสดงผลไว้ในตารางที่ 3
5. จากการวิเคราะห์หา %recovery ของ spiked sample ได้แสดงผลไว้ในตารางที่ 4
6. จากการวิเคราะห์ ค่า MDL และ LOQ ได้แสดงผลไว้ในตารางที่ 5 และรูปที่ 2
7. จากการทำ control chart ของคอเลสเทอรอล แสดงผลไว้ในตารางที่ 6 และ รูปที่ 3
8. จากการวิเคราะห์หาปริมาณคอเลสเทอรอลในนมและผลิตภัณฑ์นมที่เป็นของเหลวและผง แสดงผลการวิเคราะห์ไว้ในตารางที่ 7 และ 8 ตามลำดับ

รูปที่ 1 แสดงกราฟมาตรฐานของคอเลสเทอรอล

Calibration Curves



cholestane at exp. RT: 13.963

FID1 A,

Correlation: 1.00000

Residual Std. Dev. 0.00000

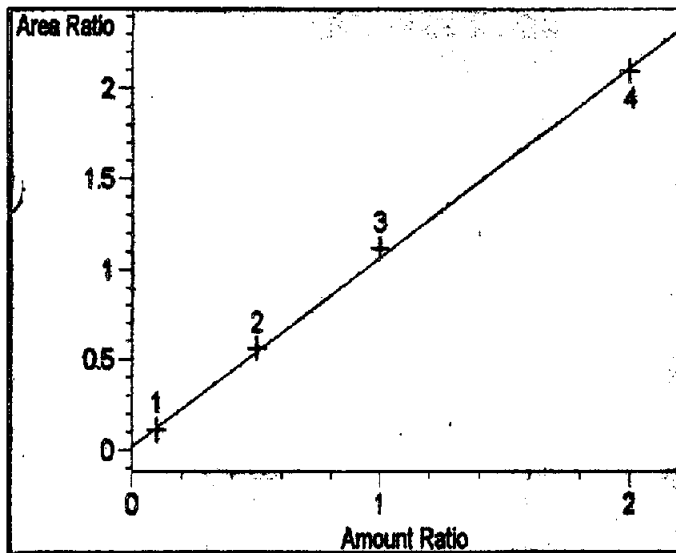
Formula: $Y = mx + b$

m: 1.00000

b: 0.00000

x: Amount Ratio

Y: Area Ration



cholesterol at exp. RT: 22.239

FID1 A,

Correlation: 0.99943

Residual Std. Dev. 0.03339

Formula: $Y = mx + b$

m: 1.04727

b: 1.94368e-2

x: Amount Ratio

Y: Area Ration

ตารางที่ 1 แสดงผลการหา % relative accuracy ของสารมาตรฐาน
อ้างอิงคอเลสเทอรอล (SRM 1563-2,NIST)

ตัวอย่างที่	น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)	คอเลสเทอรอล มิลลิกรัม/100 กรัม	% Relative accuracy
1	0.3035	63.48	99.50
2	0.3035	59.23	92.84
3	0.4501	62.88	98.56
4	0.3316	59.09	92.62
5	0.3499	57.55	90.20
6	0.3080	58.97	92.43
Mean		60.20	94.36
SD		2.39	
%RSD		3.97	

% Relative accuracy = 90.2-99.5% (เฉลี่ย 94.36 %) อยู่ในเกณฑ์กำหนด (90-110%)

ตารางที่ 2 แสดงผล precision ของวิธีวิเคราะห์คอเลสเตอรอล

Repeatability	Amt/Area ratio	Cholesterol	
		(mg/ml)	(mg/100g)
1	0.938386	0.105678	68.16
2	0.938414	0.105862	68.28
3	0.938504	0.106456	68.67
4	0.938009	0.103275	66.61
5	0.937975	0.103062	66.48
6	0.938101	0.103851	66.99
7	0.938027	0.103387	66.69
Mean	0.938202	0.104510	67.41
SD	0.000223	0.001432	0.9234
%RSD	0.024	1.37	1.37

หมายเหตุ น้ำหนักตัวอย่าง = 0.4651 กรัม

Precision ของการวัดแสดงค่าของ %RSD ของปริมาณคอเลสเตอรอล (มิลลิกรัม/100กรัม)
=1.37 มีค่าน้อยกว่า 10% ซึ่งอยู่ในเกณฑ์กำหนด

