

เอกสารรายงานผลโครงการวิจัยสิ้นสุด ปี 2556

ชื่อโครงการวิจัย

กิจกรรม

การทดลองที่ 1.3 พัฒนาวิธีทดสอบหาปริมาณกรดเบนโซอิก และกรดซอร์บิกในผลิตภัณฑ์จากข้าว

หัวหน้าการทดลอง นายภูวสินธ์ ชูสินธ์ นักวิทยาศาสตร์ปฏิบัติการ

ผู้ร่วมการทดลอง น.ส.รุ่งทิภา รอดจันทร์ นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการ

หลักการ

อาหารที่มี Benzoic acid และ sorbic acid จะถูกสกัดออกมาด้วยตัวทำละลาย (Water:Methanol) หลังจากนั้นนำไปกรองด้วย Syring Filter membrane แล้วนำไปทดสอบด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ C18 และ Diode Array Detector ที่ความยาวคลื่น 235 nm ใช้อัตราการไหลของ Mobile phase ระดับเดียวกันตลอดการทดสอบ และคำนวณหาปริมาณ Benzoic acid และ Sorbic acid โดยวิธี External Calibration curve

6. วัตถุประสงค์

เพื่อใช้ในการทวนสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบหา Benzoic acid และ Sorbic acid ในผลิตภัณฑ์จากข้าว ซึ่งพัฒนามาจากวิธีมาตรฐาน NORDIC COMMITTEE ON FOOD ANALYSIS (1987) No. 124

6.1.1 ขอบข่าย

ครอบคลุมการทวนสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบหา Benzoic acid และ Sorbic acid ในผลิตภัณฑ์จากข้าว ซึ่งพัฒนามาจากวิธีมาตรฐาน NORDIC COMMITTEE ON FOOD ANALYSIS (1987) No. 124

อ้างอิง

6.1.2 การทดสอบหาปริมาณ Benzoic acid และ Sorbic acid ในผลิตภัณฑ์จากข้าว

6.1.3 NORDIC COMMITTEE ON FOOD ANALYSIS (1987) No. 124

6.1.4 Official Method of Analysis of AOAC International, 17th Edition, Volume I, Appendix E: laboratory Quality Assurance

6.1.5 แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

ISBN:974-7549-97-2

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

6.2.1 คำนิยาม

6.1 HPLC หมายถึง High Performance Liquid Chromatograph

6.2 CV หมายถึง Percentage coefficient of variance

6.3 R^2 หมายถึง Regression coefficient

6.4 SD หมายถึง Standard deviation

7 ขั้นตอนการปฏิบัติงาน

5.1 วิธีทดสอบ ปฏิบัติตามขั้นตอนการปฏิบัติงานการทดสอบหาปริมาณ Benzoic acid และ

5. ขั้นตอนการทดสอบ

5.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 5.1.1 Volumetric Flask (Class A) ขนาด 50 ,100 และ 1000 มิลลิลิตร
- 5.1.2 Volumetric Pipette (Class A) ขนาด 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิลิตร
- 5.1.3 Cylinder ขนาด 50 ,100 ,1000 มิลลิลิตร
- 5.1.4 Erlenmeyer Flask ขนาด 150 มิลลิลิตร
- 5.1.5 Glass Funnels
- 5.1.6 กระดาษกรอง Whatman No. 1 หรือเทียบเท่า
- 5.1.7 Beaker 100 , 250 , 500 , 1000 มิลลิลิตร
- 5.1.8 ซ้อนตักสาร
- 5.1.9 Syringe แก้ว ขนาด 10 มิลลิลิตร
- 5.1.10 Filter membrane ขนาด 13 มิลลิเมตร
- 5.1.11 Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร
- 5.1.12 Pasture pipette, pipette
- 5.1.13 แท่งแก้ว
- 5.1.14 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Sortorius รุ่น AC211S (ปฏิบัติงานตามวิธีปฏิบัติงาน W/FA 5.5-001)
- 5.1.15 เครื่อง Ultrasonic bath (ปฏิบัติงานตามวิธีปฏิบัติงาน W/FA 5.5-004)
- 5.1.16 ชุด Suction pump (ปฏิบัติงานตามวิธีปฏิบัติงาน W/FA 5.5-008)
- 5.1.17 pH meter (ปฏิบัติงานตามวิธีปฏิบัติงาน W/FA 5.5-003)
- 5.1.18 เครื่อง Blender ยี่ห้อ Moulinex ตามคู่มือการใช้เครื่อง
- 5.1.19 เครื่อง HPLC ยี่ห้อ Agilent รุ่น 1100 (ปฏิบัติงานตามวิธีปฏิบัติงาน W/FA 5.5-002)

