

Detection:LOD) และค่าต่ำสุดของปริมาณน้ำมันที่สามารถตรวจหาปริมาณได้ (Limit of Quantitation:LOQ) ดำเนินการวิเคราะห์ Reference Material (RM) 2 ตัว คือ White mineral oil และ Paraffin oil เพื่อประเมินความถูกต้องและแม่นยำ โดย หาค่า Recovery ของเครื่อง TFE2000 ได้เท่ากับ 99.39% และ 99.32% ตามลำดับ ส่วนเครื่อง SOXTHERM 2000 ได้ 99.40% และ 99.53% ตามลำดับ จากการประเมินความแม่นยำโดยใช้สมการของ Horwitz's Ratio พบว่าวิเคราะห์โดยใช้เครื่องมือ บุคคล และเวลาเดียวกันได้ค่า HORRAT ของเครื่อง TFE2000 ได้เท่ากับ 0.29 และ 0.20 ตามลำดับ ส่วนเครื่อง SOXTHERM 2000 ได้ เท่ากับ 0.41 และ 0.73 ตามลำดับ ส่วนการหาปริมาณต่ำสุดที่สามารถวัดได้ (LOD) ของเครื่อง TFE2000 ได้เท่ากับ 0.15% ส่วนเครื่อง SOXTHERM 2000 ได้ 0.36% และปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์และรายงานผลได้ (LOQ)ของเครื่อง TFE2000 ได้เท่ากับ 0.22% ส่วนเครื่อง SOXTHERM 2000 ได้ 0.50% ซึ่งค่าที่ได้ทั้งหมดนั้นผ่านเกณฑ์การยอมรับตามมาตรฐานสากล ดังนั้นจึงถือว่าวิธีวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันในพืชดังกล่าวนี้เป็นเทคนิควิธีที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันในพืชสำหรับห้องปฏิบัติการวิเคราะห์พืชฯ ต่อไป

คำนำ

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันในพืชของห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิเคราะห์วิจัยพืชและวัตถุเคมีการเกษตร เดิมใช้เทคนิค Soxhlet Extraction แต่เนื่องจากการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคดังกล่าวใช้ตัวทำละลายที่มีความเป็นพิษสูง ติดไฟง่าย เพื่อสกัดไขมันออกจากตัวอย่าง ต้นทุนต่อหน่วยในการวิเคราะห์ค่อนข้างสูง และยังใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน ปี 2551 กลุ่มงานฯได้รับงบประมาณในการจัดซื้อเครื่อง TFE 2000 ซึ่งใช้เทคนิค Supercritical Fluid Extraction มาใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันในพืช ซึ่งไม่ต้องใช้ตัวทำละลายทำให้ปลอดภัยต่อผู้ใช้งาน ประกอบกับต้นทุนต่อหน่วยและเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ลดลงกว่าเทคนิคเดิมที่ใช้อยู่ เนื่องจากเทคนิค Supercritical Fluid Extraction นี้เป็นเทคนิคใหม่ จึงจำเป็นต้องทดสอบความเหมาะสม พร้อมทั้งศึกษาเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ที่ได้จากทั้งสองเทคนิค เพื่อให้มั่นใจว่าวิธีวิเคราะห์มีความเที่ยง (precision) ความแม่นยำ (accuracy) มีค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (Limit of detection ; LOD) และมีค่าต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณได้ (Limit of quantitation ; LOQ) อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ทางสถิติ และเป็นเทคนิควิธีที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันในพืชต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

- เครื่องชั่งทศนิยม 3 ตำแหน่ง
- เครื่อง TFE 2000
- เครื่อง SOXTHERM 2000
- ตู้อบ (Hot air oven)
- เครื่องแก้วและวัสดุอื่น ๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์

สารเคมี

- Leco dry
- 80% ethanol
- วัสดุอ้างอิง (Reference Material : RM)
- Petroleum ether

วิธีการ

วิธีวิเคราะห์สำหรับเครื่อง SOXTHERM 2000

1. นำถ้วยรองรับ (Extraction cup) เป่าไปอบไล่ความชื้นที่อุณหภูมิ 105°C 3 ชั่วโมง นำออกมาปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งบันทึกน้ำหนัก
2. ชั่งตัวอย่างที่บดละเอียดประมาณ 2-5 กรัม ห่อด้วยกระดาษกรองใส่ลงใน cellulose thimble
3. ทำการ warm เครื่องสักัดนานประมาณ 20 นาที
4. run program ตาม method ของเครื่อง
5. นำถ้วยรองรับไปอบที่อุณหภูมิ 105°C 3 ชั่วโมง นำออกมาปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งบันทึกน้ำหนัก