ตารางที่ 3 แสดงผล limit of detection หรือ instrument detection limit ของเครื่อง GC

สารมาตรฐานคอเลสเทอรอล 0.01 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	Signal to noise ratio
1	3.0
2	2.3
3	2.9
4	2.2
5	2.1
6	2.7
7	2.6

สารมาตรฐานความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ได้ค่า signal to noise ratio 2.1-3.0 แสดงว่า limit of detection หรือ instrument detection limit ของเครื่อง GC มีค่า 0.01 มิลลิกรัม

ตารางที่ 4 แสดงผล % recovery ของ spiked sample ของคอเลสเทอรอลที่ระดับความเข้มข้น ต่ำ กลาง สูง

ตัวอย่างที่	คอเลสเทอรอลความเข้มข้นต่ำ		% Recovery	คอเลสเทอรอลความเข้มข้นกลาง		% Recovery	คอเลสเทอรอลความเข้มข้นสูง		% Recovery
	ที่เติม (spiked) มก./100ก.	ที่พบ(recovery) มก./100ก.		ที่เติม (spiked) มก./100ก.	ที่พบ(recovery) มก./100ก.		ที่เติม (spiked) มก./100ก.	ที่พบ(recovery) มก./100ก.	
1	3.70	3.83	103.5	56.9	58.8	103.3	114.4	113.0	98.8
2	3.75	3.28	87.5	56.6	58.0	102.4	111.5	110.8	99.4
3	3.81	3.48	91.3	57.1	57.3	100.4	113.1	113.4	100.3
4	3.82	3.33	87.2	57.3	59.0	103.0	114.1	112.7	98.8
5	3.74	3.84	102.7	56.1	58.6	104.5	115.5	113.6	98.4
6	3.82	3.80	99.5	55.4	57.4	103.6	112.8	110.9	98.3
7	3.69	3.52	95.4	57.5	57.4	99.8	116.0	112.8	97.2
8	3.78	3.57	94.4	56.4	58.3	103.4	116.5	113.6	97.5
9	3.74	3.93	105.1	56.2	58.8	104.6	114.4	111.6	97.5
10	3.76	3.46	92.0	56.8	57.9	101.9	114.4	112.4	98.3
Mean			95.9			102.7			98.5

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยของคอเลสเทอรอลใน sample blank = 2.72 มิลลิกรัม/100 กรัม

% Recovery ที่ระดับความเข้มข้นต่ำมีค่า 87.2-105.1 (เฉลี่ย 95.9) ระดับความเข้มข้นกลางมีค่า 99.8-104.6 (เฉลี่ย 102.7) และระดับความเข้มข้นสูงมีค่า 97.2-100.3 (เฉลี่ย 98.5) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์กำหนด* (75-110%)

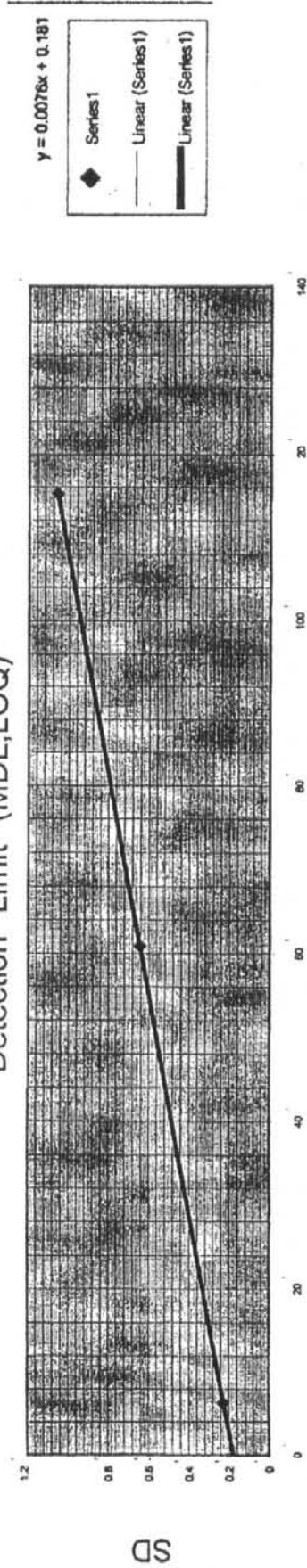
* NATA Technical Note 23

ตารางที่ 5 แสดงค่าของคอเลสเทอรอลที่ได้จาก spiked sample ระดับความเข้มข้น ต่ำ กลาง สูง เพื่อหา MDL และ LOQ