5.2 สารเคมี/อาหารเลี้ยงเชื้อ/วัสดุอ้างอิง

- 5.2.1 น้ำ Deionized Water (DI)
- 5.2.2 Methanol (HPLC grade)
- 5.2.3 Acetic acid, glacial
- 5.2.4 Sodium hydroxide (NaOH) AR grade
- 5.2.5 สารมาตรฐาน Benzoic acid และ Sorbic acid
- 5.2.6 NaOH 5 N ชั่ง NaOH 20 กรัม ละลายด้วยน้ำเทใส่ Volumetric Flask ขนาด 100 มิลลิลิตร และ

ปรับปริมาตรด้วยน้ำ

5.2.7 Water:Methanol (35:65) ผสม น้ำ DI 350 มิลลิลิตร และ Methanol (HPLC grade) 650 มิลลิลิตร

5.2.8 Acetate buffer pH 4.74 ปิเปต Acetic acid, glacial จำนวน 5.7 มิลลิลิตร ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 1000 มิลลิลิตร ที่มีน้ำ DI อยู่ 900 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วคนให้เข้ากัน ปรับ pH เป็น 4.74 ด้วย NaOH 5 N เทใส่ Volumetric flask ขนาด 1000 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI กรองผ่าน filter Membrane ขนาด 0.2 ไมครอน ด้วยเครื่อง Suction pump

5.2.9 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Benzoic acid และ Sorbic acid

a. Stock Standard 1000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ($\mu\text{g/ml}$)

ชั่ง Benzoic acid 0.1 กรัม และชั่ง Sorbic acid 0.1 กรัม ละลายรวมกันด้วย Water : Methanol ; 35:65 เทใส่ Volumetric Flask ขนาด 100 มิลลิลิตร พร้อมปรับปริมาตร

b. Working Standard

ตารางที่ 1 การเตรียม Working Standard Solutions ของ Benzoic acid และ Sorbic acid

Working Standard				
สาร Benzoic acid + Sorbic acid	ความเข้มข้นที่ ต้องการเตรียม ($\mu\text{g/ml}$)	Standard ที่ใช้ในการเตรียม		ทำปริมาตรเป็น (ml)
		ความเข้มข้น($\mu\text{g/ml}$)	ปริมาตร(ml)	
	0.5	50	1	100
	1	50	1	50
	5	50	5	50
	10	1000	1	100
	20	1000	2	100
	30	1000	3	100
	40	1000	4	100
	50	1000	5	100

หมายเหตุ : 1. ตัวทำละลายคือ Water : Methanol ; 35:65

2. เก็บรักษาในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4-8 °C เป็นเวลา 3 เดือน

3. การให้รหัส Standard Solution

ชื่อย่อสาร วัน/เดือน/ปี (ที่ทำการเตรียม) S (Stock Standard) เช่น B-S 26/10/54S

ชื่อย่อสาร วัน/เดือน/ปี (ที่ทำการเตรียม) W (Working Standard) และใส่ระดับความเข้มข้น
ต่อท้าย

เช่น B-S 26/10/54W0.5

5.3 ภาวะการทดสอบ

อุณหภูมิห้อง ยกเว้นห้องซึ่งควบคุมอุณหภูมิที่ 25 ± 2.5 °C ความชื้นสัมพัทธ์ที่ 45-60 % และห้องเครื่องมือควบคุมอุณหภูมิที่ 15-35 °C ความชื้นสัมพัทธ์ที่ 20-80 %

5.4 วิธีทดสอบ

5.4.1 การเตรียมตัวอย่างทดสอบ ปั่นให้ละเอียดเหมือนแป้ง

5.4.2 การทดสอบ

5.4.2.1 ชั่งตัวอย่าง 5 กรัม (น้ำหนักที่แน่นอนทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร

5.4.2.2 เติมน้ำ DI 30 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่าง นำไปเข้าเครื่อง Homogenize 1 นาที เพื่อให้สารเข้ากันอยู่ในรูปของสารละลาย จากนั้นเทใส่ลงใน Volumetric Flask ขนาด 100 มิลลิลิตร

5.4.2.3 ล้างบีกเกอร์ด้วย Methanol และปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วย Methanol เขย่า Volumetric Flask ให้สารละลายเข้ากัน

5.4.2.4 เทส่วนใสที่เหลือลดประมาณ 30 มิลลิลิตร และนำไป Centrifuge ที่ 4,000/นาที เป็นเวลา 5 นาที

5.4.2.5 กรองสารละลายตัวอย่างด้วย Syringe filter membrane 0.45 ไมครอน หรือ 0.2 ไมครอน

5.4.2.6 นำสารละลายตัวอย่างไปทำการวัดโดยเครื่อง High Performance Liquid

Chromatography

คอลัมน์ C18 ความยาวคลื่น 235 nm.

