abst.

ข้อมูลข่าวสารของกรมวิทยาศาสตร์บริการ
ตาม พ.ร.บ. ข้อมูลข่าวสารของราชการ พ.ศ. 2540

วศ กช
อว 53

เอกสารผลงานที่เสนอให้ประเมินเพื่อแต่งตั้งให้ดำรง

ตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ 7 ว

การพิสูจน์เพื่อยืนยันความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์วิตามินบี 1 ในผลิตภัณฑ์นมและธัญพืช

โดย

นางสาวนงนุช เมธียนต์พิริยะ
นักวิทยาศาสตร์ 6 ว

กลุ่มงานชีวเคมี กองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ
กรมวิทยาศาสตร์บริการ กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม

กรมวิทยาศาสตร์บริการ

เอกสารผลงานที่เสนอให้ประเมินเพื่อแต่งตั้งให้ดำรง

ตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ 7 ว

เลขหมู่ วศ กส
ฮว 53
เลขทะเบียน 11583
วันที่ 16 / ธ.ค. / 461

การพิสูจน์เพื่อยืนยันความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์วิตามินบี 1 ในผลิตภัณฑ์นมและธัญพืช

โดย

นางสาวนงนุช เมธียนต์พิริยะ

นักวิทยาศาสตร์ 6 ว

ด้วยอภินันทนาการ
จาก
วศ.
.....

กลุ่มงานชีวเคมี กองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

กรมวิทยาศาสตร์บริการ กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม

กรมวิทยาศาสตร์บริการ

บทคัดย่อ

การพิสูจน์เพื่อยืนยันความถูกต้องวิธีวิเคราะห์วิตามินบี 1 ในผลิตภัณฑ์นมและธัญพืช ด้วยเทคนิคไธโอโครมนั้น พบว่า วิธีดังกล่าวมีประสิทธิภาพดี มีปริมาณต่ำสุดที่ตรวจวิเคราะห์วิตามินบี 1 ในผลิตภัณฑ์นม เท่ากับ 8 ไมโครกรัม/100 กรัม และในธัญพืช เท่ากับ 33 ไมโครกรัม/100 กรัม และจากการทดลองพบว่า ได้ค่าร้อยละของปริมาณคืนกลับ (%recovery) ในผลิตภัณฑ์นม อยู่ในช่วงร้อยละ 95.2-102.38 และในธัญพืช อยู่ในช่วงร้อยละ 90.56-98.12 และความเที่ยง (precision)ในผลิตภัณฑ์นม ได้ค่า % Relative standard deviation (%RSD) อยู่ในช่วง 2.95 - 5.86 และในธัญพืช อยู่ในช่วง 4.10 - 8.99 นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์ตัวอย่างวัสดุอ้างอิง AS-FRM3 และนำค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองมาทำการทดสอบด้วยวิธีทดสอบแบบที (t-test) พบว่า ค่า t ที่คำนวณได้เท่ากับ 2.108 น้อยกว่าค่า t จากตาราง student t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และ degree of freedom เท่ากับ 9 แสดงว่าปริมาณวิตามินบี1 ในตัวอย่างวัสดุอ้างอิงที่วิเคราะห์นั้น ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับค่าที่รับรอง เป็นการยืนยันว่าวิธีและเครื่องมือที่ใช้ทดลองมีประสิทธิภาพดี จึงสรุปได้ว่าวิธีวิเคราะห์วิตามินบี1 นี้มีความถูกต้องและความเที่ยง ให้ผลการวิเคราะห์ที่น่าเชื่อถือ สามารถนำมาใช้วิเคราะห์หาปริมาณวิตามินบี1 ในผลิตภัณฑ์นมและธัญพืช

สารบัญ

หน้า

	บทคัดย่อ		**i**
	สารบัญ		**ii**
1.	**บทนำ**		**1**
	1.1	*คำนำ*	*1*
	1.2	*ความเป็นมาของปัญหา*	*5*
	1.3	*วัตถุประสงค์*	*5*
	1.4	*ประโยชน์ที่ได้รับ*	*5*
	1.5	*ระยะเวลาดำเนินการ*	*6*
2.	**วัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือ และวิธีดำเนินการ**		**7**
	2.1	*ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาทดลอง*	*7*
	2.2	*เครื่องมือและอุปกรณ์*	*7*
	2.3	*สารเคมีและวิธีการเตรียม*	*7*
	2.4	*การดำเนินงาน*	*11*
	2.5	*การศึกษาความเที่ยงและความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์วิตามินบี 1 ในตัวอย่างนม*	*14*
	2.6	*การหาค่า Limit of detection (LOD) และ limit of quantitation (LOQ) ของวิธีวิเคราะห์วิตามินบี 1 ในตัวอย่างนม*	*16*
	2.7	*การศึกษาความเที่ยงและความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์วิตามินบี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้อง*	*17*
	2.8	*การหาค่า Limit of detection (LOD) และ limit of quantitation (LOQ) ของวิธีวิเคราะห์วิตามินบี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้อง*	*17*
	2.9	*การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง*	*17*
3.	**ผลการทดลอง**		**19**
	3.1	*การศึกษาความเที่ยงและความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์วิตามินบี1 ในนมและผลิตภัณฑ์*	*19*
	3.2	*การศึกษาความเที่ยงและความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์วิตามินบี 1 ในข้าวกล้อง ซึ่งเป็นตัวแทนตัวอย่างธัญพืช*	*19*

หน้า

3.3	*การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีและเครื่องมือทดสอบ โดยการทดลองหาปริมาณวิตามินบี1 ในตัวอย่างวัสดุอ้างอิง AS-FRM3 (cereal soy)*	20
4.	**วิจารณ์ผลการทดลอง**	**21**
4.1	*การศึกษาความถูกต้องและความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์วิตามินบี1 ในผลิตภัณฑ์นมและธัญพืช ด้วยเทคนิคไธโอโครม*	21
4.2	*การศึกษาค่าต่ำสุดของวิธีวิเคราะห์วิตามินบี1 ในตัวอย่างนมและข้าวกล้อง*	21
5.	**สรุปผลการทดลอง**	**22**
5.1	*การศึกษาความถูกต้องและความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์วิตามินบี1 ในผลิตภัณฑ์นม ด้วยเทคนิคไธโอโครม*	22
5.2	*การศึกษาความถูกต้องและความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์วิตามินบี1 ในตัวอย่างข้าวกล้องซึ่งเป็นตัวแทนของธัญพืช ด้วยเทคนิคไธโอโครม*	22
5.3	*การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีและเครื่องมือทดสอบ*	22
6.	**กิตติกรรมประกาศ**	**24**
7.	**เอกสารอ้างอิง**	**25**
8.	**ภาคผนวก**	
	ภาคผนวก ก ตารางและกราฟ	**26**
ตารางที่ 1	*แสดงผลการศึกษาหาค่าความเที่ยง (precision or repeatability) ในการวิเคราะห์วิตามินบี 1 ด้วยเทคนิคไธโอโครม ในตัวอย่างนมสดยูเอชที (UX.336) จำนวน 10 ซ้ำ*	26
ตารางที่ 2	*ปริมาณวิตามินบี 1 ในตัวอย่างนมที่เติมสารมาตรฐานวิตามินบี1 ปริมาณ 0.05 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร*	27
ตารางที่ 3	*ปริมาณวิตามินบี 1 ในตัวอย่างนมที่เติมสารมาตรฐานวิตามินบี1 ปริมาณ 0.10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร*	28
ตารางที่ 4	*ปริมาณวิตามินบี 1 ในตัวอย่างนมที่เติมสารมาตรฐานวิตามินบี1 ปริมาณ 0.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร*	29
ตารางที่ 5	*แสดงผลการหาค่า Limit of detection (LOD) และ Limit of Quantitation (LOQ) ของการวิเคราะห์วิตามินบี 1 ด้วยเทคนิคไธโอโครม ในตัวอย่างนม*	30

