# การพัฒนาวิธีทดสอบหาปริมาณสารสเตอรอลจากพืชด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี
# Method Development for Determination of Plant Sterol Using Gas Chromatography

**จรรยา แสงเขียว[1*]**
**Janya Sangkhiaw[1*]**

## บทคัดย่อ

การพัฒนาวิธีทดสอบหาปริมาณสารสเตอรอลจากพืช ได้แก่ Brassicasterol, Campesterol, Stigmasterol และ β-Sitosterol ตัวอย่างถูกเตรียมด้วยการทำปฏิกิริยาซาปอนนิฟิเคชันโดยตรงโดยไม่ทำการสกัดน้ำมัน เพื่อลดเวลาในการทดสอบและลดการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ จากนั้นเตรียมสารสเตอรอลในรูปของสารอนุพันธ์ก่อนทดสอบด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี ร่วมกับตัวตรวจวัดชนิดเฟลมไอออไนเซชัน ด้วยคอลัมน์แบบชั้นฟิล์มเคลือบบนผิวด้านใน มีช่วงการทดสอบที่ระดับ 0.3-14.2 มิลลิกรัมต่อ100 กรัม จากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี พบว่า ค่าขีดจำกัดในการตรวจวัด (LOD) ของ Brassicasterol, Campesterol, Stigmasterol และ β-Sitosterol เท่ากับ 0.5, 0.3, 0.6 และ 0.4 มิลลิกรัมต่อ100กรัม ตามลำดับ มีค่าการคืนกลับในช่วงร้อยละ 82-104 และความเที่ยงในการทดสอบซ้ำอยู่ในช่วง 1.30-1.55 ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับ โดยวิธีทดสอบที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถลดเวลาในการทดสอบเหลือเพียง 2 ชั่วโมงต่อ 1 ตัวอย่าง ลดการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ได้ 180 มิลลิลิตรต่อ 1 ตัวอย่าง เมื่อนำวิธีที่ได้นี้ไปประยุกต์ใช้ทดสอบหาปริมาณคอเลสเตอรอลในตัวอย่างเนื้อสัตว์และตัวอย่างวัสดุอ้างอิง พบว่า มีคอเลสเตอรอลอยู่ในช่วง 34.96-66.15 มิลลิกรัมต่อ100กรัม โดยมีค่าการคืนกลับเท่ากับร้อยละ 93.39 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธีทดสอบที่พัฒนาขึ้นนี้มีความถูกต้อง และรวดเร็วขึ้น สามารถลดค่าใช้จ่ายและมีความคุ้มค่า เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการต่อไป

**คำสำคัญ:** สารสเตอรอลจากพืช ปฏิกิริยาซาปอนนิฟิเคชันโดยตรง การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

## Abstract

This method has been developed for measurement of plant sterols such as Brassicasterol, Campesterol, Stigmasterol and β-Sitosterol. The sample, in order to save time and solvents, was prepared with a direct saponification reaction, without the extraction of total lipid. Then, the substance in the form of a derivative before being tested with a gas chromatography with flame ionization detection and capillary column was prepared. Sterols that can be tested included those with a test range of 0.3-14.2 mg/100g. From the validation of the method, it was found that LOD of Brassicasterol, Campesterol, Stigmasterol andβ-sitosterol equals 0.5, 0.3, 0.6 and 0.4 mg/100g respectively. The accuracy is shown with the percentage of recovery in the range of 82-104 % and the reliability of the test is repeated with the value of HORRAT in the range of 1.30-1.55, which is in the accepted range. The developed method can reduce the test time to 2 hours per sample and can reduce organic solvent up to 180 ml per sample. When this method was applied to test the cholesterol content in meat samples and reference material samples, it was found that cholesterol content was in the range of 34.96- 66.15 with the recoveries of 93.39%. This indicates that the developed test method is accurate and faster. It can reduce costs and be a worthwhile and suitable method for further use in the laboratory.

**Keywords**: plant sterol, direct saponification, method validation

[1] สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร 10900
[1] Institute of Food Research and Product Development, Kasetsart University. Kasetsart Bangkok 10900
*Corresponding author: e-mail: j.agroin@gmail.com

***Received:*** *May 13, 2020,* ***Accepted:*** *August 16, 2020,* ***Published:*** *September 12, 2020*

## บทนำ

ไฟโตสเตอรอลหรือมีชื่อเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า แพลนท์สเตอรอล หรือสเตอรอลจากพืช เป็นสารประกอบประเภทสเตียรอยด์ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์และเป็นสารตั้งต้นของการผลิตฮอร์โมนในพืช โดยจะอยู่ในรูปโมเลกุลอิสระ (Free sterol) หรืออยู่ในรูปที่ถูกเอสเทอริไฟด์ (Sterol-Esters) ซึ่งสารสเตอรอลที่ถูกเอสเทอริไฟด์ จะมีฤทธิ์ที่ดีกว่าและสามารถละลายในไขมันได้ดีกว่าสารสเตอรอลในรูปโมเลกุลอิสระ จึงพบมากในน้ำมันพืช ถั่วชนิดต่าง ๆ สารสเตอรอลจากพืชที่พบปริมาณมาก ได้แก่ Campesterol, Stigmasterol และ β-Sitosterol ที่พบมากที่สุด คือ β-Sitosterol สารสเตอรอลจากพืชสามารถช่วยลดปริมาณคอเลสเตอรอลได้ เนื่องจากมีโครงสร้างคล้ายกับคอเลสเตอรอลในสัตว์ โดยจะไปแย่งการดูดซึมคอเลสเตอรอลที่ลำไส้เล็ก เป็นผลทำให้สามารถลดปริมาณคอเลสเตอรอลที่เข้าสู่กระแสเลือด จึงส่งผลให้ลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเกี่ยวกับหัวใจได้ ทศพร (2563)