5.4.2.7 การตรวจสอบหา % Recovery ทำตามข้อ 5.4.2.1 เติม Standard Benzoic acid และ Sorbic acid

1000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ($\mu\text{g/ml}$) ลงไป 1 มิลลิลิตร ในตัวอย่าง หลังจากนั้นทำการทดสอบตามข้อ 5.4.2.2 - 5.4.2.6

5.4.2.8 การทำ Reagent blank ทำได้โดย เติมน้ำ DI 30 มิลลิลิตร ลงใน Volumetric Flask ขนาด 100

มิลลิลิตร แล้วนำมาทำตามข้อ 5.4.2.3 – 5.4.2.6

5.4.2.9 Instrument Setting และ Condition

Technique	:	HPLC-DAD , UV lamp
Column	:	X-terra RP18
Flow rate	:	0.8 ml/min
Detector	:	Diode Array Detector ที่ wavelength 235 nm
Temperature column:	:	28 °C
Injection volume	:	20 μl
Run Time	:	15 min

Wavelength : 235 nm
 Mobile Phase : Acetate buffer pH 4.74 : Methanol อัตราส่วน 70:30
 Correlation Coefficient(r) ≥ 0.995

5.4.3 การคำนวณปริมาณ Benzoic acid และ Sorbic acid

$$(mg/kg, \mu g/g) = \frac{ppm \text{ reading}}{Weight (g)} \times Volume (ml)$$

$$\% \text{ Recovery} = \frac{Std \text{ Found} (\mu g / ml)}{Std \text{ Added} (\mu g / ml)} \times 100$$

$$Std. \text{ Found} (\mu g/ml) = ppm \text{ reading} - \frac{(\mu g / g \text{ in sample } \times weight , g)}{Volume (ml)}$$

$$Std. \text{ Added} (\mu g/ml) = \frac{\mu g \text{ of std .added}}{Volume (ml)}$$

$$\% \text{ RPD} = \frac{|\text{ผลการทดสอบครั้งที่ 1} - \text{ผลการทดสอบครั้งที่ 2}|}{\text{ค่าเฉลี่ยของผลการทดสอบทั้งสองครั้ง}} \times 100$$

5.4.4 การรายงานผล

- ปริมาณ Benzoic acid และ Sorbic acid ในตัวอย่าง รายงานเป็น มิลลิกรัม/กิโลกรัม (mg/kg)
- กรณีที่ผลการทดสอบมีค่าน้อยกว่าค่า LOD (Limit of Detection) รายงานผลว่า ไม่พบ (<ค่า LOD) หรือ Not Detected (<LOD)
- กรณีที่ผลการทดสอบมีค่าอยู่ระหว่างค่า LOD และค่า LOQ (Limit of Quantitation) รายงานผลว่าน้อยกว่าค่า LOQ
- ถ้าผลการทดสอบมากกว่าหรือเท่ากับค่า LOQ รายงานผลด้วยทศนิยม 2 ตำแหน่ง

หมายเหตุ : การคำนวณค่า LOD และ LOQ อยู่ในขั้นตอนการปฏิบัติงาน เรื่อง การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบหาปริมาณ Benzoic acid และ Sorbic acid ในอาหาร

5.4.5 การตัดสินผลการทดสอบเกินเกณฑ์ที่กำหนด

- เมื่อผลการทดสอบครั้งแรกเกินเกณฑ์ที่กำหนดให้ทำการทดสอบครั้งที่ 2
- ถ้าผลทั้ง 2 ครั้งสอดคล้องกัน คือ เกินเกณฑ์ที่กำหนดทั้ง 2 ครั้ง ให้ใช้ค่าเฉลี่ยรายงานผล
- กรณีผลการทดสอบแตกต่างกัน คือ ผลครั้งแรกเกินเกณฑ์ที่กำหนด ผลครั้งที่ 2 ไม่เกินที่กำหนด

ถ้า % ความแตกต่างของผลทั้ง 2 ครั้งน้อยกว่า 10 ให้ใช้ค่าเฉลี่ยรายงาน แต่ถ้า % ความแตกต่างของผลการทดสอบทั้ง 2 ครั้งมากกว่า 10 ให้ทดสอบใหม่กับตัวอย่างเดียวกันที่ทางห้องปฏิบัติการเก็บไว้เพื่อใช้ในการตัดสินผล

5.4.6 การคำนวณค่า Measurement Uncertainty (MU)

การคำนวณค่า MU ตามขั้นตอนการปฏิบัติงาน เรื่อง การประมาณค่าความไม่แน่นอนของของวิธีทดสอบหาปริมาณ Benzoic acid และ Sorbic acid ในอาหาร (W/FA 5.4-005) โดยผลการทดสอบจะต้องมากกว่าค่า LOQ และรายงานต่อเมื่อลูกค้าร้องขอ โดยรายงานดังนี้