หน้า

ตารางที่ 6	*แสดงผลการศึกษาหาค่าความเที่ยง (precision or repeatability) ในการวิเคราะห์วิตามินบี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้อง (US.520) จำนวน 7 ซ้ำ*	*31*
ตารางที่ 7	*ปริมาณวิตามินบี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้องที่เติมสารมาตรฐานวิตามินบี1 ปริมาณ 0.075 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร*	*32*
ตารางที่ 8	*ปริมาณวิตามินบี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้องที่เติมสารมาตรฐานวิตามินบี1 ปริมาณ 0.125 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร*	*33*
ตารางที่ 9	*ปริมาณวิตามินบี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้องที่เติมสารมาตรฐานวิตามินบี1 ปริมาณ 0.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร*	*34*
ตารางที่ 10	*แสดงผลการหาค่า Limit of detection (LOD) และ Limit of Quantitation (LOQ) ของวิธีวิเคราะห์วิตามินบี 1 ด้วยเทคนิคไธโอโครม ในตัวอย่างข้าวกล้อง*	*35*
ตารางที่ 11	*แสดงปริมาณวิตามินบี 1 ในตัวอย่างข้าวหอมมะลิ (UX.335) เพื่อยืนยันค่า LOQ ของตัวอย่างข้าว ที่ 5 SD_0*	*36*
ตารางที่ 12	*แสดงผลการทดลองหาปริมาณวิตามินบี 1 ในตัวอย่างอ้างอิงมาตรฐาน AS-FRM3 (cereal soy) จำนวน 10 ซ้ำ*	*37*
ตารางที่ 13	*ตาราง student t-test*	*38*
กราฟที่ 1	*แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นวิตามินบี1 และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ในตัวอย่างนม*	*30*
กราฟที่ 2	*แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นวิตามินบี1 และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ในตัวอย่างข้าวกล้อง*	*35*

ภาคผนวก ข รูป

รูปที่ 1	*Chromatographic column*	*39*

1. บทนำ

1.1 คำนำ

วิตามินบี 1 หรือ ไธอามิน (thiamine) โดยทั่วไปจะอยู่ในรูปของไธอามินไฮโดรคลอไรด์ (thiamine hydrochloride)[5,6] เป็นผลึกสีขาว ละลายน้ำและแอลกอฮอล์ได้ถึงร้อยละ 70 ไม่ละลายในไขมันและตัวทำละลายอินทรีย์ ถูกทำลายด้วยความร้อนในสารละลายที่เป็นกลางหรือด่าง ในสารละลายที่เป็นกรดจะทนความร้อนได้ถึง 150 องศาเซลเซียส

วิตามินบี1 มีความจำเป็นต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรทและการสังเคราะห์กรดอะมิโนบางชนิดภายในร่างกาย การขาดวิตามินบี 1 จะทำให้เบื่ออาหาร ร่างกายไม่เจริญเติบโต น้ำหนักลดลง ถ้ายังขาดวิตามินบี 1 ต่อไปอีก จะทำให้เกิดโรคเหน็บชา

วิตามินบี 1 มีในเมล็ดพืชและผักมีใบ เนื้อสัตว์ ไข่ เครื่องในสัตว์ เช่น ตับ ไต ความต้องการวิตามินบี 1 ของบุคคลวัยต่างๆเพื่อให้มีสุขภาพดีนั้น คณะกรรมการอาหารและโภชนาการกำหนดไว้ว่า โดยเฉลี่ยทุกคนควรได้รับประทาน 1.5 มิลลิกรัม/วัน[1] นอกจากนี้กระทรวงสาธารณสุขได้เล็งเห็นถึงความสำคัญของวิตามินบี 1 จึงได้กำหนดให้ผลิตภัณฑ์อาหารทุกชนิดต้องแจ้งปริมาณวิตามินบี 1 ในฉลากตามที่กำหนดในประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 182 (พ.ศ. 2541) ว่าด้วยเรื่อง ฉลากโภชนาการ เพื่อให้ผู้บริโภคได้รู้ถึงคุณค่าสารอาหารของผลิตภัณฑ์นั้นๆ และเป็นเกณฑ์ในการตัดสินใจสำหรับผู้บริโภคในการเลือกซื้ออาหารที่มีคุณค่าตามต้องการ อย่างไรก็ดีข้อความที่แจ้งบนฉลากจะมีความน่าเชื่อถือได้ต้องมาจากผลการวิเคราะห์ที่น่าเชื่อถือ ซึ่งผลิตออกโดยห้องปฏิบัติการที่มีความสามารถและมีหลักฐานยืนยันของความสามารถห้องปฏิบัติการนั้นๆ

มอก17025-2543 (ISO/IEC 17025 :1999) เป็นข้อกำหนดทั่วไปว่าด้วยความสามารถห้องปฏิบัติการทดสอบและสอบเทียบ ซึ่งสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมได้นำมาใช้เป็นเกณฑ์กำหนดในการให้การรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการนั้น มีเกณฑ์เกี่ยวกับการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (method validation) ที่ห้องปฏิบัติการพัฒนา/ออกแบบขึ้นเอง วิธีมาตรฐานที่ถูกใช้นอกขอบข่ายที่กำหนดไว้ การขยายและการดัดแปลงวิธีมาตรฐาน เพื่อยืนยันว่าวิธีนั้นเหมาะสมกับการใช้ที่กำหนดไว้

ดังนั้นการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (method validation) คือการยืนยันโดยการตรวจสอบและจัดทำหลักฐานที่เป็นรูปธรรมเพื่อแสดงว่าข้อกำหนดพิเศษโดยเฉพาะต่างๆ สำหรับการใช้ตามที่ตั้งใจไว้โดยเฉพาะ สามารถบรรลุโดยครบถ้วน นั่นคือ วิธีที่จะนำมาใช้มีความถูกต้องแม่นยำและ

ใช้ได้ดีในช่วงความเข้มข้น/ชนิดตัวอย่างที่ต้องการ สามารถใช้ได้ไม่จำกัดเฉพาะห้องปฏิบัติการ หรือใช้กับผู้วิเคราะห์คนเดียวเท่านั้น ซึ่งการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีสามารถดำเนินการตามวิธีใดวิธีหนึ่งหรือหลายวิธี ดังนี้

- การสอบเทียบโดยใช้มาตรฐานอ้างอิงหรือวัสดุอ้างอิง
- การเปรียบเทียบผลที่ได้กับวิธีอื่น
- การประเมินอย่างเป็นระบบเกี่ยวกับปัจจัยต่างๆ ที่มีอิทธิพลต่อผลที่ได้
- การประเมินค่าความไม่แน่นอนของผลที่ได้โดยอาศัยความเข้าใจทางวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับหลักการทางทฤษฎีของวิธีและประสบการณ์จากการทำงาน

เนื่องจากข้อมูลจาก มอก 17025-2543 เกี่ยวกับขั้นตอนการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบเป็นเพียงแนวทางอย่างกว้างๆ เท่านั้น จึงมีหน่วยงานหลายแห่งได้จัดทำข้อมูลเพื่อใช้เป็นแนวทางการปฏิบัติได้ เช่น Eurachem และ National Association of Testing Authorities (NATA) [7,9] ซึ่งได้จัดทำเกณฑ์เกี่ยวกับการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี โดยการตรวจสอบหาค่าต่างๆ ดังต่อไปนี้

- ทดสอบความถูกต้อง (accuracy) เป็นการวัดความใกล้เคียงระหว่างค่าที่ได้จากการวิเคราะห์และค่าที่มีอยู่จริง การทดสอบความแม่นของวิธีสามารถดำเนินการได้ 2 วิธี ดังนี้

ก. การวิเคราะห์ด้วยวิธีที่เราต้องการตรวจสอบในตัวอย่าง standard reference material (SRM) หรือ certified reference material (CRM) หรือ reference material (RM) ซึ่งเป็นวัสดุอ้างอิงหรือสารอ้างอิงที่มีค่ารับรองปริมาณของสารที่เราต้องการทดสอบ แล้วเปรียบเทียบค่าที่วิเคราะห์ได้กับค่าที่มีอยู่จริง มีเกณฑ์การตัดสินผลการวิเคราะห์โดยใช้การทดสอบแบบที (t-test) โดยค่า t ที่ได้จากการคำนวณจากการวิเคราะห์จะต้องน้อยกว่า ค่า t ที่ได้จากตาราง student t-test ที่ระดับความเชื่อมั่นเดียวกันและองศาอิสระเดียวกัน จึงจะยอมรับสมมุติฐานที่ว่าค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลองไม่มีความแตกต่างจากค่าที่รับรองอย่างมีนัยสำคัญ

ข. การวิเคราะห์โดยการค่า %recovery หรือร้อยละของปริมาณที่คืนกลับได้ โดยการเติมสารมาตรฐานของสารที่จะวิเคราะห์ลงใน sample blank หรือตัวอย่าง ในปริมาณที่แน่นอน ที่ความเข้มข้น 3-5 ความเข้มข้น ให้ครอบคลุมช่วงที่ใช้งาน แต่ละความเข้มข้นทำการวิเคราะห์ซ้ำ 6-10 ซ้ำ คำนวณหาร้อยละของปริมาณที่คืนกลับได้ เกณฑ์การยอมรับขึ้นอยู่กับชนิดของตัวอย่างและปริมาณสารในตัวอย่าง โดยทั่วไป ควรอยู่ในช่วงร้อยละ 90-110