ปัจจุบันในท้องตลาดมีผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก รวมทั้งผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีส่วนผสมของสารสเตอรอลจากพืช เช่น โยเกิร์ต ไส้กรอก มายองเนส ครีมชีส คุกกี้ น้ำสลัด กาแฟผงสำเร็จรูป เครื่องดื่มธัญพืชสำเร็จรูป เนย เนยเทียม มาการีน เป็นต้น ทั้งนี้ผู้ผลิตและผู้นำเข้าผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของสารสเตอรอลจากพืช ต้องนำผลิตภัณฑ์ไปทดสอบหาปริมาณสารสเตอรอลจากพืชโดยห้องปฏิบัติการ ก่อนนำไปขึ้นทะเบียนตำรับอาหารกับสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.) โดยห้องปฏิบัติการศูนย์บริการประกันคุณภาพอาหาร (Food Quality Assurance Service Center : FQA) เป็นหน่วยงานของสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร ที่ได้รับการรับรองมาตรฐานห้องปฏิบัติการ ISO/IEC 17025 : 2017 และเป็นหน่วยงานระดับประเทศที่ได้รับมอบอำนาจจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เพื่อรับผิดชอบการทดสอบวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์อาหาร เพื่อการรับรองคุณภาพและการขึ้นทะเบียนตำรับอาหาร โดยให้บริการทดสอบทั้งด้านเคมี ด้านกายภาพ ด้านจุลชีววิทยาและการจัดทำฉลากโภชนาการ ด้วยเทคนิค/วิธีการ และเครื่องมือที่ทันสมัย มีผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง เชื่อถือได้

อย่างไรก็ตามในวิธีการทดสอบหาปริมาณสารสเตอรอลจากพืชที่ห้องปฏิบัติการใช้อยู่เดิมนั้น ใช้วิธีการสกัดน้ำมันออกจากตัวอย่างด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มและเมทานอล (Abidi, 2001) ก่อนนำไปทำปฏิกิริยาซาปอนนิฟิเคชันด้วยด่าง และทำอนุพันธ์ของสารสเตอรอลก่อนนำไปทดสอบด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีซึ่งใช้เวลานาน นอกจากนี้การสกัดน้ำมันด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มและเมทานอลนั้น มีความเป็นพิษสูงเป็นอันตรายต่อผู้ปฏิบัติงานในระยะยาวเป็นอย่างมาก ปัจจุบันตัวทำละลายคลอโรฟอร์มจะต้องได้รับอนุญาตในการจัดซื้อตามประกาศกระทรวงอุตสาหกรรมก่อนนำมาใช้ และตัวทำละลายดังกล่าวยังมีราคาแพง ดังนั้นเพื่อให้การทดสอบได้รวดเร็วขึ้น เพื่อรองรับความต้องการของผู้ใช้บริการที่เพิ่มสูงขึ้นและสามารถแข่งขันกับห้องปฏิบัติการอื่นได้ จึงได้พัฒนาวิธีทดสอบหาปริมาณสารสเตอรอลจากพืช โดยปรับปรุงขั้นตอนวิธีการทดสอบในส่วนของการเตรียมตัวอย่างเพื่อให้ได้สารอนุพันธ์ของสเตอรอลที่รวดเร็วขึ้น โดยอาศัยเทคนิคการทำปฏิกิริยาซาปอนนิฟิเคชันโดยตรง (Direct Saponification) ซึ่งช่วยลดระยะเวลาการทดสอบและลดการใช้ตัวทำละลายที่เป็นพิษสูง เพื่อให้ผู้ปฏิบัติงานมีความปลอดภัยมากขึ้น โดยสอดคล้องกับวัตถุประสงค์ของห้องปฏิบัติการศูนย์บริการประกันคุณภาพอาหาร ที่มุ่งเน้นความรวดเร็ว ถูกต้องแม่นยำ นอกจากนี้ยังทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้น เพื่อประเมินวิธีทดสอบที่พัฒนาขึ้นว่ามีความเหมาะสม สามารถใช้ทดสอบหาปริมาณสารสเตอรอลในตัวอย่างได้ถูกต้อง แม่นยำ เชื่อถือได้ เพื่อยืนยันความสามารถของห้องปฏิบัติการที่สอดคล้องกับข้อกำหนดตามระบบมาตรฐาน ISO/IEC 17025 : 2017

## วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อพัฒนาวิธีการทดสอบหาปริมาณสารสเตอรอลจากพืชด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีที่สามารถทำให้การทดสอบรวดเร็วขึ้น

2. เพื่อพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบหาปริมาณสารสเตอรอลจากพืช (Method validation) ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี

3. เพื่อศึกษาความถูกต้องในการนำวิธีทดสอบที่พัฒนาขึ้นไปประยุกต์ใช้ในรายการทดสอบหาปริมาณคอเลสเตอรอล

4. เพื่อศึกษาความคุ้มค่าของวิธีการทดสอบหาปริมาณสารสเตอรอลจากพืชที่พัฒนาขึ้น

## ระเบียบวิธีวิจัย

**เครื่องมือและอุปกรณ์**

การพัฒนาวิธีการทดสอบหาปริมาณสารสเตอรอลจากพืชด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography) ร่วมกับตัวตรวจวัดชนิดเฟลมไอออไนเซชัน (GC-FID) ยี่ห้อ Agilent รุ่น 6850, capillary Column ชนิด HP-1 Length 30 m, ID 0.32 mm, Film 0.25 um โดยสภาวะการทดสอบในการแยกสารที่สนใจดังนี้ Column flow 1 ml/min, Inlet temperature 300 °C, Detector temperature 300 °C, Oven temperature 260 - 300 °C Injection Volume 1 μl

**สารเคมี**

Stigmasterol Purity 97.6%, β-sitosterol Purity 95.7%, Brassicasterol Purity 98%, Campesterol Purity 65%, 5-α-cholestan Purity 98% ยี่ห้อ Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany) Chloroform (AR Grade), Methanol (AR Grade), Potassium hydroxide (AR Grade), Ethanol (AR Grade, 95%), Hexane (AR Grade), n-Heptane (AR Grade), Petroleum Ether (AR Grade), Sodium sulphate anhydrous (AR Grade) ซื้อจาก Labscan (Bangkok, Thailand), Hexamethyldisilizane (HMDS) (GR Grade purity ≥ 99.0%), Trimethylchlorosilane (TMCS) (GR Grade purity ≥ 99.0%), Pyridine (AR Grade) ยี่ห้อ Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany)