$$C \pm U$$

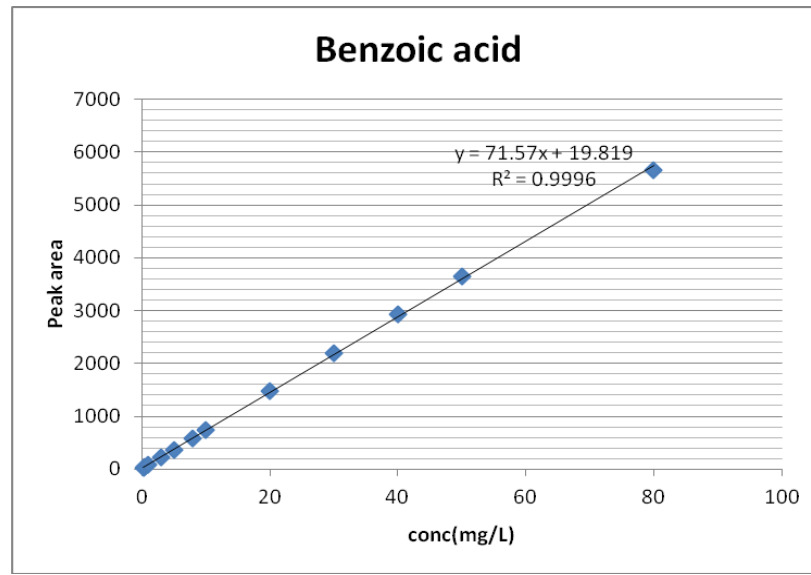
เมื่อ C = ปริมาณ Benzoic acid และ Sorbic acid ในตัวอย่าง หน่วยเป็น มิลลิกรัม/กิโลกรัม (mg/kg)

U = ค่าความไม่แน่นอนของการวัด หน่วยเป็น มิลลิกรัม/กิโลกรัม (mg/kg)

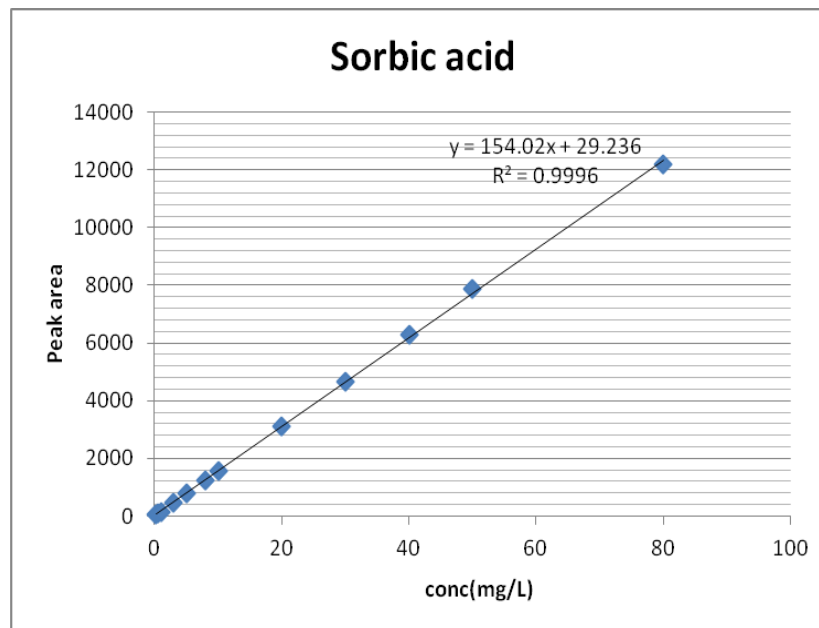
5.2 Range

เตรียมสารละลายมาตรฐาน Benzoic acid และ Sorbic acid มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.25 ถึง 80 mg/L โดยใช้ Water:Method (35:65) เป็นตัวทำละลาย นำฉีดเข้าเครื่อง HPLC ความเข้มข้นละ 1 ซ้ำ ผลการทดสอบดังตารางที่ 1 ตารางที่ 1 Peak area ของแต่ละความเข้มข้นของการหา Range

Conc. mg/L	Benzoic acid (Peak area)	Sorbic acid (Peak area)
0.25	17.49559	43.86438
0.5	36.04368	81.13342
1	74.47932	146.21054
3	215.49994	473.05188
5	371.58725	779.72003
8	585.30164	1248.72156
10	735.78070	1565.18567
20	1472.53125	3131.67505
30	2199.76660	4658.47510
40	2941.14185	6302.61963
50	3653.37793	7885.44580