-ทดสอบความเที่ยง (precision) เป็นการตรวจสอบความใกล้เคียงของกลุ่มค่าที่ทดสอบหลายครั้ง (repeatability) หรือค่าความแตกต่างระหว่างการวิเคราะห์แต่ละครั้ง ความเที่ยงแสดงด้วยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) หรือค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพันธ์ (relative standard deviation, RSD) หรือ coefficient of variant (CV) การหาค่าความเที่ยงสามารถทำโดยการวิเคราะห์ตัวอย่างเดียวกัน 6-10 ซ้ำคำนวณหาค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และ %RSD (%CV) โดยเกณฑ์การยอมรับค่า %RSD หรือ %CV ขึ้นอยู่กับปริมาณของสารที่ต้องการทดสอบ เช่น ถ้าความเข้มข้นของสารอยู่ในช่วง 1ppm %CV ไม่เกิน 10 ความเข้มข้นของสารในช่วงร้อยละ 1 %CV ไม่เกิน 2 ความเข้มข้นร้อยละ 0.001 %CV ไม่เกิน 5.6 ความเข้มข้นร้อยละ 0.01 %CV ไม่เกิน 4% เป็นต้น

- Limit of detection (LOD) เป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่เราสามารถวิเคราะห์สารนั้นได้ โดยอาจดูจากปริมาณสารที่ให้สัญญาณ (signal, S) เป็น 3 เท่าของสัญญาณรบกวน (noise, N)

Limit of detection สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ instrument detection limit (IDL) และ method detection limit (MDL) โดย IDL เป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ต้องการวิเคราะห์ซึ่งสามารถวัดได้โดยเครื่องมือวัด หาได้จากการวัดแบลงค์ (blank) จำนวน 10 ซ้ำ คำนวณค่า SD แล้วคำนวณค่า IDL ซึ่งเท่ากับ ค่าเฉลี่ยของแบลงค์บวก 3 เท่าของค่า SD (IDL = ค่าเฉลี่ยของแบลงค์ + 3SD)

ส่วน MDL เป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ต้องการวิเคราะห์ ซึ่งสามารถวัดได้โดยวิธีทดสอบนั้น การหา MDL นั้น สามารถทำได้ 2 วิธี

ก. วัดค่าสารละลายแบลงค์ของตัวอย่าง (sample blank) ที่ดำเนินการเตรียมตั้งแต่ขั้นตอนแรกของการวิเคราะห์ จำนวน 6-10 ซ้ำ หาค่าความเข้มข้นหรือปริมาณ คำนวณค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดย MDL = ค่าเฉลี่ยของสารละลายแบลงค์ของตัวอย่าง + 3SD

ข. วิเคราะห์สารตัวอย่าง หรือ สารตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 3 ระดับ ทำการวัด ความเข้มข้นละ 6-10 ซ้ำ คำนวณหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน สร้างกราฟระหว่าง ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (แกน Y) กับความเข้มข้นที่วัดได้ (แกน X) ลากเส้นตัดแกน Y ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ที่อ่านจากจุดตัดแกน Y คือ ค่า SD_0 ของสารละลายแบลงค์ของตัวอย่าง คำนวณค่า MDL โดย MDL = 3 SD_0 คูณกับอัตราการเจือจางของสาร

- Limit of quantitation (LOQ) เป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ต้องการวิเคราะห์ ซึ่งสามารถหาปริมาณได้โดยมีความถูกต้องและความเที่ยงเป็นที่ยอมรับ โดยทั่วไป ค่า LOQ คือ ปริมาณสารที่ให้สัญญาณประมาณ 10 เท่าของสัญญาณรบกวน หรือ 10 เท่าของค่า SD_0

- Selectivity & specificity หมายถึง ความสามารถที่จะวิเคราะห์สารนั้นๆ ในตัวอย่างที่มีสารอื่นเจือปนได้อย่างถูกต้อง วิธีวิเคราะห์ที่นำมาใช้นั้นสามารถแยกความแตกต่างออกได้จากสารอื่นๆ ที่คล้ายกัน หรือสารปนเปื้อนที่มีในตัวอย่างได้ การทำ selectivity นั้นอาจทำได้หลายแบบ เช่น การวัด resolution (R) ระหว่างสารที่จะวิเคราะห์กับสารปนเปื้อน หรืออาจใช้วิธีวัด absorbance ratio ร่วมกับการดู countour plot หรือ peak purity

- Range หมายถึง ช่วงความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ที่สามารถทำการวิเคราะห์ได้โดยให้ความถูกต้องและความเที่ยงตามที่ยอมรับได้ ส่วน linear range หมายถึง ช่วงความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ ที่มีความสัมพันธ์กับสัญญาณที่วัดได้เป็นเส้นตรง

- Linearity เป็นความสัมพันธ์เชิงเส้นที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีความเข้มข้นต่ำสุดจนถึงสูงสุด ในช่วงใช้งาน ความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรสองตัวซึ่งมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง เช่น ความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงกับค่า response จากเครื่องมือวัดหรือไม่ ความสัมพันธ์เชิงเส้นนี้ แสดงด้วยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ซึ่งมีค่าระหว่าง –1 ถึง 1 โดยทั่วไปยอมรับค่า r ที่อยู่ในช่วง 1 ถึง 0.995

- Sensitivity ของวิธีทดสอบ เป็นการวัดการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณต่อความเข้มข้น แสดงด้วยค่าความชันของกราฟมาตรฐาน และต้องรายงานโดยระบุช่วงความเข้มข้น

- Ruggedness (ความแข็งของวิธี) เป็นการทดสอบโดยตั้งใจที่จะเปลี่ยนตัวแปรของวิธีปฏิบัติงาน โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อจะทดสอบภาวะการทำงานที่มีตัวแปรใดตัวแปรหนึ่ง หรือหลายตัวแปรที่เปลี่ยนแปลง เช่น เปลี่ยนชนิดของเครื่องมือ เปลี่ยนสภาวะแวดล้อมของการทดสอบ ผู้ทดสอบที่มีประสบการณ์ต่างกัน สารเคมีหรือสารมาตรฐานจากผู้ผลิตที่ต่างกัน เป็นต้น

จากที่ได้กล่าวมาข้างต้น จะเห็นได้ว่าการตรวจสอบความถูกต้องหรือความใช้ได้ของวิธีนั้นมีหลายวิธี ดังนั้นการเลือกใช้วิธีใดวิธีหนึ่งนั้นขึ้นอยู่กับความเหมาะสมและวิธีการวิเคราะห์นั้นๆ เช่น ถ้าต้องการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีที่ปฏิบัติอยู่เป็นประจำ ก็อาจใช้วิธีการทดสอบหาความถูกต้อง ความเที่ยงของวิธี การหาค่าต่ำสุด LOD และ LOQ ก็เพียงพอ ในขณะที่วิธีวิเคราะห์ที่ได้เปลี่ยนจากเดิมโดยสิ้นเชิง หรือเป็นวิธีที่พัฒนาขึ้นใหม่ จะต้องทดสอบหาความถูกต้อง ความเที่ยง การหาค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ (LOQ) ค่า linearity ค่า range เป็นต้น

ดังนั้นการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีที่กรมวิทยาศาสตร์บริการใช้ในการวิเคราะห์วิตามินบี1 ด้วยเทคนิคไฮโอโครมนั้นจึงใช้วิธีตรวจสอบค่าความถูกต้อง ความเที่ยง ค่าต่ำสุดของการวิเคราะห์ (LOD, LOQ) ในตัวอย่างนมและข้าว ซึ่งเป็นตัวแทนของผลิตภัณฑ์นมและธัญพืช เพื่อยืนยันถึงความใช้ได้ของวิธีที่ให้บริการอยู่ รวมทั้งแสดงให้เห็นถึงความน่าเชื่อถือของผลวิเคราะห์

1.2 ความเป็นมาของปัญหา

กรมวิทยาศาสตร์บริการมีหน้าที่ความรับผิดชอบในการตรวจวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ สารเจือปน สารปรุงแต่ง แร่ธาตุ และวิตามิน ในอาหารชนิดต่างๆ เพื่อรับรองคุณภาพผลิตภัณฑ์อาหาร ใช้เป็นข้อมูลในการประกอบการขอขึ้นทะเบียนอาหารต่างๆ หรือเป็นข้อมูลสำหรับผู้ประกอบการในการปรับปรุงคุณภาพผลิตภัณฑ์อาหาร ดังนั้นผลการวิเคราะห์จะต้องมีประสิทธิภาพ คือ มีความเที่ยงและถูกต้อง เป็นที่น่าเชื่อถือของหน่วยงานต่างๆที่มารับบริการ