**ตัวอย่าง**

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ ตัวอย่างธัญพืชและผลิตภัณฑ์จากธัญพืช ซึ่งเป็นกลุ่มตัวอย่างที่ลูกค้าส่งมาตรวจวิเคราะห์เป็นจำนวนมาก ได้แก่ จมูกข้าวกล้องไรซ์เบอร์รี่ ลูกเดือย ข้าวโพด เครื่องดื่มนมถั่วเหลืองผสมธัญพืช และเครื่องดื่มทางการค้าที่มีการเติมสารสเตอรอลจากพืช และตัวอย่าง เนื้อหมูต้มสุก หมูหยอง และปลาแซลมอน สำหรับการทดสอบหาปริมาณคอเลสเตอรอลด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น

**ขั้นตอนวิธีการดำเนินการ**

1.การพัฒนาวิธีทดสอบหาปริมาณสารสเตอรอลจากพืชด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีที่สามารถทำให้การทดสอบรวดเร็วขึ้น

ทำการพัฒนาวิธีทดสอบโดยปรับปรุงขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเพื่อเตรียมสารอนุพันธ์ของสารสเตอรอลจากพืช โดยใช้เทคนิคการทำปฏิกิริยาซาปอนนิฟิเคชันโดยตรง (Direct Saponification) ซึ่งดัดแปลงวิธีการมาจาก Sorenson and Sullivan (2006) มีขั้นตอนดังนี้ ชั่งตัวอย่าง 0.2-0.5 กรัม น้ำหนักที่แน่นอน นำไปทำปฏิกิริยาซาปอนนิฟิเคชันโดยเติม Ethanolic-KOH 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่ 85 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที สกัดสารสเตอรอล (Unsaponificable matter) ด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเฮกเซนและปิโตรเลียมอีเทอร์ และน้ำปริมาตร 10 มิลลิลิตร รวมสารละลายผสมระหว่างเฮกเซนและ ปิโตรเลียมอีเทอร์ส่วนบนที่ได้และนำไปประเหยให้แห้ง ทำให้อยู่ในรูปสารอนุพันธ์ของสารสเตอรอลด้วย HMDS 200 ไมโครลิตร,TMCS 100 ไมโครลิตร และ Pyridine 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที เติม Internal standard (5-α-cholestan) 1 มิลลิลิตร กรองผ่านไนลอนฟิลเตอร์ นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี คำนวณผลร้อยละโดยมวล (มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัม) ของ Brassicasterol, Campesterol, Stigmasterol และ β-Sitosterol

2.การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (Method Validation)

ทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้น โดยใช้ตัวอย่างจมูกข้าวกล้องไรซ์เบอร์รี่ ซึ่งเป็นกลุ่มตัวอย่างที่ผู้ใช้บริการส่งมาทดสอบเป็นจำนวนมาก โดยการเติมสารละลายมาตรฐาน β-sitosterol เนื่องจากเป็นสารสเตอรอลกลุ่มที่พบในตัวอย่างมากที่สุด นอกจากนี้สารมาตรฐานตัวอื่นยังมีราคาสูงมาก จึงใช้ β-sitosterol เป็นตัวแทนของสารสเตอรอลเพียงตัวเดียว ลงในตัวอย่างจมูกข้าวกล้องไรซ์เบอร์รี่ (fortified sample) จากนั้นพิสูจน์ช่วงของการวัด (Working rang) และความเป็นเส้นตรง (Linearity) โดยเตรียม

สารละลายมาตรฐานความเข้มข้นอย่างน้อย 5 ระดับ ประเมินความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานโดยหาความสัมพันธ์เชิงเส้น ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (แกน X) และค่า Respons Ratios Factor หรือ RRF (แกน Y) ของพื้นที่ใต้กราฟสารมาตรฐานต่อพื้นที่ใต้กราฟ Internal standard (IS) พิจารณาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, $R^2$) โดยค่าที่ได้ควรมีค่าเข้าใกล้หนึ่ง

ทดสอบปริมาณต่ำสุดของสารที่สามารถตรวจพบได้ (Limit of detection; LOD) และปริมาณต่ำสุดของสารที่สามารถตรวจสอบเชิงปริมาณได้ (Limit of quantitation: LOQ) ด้วยการเปรียบเทียบ signal ที่วัดได้จากตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กับตัวอย่างที่เป็น blank เรียกว่า signal-to-noise ratio

พิสูจน์ความเที่ยง (Precision) โดยทดสอบตัวอย่างจมูกข้าวกล้องไรซ์เบอร์รี่ จำนวน 10 ซ้ำ (n = 10) คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ % RSD = (SDx100) / ค่าเฉลี่ยที่วิเคราะห์ได้ และหาค่า HORRAT จาก % $RSD_{Lab}$/ % $RSD_{expected}$โดย Expected %RSD = $2^{(1-0.5\log C)}$ ; C คือ Concentration ratio

พิสูจน์ความแม่นของวิธี (Accuracy) โดยเติมสารมาตรฐาน β-sitosterol (C1) ลงในตัวอย่างจมูกข้าวกล้องไรซ์เบอร์รี่ (C2: Unspike sample) วิเคราะห์หาปริมาณ β-sitosterol ในตัวอย่างจมูกข้าวกล้องไรซ์เบอร์รี่ที่เติมสารมาตรฐาน (spiked sample) (C3) คำนวณความแม่นได้จากค่าร้อยละการคืนกลับ (%Recovery) จาก ((C3-C2)*100) / C1