รูปที่ 1 แสดง Range ของ Benzoic acid ความเข้มข้น 0.25 – 80 mg/L



รูปที่ 2 แสดง Range ของ Sorbic acid ความเข้มข้น 0.25 – 80 mg/L

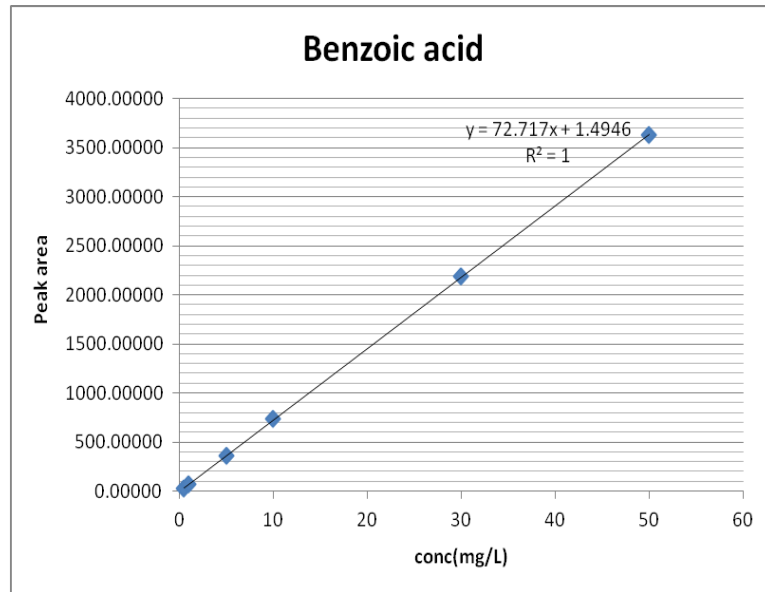
เมื่อเขียนกราฟระหว่างค่า Peak area (แกน Y) กับความเข้มข้น (แกน X) โดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel ผลดังรูปที่ 1 และรูปที่ 2 ค่า R^2 ของ Benzoic acid และ Sorbic acid ได้เท่ากับ 0.9996 ซึ่งสูงกว่า 0.995 แสดงว่า Peak area กับความเข้มข้นมีความสัมพันธ์เป็นเชิงเส้นที่อยู่ในช่วง 0.25 ถึง 80 mg/L

5.3 Linearity

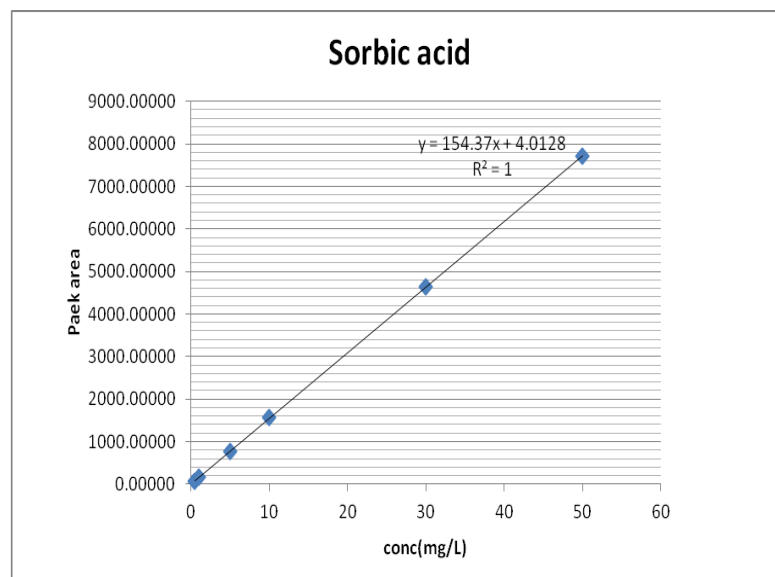
เตรียมสารละลายมาตรฐาน Benzoic acid และ Sorbic acid มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5 ถึง 50 mg/kg โดยใช้ Water:Method (65:35) เป็นตัวทำละลาย นำฉีดเข้าเครื่อง HPLC ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ผล ดังตารางที่ 2 แล้วนำมา Plot เพื่อศึกษา Linearity โดยพิจารณาค่า Regression Coefficient (R2) ดังรูปที่ 3 และ รูปที่ 4 ตารางที่ 2 Calibration data ของสาร Benzoic acid และ Sorbic acid

Conc. mg/L	Benzoic acid (Peak area)	Sorbic acid (Peak area)
0.5	30.23614	72.33115
	33.05898	77.21296
	32.22456	73.60904
	ค่าเฉลี่ย	31.83989
1	71.63300	153.77333
	72.63193	159.13618
	75.68568	158.43918
	ค่าเฉลี่ย	73.31687
5	363.96509	774.37207
	362.26761	772.35693
	365.11157	776.28864
	ค่าเฉลี่ย	363.78142
10	736.08789	1554.84399
	735.27576	1561.52087
	737.77386	1554.77502
	ค่าเฉลี่ย	736.37917
30	2184.43677	4637.15723
	2193.09692	4642.94189
	2185.18555	4640.29639
	ค่าเฉลี่ย	2187.57308
50	3634.61938	7724.89746
	3632.33203	7714.94629

ค่าเฉลี่ย	3632.86084	7714.74902
	3633.27075	7718.19759



รูปที่ 3 Linearity ของ Benzoic acid ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5-50 mg/L



รูปที่ 4 Linearity ของ Sorbic acid ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5-50 mg/L

ตารางที่ 3 ค่า Slope , Intercept and Regression coefficient (R2) ของสาร Benzoic acid และ Sorbic acid