ดังนั้นเพื่อให้ผลการวิเคราะห์วิตามินบี 1 ด้วยเทคนิคไฮโอโครมที่กรมวิทยาศาสตร์บริการให้บริการอยู่นั้น มีความถูกต้อง ความเที่ยง และน่าเชื่อถือ จึงได้ศึกษาความถูกต้องหรือความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์วิตามินบี 1 [7,8,9] โดยการวิเคราะห์เปรียบเทียบกับวัสดุอ้างอิงมาตรฐาน การหาค่าความเที่ยง การหาค่าความถูกต้อง และปริมาณต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ในผลิตภัณฑ์นมและธัญพืช

หลักการในการวิเคราะห์ไธอามิน [4,10] ไธอามินที่จะวิเคราะห์จะต้องอยู่ในรูปอิสระหรือถ้าเป็นไธอมินไทโรฟอสเฟต ต้องทำให้แตกตัวเป็นไธอามินอิสระด้วยเอนไซม์ จากนั้นทำให้บริสุทธิ์ด้วย ion-exchange resin แล้วจึงออกซิไดซ์ ไธอามินเป็นไธโอโครม ซึ่งจะให้แสงฟลูออเรสเซนส์ แล้ววัดความเข้มของฟลูออเรสเซนส์ ด้วยเครื่องฟลูออโรมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น excitation 365 นาโนเมตร emission 430 นาโนมิเมตร ปริมาณฟลูออเรสเซนส์ เป็นสัดส่วนโดยตรงกับไธโอโครมที่มีอยู่ ซึ่งจะแปรผันตามปริมาณไธอามินในตัวอย่าง

1.3 วัตถุประสงค์

เพื่อยืนยันความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์วิตามินบี 1 ด้วยเทคนิคไธโอโครม ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมและธัญพืช

1.4 ประโยชน์ที่ได้รับ

- เพื่อให้ได้วิธีวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพ มีความถูกต้อง เที่ยง และเชื่อถือได้
- เป็นส่วนหนึ่งของการเป็นห้องปฏิบัติการที่ดี (Good Laboratory Practice, GLP)
- เป็นแนวทางในการพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์อื่นๆ

1.4 ระยะเวลาดำเนินการ

4 เดือน (กุมภาพันธ์ - พฤษภาคม 2543)

2. วัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือ และ วิธีดำเนินการ

2.1. ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาทดลอง

2.1.1 การศึกษาความเที่ยง (precision) ร้อยละของปริมาณที่คืนกลับ (% recovery) ค่า limit of detection (LOD) และ limit of quantitation (LOQ) ของวิธีวิเคราะห์วิตามินบี 1 ใช้ตัวอย่างนมสดยูเอชที (UX.335) ข้าวกล้อง (US.520) ข้าวหอมมะลิ (UX.336)

2.1.2 การศึกษาความถูกต้องของวิธีและเครื่องมือที่ใช้ในการทดลองวิเคราะห์วิตามินบี 1 ใช้ตัวอย่างวัสดุอ้างอิง (reference material) : AS-FRM3 , concensus value vitamin B1 = 0.85 mg/100g

2.2. เครื่องมือและอุปกรณ์

2.2.1 เครื่องชั่งไฟฟ้า ชั่งได้ละเอียด 0.0001 กรัม 0.01 กรัม

2.2.2 เครื่องบดตัวอย่าง

2.2.3 Spectrofluorometer, Kontron SFM 23/B

2.2.4 หม้อนึ่งความดัน

2.2.5 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH-meter)

2.2.6 กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 2

2.2.7 อ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 45 $\pm$ 5 องศาเซลเซียส

2.2.8 นาฬิกาจับเวลา

2.2.9 เครื่องแก้วต่างๆ เช่น ปิเปตต์และขวดแก้วปริมาตร บีกเกอร์ กระบอกตวง ขนาดต่างๆ

2.2.10 หลอดแก้วทดลองแบบที่มีจุกแก้ว

2.2.11 Chromatographic glass column (ดูรูปที่ 1)

2.2.12 เครื่อง suction pump

2.3. สารเคมีและวิธีการเตรียม (สารเคมีทุกชนิดมีคุณภาพระดับชั้นคุณภาพวิเคราะห์)

2.3.1 ไอโซบิวทานอล

2.3.2 เอทานอล ร้อยละ 95

2.3.3 เอทานอล ความบริสุทธิ์ร้อยละ 99.8

2.3.4 กรดไฮโดรคลอริก ความถ่วงจำเพาะ 1.18

2.3.5 กรดซัลฟุริก ความถ่วงจำเพาะ 1.84

2.3.6 เอนไซม์อะไมเลส

2.3.7 โซเดียมไฮดรอกไซด์

2.3.8 โพแทสเซียมเฟอร์โรไซยาไนด์

2.3.9 โพแทสเซียมคลอไรด์

2.3.10 กรดอะซีติก ความถ่วงจำเพาะ 1.05

2.3.11 ควินนินซัลเฟต

2.3.12 สารมาตรฐานวิตามินบี1 (ไธอามินไฮโดรคลอไรด์) ความบริสุทธิ์ร้อยละ 98.5

2.3.13 ซิลเวอร์ไนเตรท

2.3.14 Decalso (60-80 mesh)

2.3.15 โซเดียมอะซีเตทไตรไฮเดรท

2.3.16 สารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1.0 นอร์มัล

ปิเปตต์กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (ข้อ 2.3.4) จำนวน 8.5 มิลลิลิตร ลงในขวดแก้วปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร

2.3.17 สารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล

ปิเปตต์กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (ข้อ 2.3.4) จำนวน 8.5 มิลลิลิตร ลงในขวดแก้วปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร

2.3.18 สารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.01 นอร์มัล

ปิเปตต์สารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล (ข้อ 2.3.17) จำนวน 10 มิลลิลิตร ลงในขวดแก้วปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร

2.3.19 สารละลายโซเดียมอะซิเตท ความเข้มข้น 2.0 นอร์มัล

ชั่งโซเดียมอะซีเตทไตรไฮเดรท 272.0 กรัม (ข้อ 2.3.15) ในบีกเกอร์ขนาด 400 มิลลิลิตร ละลายด้วยน้ำกลั่น ถ่ายลงในขวดแก้วปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร

2.3.20 สารละลายเอนไซม์อะไมเลส ร้อยละ 10

ชั่งเอนไซม์อะไมเลส 10.00 กรัม (ข้อ 2.3.6) ละลายด้วยน้ำกลั่น ถ่ายลงในขวดแก้วปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร (เตรียมทันทีก่อนใช้งาน)

2.3.21 สารละลายเอทานอลร้อยละ 25

ตวงเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 (ข้อ 2.3.2) จำนวน 26.3 มิลลิลิตรลงในขวดแก้วปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร

2.3.22 สารละลายกรดซัลฟุริก ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล

ปิเปตต์กรดซัลฟุริก (ข้อ 2.3.5) จำนวน 2.8 มิลลิลิตรลงในขวดแก้วปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร

2.3.23 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1.0 นอร์มัล

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40.00 กรัม (ข้อ 2.3.7) ละลายด้วยน้ำกลั่น ถ่ายลงในขวดแก้วปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร

2.3.24 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ร้อยละ 15

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 15.00 กรัม (ข้อ 2.3.7) ละลายด้วยน้ำกลั่น ถ่ายลงในขวดแก้วปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร

2.3.25 สารละลายโพแทสเซียมเฟอร์โรไซยาไนด์ ร้อยละ 1

ชั่งโพแทสเซียมเฟอร์ริไซยาไนด์ 0.50 กรัม (ข้อ 2.3.8) ละลายด้วยน้ำกลั่น ถ่ายลงในขวดแก้วปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร (เตรียมทันทีก่อนใช้งาน)

2.3.26 สารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ ร้อยละ 25

ชั่งโพแทสเซียมคลอไรด์ 250.00 กรัม (ข้อ 2.3.9) ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 400 มิลลิลิตร ละลายด้วยน้ำกลั่น ถ่ายใส่ขวดแก้วปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร

2.3.27 สารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ ร้อยละ 25 ในกรด

ปิเปตต์กรดไฮโดรคลอริก (ข้อ 2.3.4) จำนวน 8.5 มิลลิลิตร ลงในขวดแก้วปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร เติมสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ ร้อยละ 25 (ข้อ 2.3.26) จนถึงขีดปริมาตร

2.3.28 สารละลายกรดอะซีติก ร้อยละ 3

ปิเปตต์กรดซิติก (ข้อ 2.3.10) จำนวน 3 มิลลิลิตรลงในขวดแก้วปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร

2.3.29 สารละลายควินนินซัลเฟต ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ชั่งควินินซัลเฟต 0.0200 กรัม (ข้อ 2.3.11) ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 10 มิลลิลิตร ละลายด้วยสารละลายกรดซัลฟุริก ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล (ข้อ 2.3.22) ถ่ายลงใส่ขวดปริมาตรขนาด 200 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดซัลฟุริกจนถึงขีดปริมาตร เก็บในขวดสีชาในตู้เย็น

2.3.30 สารละลายควินนินซัลเฟต ความเข้มข้น 3 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ปิเปตต์สารละลายควินนินซัลเฟต ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ข้อ 2.3.29) จำนวน 3 มิลลิลิตรลงในขวดแก้วปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดซัลฟุริก (ข้อ 2.3.22) จนถึงขีดปริมาตร

2.3.31 สารละลายควินนินซัลเฟต ความเข้มข้น 0. 3 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ปิเปตต์สารละลายควินนินซัลเฟต ความเข้มข้น 3 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ข้อ 2.3.30) จำนวน 10 มิลลิลิตรลงในขวดแก้วปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดซัลฟุริก (ข้อ 2.3.22) จนถึงขีดปริมาตร

2.3.32 สารละลายมาตรฐานวิตามินบี 1 ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ชั่งสารมาตรฐานวิตามินบี 1 (ข้อ 2.3.12) 0.0100 กรัม ละลายด้วยสารละลายเอทานอลร้อยละ 25 (ข้อ 2.3.21) ถ่ายลงในขวดแก้วปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เติมสารละลายเอทานอลจนถึงขีดปริมาตร เก็บในขวดแก้วสีชา ในตู้เย็นอุณหภูมิ 5-10 องศาเซลเซียส

2.3.33 สารละลายมาตรฐานวิตามินบี 1 ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ปิเปตต์สารละลายมาตรฐานวิตามินบี 1 ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ข้อ 2.3.32) จำนวน 2 มิลลิลิตรลงในขวดแก้วปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร

2.3.34 สารละลายมาตรฐานวิตามินบี 1 ความเข้มข้น 0.2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ปิเปตต์สารละลายมาตรฐานวิตามินบี 1 ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ข้อ 2.3.33) จำนวน 10 มิลลิลิตรลงในขวดแก้วปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร

2.3.35 สารละลายซิลเวอร์ไนเตรท ร้อยละ 1

ชั่งซิลเวอร์ไนเตรท 1.00 กรัม (ข้อ 2.3.13) ละลายด้วยสารละลายกรดอะซีติก (ข้อ 2.3.28) ถ่ายใส่ขวดแก้วปิรมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร

2.3.35 Activated Decalso

- ชั่ง Decalso (ข้อ 2.3.14) 100.00 กรัม ใส่ใน porcelain funnel ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง ขนาด 7 นิ้ว ที่มีกระดาษกรองรองอยู่ แล้วตั้งบน filtering flask ต่อสายยางเพื่อดูดน้ำออก โดยใช้ suction pump
- เติมสารละลายกรดอะซีติก ความเข้มข้นร้อยละ 3 (ร้อน) (ข้อ 2.3.28) จำนวน 200 มิลลิลิตร และตั้งแช่ไว้นาน 15 นาที ดูดสารละลายออกด้วย suction pump
- ล้างด้วยสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ ร้อยละ 25 ที่ร้อน (ข้อ 2.3.26) จำนวน 250 มิลลิลิตร
- ดูดสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ ออกด้วยเครื่อง suction pump
- ล้างด้วยสารละลายกรดอะซีติก ความเข้มข้นร้อยละ 3 (ร้อน) จำนวน 200 มิลลิลิตร หลายครั้ง และดูดสารละลายกรดอะซีติกออกด้วยเครื่อง suction pump
- ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ต้มร้อน จำนวน 500-600 มิลลิลิตร โดยดูดน้ำออกด้วยเครื่อง suction pump
- ทดสอบจากน้ำล้างครั้งสุดท้าย ด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรทร้อยละ 1 (ข้อ 2.3.35) เพื่อดูว่ายังมีคลอไรด์อยู่หรือไม่ โดยจะต้องไม่มีตะกอนเมื่อเติมสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท
- ตั้ง Decalso ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง หรือ ทำให้แห้งโดยการอบในตู้อบ ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 100 องศาเซลเซียส
- เก็บไว้ในขวดปากกว้าง ในที่แห้งที่อุณหภูมิห้อง

2.4. การดำเนินงาน

2.4.1 การเตรียมตัวอย่าง

2.4.1.1 ตัวอย่างที่เป็นของแห้ง

- สุ่มตัวอย่างให้มีปริมาณ 100 กรัม แบบ random
- บดตัวอย่างให้ละเอียดด้วยเครื่องบดละเอียด ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน
- ชั่งตัวอย่างที่บดแล้วประมาณ 5-10 กรัม ให้รู้น้ำหนักที่แน่นอน ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

2.4.1.2 ตัวอย่างที่เป็นของเหลว

- สุ่มตัวอย่างให้มีปริมาณ 1000 มิลลิลิตร แบบ random

- เขย่าตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกัน
- ชั่งตัวอย่างประมาณ 5-10 กรัม ให้รู้น้ำหนักที่แน่นอน ใส่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร

2.4.2 การสกัดตัวอย่าง

2.4.2.2 เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล (ข้อ 2.3.17) จำนวน 100 มิลลิลิตร ในตัวอย่าง

2.4.2.3 นำเข้าหม้อนึ่งความดัน อุณหภูมิ 121-123 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2.4.2.4 นำออกจากหม้อนึ่งความดัน ทิ้งให้เย็น

2.4.2.5 ถ่ายใส่บีกเกอร์ขนาด 400 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 4.5 ด้วยสารละลายโซเดียมอะซีเตต (ข้อ 2.3.19)

2.4.2.6 เติมสารละลายเอนไซม์อะไมเลส (ข้อ 2.3.20) จำนวน 5 มิลลิลิตร

2.4.2.7 ถ่ายลงขวดแก้วปริมาตรขนาด 200 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

2.4.2.8 นำสารละลายไปบ่มในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

2.4.2.9 นำออกจากอ่างน้ำ ทิ้งให้เย็น

2.4.2.10 กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 2

2.4.2.11 เก็บสารละลายในขวดสีชา (ถ้าจะเก็บสารละลายสำหรับวิเคราะห์ในวันต่อไป ให้เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 5-10 องศาเซลเซียส)

2.4.3 การทำให้บริสุทธิ์ด้วย ion-exchange resin (Decalso)

ในกรณีที่สารละลายตัวอย่างมีลักษณะไม่ใส (ขุ่น) และค่าแบลงค์ของสารละลายตัวอย่างมากกว่า 1 ½ เท่าของแบลงค์ของสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 1 จะต้องนำสารละลายดังกล่าวมาดำเนินการทำให้บริสุทธิ์ ดังต่อไปนี้

2.4.3.1 ชั่ง Decalso ประมาณ 3 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นประมาณ 20 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน

2.4.3.2 เทใส่ chromatographic column ที่มีน้ำกลั่นอยู่และมี glasswool รองอยู่ที่ปลายคอลัมน์ พยามยามหลีกเลี่ยงการเกิดฟองอากาศในคอลัมน์

2.4.3.3 เมื่อน้ำผ่านคอลัมน์หมด ปิเปตต์สารละลายตัวอย่าง จำนวน 25 มิลลิลิตร ลงในคอลัมน์

2.4.3.4 เมื่อสารละลายตัวอย่างผ่านคอลัมน์หมด ให้ล้างด้วยน้ำร้อน 3 ครั้ง ๆ ละ 10 มิลลิลิตร

2.4.3.5 ละลายไธอามินอิสระที่จับอยู่กับ Declaso ด้วย สารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ ร้อยละ 25 ในกรดไฮโดรคลอริก (ข้อ 2.3.27) จำนวน 25 มิลลิลิตร

2.4.3.6 เก็บสารละลายตัวอย่างในขวดแก้วปริมาตร ขนาด 25 มิลลิลิตร

2.4.4 การออกซิเดชันของไธอามินเป็นไธโอโครม

2.4.4.1 ปิเปตต์สารละลายตัวอย่าง (ข้อ 2.4.2.11 หรือ 2.4.3.6) สารละลายมาตรฐานวิตามินบี 1 (ข้อ 2.3.34) น้ำกลั่น สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ร้อยละ 15 (ข้อ 2.3.24) สารละลายโพแตสเซียมเฟอร์โรไซยาไนด์ (ข้อ 2.3.35) ดังนี้