ตัวอย่าง	คอเลสเทอรอล (ความเข้มข้นต่ำ) มิลลิกรัม/100กรัม	คอเลสเทอรอล (ความเข้มข้นกลาง) มิลลิกรัม/100กรัม	คอเลสเทอรอล (ความเข้มข้นสูง) มิลลิกรัม/100กรัม
1	6.55	61.5	115.7
2	6.00	60.7	113.5
3	6.20	60.0	116.1
4	6.05	61.7	115.4
5	6.56	61.3	116.4
6	6.52	60.1	113.6
7	6.24	60.1	115.5
8	6.29	61.0	116.3
9	6.65	61.5	114.3
10	6.18	60.6	115.1
Mean	6.32	60.85	115.19
SD	0.2299	0.6433	1.0598

รูปที่ 2 แสดงกราฟของค่าคอเลสเตอรอลที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง สูง เพื่อหาค่า SD₀

Detection Limit (MDL, LOQ)



Cholesterol mg/100g.

จากกราฟ ระหว่างความเข้มข้นของคอเลสเตอรอลระดับต่ำ กลาง สูง กับ SD ของค่ามัน เมื่อลากเส้นกราฟมาตัดแกน Y ได้ค่า SD₀ = 0.181

MDL = 3SD₀ = 3x0.181 = 0.543

LOQ = 10SD₀ = 10x0.181 = 1.81

MDL มีค่า 0.543 มก./100ก.

LOQ มีค่า 1.81 มก./100ก.

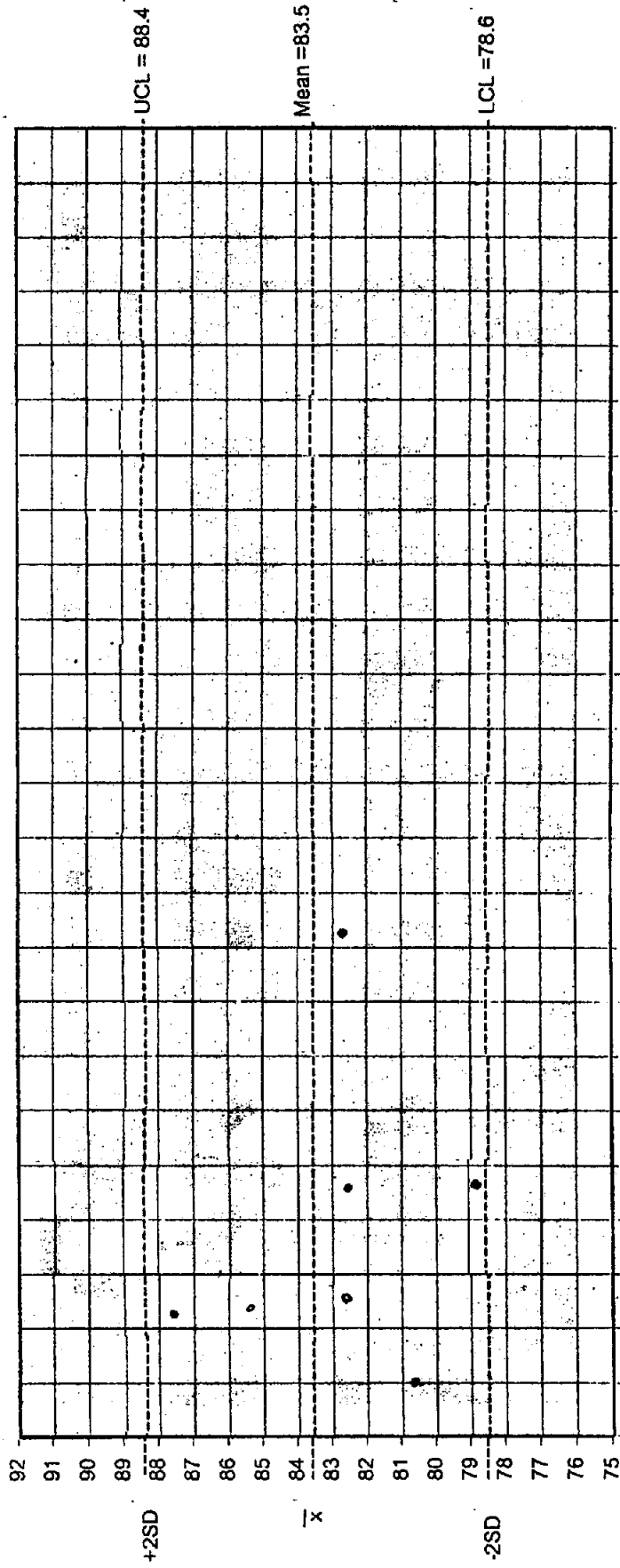
ค่าคอเลสเตอรอลที่วิเคราะห์ได้ มก./100ก.	ค่าคอเลสเตอรอลที่ได้จากสมการ(ค่าทฤษฎี) มก./100ก.	%Relative error	%Relative accuracy
6.32	6.43	-1.71	98.29
60.85	60.83	0.03	100.03
115.19	115.63	-0.38	99.62