NO	Compound	Slope	Intercept	R2
----	----------	-------	-----------	----

		(peak area per concentration)		
1	Benzoic acid	72.72	1.4946	1
2	Sorbic acid	154.37	4.0128	1

เมื่อเขียนกราฟระหว่างค่า Peak area (แกน Y) กับความเข้มข้น (แกน X) โดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel ผลดังรูปที่ 3 และรูปที่ 4 ค่า R² ของ Benzoic acid และ Sorbic acid ได้เท่ากับ 1 ซึ่งสูงกว่า 0.995 แสดงว่า Peak area กับความเข้มข้นมีความสัมพันธ์เป็นสมการเส้นภายในช่วงของ Range

5.4 Sensitivity

สรุปผล : ความไวของการทดสอบ (Slope) ของ Benzoic acid และ Sorbic acid เท่ากับ 72.72 และ 154.37 ตามลำดับ

5.5 Selectivity

ทำการฉีด Sample Martrix ที่เส้นก่ายเดียว โดยทำเป็น Sample blank แล้วไม่พบสารรบกวนที่บริเวณ Retention time เดียวกับสารที่สนใจ

5.6 ทดสอบหา LOD และ Predicted LOQ

ทดสอบ Sample blank และ fortified sample blanks ที่ความเข้มข้นระดับ 10 mg/kg 10 ซ้ำ โดยเติมสารมาตรฐานของ Benzoic acid และ Sorbic acid ความเข้มข้น 50 mg/kg จำนวน 1 ml ลงในตัวอย่างผลิตภัณฑ์จากข้าว จำนวน 5 กรัม คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ผลเป็นดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ความเข้มข้นที่ทดสอบได้เมื่อทดสอบ fortified sample blanks ที่ความเข้มข้น 10 mg/kg 10 ซ้ำ

ลำดับที่	Benzoic	Sorbic
1	10.8207	8.0943
2	10.2888	8.3094
3	12.2966	7.3935
4	13.1485	8.5672
5	10.7012	7.9913
6	11.9115	8.1552
7	11.7795	8.9644

8	12.4305	8.5965
9	12.5712	8.7572
10	12.3989	8.5306
ค่าเฉลี่ย	11.8347	8.3359
SD	0.9349	0.4510
3SD	2.8048	1.3529
10SD	9.3493	4.5097

เนื่องจากการทดสอบไม่พบ Benzoic และ Sorbic acid ใน Sample blank ดังนั้น LOD จะเท่ากับสามเท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และ LOQ จะเท่ากับสิบเท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของผลการทดสอบที่มีการเติม standard ปริมาณน้อย ๆ ลงในตัวอย่าง ซึ่งจากผลในตารางที่ 4 จะได้ค่า

LOD ของ Benzoic acid = 3SD = 2.8048 mg/kg

LOD ของ Sorbic acid = 3SD = 1.3529 mg/kg

Predicted LOQ ของ Benzoic acid = 10SD = 9.3493 mg/kg

Predicted LOQ ของ Sorbic acid = 10SD = 4.5097 mg/kg

เพราะฉะนั้น จึงกำหนดให้ LOD ของ Benzoic acid และ Sorbic acid = 5 mg/kg และ LOQ ของ Benzoic acid และ Sorbic acid = 10 mg/kg

5.7 Limit of Detection (LOD)

ยืนยันค่า LOD โดยเติมสารละลายมาตรฐาน Benzoic acid และ Sorbic acid ลงในตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้น 5 mg/kg จำนวน 10 ซ้ำ ทดสอบระดับสัญญาณของ peak ที่ signal/noise = 3 ผลที่ได้ต้องมีค่า signal/noise ไม่น้อยกว่า 3 ผลที่ได้แสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ค่า signal/noise ของการตรวจเพื่อยืนยัน ค่า Limit of Detection (LOD) ของสาร Benzoic acid และ Sorbic acid

ในตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานระดับความเข้มข้น 5 mg/kg

Compound	Signal/Noise									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Benzoic acid	15.9	13.9	12.0	18.2	16.7	19.0	12.4	17.0	13.7	13.7
Sorbic acid	12.8	14.5	16.8	18.2	20.0	23.8	13.1	23.1	16.1	14.6

5.8 Limit of Quantitation (LOQ)

ปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดสาร Benzoic acid และ Sorbic acid ได้ตามวิธีทดสอบและให้ผลการทดสอบแม่นยำ (Precision) และเที่ยงตรง (Accuracy) ตามเกณฑ์ที่กำหนด

5.8.1 ความแม่นยำ (Precision)