	แบลงค์	ตัวอย่าง	ตัวอย่าง + สารมาตรฐานวิตามินบี 1
	(A)	(B)	(C)
สารละลายตัวอย่าง (มล.)	V	V	V
สารละลายมาตรฐานวิตามินบี 1 (มล)	0	0	1
น้ำกลั่น (มล)	6-V	6-V	(6-V) -1
สารละลายโพแตสเซียมเฟอร์ริไซยาไนด์ (มล)	0	0.4	0.4
สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (มล)	3	3	3

2.4.4.2 เขย่าให้เข้ากัน แล้วทิ้งไว้ 2 นาที

2.4.4.3 เติมไอโซบิวทานอล (ข้อ 2.3.1) 10 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลอดทดลอง ปิดจุกแก้ว เขย่าแรงๆ เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที

2.4.4.4 ตั้งให้สารละลายแยกชั้น

2.4.4.5 ปิเปตต์สารละลายส่วนบนซึ่งเป็นชั้นของไอโซบิวทานอล 5 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลอง

2.4.4.6 ปิเปตต์เอทานอลบริสุทธิ์ (ข้อ 2.3.3) จำนวน 0.5 มิลลิลิตรลงในแต่ละหลอดทดลอง เขย่าให้เข้ากัน จะได้สารละลายใส

2.4.4.7 นำสารละลายข้อ 2.4.2.6 ไปวัดค่า emission ด้วยเครื่อง Spectrofluorometer ที่ความยาวคลื่น

Emission = 435 นาโนเมตร

Excitation = 365 นาโนเมตร

โดยใช้ ไอโซบิวทานอลปรับค่า emission ให้เป็นศูนย์ (set zero) และ สารละลายควินนินซัลเฟต (ข้อ 2.3.31) ปรับค่า sensitivity โดยให้ค่า emission เท่ากับ 100

2.4.5 การคำนวณ

$$\text{ปริมาณวิตามินบี 1 (มิลลิกรัม/100 กรัม)} = \frac{(B-A)}{(C-B)} \times 0.2 \times \frac{V_1}{V_2} \times \frac{100}{1000} \times \frac{D}{W}$$

A	=	ค่า emission ของแบลงค์ของสารละลายตัวอย่าง
B	=	ค่า emission ของสารละลายตัวอย่าง
C	=	ค่า emission ของสารละลายตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานวิตามินบี1 0.2 ไมโครกรัม
V_1	=	ปริมาตรทั้งหมดของสารละลายตัวอย่าง (มิลลิลิตร)
V_2	=	ปริมาตรของสารละลายตัวอย่างที่ใช้ในปฏิกิริยาออกซิเดชัน (มิลลิลิตร)
W	=	น้ำหนักของตัวอย่างเป็นกรัม
D	=	อัตราการเจือจาง

2.5 ศึกษาความเที่ยงและความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์วิตามินบี 1 ในนมและผลิตภัณฑ์ โดยดำเนินการดังต่อไปนี้

2.5.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามินบี1 ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปิเปตต์สารละลายมาตรฐานวิตามินบี 1 (ข้อ 2.3.32) จำนวน10 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

2.5.2 เตรียมตัวอย่างนม

2.5.2.1 สุ่มตัวอย่างนมให้มีปริมาณ 1000 มิลลิลิตร แบบ random

2.5.2.2 ชั่งตัวอย่างนมสำหรับเป็น original sample or control sample จำนวน 10 ซ้ำ

2.5.2.3 เติมความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานวิตามินบี1 จำนวน 3 ระดับ ในตัวอย่างนม (spiked sample) โดยความเข้มหรือค่า emission ในแต่ละชุดตัวอย่างต้องอยู่ในช่วงไม่เกิน 0-120

ปิเปตต์สารละลายมาตรฐานวิตามินบี 1 ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ข้อ 2.5.1) จำนวน 1, 2, 5 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างนมดังนี้

- เติมความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม (0.05 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) จำนวน 7 ซ้ำ (spiked sample)
- เติมความเข้มข้น 20 ไมโครกรัม (0.1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) จำนวน 7 ซ้ำ (spiked sample)
- เติมความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม (0.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) จำนวน 7 ซ้ำ (spiked sample)

2.5.3 วิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 1 ในตัวอย่างนมที่เติมสารมาตรฐานวิตามินบี 1 ระดับต่างๆ ตามข้อ 2.4.2.2 ถึง ข้อ 2.4.5

2.5.4 คำนวณค่าความเที่ยง (precision หรือ repeatability) ของวิธี โดย

- นำผลการวิเคราะห์ตัวอย่างนม (original sample) และนมที่เติมสารมาตรฐานวิตามินบี 1 ระดับต่างๆ (spiked sample) ในข้อ 2.5.3 แล้วคำนวณปริมาณวิตามินบี 1 ตามข้อ 2.4.5
- คำนวณหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ของข้อมูลผลการวิเคราะห์ทั้งหมด
- เกณฑ์ค่าความเที่ยง (7 ซ้ำ) ของแต่ละความเข้มข้นจะต้องมีค่า RSD (relative standard deviation) หรือ coefficient of variant (CV) $\leq$ 10%

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

เมื่อ RSD = เป็นค่าความเที่ยงของวิธี

SD = เป็นค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน

กรมวิทยาศาสตร์บริการ

Mean = เป็นค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นวิตามินบี 1 ที่ได้จากการทดลอง

2.5.5 คำนวณค่าความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์วิตามินบี 1 ในนม โดยคำนวณร้อยละของปริมาณคืนกลับของวิตามินบี 1 (%recovery)

- นำผลการวิเคราะห์ตัวอย่างนม (original sample) และตัวอย่างนมที่เติมสารมาตรฐานวิตามินบี 1 ระดับต่างๆ (spiked sample) ในข้อ 2.5.3 แล้วคำนวณปริมาณวิตามินบี 1 ตามข้อ 2.4.5
- คำนวณหาร้อยละของปริมาณคืนกลับของวิตามินบี 1 (%recovery) ในตัวอย่างข้อ 2.5.3

โดยเกณฑ์การยอมรับค่า % recovery จะต้องอยู่ในช่วง 80-110 %

$$\% \text{ Recovery} = \frac{([\text{ค่าความเข้มข้นของวิตามินบี1 ใน spiked sample}] - [\text{ค่าความเข้มข้นของวิตามินบี1 ใน original sample}]) \times 100}{\text{ค่าความเข้มข้นของวิตามินบี1 ใน spiked sample}}$$

2.6 การหาค่า limit of detection (LOD) limit of quantitation (LOQ) ของวิธีวิเคราะห์วิตามินบี 1 ในตัวอย่างนม ตามวิธีของ John K. Taylor [8] โดย

- นำผลการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี1 ในตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานวิตามินบี1 แต่ละความเข้มข้น (ข้อ 2.5.3) มาคำนวณหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD)
- นำค่า SD ของแต่ละความเข้มข้นมาสร้างกราฟ โดยแกน X เป็นแกนความเข้มข้น แกน Y เป็นค่า SD
- ลากเส้นต่อไปให้ตัดแกน Y ตำแหน่งที่ตัดแกน Y เป็นค่า SD_0
- คำนวณค่า LOD โดย

$$\text{LOD} = 3\,SD_0 \times \frac{\text{ปริมาตรที่ใช้}}{\text{น้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม)}} \times \frac{1}{100} \quad \text{ไมโครกรัม/100 กรัม}$$

- คำนวณค่า LOQ โดย

$$\text{LOQ} = 10\,SD_0 \times \frac{\text{ปริมาตรที่ใช้}}{\text{น้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม)}} \times \frac{1}{100} \quad \text{ไมโครกรัม/100 กรัม}$$

หรือ

$$LOQ = 5\ SD_0 \times \frac{\text{ปริมาตรที่ใช้}}{\text{น้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม)}} \times \frac{1}{100} \text{ ไมโครกรัม/100 กรัม}$$

ในกรณีที่ LOQ = 5 SD_0 จะต้องทำการพิสูจน์ยืนยันโดยการวิเคราะห์วิตามินบี1 ในตัวอย่างที่มี matrix เดียวกับที่หา LOQ และมีปริมาณวิตามินบี1 ในระดับใกล้เคียงกับ LOQ แล้วคำนวณค่า % RSD โดย % RSD จะต้อง $\leq$ 10%

2.7 ศึกษาความเที่ยงและความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์วิตามินบี 1 โดยเทคนิคไธโอโครมในตัวอย่างข้าวกล้อง ซึ่งเป็นตัวแทนตัวอย่างธัญพืช โดยดำเนินการเช่นเดียวกับการศึกษาในตัวอย่างนม ตามข้อ 2.5 และความเข้มข้นของสารมาตรฐานวิตามินบี 1 ที่เติมคือ 15, 25, 50 ไมโครกรัม โดยการปิเปตต์สารละลายมาตรฐานวิตามินบี 1 ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ข้อ 2.5.1) ลงในตัวอย่าง จำนวน 1.5, 25, และ 50 มิลลิลิตร