3.การประยุกต์ใช้วิธีที่พัฒนาขึ้นกับรายการทดสอบหาปริมาณคอเลสเตอรอล

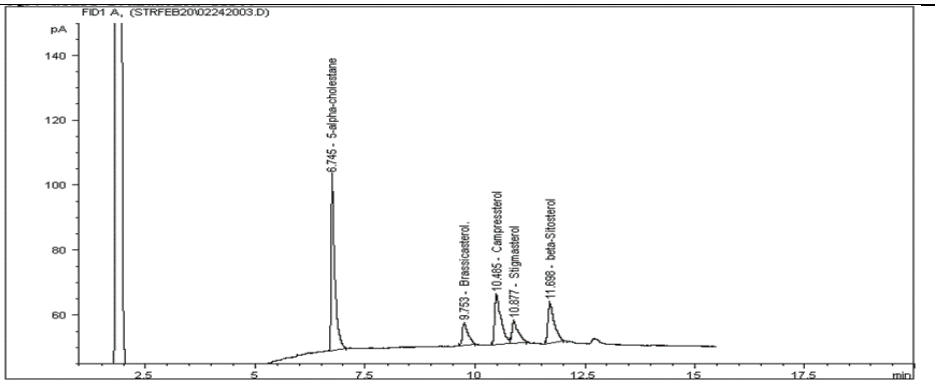
เนื่องจากคอเลสเตอรอลมีโครงสร้างคล้ายกับสารสเตอรอลจากพืช และมีวิธีการเตรียมตัวอย่างให้อยู่ในรูปอนุพันธ์ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีเช่นเดียวกัน จึงนำวิธีการที่พัฒนาขึ้นนี้ มาเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้ทดสอบหาปริมาณคอเลสเตอรอล โดยทดสอบหาปริมาณคอเลสเตอรอลด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น ด้วยตัวอย่างวัสดุอ้างอิง (Standard Reference Material: SRM 3233) ที่ทราบปริมาณคอเลสเตอรอลที่แน่นอน (71.7± 2.2 มิลลิกรัม/100กรัม) และตัวอย่างเนื้อหมูต้มสุก หมูหยอง และปลาแซลมอน เพื่อเป็นตัวแทนของเนื้อสัตว์

4. ศึกษาความคุ้มค่าของวิธีทดสอบหาปริมาณสารสเตอรอลจากพืชด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น

ทำการศึกษาความคุ้มค่าของวิธีทดสอบหาปริมาณสเตอรอลจากพืช โดยเปรียบเทียบระหว่างวิธีเดิมที่ห้องปฏิบัติการใช้อยู่เดิมและวิธีที่พัฒนาขึ้นใหม่ ได้แก่ ปริมาณตัวอย่างที่ใช้ ระยะเวลาในการทดสอบ ปริมาณสารเคมีที่ใช้ และความคุ้มค่าของวิธีที่พัฒนาขึ้นในการทดสอบสารสเตอรอลจากพืชร่วมกับคอเลสเตอรอลพร้อมกัน โดยเติมสารมาตรฐาน β-Sitosterol ที่เป็นตัวแทนของสารสเตอรอลจากพืช ในตัวอย่างวัสดุอ้างอิง (Standard Reference Material : SRM 3233) ทราบปริมาณคอเลสเตอรอลที่แน่นอนจากนั้นทดสอบความแม่น (% Recovery) ของวิธีทดสอบดังกล่าว

## ผลการวิจัย

1. การพัฒนาวิธีทดสอบหาปริมาณสารสเตอรอลจากพืชด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี ที่สามารถทำให้การทดสอบรวดเร็วขึ้นทำการพัฒนาวิธีทดสอบโดยปรับปรุงขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง โดยใช้เทคนิคการทำปฏิกิริยาซาปอนนิฟิเคชันโดยตรง (Direct Saponification) จากการทดสอบหาสารสเตอรอลจากพืชได้แก่ Brassicasterol, Campesterol, Stigmasterol และ β-sitosterol ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีร่วมกับตัวตรวจวัดชนิดเฟลมไอออไนเซชัน (GC-FID) ใช้เวลาในการทดสอบ (Run time) 18 นาที พบว่าเป็นวิธีที่มีความจำเพาะ สามารถแยกสารสเตอรอลจากพืชทั้ง 4 ชนิดได้แก่ Brassicasterol (นาทีที่ 9.7), Campesterol (นาทีที่ 10.4), Stigmasterol (นาทีที่ 10.8), β-sitosterol (นาทีที่ 11.6) และ 5-α-cholestan (นาทีที่ 6.7) ออกจากกันอย่างชัดเจน แสดงโครมาโทแกรมจากการทดสอบด้วยเครื่องแก๊ส โครมาโทกราฟี (ภาพที่ 1)




**ภาพที่ 1** โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน Brassicasterol, Campesterol, Stigmasterol และ β-Sitosterol ตามลำดับ และ Internal standard (5-α-cholestan)

2. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (Method Validation) การพิสูจน์ช่วงของการวัด (Working rang) และความเป็นเส้นตรง (Linearity) ของกราฟมาตรฐาน Brassicasterol, Campesterol Stigmasterol และ β-Sitosterol โดยพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, $R^2$) พบว่า กราฟมาตรฐาน Brassicasterol, Campesterol Stigmasterol และ β-Sitosterol มีค่า $R^2 \geq 0.995$ ซึ่งเป็นค่าตามเกณฑ์ การยอมรับ และมีช่วงการวัด (working range) ของ Brassicasterol เท่ากับ 4.80-121.25 มิลลิกรัม/กิโลกรัม, Campesterol เท่ากับ 3.25-81.25 มิลลิกรัม/กิโลกรัม, Stigmasterol เท่ากับ 5.70-142.50 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และ β-Sitosterol เท่ากับ 3.80-95.00 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ตามลำดับ

ทดสอบปริมาณต่ำสุดของสารที่สามารถตรวจพบได้ (Limit of detection: LOD) และปริมาณต่ำสุดของสารที่สามารถตรวจสอบเชิงปริมาณได้ (Limit of quantitation: LOQ) โดยทำการเปรียบเทียบ signal-to-noise ratio โดย LOD มีค่า signal-to-noise ratio ค่าที่ยอมรับคือ 3 ต่อ 1 และ LOQ มีค่า signal-to-noise ratio ที่ยอมรับคือ 10 ต่อ 1 (ตารางที่ 1)

**ตารางที่ 1** ค่า Regression line, $R^2$, LOD และ LOQ ของสารมาตรฐาน

| Sterol componant | Concentration (mg/kg) | Slop | Intercept | $R^2$ | LOD (mg/100g) | LOQ (mg/100g) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Brassicasterol | 4.85-121.25 | 0.009 | -0.0159 | 0.999 | 0.50 | 2.40 |
| Campesterol | 3.25-81.25 | 0.028 | -0.007 | 1.000 | 0.30 | 0.80 |
| Stigmasterol | 5.70-142.50 | 0.009 | -0.009 | 0.999 | 0.60 | 2.90 |
| β-Sitosterol | 3.80-95.00 | 0.021 | -0.025 | 0.999 | 0.40 | 1.10 |