วิธีวิเคราะห์สำหรับเครื่อง TFE 2000

1. ชั่งตัวอย่างที่บดละเอียดประมาณ 2 กรัม ใส่ลงใน thimble
2. นำ glass wool ใส่ลงใน vial แล้วนำไปอบด้วยไมโครเวฟที่ 750w เป็นเวลา 3 นาที นำมาทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งบันทึกน้ำหนัก
3. ทำการ warm เครื่องสักัดนานประมาณ 20 นาที

4. run program ตาม method ของเครื่อง
5. นำ vial ไปอบด้วยไมโครเวฟที่ 750w เป็นเวลา 3 นาที นำมาทิ้งให้เย็นในตู้ดูดความชื้น ชั่งบันทึกน้ำหนัก

1. การศึกษาหาค่า Accuracy และค่า Precision ของวิธีวิเคราะห์น้ำมันในพืช

- 1.1 ชั่ง RM คือ paraffin oil และ white mineral oil จำนวนอย่างละ 10 ชั่ง
- 1.2 ดำเนินการวิเคราะห์ตามวิธีวิเคราะห์
- 1.3 บันทึกข้อมูล และคำนวณผล
- 1.4 เปรียบเทียบค่าที่ได้กับค่าที่รับรองของ RM

2. การศึกษาหาค่า Limit of Detection (LOD) และ Limit of Quantitation (LOQ)

2.1 ชั่ง Sample Blank ให้ได้น้ำหนัก 2 กรัม นำไปหาค่าต่ำสุดของปริมาณน้ำมันที่สามารถตรวจพบได้ (Limit of Detection:LOD) และค่าต่ำสุดของปริมาณน้ำมันที่สามารถตรวจหาปริมาณได้ (Limit of Quantitation:LOQ)

2.2 บันทึกข้อมูล และคำนวณหาค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ระยะเวลาและสถานที่ดำเนินการ

ระยะเวลา	เดือนตุลาคม 2553 - กันยายน 2555 ระยะเวลา 2 ปี
สถานที่ดำเนินการ	ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิเคราะห์วิจัยพืช วัตถุประสงค์การเกษตร และนิวเคลียร์ เทคนิคการเกษตร กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

ผลการดำเนินงานและวิจารณ์

เนื่องจากการวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันด้วยเครื่อง TFE 2000 เป็นเทคนิคการวิเคราะห์ใหม่ จึงต้องทำการหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สำหรับพืชแต่ละชนิด โดยได้ลองทำ 3 method แต่ละ method วิเคราะห์ 30 ตัวอย่าง จนได้สภาวะของเครื่องที่เหมาะสมออกมา แล้วจึงทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบกับเครื่อง SOXTHERM 2000

เมื่อทำการวิเคราะห์แล้วจะได้ค่าจากการทำซ้ำ(Repeatability) ความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision) โดยทำการวิเคราะห์ RM คือ White mineral oil และ Paraffin oil อย่างละ 10 ซ้ำ โดย %Fat ของ RM ทั้ง 2 ชนิด ที่กำหนดมาคือ 100%

ตารางแสดงค่าเฉลี่ย (mean) ค่าSD และค่า %RSD

RM \ เครื่องมือ	TFE 2000			SOX THERM 2000		
	mean	SD	%RSD	mean	SD	%RSD
White mineral oil	99.39	0.37	0.38	99.40	0.54	0.54
Paraffin oil	99.32	0.26	0.26	99.53	0.95	0.96

หา Accuracy

-ประเมิน Accuracy โดยใช้ค่า %recovery

วิธีคำนวณค่า Accuracy

TFE2000 (White mineral oil)

$$\%recovery = \frac{\text{mean}}{\mu} \times 100$$

μ

$$= \frac{99.39}{100} \times 100$$

100

$$= 99.39\%$$

TFE2000 (Paraffin oil)

$$\begin{aligned}\% \text{recovery} &= \frac{\text{mean} \times 100}{\mu} \\ &= \frac{99.32 \times 100}{100} \\ &= 99.32\%\end{aligned}$$