2.8 การหาค่า limit of detection (LOD) limit of quantitation (LOQ) ของวิธีวิเคราะห์วิตามินบี 1 ในตัวอย่างข้าวสาร โดยการดำเนินการตาม ข้อ 2.6

2.9 ศึกษาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดสอบ ด้วยการทดสอบแบบที (the student t-test)[10] โดยใช้วัสดุอ้างอิง

- ชั่งตัวอย่างวัสดุอ้างอิง จำนวน 10 ซ้ำ
- วิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี1 ในสารอ้างอิงมาตรฐาน ตามข้อ 2.4.1 ถึง 2.4.4
- คำนวณหาปริมาณวิตามินบี 1 ในวัสดุอ้างอิง
- นำผลที่ได้หาค่าเฉลี่ย (mean) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)
- ดำเนินการทดสอบข้อมูลแบบที โดยตั้งสมมติฐาน (Null hypothesis) ว่า

  $\bar{X} = \mu$

- พิสูจน์สมมติฐาน โดยหาค่า t จากสมการ

$$\pm t = (\bar{X} - \mu)(N)^{1/2}(1/S)$$

$\bar{X}$ = เป็นค่าเฉลี่ยของปริมาณวิตามินบี 1 ในวัสดุอ้างอิงที่ได้จากการทดลอง

μ = ค่าที่ได้รับการรับรอง (consensus value or assigned value)

N = จำนวนครั้งที่ทดลอง

S = เป็นค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน

- หาค่า t จากตาราง student t-test ที่องศาอิสระเดียวกัน
- เปรียบเทียบค่า t ที่ได้จากการทดลองกับค่า t จากตาราง student t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%
- ถ้าค่า t จากการทดลองน้อยกว่าค่า t ที่ได้จากตาราง student t-test ที่องศาอิสระเดียวกัน แสดงว่าเรายอมรับสมมติฐานที่ตั้งไว้ คือ ค่าที่ได้จากการทดลองไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับค่าที่ได้การรับรอง เป็นการยืนยันถึงประสิทธิภาพของวิธีและเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

3. ผลการทดลอง

3.1 การศึกษาความเที่ยงและความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์วิตามินบี1 ในนมและผลิตภัณฑ์

3.1.1 การศึกษาทดลองหาค่าความเที่ยง (precision or repeatability) ในการวิเคราะห์วิตามินบี 1 ด้วยเทคนิคไธโอโครม ในตัวอย่างนมสดยูเอชที (UX.336) และตัวอย่างนมที่เติมสารมาตรฐานความเข้มข้น 3 ระดับ จำนวน 10 ซ้ำ พบว่า ค่า % RSD อยู่ในช่วง 2.92 - 5.86 (ตารางที่ 1-4)

3.1.2 การศึกษาหาค่าความถูกต้อง (accuracy) โดยการเติมสารมาตรฐานวิตามินบี 1 ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.05 0.10 และ 0.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างนม ตามลำดับ ทดลอง 7 ซ้ำ พบว่าค่าร้อยละของปริมาณที่คืนกลับ (%recovery) อยู่ในช่วงร้อยละ 95.21 - 102.38 (แสดงในตารางที่ 2-4)

3.1.3 การศึกษาค่าต่ำสุดที่ตรวจได้ของการวิเคราะห์วิตามินบี 1 ในตัวอย่างนม โดยนำค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ได้จากการเติมสารละลายมาตรฐาน ความเข้มข้น 3 ระดับ (ตารางที่ 5) มาสร้างกราฟ โดยแกน x เป็นแกนความเข้มข้น แกน Y เป็นค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ลากเส้นต่อไปให้ตัดแกน Y ตำแหน่งที่ตัดแกน Y เป็นค่า SD_0 (กราฟรูปที่ 1) ได้ค่า SD_0 เท่ากับ 0.0008 และคำนวณค่า LOD ได้เท่ากับ 2.4 ไมโครกรัม/100 กรัม และค่า LOQ เท่ากับ 8 ไมโครกรัม/100 กรัม

ดังนั้น

LOD ของวิตามินบี 1 ในนม = 3 ไมโครกรัม/100 กรัม

LOQ ของวิตามินบี 1 ในนม = 10 ไมโครกรัม/100 กรัม

3.2 การศึกษาความเที่ยงและความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์วิตามินบี1 ในข้าวกล้อง ซึ่งเป็นตัวแทนตัวอย่างธัญพืช

3.2.1 การศึกษาทดลองหาค่าความเที่ยง (precision or repeatability) ในการวิเคราะห์วิตามินบี 1 ด้วยเทคนิคไธโอโครม ในตัวอย่างข้าวกล้อง (US.520) และข้าวกล้องที่เติมสารมารฐานความเข้มข้น 3 ระดับ จำนวน 7 ซ้ำ พบว่า ค่า % RSD อยู่ในช่วง 4.10 - 8.99 (ตารางที่ 6-9)

3.2.1 การศึกษาหาค่าความถูกต้อง (accuracy) โดยการเติมสารมาตรฐานวิตามินบี 1 ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 15, 25, 50 ไมโครกรัม (หรือ 0.075 0.10 และ 0.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ลงในตัวอย่างข้าวกล้อง ตามลำดับ ทดลอง 7 ซ้ำ พบว่าค่า %recovery อยู่ในช่วงร้อยละ 90.56- 98.12 (แสดงในตารางที่ 7-9)

3.2.3 การศึกษาค่าต่ำสุดที่ตรวจได้ของการวิเคราะห์วิตามินบี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้อง โดยนำค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ได้จากการเติมสารละลายมาตรฐาน ความเข้มข้น 3 ระดับ (ตารางที่ 10) มาสร้างกราฟ โดยแกน x เป็นแกนความเข้มข้น แกน Y เป็นค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ลากเส้นต่อไปให้ตัดแกน Y ตำแหน่งที่ตัดแกน Y เป็นค่า SD_0 (กราฟรูปที่ 2) ได้ค่า SD_0 เท่ากับ 0.0033 และคำนวณค่า LOD ได้เท่ากับ 19.8 ไมโครกรัม/100 กรัม และค่า LOQ (ที่ 5 SD_0) เท่ากับ 33 ไมโครกรัม/100 กรัม

นอกจากนี้ได้พิสูจน์ยืนยันค่า LOQ ดังกล่าว โดยการวิเคราะห์วิตามินบี1 ด้วยเทคนิคไธโอโครม ในตัวอย่างข้าวหอมมะลิ (UX.335) ซึ่งมีปริมาณวิตามินบี1 ในระดับใกล้เคียงกับ LOQ คือ 37 ไมโครกรัม/100 กรัม แล้วคำนวณค่า % RSD ได้เท่ากับ 7.35 (ตารางที่ 11) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ คือ % RSD จะต้อง $\leq$ 10

ดังนั้น

LOD ของวิตามินบี 1 ในข้าวและธัญญพืช = 20 ไมโครกรัม/100 กรัม

LOQ ของวิตามินบี 1 ในข้าวและธัญญพืช = 33 ไมโครกรัม/100 กรัม

3.3 การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีและเครื่องมือทดสอบ โดยการทดลองหาปริมาณวิตามินบี 1 ในตัวอย่างวัสดุอ้างอิง AS-FRM3 (cereal soy)

จากผลการทดลอง (ตารางที่ 12) ได้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.87 มิลลิกรัม/100 กรัม ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 0.02998 และค่า % RSD เท่ากับ 3.43 สามารถคำนวณหาค่า t ได้เท่ากับ 2.108 และค่า t จากตาราง student t-test (ตารางที่ 13) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และ degree of freedom 9 (10-1) ได้เท่ากับ 2.26 เมื่อเปรียบเทียบกัน พบว่าค่า t จากการทดลองน้อยกว่าค่า t จากตาราง student t-test จึงยอมรับสมมติฐาน คือ ปริมาณวิตามินบี 1 ที่วิเคราะห์ได้ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับค่าที่รับรอง (0.85 มิลลิกรัม/100 กรัม)

4. วิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาความถูกต้องและความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์วิตามินบี 1 ในผลิตภัณฑ์นมและธัญพืช ด้วยเทคนิคไธโอโครม