กราฟ ระหว่างความเข้มข้นของคอเลสเตอรอลระดับต่ำ กลาง สูง กับ SD ของค่ามันมี linearity โดยมีค่า R² = 1 ซึ่งมีค่ามากกว่าค่าที่กำหนด คือ > 0.995 ค่าคอเลสเตอรอลที่วิเคราะห์ที่มีความแตกต่างจากค่าที่ได้จากสมการ (%relative error) = -1.71 , 0.03 และ -0.38% ตามลำดับ ซึ่งมีค่าไม่เกินที่กำหนด คือ + 10% และค่าคอเลสเตอรอลที่วิเคราะห์ได้มีความถูกต้อง (%relative accuracy) = 98.29, 100.03 และ 99.62%ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในช่วงที่กำหนดคือ 90-110%

ตารางที่ 6 แสดงผลการวิเคราะห์คอเลสเทอรอลใน control sample

	คอเลสเทอรอล มิลลิกรัม/100กรัม
1	87.9
2	82.3
3	83.0
4	87.4
5	81.3
6	84.4
7	80.8
8	81.5
9	82.8
10	85.7
11	84.5
12	80.9
mean	83.5
SD	2.45
2SD	4.90
3SD	7.35
%RSD	2.93
LCL	78.6
UCL	88.4

รูปที่ 3 แสดง control chart ของ คอเลสเทอรอล



2543

2544

ตารางที่ 7 แสดงผลการวิเคราะห์หาคอเลสเทอรอลในตัวอย่างนมและ
ผลิตภัณฑ์นมที่เป็นของเหลว

ลำดับที่	ชื่อ	คอเลสเทอรอล มิลลิกรัม /100 กรัม
1	นมปรุงแต่งพร้อมดื่ม ยูเอชที รสหวาน	11.8
2	นมปรุงแต่งพร้อมดื่ม ยูเอชที รสช็อกโกแลต มอลต์	11.0
3	นมปรุงแต่งพร้อมดื่ม ยูเอชที รส มอลต์	11.7
4	นมคั้นรูปปรุงแต่งพร้อมดื่ม ยูเอชที กลิ่นวานิลลา	13.6
5	นมคั้นรูปรสธรรมชาติพร้อมดื่ม ยูเอชที ชนิดจืด	16.1
6	นมคั้นรูปรสธรรมชาติพร้อมดื่ม ยูเอชที ชนิดจืด	14.5
7	นมคั้นรูปรสธรรมชาติพร้อมดื่ม ยูเอชที รสหวาน	11.2
8	ผลิตภัณฑ์นม ยูเอชที	13.8
9	นมดัดแปลงสูตรต่อเนื่องสำหรับ ทารกและ เด็กเล็ก เสริมธาตุเหล็ก (อายุตั้งแต่ 6 เดือน ถึงครบ 3 ปี)	2.7
10	นมปรุงแต่งพร้อมดื่ม ยูเอชที รสช็อกโกแลต	11.8
11	นมปรุงแต่งพร้อมดื่ม ยูเอชที รสมอลต์	11.8
12	นมปรุงแต่งพร้อมดื่ม ยูเอชที กลิ่นวานิลลา	10.6