SOXTHERM2000 (White mineral oil)

$$\begin{aligned}\% \text{recovery} &= \frac{\text{mean} \times 100}{\mu} \\ &= \frac{99.40 \times 100}{100} \\ &= 99.40\%\end{aligned}$$

SOXTHERM2000 (Paraffin oil)

$$\begin{aligned}\% \text{recovery} &= \frac{\text{mean} \times 100}{\mu} \\ &= \frac{99.53 \times 100}{100} \\ &= 99.53\%\end{aligned}$$

หา Precision โดยการทดลองซ้ำแบบ repeatability

-ประเมิน Precision โดยใช้ HORRAT

วิธีคำนวณค่า Precision

$$\text{HORRAT} = \frac{\% \text{RSD}}{\text{Predicted RSD}}$$

Predicted RSD :

$$\text{Repeatability : -PRSD} = 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)}$$

TFE2000 (White mineral oil)

Predicted RSD :

$$\begin{aligned} \text{Repeatability : -PRSD} &= 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log 0.9939)} \\ &= 1.32 \end{aligned}$$

TFE2000 (Paraffin oil)

Predicted RSD :

$$\begin{aligned} \text{Repeatability : -PRSD} &= 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log 0.9932)} \\ &= 1.32 \end{aligned}$$

SOXTHERM2000 (White mineral oil)

Predicted RSD :

$$\begin{aligned} \text{Repeatability : -PRSD} &= 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log 0.9940)} \\ &= 1.32 \end{aligned}$$

SOXTHERM2000 (Paraffin oil)

Predicted RSD :

$$\begin{aligned} \text{Repeatability : -PRSD} &= 0.66 \times 2^{(1-0.5\log 0.9953)} \\ &= 1.32 \end{aligned}$$

HORRAT

TFE2000 (White mineral oil)

$$\begin{aligned} \text{HORRAT} &= \frac{\%RSD}{\text{Predicted RSD}} \\ &= \frac{0.38}{1.32} = 0.29 \end{aligned}$$

TFE2000 (Paraffin oil)

$$\begin{aligned} \text{HORRAT} &= \frac{\%RSD}{\text{Predicted RSD}} \\ &= \frac{0.26}{1.32} = 0.20 \end{aligned}$$

SOXTHERM2000 (White mineral oil)

$$\begin{aligned} \text{HORRAT} &= \frac{\%RSD}{\text{Predicted RSD}} \\ &= \frac{0.54}{1.32} = 0.41 \end{aligned}$$

SOXTHERM2000 (Paraffin oil)

$$\text{HORRAT} = \frac{\%RSD}{\text{Predicted RSD}} = \frac{0.96/1.32}{0.73}$$

HORRAT < 2 ยอมรับ Precision

ตารางแสดงค่า %recovery และค่า HORRAT

RM \ เครื่องมือ	TFE 2000		SOX THERM 2000	
	%recovery	HORRAT	%recovery	HORRAT
White mineral oil	99.39%	0.29	99.40%	0.41
Paraffin oil	99.32%	0.20	99.53%	0.73

เมื่อทำการวิเคราะห์ sample blank จำนวน 10 ซ้ำ ได้ค่าดังตาราง และสามารถหาค่าต่ำสุดของปริมาณน้ำมันที่สามารถตรวจพบได้ (Limit of Detection:LOD) และค่าต่ำสุดของปริมาณน้ำมันที่สามารถตรวจหาปริมาณได้ (Limit of Quantitation:LOQ)

TFE2000	SOX THERM2000
ค่าเฉลี่ย = 0.11%	ค่าเฉลี่ย = 0.30%
SD = 0.01	SD = 0.02
%RSD = 9.09	%RSD = 6.67

วิธีคำนวณค่า Limit of Detection:LOD

TFE2000

$$\begin{aligned} \text{LOD} &= \text{mean} + 3\text{SD} \\ &= 0.11 + 3(0.012) \\ &= 0.15 \end{aligned}$$

SOX THERM2000

$$\begin{aligned} \text{LOD} &= \text{mean} + 3\text{SD} \\ &= 0.30 + 3(0.02) \\ &= 0.36 \end{aligned}$$

TFE2000

$$\begin{aligned} \text{LOQ} &= \text{mean} + 10\text{SD} \\ &= 0.11 + 10(0.01) \\ &= 0.21 \end{aligned}$$

SOX THERM2000

$$\begin{aligned} \text{LOQ} &= \text{mean} + 10\text{SD} \\ &= 0.30 + 10(0.02) \\ &= 0.50 \end{aligned}$$