พิสูจน์ความเที่ยง (Precision) ในตัวอย่างจมูกข้าวกล้องไรซ์เบอร์รี่ตรวจไม่พบสาร Brassicasterol ส่วนปริมาณ CampesterolStigmasterol และ β-Sitosterol ในตัวอย่างเท่ากับ 2.98 ± 0.25, 6.42 ± 0.49 และ 9.39 ± 0.70 มิลลิกรัม/100กรัม ตามลำดับ มีค่า % RSD น้อยกว่า 10 % และค่า HORRAT ซึ่งใช้พิสูจน์ความเที่ยงของการทำซ้ำ (Repeatability) ของ Campesterol Stigmasterol และ β-Sitosterol เท่ากับ 1.30, 1.46 และ 1.55 ตามลำดับ โดยมีค่าน้อยกว่า 2 อยู่ในเกณฑ์การยอมรับของ Horwitz (2016) จึงถือว่าวิธีนี้มีความเที่ยงตรง (ตารางที่ 2)

จากการพิสูจน์ความแม่น (Recovery)ของการทดสอบ โดยเติมสารมาตรฐานβ-Sitosterol ลงในตัวอย่างจมูกข้าวกล้องไรซ์เบอร์รี่ จากนั้นพิจารณาค่าการคืนกลับของสารมาตรฐานβ-Sitostero พบว่า มีค่าการคืนกลับของสารมาตรฐาน β-Sitosterol เฉลี่ยร้อยละ 90.25 (ตารางที่ 3) โดยมีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 82.13-104.24 ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนดตามแนวทางของ Horwitz (2016) ที่กำหนดให้ค่าการคืนกลับอยู่ในช่วงร้อยละ 75-120

จากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบหาปริมาณสารสเตอรอลจากพืช โดยทำการประเมินความเป็นเส้นตรง ความเที่ยง และความแม่น พบว่ามีค่าอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนดตามมาตรฐาน แสดงให้เห็นว่าวิธีการทดสอบหาปริมาณสารสเตอรอลจากพืชที่พัฒนาขึ้นนี้ ให้ผลการทดสอบที่ถูกต้อง แม่นยำ สามารถนำวิธีการทดสอบนี้ไปใช้งานได้ (ตารางที่ 3)

ทำการทดสอบตัวอย่างจมูกข้าวกล้องไรซ์เบอร์รี่ ลูกเดือย ข้าวโพด เครื่องดื่มนมถั่วเหลืองผสมธัญพืช และเครื่องดื่มทางการค้าที่เติมสารสเตอรอลจากพืช โดยทำการทดสอบหาสาร Brassicasterol, Campesterol, Stigmasterol และ β-Sitosterol (n=3) โดยผลที่ได้แสดงร้อยละโดยมวลต่อน้ำหนักตัวอย่าง (ตารางที่ 4)

**ตารางที่ 2** ผลการพิสูจน์ความเที่ยง (Precision) ในตัวอย่างจมูกข้าวกล้องไรซ์เบอร์รี่ (n=10)

| Componant | Concentration (mg/100g) | % RSD | HORRAT |
|---|---|---|---|
| Brassicasterol | Not Detected | - | - |
| Campesterol | 2.98 ± 0.25 | 8.25 | 1.30 |
| Stigmasterol | 6.42 ± 0.49 | 7.68 | 1.46 |
| β-Sitosterol | 9.39 ± 0.70 | 7.49 | 1.55 |

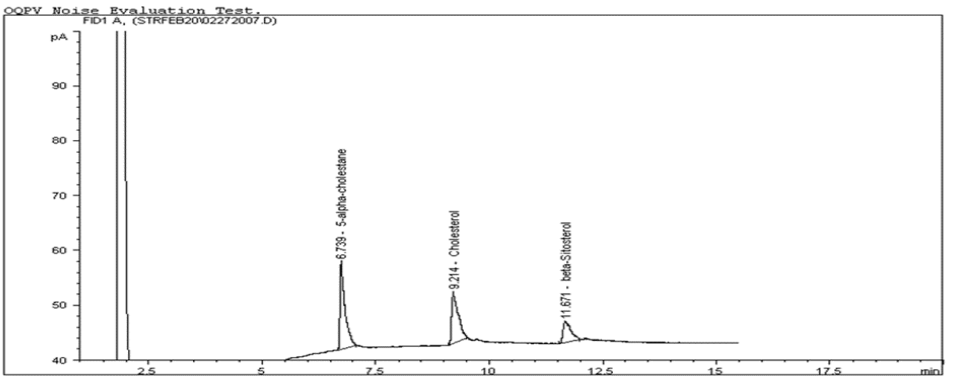
**ตารางที่ 3** ผลการพิสูจน์การคืนกลับของสารมาตรฐาน β-Sitosterol ในตัวอย่างจมูกข้าวกล้องไรซ์เบอร์รี่ (n=10)

| ตัวอย่าง | ความเข้มข้นของβ-Sitosterol ในตัวอย่าง(มิลลิกรัม/100กรัม) | ความเข้มข้นของ β-Sitosterol ที่เติม (มิลลิกรัม/100กรัม) | Recovery (%) | RSD (%) |
|---|---|---|---|---|
| จมูกข้าวกล้องไรซ์เบอร์รี่ | 9.39 ± 0.7 | 17.96 ± 0.58 | 90.25 | 6.73 |

**ตารางที่ 4** ปริมาณสารสเตอรอลจากพืชที่ทดสอบได้(mean±SD) ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น

| ตัวอย่าง | ปริมาณของสารสเตอรอลจากพืช (มิลลิกรัม /100 กรัมตัวอย่าง) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Brassicasterol | Campesterol | Stigmasterol | β-Sitosterol |
| ลูกเดือย | Not detected | 2.03 ± 0.14 | 1.57 ± 0.32 | 12.61 ± 0.31 |
| ข้าวโพด | Not detected | 2.21 ± 0.38 | 1.01 ± 0.16 | 13.09 ± 0.63 |
| ข้าวกล้องไรซ์เบอร์รี่ | 1.80 ± 0.11 | 2.17 ± 0.03 | 7.47 ± 0.20 | 11.72 ± 0.04 |
| เครื่องดื่มนมถั่วเหลืองผสมธัญพืช | Not detected | 0.47 ± 0.03 | 0.73 ± 0.07 | 0.93 ± 0.05 |
| เครื่องดื่มทางการค้าที่เติมสารสเตอรอลจากพืช | Not detected | 97.76 ± 7.01 | Not detected | 270.03 ± 4.62 |