ตารางที่ 8 แสดงผลการวิเคราะห์คอเลสเทอรอลในตัวอย่างนมและ
ผลิตภัณฑ์นมที่เป็นผง

ลำดับที่	ชื่อ	คอเลสเทอรอล มิลลิกรัม/100 กรัม
1	ผลิตภัณฑ์นม	63.8
2	นมปรุงแต่ง รสช็อกโกแลต	44.8
3	ผลิตภัณฑ์นมชนิดละลายทันที	78.0
4	นมผงปรุงแต่งชนิดละลายทันที สูตรผสมใยอาหาร 4%	64.9
5	ผลิตภัณฑ์นมชนิดละลายทันที	74.6
6	นมปรุงแต่งกลิ่นวานิลลา	22.6
7	นมผงปรุงแต่งกลิ่นวานิลลา	74.6
8	นมปรุงแต่งรสน้ำผึ้ง	66.0
9	นมผงปรุงแต่งรสหวาน สูตรผสมใยอาหาร 3%	87.8
10	นมปรุงแต่งชนิดหวาน	80.3
11	นมผงปรุงแต่งกลิ่นวานิลลา	82.2
12	ผลิตภัณฑ์นมชนิดละลายทันที	68.4
13	ผลิตภัณฑ์นมชนิดละลายทันที	70.1
14	นมผงปรุงแต่งกลิ่นวานิลลา สูตรผสมใยอาหาร	75.8
15	ผลิตภัณฑ์นมชนิดละลายทันที	70.3
16	นมผงปรุงแต่งกลิ่นวานิลลา	68.1
17	ผลิตภัณฑ์นมชนิดละลายทันที	68.9
18	นมผงปรุงแต่ง	47.7
19	นมผงปรุงแต่ง	27.8
20	นมปรุงแต่งกลิ่นวานิลลา	48.9
21	นมผงปรุงแต่งชนิดละลายทันที สูตรผสมใยอาหาร 4%	70.8
22	นมปรุงแต่งรสน้ำผึ้ง	57.9
23	นมผงปรุงแต่งชนิดละลายทันที สูตรผสมใยอาหาร 4%	72.8

วิจารณ์ผล

จากการทำกราฟมาตรฐานของคอเลสเทอรอล แสดงผลไว้ในรูปที่ 1 ได้ค่า correlation coefficient 0.99943 แสดงว่าค่าที่วิเคราะห์ได้โดยวิธีทดสอบคอเลสเทอรอลที่ใช้เป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณที่มีอยู่จริง วิธีทดสอบคอเลสเทอรอลที่ใช้คือเป็นวิธีวิเคราะห์ที่ดี เพราะว่ามีค่า correlation coefficient มากกว่า 0.995

ผลการหาค่า % relative accuracy โดยใช้สารมาตรฐานอ้างอิง (SRM) จำนวน 6 ตัวอย่าง เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตามตารางที่ 1 พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 90.2-99.5 % (เฉลี่ย 94.4%) แสดงว่าวิธีที่ใช้ทดสอบคอเลสเทอรอลมีความถูกต้อง เพราะว่ามีค่าที่ได้อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด คือ อยู่ในช่วง 90-110 %

ผลการทำ repeatability หรือ precision ของวิธีทดสอบคอเลสเทอรอล ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2 ได้ %RSD = 1.37 แสดงว่า วิธีที่ใช้มีความแม่นยำมากโดยมีความแตกต่างระหว่างการวิเคราะห์แต่ละครั้งน้อย

Instrument detection limit ของเครื่อง GC มีค่า 0.01 มิลลิกรัม โดยให้ค่า signal to noise ratio = 2.1-3.0

การหา % recovery ของ spiked sample ในตารางที่ 4 พบว่า % recovery ที่ระดับความเข้มข้นต่ำมีค่า 87.1-105.1 (เฉลี่ย 102.7) และระดับความเข้มข้นสูงมีค่า 97.2-100.3 (เฉลี่ย 98.5) ซึ่งมีค่าอยู่ในเกณฑ์กำหนด (75-110 %) แสดงว่าผลที่ได้จากการวิเคราะห์ทดสอบมีค่าใกล้เคียงกับค่ามาตรฐานหรือค่าจริง