ทำการศึกษาความแม่นยำของวิธีทดสอบ (Precision) โดยการเติมสารมาตรฐาน Benzoic acid และ Sorbic acid ที่ระดับความเข้มข้น 10 , 200 และ 1,000 mg/kg ระดับความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ลงในตัวอย่าง แล้วสกัดตามวิธีทดสอบ หา % Recovery ของสารดังในตารางที่ 6 และ 7

$$\% \text{ Recovery} = \frac{(\text{ปริมาณสารที่วัดได้} - \text{ปริมาณของสารที่มีอยู่เดิม}) \times 100}{\text{ปริมาณของสารที่เติม}}$$

และทำการทดสอบความแม่นยำโดยนำผลของ % Recovery ที่ได้มาคำนวณหา % RSD เทียบกับ HORRAT โดยใช้ สูตรดังนี้ Horwitz equation (Predicted RSD) = $0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)}$ โดยที่ C = concentration of analyte และ HORRAT : % RSD/Predicted RSD ≤ 2 เป็นเกณฑ์สำหรับการทดสอบความแม่นยำของวิธีทดสอบ

ตารางที่ 6 Recovery data ของสาร Benzoic acid ที่เติมสารมาตรฐานระดับความเข้มข้น 10 , 200 และ 1,000 mg/kg

No.	Benzoic acid					
	ความเข้มข้น 10 mg/kg		ความเข้มข้น 200 mg/kg		ความเข้มข้น 1000 mg/kg	
	Cal.conc.	% Recovery	Cal.conc.	% Recovery	Cal.conc.	% Recovery
1	10.1991	101.99	216.0236	108.01	1027.9964	102.80
2	10.2115	102.11	211.8552	105.93	1030.3768	103.04
3	10.1800	101.80	215.0624	107.53	1029.5492	102.95
4	10.2035	102.04	214.3966	107.20	1037.3022	103.73
5	10.3136	103.14	214.4134	107.21	1037.1648	103.72
6	10.0074	100.07	216.0612	108.03	1032.8148	103.28
7	10.2314	102.31	216.9646	108.48	1038.1158	103.81
8	10.6048	106.05	216.0948	108.05	1035.4344	103.54
9	10.4308	104.31	217.5192	108.76	1031.3734	103.14
10	10.2401	102.40	217.6436	108.82	1029.0504	102.91
Average	10.2622	102.62	215.6035	107.80	1032.9178	103.29
SD	0.16	1.60	1.75	0.87	3.80	0.38

%RSD	1.56293	1.56293	0.81116	0.81116	0.36793	0.36793
Predicted Horwitz RSD	7.4380	-	4.7034	-	3.7154	-
HORRAT (target 2)	0.21	-	0.17	-	0.10	-
N =	10	10	10	10	10	10

ตารางที่ 7 Recovery data ของสาร Sorbic acid ที่เติมสารมาตรฐานระดับความเข้มข้น 10 , 200 และ 1,000 mg/kg

No.	Sorbic acid					
	ความเข้มข้น 10 mg/kg		ความเข้มข้น 200 mg/kg		ความเข้มข้น 1000 mg/kg	
	Cal.conc.	% Recovery	Cal.conc.	% Recovery	Cal.conc.	% Recovery
1	8.8359	88.36	207.5268	103.76	1016.7978	101.68
2	8.6546	86.55	206.9928	103.50	1019.5312	101.95
3	8.7609	87.61	206.2768	103.14	1018.6652	101.87
4	8.8973	88.97	207.0056	103.50	1024.5820	102.46
5	8.5015	85.02	208.5378	104.27	1025.3494	102.53
6	8.7501	87.50	208.8378	104.42	1022.7384	102.27
7	8.9686	89.69	208.1272	104.06	1025.4024	102.54
8	8.6702	86.70	209.1108	104.56	1023.7340	102.37
9	8.8384	88.38	208.7412	104.37	1018.2348	101.82
10	8.5033	85.03	208.9064	104.45	1020.0932	102.01
Average	8.7381	87.38	208.0063	104.00	1021.5128	102.15
SD	0.16	1.57	0.99	0.49	3.21	0.32
%RSD	1.7952	1.7952	0.4756	0.4756	0.3142	0.3142
Predicted Horwitz RSD	7.6202	-	4.7289	-	3.7216	-
HORRAT	0.24	-	0.10	-	0.08	-

(target <input type="checkbox"/> 2)						
N =	10	10	10	10	10	10

สรุปผล : การศึกษาความแม่นยำของวิธีทดสอบโดยใช้เกณฑ์ HORRAT target พบว่า

1. HORRAT ของสาร Benzoic acid และ Sorbic acid ที่ระดับความเข้มข้น 10 mg/kg มีค่าเท่ากับ 0.21 และ 0.24 ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่น้อยกว่า 2
2. HORRAT ของสาร Benzoic acid และ Sorbic acid ที่ระดับความเข้มข้น 200 mg/kg มีค่าเท่ากับ 0.17 และ 0.10 ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่น้อยกว่า 2
3. HORRAT ของสาร Benzoic acid และ Sorbic acid ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 mg/kg มีค่าเท่ากับ 0.10 และ 0.08

ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่น้อยกว่า 2

ดังนั้น ผลการศึกษาความแม่นยำของวิธีทดสอบอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ตั้งแต่ระดับความเข้มข้น 10 mg/kg

5.8.2 ความเที่ยง (Accuracy)

การทดสอบความถูกต้องของการวิเคราะห์ ด้วยการเติมสารมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นลงในตัวอย่างเพื่อหาเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของสาร(% Recovery) โดยพิจารณา %Recovery ตามเกณฑ์มาตรฐาน Codex ที่ระดับ ความเข้มข้นมากกว่า 1 mg/kg ต้องอยู่ในช่วง 70-110

ตารางที่ 8 Accuracy ของ Benzoic acid และ Sorbic acid ที่ระดับความเข้มข้น 10 ,200 และ 1,000 mg/kg

Compound	% Recovery		
	10 mg/kg	200 mg/kg	1,000 mg/kg
Benzoic acid	102.62	107.80	103.29
Sorbic acid	87.38	104.00	102.15

สรุปผล : การศึกษาความถูกต้องของวิธีทดสอบ

1. % Recovery ของสาร Benzoic acid และ Sorbic acid ที่ระดับความเข้มข้น 10 mg/kg มีค่าเท่ากับ 102.62 และ

87.38 ตามลำดับ

2. % Recovery ของสาร Benzoic acid และ Sorbic acid ที่ระดับความเข้มข้น 200 mg/kg มีค่าเท่ากับ 107.80 และ

104.0 ตามลำดับ

3. % Recovery ของสาร Benzoic acid และ Sorbic acid ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 mg/kg มีค่าเท่ากับ 103.29 และ

102.15 ตามลำดับ

ดังนั้น ผลการศึกษาความถูกต้องของวิธีทดสอบอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ตั้งแต่ระดับความเข้มข้น 10 mg/kg

5.9 Summary

ผลสรุปของการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ หา Benzoic acid และ Sorbic acid ในผลิตภัณฑ์จากข้าวตามวิธีทดสอบซึ่งเป็นไปตามมาตรฐานของการทดสอบ แสดงอยู่ในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 สรุปผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ หา Benzoic acid และ Sorbic acid ในผลิตภัณฑ์จากข้าว

No.	Parameter	Result		Standard Limit
		Benzoic acid	Sorbic acid	
1.	Linearity -R ² ที่ระดับ 0.5-50 mg/kg	0.99997	0.9982	≥ 0.995
2.	Sensitivity -Slope	72.72	154.37	-
3.	Selectivity	ไม่พบสารรบกวนบริเวณ Retention time เดียวกับ สารที่สนใจ เมื่อฉีด Sample blank ที่เป็น ตัวอย่างผลิตภัณฑ์จากข้าว	ไม่พบสารรบกวนบริเวณ Retention time เดียวกับ สารที่สนใจ เมื่อฉีด Sample blank ที่เป็นตัวอย่าง ผลิตภัณฑ์จากข้าว	-
4.	Precision -% RSD ที่ระดับ 10 mg/kg	% RSD = 1.56 , HORRAT = 0.21	% RSD = 1.80 , HORRAT = 0.24	HORRAT ≤ 2
5.	Accuracy -% Recovery ที่ระดับ 10 mg/kg	102.62 %	87.38 %	70-110 %
6.	LOD	5 mg/kg	5 mg/kg	-
7.	LOQ	10 mg/kg	10 mg/kg	-

ดังนั้นจากผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบนี้มีความถูกต้องและแม่นยำในช่วง 10-1,000 mg/kg โดยมีค่า LOD เท่ากับ 5 mg/kg และ LOQ เท่ากับ 10 mg/kg สามารถยืนยันได้ว่าวิธีทดสอบนี้มีความเหมาะสมในการทดสอบหา Benzoic acid และ Sorbic acid ในผลิตภัณฑ์จากข้าว

ปัญหา/อุปสรรคและข้อเสนอแนะในภาพรวมของโครงการ

ผลิตภัณฑ์จากข้าวที่นำมาทดสอบใช้ถ้วยตวงเส้นเล็กแห้ง โดยในขนาดเส้นมีขนาดใหญ่ไม่สามารถละลายในน้ำได้ต้องทำการปั่นให้ละเอียดถึงจะนำมาวิเคราะห์ทดสอบได้

การนำไปใช้ประโยชน์

1. เพื่อให้ได้วิธีทดสอบมาตรฐานในวิธีหาปริมาณกรดเบนโซอิก และกรดซอร์บิกในผลิตภัณฑ์จากข้าว
2. นำวิธีทดสอบหาปริมาณกรดเบนโซอิก และกรดซอร์บิกในผลิตภัณฑ์จากข้าวที่ได้ไปเผยแพร่ให้กับห้องปฏิบัติการเอกชน

งบประมาณ

งบประมาณที่ได้รับ 170,000 บาท

เงินที่ใช้ไป 150,6840 บาท