3. การประยุกต์ใช้วิธีที่พัฒนาขึ้นเพื่อทดสอบหาปริมาณคอเลสเตอรอล จากการประยุกต์ใช้วิธีทดสอบที่พัฒนาขึ้นนี้ไปใช้สำหรับทดสอบหาปริมาณคอเลสเตอรอลด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีเดียวกันนี้ พบว่าสามารถแยกคอเลสเตอรอลออกจากสารมาตรฐาน β-Sitosterol ได้อย่างชัดเจน โดยคอเลสเตอรอลถูกแยกออกได้นาทีที่ 9.214 และสารมาตรฐาน β-Sitosterol แยกออกได้นาทีที่ 11.671 ตามลำดับ (ภาพที่ 2)




**ภาพที่ 2** แสดงโครมาโตแกรมของ cholesterol และ β-Sitosterol ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร

จากการทดสอบหาปริมาณคอเลสเตอรอลด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น โดยใช้ตัวอย่างวัสดุอ้างอิง SRM 3233 ได้ปริมาณคอเลสเตอรอลได้ 69.12 ± 3.33 มิลลิกรัม/100 กรัม ตัวอย่างมีค่าการคืนกลับ (Recovery) ของคอเลสเตอรอล ร้อยละ 96.40 มีค่า HORRAT เท่ากับ 0.57 และทำการทดสอบหาปริมาณคอเลสเตอรอลในตัวอย่าง เนื้อหมูต้มสุก หมูหยอง และปลาแซลมอน ได้ปริมาณคอเลสเตอรอล เท่ากับ 66.15 ± 0.72 , 48.84 ± 0.71 และ 34.96 ± 0.09 มิลลิกรัม/100 กรัมตัวอย่าง ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

**ตารางที่ 5** ปริมาณคอเลสเตอรอลในตัวอย่างวัสดุอ้างอิง SRM 3233 เนื้อหมูต้มสุก หมูหยอง และปลาแซลมอน ที่ได้จากการทดสอบด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น

| ตัวอย่าง | ปริมาณคอเลสเตอรอล (มิลลิกรัม/100กรัม) |
|---|---|
| วัสดุอ้างอิง SRM 3233 | 69.12 ± 3.33 |
| เนื้อหมูต้มสุก | 66.15 ± 0.72 |
| หมูหยอง | 48.84 ± 0.71 |
| ปลาแซลมอน | 34.96 ± 0.09 |

4. การศึกษาความคุ้มค่าของวิธีทดสอบหาปริมาณสารสเตอรอลจากพืชที่พัฒนาขึ้น ทำการศึกษาความคุ้มค่าของวิธีทดสอบหาปริมาณสารสเตอรอลจากพืชที่พัฒนาขึ้น โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีที่พัฒนาขึ้นกับวิธีที่ใช้ปฏิบัติงานอยู่เดิม จากตารางที่ 5 พบว่า วิธีการที่เลือกใช้นั้นสามารถ ลดขั้นตอนการปฏิบัติงานจากเดิมได้ 2 ขั้นตอน คือ สามารถลดขั้นตอนการสกัดน้ำมันและขั้นตอนการกำจัดตัวทำละลายที่ใช้สกัดน้ำมัน ทำให้สามารถทำการทดสอบได้รวดเร็วขึ้น จากเดิมใช้เวลาทำการทดสอบประมาณ 4 ชั่วโมงต่อ 1 ตัวอย่าง เหลือเพียง 2 ชั่วโมงต่อ 1 ตัวอย่าง และลดการใช้ตัวทำละลายคลอโรฟอร์มและเมทานอล ที่เป็นอันตรายต่อผู้ปฏิบัติงานได้ถึง 180 มิลลิลิตร ต่อ 1 ตัวอย่าง นอกจากนี้วิธีที่พัฒนาขึ้นยังใช้ตัวอย่างในการทดสอบปริมาณที่น้อยลงเหลือแค่ 0.2-0.5 กรัม ซึ่งเหมาะสำหรับตัวอย่างงานวิจัยที่มีปริมาณน้อย ๆ (ตารางที่ 6)

**ตารางที่ 6** เปรียบเทียบความความคุ้มค่าของวิธีการทดสอบปริมาณสารสเตอรอลจากพืช ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นกับวิธีปัจจุบันที่ใช้อยู่

| ขั้นตอน | วิธีเดิมที่ใช้งานในปัจจุบัน | วิธีที่พัฒนาขึ้น |
|---|---|---|
| น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้ (กรัม) | 1-5 | 0.2-0.5 |
| ขั้นตอน การสกัดน้ำมัน | คลอโรฟอร์ม : เมทานอล | X |
| ขั้นตอน ระเหยตัวทำละลาย | เครื่องระเหยแห้ง | X |
| ขั้นตอนทำปฏิกิริยาซาปอนนิฟิเคชัน | / | / |
| ขั้นตอนสกัดสารที่ไม่ทำปฏิกิริยาซาปอนนิฟิเคชัน | / | / |
| ขั้นตอนการเตรียมสารอนุพันธ์ | / | / |
| ขั้นตอนการทดสอบด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี | / | / |
| ปริมาณตัวทำละลายที่ใช้สกัดน้ำมัน (มิลลิลิตร) | 180 | 0 |
| เวลาที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างต่อ 1 ตัวอย่าง (ชั่วโมง) | 4 | 2 |