สรุปผลการทดลอง

ผลจากค่าวิเคราะห์ %recovery อยู่ในช่วง 98 – 101% และ HORRAT < 2 อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

6. การนำไปใช้ประโยชน์

ได้เทคนิคการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำมันในพืชที่สะดวก รวดเร็ว ให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องแม่นยำ และเป็นวิธีที่สามารถนำไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ของกลุ่มงานวิเคราะห์วิจัยพืชวัตถุเคมีการเกษตรและนิวเคลียร์เทคนิคการเกษตร

ภาคผนวก

ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์เพื่อหาค่าความถูกต้อง (Accuracy) และ ความแม่นยำ (Precision)

RM (White Mineral Oil)	Fat (%)	
	TFE 2000	SOXTHERM 2000
1	98.72	98.73
2	99.73	99.84
3	99.57	99.10
4	99.68	99.81
5	99.66	98.65
6	99.62	99.60
7	99.40	99.87
8	99.50	99.89
9	98.74	99.83
10	99.28	98.74
Mean	99.39	99.40
SD	0.37	0.54

%RSD	0.38	0.54
------	------	------

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์เพื่อหาค่าความถูกต้อง (Accuracy) และ ความแม่นยำ (Precision)

RM (Paraffin Oil)	Fat (%)	
	TFE 2000	SOX THERM 2000
1	99.76	99.93
2	99.31	99.87
3	99.35	99.92
4	99.41	99.93
5	98.84	99.89
6	99.05	99.89
7	99.17	99.92
8	99.56	99.75
9	99.50	98.97
10	99.26	97.25
Mean	99.32	99.53

SD	0.26	0.95
%RSD	0.26	0.96

ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์เพื่อหาค่าต่ำสุดของปริมาณน้ำมันที่สามารถตรวจพบได้ (Limit of Detection:LOD) และค่าต่ำสุดของปริมาณน้ำมันที่สามารถตรวจหาปริมาณได้ (Limit of Quantitation:LOQ)

Sample blank	Fat (%)	
	TFE 2000	SOX THERM 2000
1	0.11	0.28
2	0.12	0.30
3	0.10	0.29
4	0.12	0.30
5	0.10	0.32
6	0.13	0.32
7	0.13	0.28
8	0.10	0.29

9	0.10	0.33
10	0.11	0.27
Mean	0.11	0.30
SD	0.01	0.02
%RSD	9.09	6.67

ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างสบู่ดำเปรียบเทียบระหว่าง 2 เครื่องมือ พบว่าความแตกต่างไม่เกิน 2%

สบู่ดำ	% Fat	
	TFE 2000	SOX THERM 2000
1	32.77	31.25
2	30.87	28.89
3	35.27	36.12
4	34.85	32.97
5	33.56	34.10
6	30.19	31.08
7	29.50	30.67

8	33.41	32.44
9	32.22	32.15
10	36.36	37.48
11	31.75	30.39
12	31.81	30.78
13	32.14	33.00
14	34.77	33.56
15	32.28	30.44
16	35.19	35.15
17	32.13	34.02
18	32.18	31.93
19	34.14	32.16
20	31.53	32.39
21	30.89	29.50
22	32.46	33.14
23	33.62	32.78
24	31.85	30.07
25	33.80	34.12
26	31.32	30.76
27	33.58	34.80

28	30.12	29.55
29	35.81	35.07
30	34.58	34.12

ตารางที่ 5 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างถั่วเหลืองเปรียบเทียบระหว่าง 2 เครื่องมือ พบว่าความแตกต่างไม่เกิน 2%

ถั่วเหลือง	% Fat	
	TFE 2000	SOX THERM 2000
1	15.63	16.97
2	15.55	17.42
3	15.30	17.22

4	16.25	16.19
5	18.20	17.11
6	18.20	18.78
7	16.29	15.55
8	14.11	12.89
9	13.70	13.35
10	12.60	11.51
11	12.77	11.23
12	15.95	17.88
13	16.72	17.47
14	16.31	17.3
15	15.60	14.37
16	17.40	15.65
17	19.09	20.73
18	13.70	12.94
19	12.75	12.21
20	14.92	15.37
21	15.72	14.43
22	14.08	13.57
23	14.20	12.43

24	12.42	14.37
25	16.72	17.36
26	15.10	15.53
27	18.55	18.86
28	19.32	18.09
29	15.67	14.15
30	14.39	15.33