ผลของ MDL และ LOQ ของวิธีทดสอบคอเลสเทอรอลตามตารางที่ 5 และรูปที่ 2 แสดงว่า วิธีที่ใช้มีความเข้มข้นต่ำสุดหรือน้อยที่สุดที่สามารถวัดได้ = 0.543 มิลลิกรัม/100 กรัม และความเข้มข้นต่ำสุดของคอเลสเทอรอลที่วิเคราะห์ได้โดยวิธีนี้ให้ค่าที่มีความถูกต้องแม่นยำและมีผลการวิเคราะห์ที่เป็นที่ยอมรับได้ตามกำหนดมีค่า 1.81 มิลลิกรัม/100 กรัม

วิธีวิเคราะห์คอเลสเทอรอลได้มีการควบคุมคุณภาพภายในของวิธีโดยมี control sample และได้ทำ control chart ดังแสดงไว้ในรูปที่ 3

จากการวิเคราะห์ปริมาณคอเลสเตอรอลในนมและผลิตภัณฑ์นม พบว่านมและผลิตภัณฑ์นมที่เป็นของเหลวที่มีจำหน่ายในท้องตลาดของไทยมีคอเลสเตอรอลอยู่ในช่วง 2.7-16.1 มิลลิกรัม/100 กรัม ส่วนนมและผลิตภัณฑ์นมที่เป็นผงมีคอเลสเตอรอลอยู่ในช่วง 22.6-87.8 มิลลิกรัม /100 กรัม

สรุปผล

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์/ทดสอบคอเลสเทอรอล พบว่าวิธีที่ใช้มีความถูกต้องและแม่นยำ เพราะมีค่าของ%relative accuracy และ% recovery อยู่ในเกณฑ์กำหนด วิธีวิเคราะห์ดังกล่าวเป็นวิธีวิเคราะห์ที่ดีเพราะมีค่า correlation coefficient มากกว่า 0.995 แสดงว่าค่าคอเลสเทอรอลที่วิเคราะห์ได้เป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณที่มีอยู่จริง นอกจากนี้ยังได้ควบคุมคุณภาพภายในของวิธีวิเคราะห์โดยใช้ control sample และได้แสดงปริมาณต่ำสุดของการวิเคราะห์ที่ให้ค่าถูกต้องและแม่นยำ หรือ limit of quantitation

ปริมาณคอเลสเทอรอลในนมและผลิตภัณฑ์นมที่เป็นของเหลวที่มีจำหน่ายในท้องตลาดของไทยมีคอเลสเทอรอลอยู่ในช่วง 2.7-16.1 มิลลิกรัม/100กรัม ส่วนในนมและผลิตภัณฑ์นมที่เป็นผงมีคอเลสเทอรอลอยู่ในช่วง 22.6-87.8 มิลลิกรัม/100กรัม ทำการศึกษาทดลองโดยใช้วิธีสเปกโตรโฟโตเมตริกในหลอดแก้วทดลองและแยกสกัดคอเลสเทอรอลในหลอดแก้วด้วยเอ็น-เฮกเซน ระเหยแห้ง เติรวอร์เท็กซ์และวิเคราะห์หาคอเลสเทอรอลโดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ

กิตติกรรมประกาศ

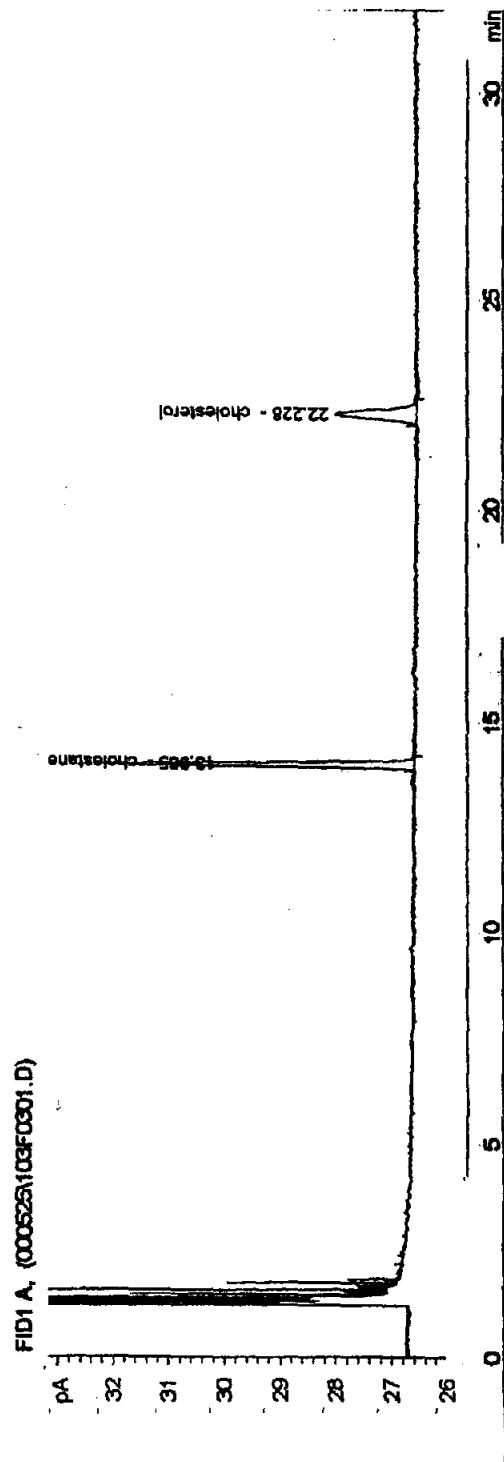
ขอขอบคุณ ผู้อำนวยการกอง กองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คุณสุจินต์ ศรีคงศรี
คุณสุนทรี เป็รื่องการ คุณปรีชา ธรรมนิยม คุณธิดาดวง พลเลิศ คุณรวีวรรณ
วงศ์สมุทร และ คุณปราณี วิเศษ ที่กรุณาให้คำปรึกษาและข้อเสนอแนะตลอดจนให้ข้อมูล
ที่เป็นประโยชน์ จนทำให้ผลงานนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. เอกสารประกอบการอบรม เรื่อง การสอบเทียบ , การทำ Method Validation , Uncertainty Measurement, การควบคุมคุณภาพภายใน. 2543 มกราคม 10-13 ; กรุงเทพฯ : โรงแรมมารวยการ์เด็น , กรุงเทพฯ : สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย.
2. Association of Official Analytical Chemists. Cholesterol in Foods (994.10). Official Methods of Analysis-AOAC. 16th ed. Virginia : Association of Official Analytical Chemists, 1995. p.73-75.
3. Eurachem . A laboratory Guide to Method Validation and Related Topics : First Internet version . 1998.
4. International Organization for Standardization/International Electrotechnical Commission. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. ISO/IEC 17025. 1999.
5. Kovac , M.I.P., Anderson , W.E. and Ackman , R.G. A simple method for the determination of cholesterol and some plant sterols in fishery-based food products. J.of Food Science. September/October,1979, vol .44, no.5. p 1299-1301 ,1305
6. National Association of Testing Authorities. Format and Content of Test Methods and Procedures for Validation and Verification of Chemical Test Methods : NATA Technical Note 17.1997.
7. National Association of Testing Authorities. Guidelines for Quality Control in the Analytical Laboratory : NATA Technical Note 23. 1995.
8. National Measurements Accreditation Service. Accreditation for chemical laboratories : NAMAS Information Sheet NIS 45. 1990.
9. Taylor, J.K. Quality Assurance of Chemical Measurements. Michigan : Lewis Publishers. 1989.

ภาคผนวก

ภาคผนวก แสดงโครมาโตแกรมของคอเลสเตอรอลและสารมาตรฐานภายในคอเลสเตอรอล



Cholesterol

Column HP-5
(5% -phenyl)-methylpolysiloxane
30m x 0.32 mm id, 0.25µm

P/N 19091J-413

Carrier gas Nitrogen at 2 ml/min

Oven 190°C , hold 2 min
190-230°C at 20°C/min , hold 3 min
230-255°C at 40°C/min, hold 25 min

Injector 250°C

Split flow 30 ml/min.

Detector FID 300°C