/ หมายถึง มีการดำเนินการในขั้นตอนนั้น, X หมายถึง ไม่มีการดำเนินการในขั้นตอนนั้น

นอกจากนี้ทำการศึกษาความคุ้มค่าของวิธีที่พัฒนาขึ้น ด้วยการทดสอบสารสเตอรอลจากพืชร่วมกับสารคอเลสเตอรอล พร้อมกัน โดยเติมสารมาตรฐาน β-Sitosterol ที่เป็นตัวแทนของสารสเตอรอลจากพืช ในตัวอย่างวัสดุอ้างอิง (Standard Reference Material : SRM 3233) ที่ทราบปริมาณคอเลสเตอรอลที่แน่นอน พิสูจน์ความถูกต้องในการทดสอบ พบว่า มีค่าร้อยละการคืนกลับของคอเลสเตอรอล(Recovery) ร้อยละ 93.39 ค่า RSD เท่ากับ 5.16 % และมีค่า HORRAT เท่ากับ 0.65 ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนดของ Horwitz (2016) แสดงให้เห็นว่าวิธีทดสอบหาปริมาณสารสเตอรอลจากพืชที่พัฒนาขึ้นนี้ และสามารถทำการทดสอบสารสเตอรอลและคอเลสเตอรอลได้พร้อมกันอย่างถูกต้อง

จากความคุ้มค่าดังกล่าว แสดงให้เห็นว่าการพัฒนาวิธีการทดสอบด้วยเทคนิคการทำปฏิกิริยาซาปอนนิฟิเคชันโดยตรงในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง เป็นวิธีทางเลือกหนึ่งที่มีประสิทธิภาพ รวดเร็ว ประหยัด และสามารถนำมาใช้ในการปฏิบัติงานประจำได้

## สรุปผลการวิจัย

จากการพัฒนาวิธีทดสอบปริมาณสารสเตอรอลในพืชโดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีร่วมกับตัวตรวจวัดชนิดเฟลมไอออไนเซชัน (GC-FID โดยปรับปรุงกระบวนการเตรียมตัวอย่างจากที่ปฏิบัติงานอยู่เดิมให้มีความรวดเร็วขึ้นด้วยเทคนิคการทำปฏิกิริยาซาปอนนิฟิเคชันกับตัวอย่างโดยตรง สามารถลดขั้นตอนการปฏิบัติงานได้ถึง 2 ขั้นตอน ได้แก่ ขั้นตอนการสกัดน้ำมันออกจากตัวอย่าง และขั้นตอนการระเหยตัวทำละลายออกจากน้ำมันที่สกัดได้ ใช้เวลาในการทดสอบเหลือเพียง 120 นาทีต่อ 1 ตัวอย่าง ทำให้ทำการทดสอบได้รวดเร็วขึ้น นอกจากนี้ยังสามารถลดการใช้ตัวทำละลายคลอโรฟอร์มและเมทานอลที่เป็นอันตรายต่อผู้ปฏิบัติงานได้ถึง 180 มิลลิลิตรต่อ 1 ตัวอย่าง ทำให้ผู้ปฏิบัติงานมีความปลอดภัยมากขึ้น นอกจากนี้ยังสามารถลดต้นทุนในการทดสอบของห้องปฏิบัติการได้อีกด้วย โดยวิธีการนี้สามารถตรวจสอบสารสเตอรอลจากพืชได้ 4 ชนิด ได้แก่ Brassicasterol, Campesterol, Stigmasterol และ **β**-Sitosterol โดยสภาวะที่ใช้ในการทดสอบพบว่าเป็นวิธีที่มีความจำเพาะสามารถแยกสารสเตอรอลจากพืชทั้ง 4 ชนิดออกจากกันอย่างชัดเจน ได้แก่ Brassicasterol, Campesterol Stigmasterol และ **β**-sitosterol ตรวจพบนาทีที่ 9.7, 10.4, 10.8 และนาทีที่ 11.6 ตามลำดับ

จากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (Method validation) พบว่า วิธีการที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ทดสอบหาสารสเตอรอลจากพืชได้โดยมีช่วงของการวัด 3.25-142.5 มิลลิกรัม/ลิตร มีความเป็นเส้นตรงโดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ; $R^2 \geq 0.995$ มีความเที่ยงในการทดสอบซ้ำ HORRAT น้อยกว่า 2 และมีค่าร้อยละการคืนกลับ (Recovery) ของสาร **β**-Sitosterol เท่ากับร้อยละ 90.25 ± 6.08 ซึ่งอยู่ในช่วงร้อยละ 75 - 120 ตามเกณฑ์ที่กำหนดของ Horwitz (2016) และนอกจากนี้ยังสามารถนำวิธีทดสอบที่พัฒนาขึ้นนี้มาประยุกต์ใช้ทดสอบหาปริมาณคอเลสเตอรอลในตัวอย่างเนื้อสัตว์และตัวอย่างวัสดุอ้างอิง (Standard Reference Material: SRM 3233) พบว่ามีค่าคอเลสเตอรอลอยู่ในช่วง 34.96- 66.15 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม โดยมีค่าร้อยละการคืนกลับ เท่ากับร้อยละ 93.39 ค่า RSD เท่ากับ 5.16 % และมีค่า HORRAT เท่ากับ 0.65 ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนดของ Horwitz (2016) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธีทดสอบที่พัฒนาขึ้นนี้ มีความคุ้มค่าสามารถทำให้การปฏิบัติงานได้รวดเร็วขึ้นโดยให้ผลการทดสอบที่ถูกต้องเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

## อภิปรายผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

วิธีการทดสอบหาปริมาณสารสเตอรอลจากพืชด้วยวิธีการแบบเดิมที่ห้องปฏิบัติการใช้อยู่นั้น ต้องนำตัวอย่างมาทำการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (Liquid-Liquid Solvent Extraction) ให้อยู่ในรูปของน้ำมันก่อนนำไปทำปฏิกิริยาซาปอนนิฟิเคชันด้วยด่างเข้มข้นก่อนนำไปตรวจสอบด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี ซึ่งพบว่าวิธีการดังกล่าวใช้เวลานานและมีสารเคมีที่เป็นอันตรายต่อผู้ปฏิบัติงานเป็นอย่างมาก งานวิจัยนี้จึงได้พัฒนาวิธีทดสอบหาปริมาณสารสเตอรอลจากพืช โดยปรับปรุงขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง โดยใช้เทคนิคการทำปฏิกิริยาซาปอนนิฟิเคชันกับตัวอย่างด้วยด่างเข้มข้นโดยตรง (Direct Saponification) จากนั้นนำไปทำเป็นสารอนุพันธ์และตรวจสอบด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี พบว่าเป็นวิธีที่สามารถลดขั้นตอนและลดระยะเวลาในการทดสอบจากเดิมได้ถึง 2 ชั่วโมงต่อ 1 ตัวอย่าง โดยผลการทดสอบยังคงมีความถูกต้อง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Brufau *et al.* (2006) ที่ใช้เทคนิคการทำปฏิกิริยาซาปอนนิฟิเคชันโดยตรงในการทดสอบสารสเตอรอลทั้งหมดในตัวอย่างตับเพื่อลดระยะเวลาในการทดสอบเช่นเดียวกัน เมื่อทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้น โดยพิสูจน์ความเที่ยงของการทำซ้ำ (Repeatability) ด้วยค่า % RSD มีค่าน้อยกว่า 10 % และค่า HORRAT มีค่าน้อยกว่า 2 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับมาตรฐานของ Association of Official Agricultural Chemists (AOAC) ส่วนการพิสูจน์ความถูกต้องในการทดสอบโดยพิจารณาค่าร้อยละการคืนกลับ (% recovery) จากการเติมสารมาตรฐาน และการทดสอบด้วย Standard Reference

Material พบว่า มีค่าร้อยละการคืนกลับเฉลี่ยที่ร้อยละ 90.25 ซึ่งค่าร้อยละการคืนกลับที่ได้ไม่ถึงระดับร้อยละ 100 อาจเนื่องจากตัวอย่างที่นำมาทดสอบเป็นตัวอย่างในกลุ่มของธัญพืช ซึ่งเป็นกลุ่มคาร์โบไฮเดรตเชิงซ้อน สารสเตอรอลจะถูกยึดเกาะในโครงสร้างโมเลกุลด้วยพันธะ glycosidic bonds ที่มีความแข็งแรง ทำให้ในขั้นตอนการทำซาปอนนิฟิเคชันด้วยด่างเกิดขึ้นได้ไม่สมบูรณ์ เมื่อนำมาทดสอบด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี จึงทำให้ค่าร้อยละการคืนกลับได้ไม่ถึงร้อยละ 100 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Winkler-Moser (2017) โดยตัวอย่างที่มีโครงสร้างเป็นโปรตีนหรือคาร์โบไฮเดรตเชิงซ้อน เช่น ถั่วต่าง ๆ ข้าว ข้าวสาลี เป็นต้น ควรจะย่อยตัวอย่างด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 3-5 โมล ให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง ก่อนนำไปทดสอบในขั้นตอน ซาปอนนิฟิเคชันด้วยด่างต่อไป อย่างไรก็ตามค่าร้อยละการคืนกลับยังอยู่ในช่วงเกณฑ์กำหนดที่ยอมรับได้คือ 75-120% ซึ่งยืนยันได้ว่าวิธีทดสอบที่พัฒนาขึ้นนี้มีความถูกต้องเหมาะสม สามารถนำไปในการทดสอบหาปริมาณสารสเตอรอลจากพืชในตัวอย่างได้

จากการประยุกต์ใช้วิธีทดสอบที่พัฒนาขึ้นนี้มาทดสอบหาปริมาณคอเลสเตอรอล พบว่าวิธีทดสอบนี้สามารถแยกสารคอเลสเตอรอลออกจากสารสเตอรอลได้อย่างชัดเจน ทั้งนี้เนื่องจากคอเลสเตอรอลมีลักษณะโครงสร้างคล้ายคลึงกับสารสเตอรอลจากพืช และมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างให้อยู่ในรูปของเอสเทอร์เช่นเดียวกันก่อนนำไปทดสอบด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี ทำให้สามารถใช้วิธีทดสอบเดียวกันนี้ ทำการทดสอบได้ทั้รคอเลสเตอรอลและสารสเตอรอลได้พร้อมกัน ทำให้ช่วยลดระยะเวลาในการทดสอบ นอกจากนี้จากการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้พบว่า ให้ผลการทดสอบที่ถูกต้องเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนดของ AOAC ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธีการทดสอบที่พัฒนาขึ้นมีความคุ้มค่า เหมาะสมสำหรับการทดสอบที่ต้องการความถูกต้องและรวดเร็ว และช่วยลดต้นทุนในการทดสอบมากขึ้นกว่าเดิม เพื่อเพิ่มศักยภาพของห้องปฏิบัติการศูนย์บริการประกันคุณภาพอาหารให้สามารถแข่งขันกับห้องปฏิบัติการอื่นต่อไปได้

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลงด้วยดี จากการอนุเคราะห์ของหัวหน้าศูนย์บริการประกันคุณภาพอาหาร สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร ที่สนับสนุนเครื่องมือและอุปกรณ์ต่าง ๆ อีกทั้งยังให้การสนับสนุนบุคลากรพัฒนาความรู้ต่อยอดจากงานประจำสู่งานวิจัย เพื่อตอบสนองความต้องการของผู้ใช้บริการของห้องปฏิบัติการศูนย์บริการประกันคุณภาพอาหาร ผู้วิจัยต้องขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

## เอกสารอ้างอิง

ทศพร นามโฮง. 2563. ไฟโตสเตอรอลและเอสเทอร์: ส่วนประกอบอาหารใหม่ (Novel food ingredient). ระบบสารสนเทศอาหารอนาคต. [Online].Available:http://fic.nfi.or.th/futurefood/novel_research_detail.php?id=11. (สืบค้นเมื่อ ธันวาคม 2562).

Abidi, S.L. 2001. Chromatographic analysis of plant sterols in food and vegetable oils. Journal of Chromatography A. 935: 173–201.

Brufau, G., Codony, R., Canela, M.A., and M. Rafecas. 2006. Rapid and quantitative determination of total sterols of plant and animal origin in liver samples by gas chromatography. Chromatographia. 64(9): 559-563.

Horwitz, W. 2016. Requirements for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements. AOAC.

Sorenson, W.R., and D. Sullivan. 2006. Determination of campesterol, stigmasterol, and beta-sitosterol in saw palmetto raw materials and dietary supplements by gas chromatography : Single-Laboratory Validation. Journal of AOAC International. 89(1): 22–34.

Winkler-Moser, J. 2017. Gas chromatographic analysis of plant sterols. AOCS Lipid Library.