ผลการทดลองพบว่า ความถูกต้อง หรือ ร้อยละของปริมาณที่คืนกลับ (% recovery) และความเที่ยง หรือ % Relative standard deviation (%RSD) ในตัวอย่างนมและข้าวกล้องอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ และเมื่อทดสอบประสิทธิภาพด้วยการวิเคราะห์วิตามินบี 1 ในวัสดุอ้างอิง ได้ค่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับเช่นกัน แสดงว่าเทคนิคไธโอโครมที่ใช้วิเคราะห์วิตามินบี1 นั้นเป็นวิธีที่ดี สามารถใช้ได้กับตัวอย่างหลายประเภท คือในผลิตภัณฑ์นมและธัญพืช แต่อย่างไรก็ตาม ถ้าต้องการนำเทคนิคนี้ไปใช้ในการวิเคราะห์วิตามินบี1 ในตัวอย่างประเภทอื่น ก็ต้องทำการศึกษาความถูกต้องและความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ในตัวอย่างประเภทนั้น เช่นกัน

4.2 การศึกษาค่าต่ำสุดของวิธีวิเคราะห์วิตามินบี 1 ในตัวอย่างนมและข้าวกล้อง

ผลการทดลองพบว่าค่าต่ำสุดในตัวอย่างนมจะต่ำกว่าค่าต่ำสุดในตัวอย่างข้าวกล้อง เนื่องจากเป็นนมชนิดน้ำ จึงมีน้ำเป็นองค์ประกอบอยู่มากและมีความเป็นเนื้อเดียวกันมากกว่าข้าวกล้องซึ่งเป็นเมล็ด มีผลทำให้ค่าที่ได้นั้นแตกต่างกัน

5. สรุปผลการทดลอง

5.1 การศึกษาความถูกต้องและความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์วิตามินบี 1 ในผลิตภัณฑ์นมด้วยเทคนิคไธโอโครม

จากการทดลองพบว่า การเติมสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 1 ความเข้มข้น 10, 20, 50 ไมโครกรัม ในตัวอย่างเพื่อหาค่าความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ได้ค่าร้อยละของปริมาณที่คืนกลับ (% recovery) อยู่ในช่วงร้อยละ 95.2 -102.38 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ คือ ร้อยละ 80-110 และความเที่ยงในการวัด ได้ค่า % RSD อยู่ในช่วง 2.95- 5.86 อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ คือ ไม่เกินร้อยละ 10 แสดงว่าวิธีวิเคราะห์วิตามินบี 1 ด้วยเทคนิคไธโอโครมในผลิตภัณฑ์นมนี้มีประสิทธิภาพดี คือ มีความถูกต้องและความแม่นยำ และจากการทดลองหาปริมาณต่ำสุดที่ตรวจวิเคราะห์วิตามินบี 1 ในตัวอย่างนมด้วยวิธีนี้ ได้เท่ากับ 8 ไมโครกรัม/100 กรัม

5.2 การศึกษาความถูกต้องและความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์วิตามินบี1 ในตัวอย่างข้าวกล้องซึ่งเป็นตัวแทนของธัญญพืช ด้วยเทคนิคไธโอโครม

จากการทดลองพบว่า การเติมสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 1 ความเข้มข้น 15, 25, 50 ไมโครกรัม ในตัวอย่างเพื่อหาค่าความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ได้ค่าร้อยละของปริมาณที่คืนกลับ (% recovery) อยู่ในช่วงร้อยละ 90.56- 98.12 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ คือ ร้อยละ 80-110 และความเที่ยงในการวัด ได้ค่า %RSD อยู่ในช่วง 4.10 - 8.99 อยู่ในเกณฑ์การยอมรับคือ ไม่เกินร้อยละ 10 และจากการทดลองหาปริมาณต่ำสุดที่ตรวจวิเคราะห์วิตามินบี 1 ในตัวอย่างข้าวหอมมะลิด้วยวิธีนี้ ได้เท่ากับ 33 ไมโครกรัม/100 กรัม

5.3 การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีและเครื่องมือทดสอบ

โดยการวิเคราะห์ตัวอย่างวัสดุอ้างอิง AS-FRM3 จำนวน 10 ซ้ำ และทดสอบด้วยวิธีทดสอบแบบที คำนวณหาค่า t ได้เท่ากับ 2.108 และเมื่อเปรียบเทียบกับค่า t จากตาราง student t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และ degree of freedom 9 (10-1) ได้เท่ากับ 2.26 พบว่าค่า t จากการทดลองน้อยกว่าค่า t จากตาราง student t-test จึงยอมรับสมมติฐาน คือ ปริมาณวิตามินบี 1 ที่วิเคราะห์ได้ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับค่าที่รับรอง (0.85 มิลลิกรัม/100 กรัม) เป็นการยืนยันว่าวิธีวิเคราะห์วิตามินบี1 และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง (spectrofluorometer) มีประสิทธิภาพดี

จากผลการทดลองดังกล่าวจึงสรุปได้ว่าวิธีวิเคราะห์วิตามินบี1 ด้วยเทคนิคไธโอโครมนี้มีประสิทธิภาพดี มีความถูกต้องและความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์ดี สามารถนำมาใช้วิเคราะห์หาปริมาณวิตามินบี 1 ในผลิตภัณฑ์นมและธัญพืช

6. กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอขอบคุณ คุณสุจินต์ ศรีคงศรี ผู้อำนวยการกอง กองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ และคุณสุนทรี เปรื่องการ หัวหน้ากลุ่มงานชีวเคมี ที่กรุณาให้คำแนะนำอันเป็นประโยชน์ และขอขอบคุณทุกท่านในกลุ่มงานชีวเคมีที่มีส่วนร่วมในการช่วยให้ผลงานสำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี

7. เอกสารอ้างอิง

1. ประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 182 (พ.ศ. 2541) เรื่อง ฉลากโภชนาการ
2. มอก. 17025-2543 (ISO/IEC 17025: 1999) ข้อกำหนดทั่วไปว่าด้วยความสามารถห้องปฏิบัติการทดสอบและสอบเทียบ
3. ศุภชัย ใช้เทียมวงศ์. ปฏิบัติการเคมีปริมาณวิเคราะห์. พิมพ์ครั้งที่ 5, สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพมหานคร. 2539, หน้า 6-42
4. AOAC 1995 16th edition, supplement March 1996, section 45.1.06 45.1.07 และ 50.1.08
5. C.J.Gubler. Thiamine. In : Handbook of vitamins edited by L.J. Machlin 2nd edition. Marcel Dekker, Inc. New York and Basel. 1991, p.233-281
6. Committee on Dietary Allowances, Food and Nutrition Board. Water-soluble vitamins. In : Recommemded dietary allowances ninth edition. National Academy of Sciences. Washington, D.C. 1980, p.83-89
7. Eurachem working group. The fitness for purpose of analytical methods : A laboratory guide to method validation and related topics. LCG (Teddington) U.K., English version 1st ed.1998
8. John K.Taylor. Quality assurance of chemical measurement. Lewis publishers, Inc. USA. 1987
9. NATA Technical Note No.17. Format and content of test methods and procedures for validation and verification of chemical test methods. National Association of Testing Authorities, Australia. December 1998.
10 Thiamine. In Method of vitamin assay 3rd edtion. Edited by the Association of vitamin chemists, Inc. Interscience publishers. New York, London, Sydney. 1966, p123-145

ภาคผนวก ก

<u>ตารางที่ 1</u> แสดงผลการศึกษาหาค่าความเที่ยง (precision or repeatability) ในการวิเคราะห์วิตามินบี 1 ด้วยเทคนิคไธโอโครม ในตัวอย่างนมสดยูเอชที (UX.336) จำนวน 10 ซ้ำ

ครั้งที่	น้ำหนัก (กรัม)	Emission			วิตามินบี 1
		Blank	Sample	Sample+Std.	มคก/100 ก
1	20.6231	4.0	22.3	58.2	32.9
2	20.2323	4.8	24.7	64.5	32.9
3	20.3138	5.4	23.4	63.9	29.2
4	20.7185	5.3	24.6	66.1	29.9
5	20.1212	5.6	25.3	63.8	33.9
6	20.1817	5.0	22.8	57.9	33.5
7	20.2250	7.3	24.7	64.1	29.1
8	20.0710	6.5	24.9	61.1	33.8
9	20.4043	5.9	25.6	66.3	31.6
10	20.1807	6.4	65.4	65.4	32.1
				Mean	31.9
				SD	1.87120
				% RSD ($\leq$ 10%)	5.86

ได้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน = 1.87210

และค่า %RSD = 5.86 ซึ่งไม่เกิน 10%

<u>ตารางที่ 2</u> ปริมาณวิตามินบี1 ในตัวอย่างนมที่เติมสารมาตรฐานวิตามินบี 1 ปริมาณ 0.05 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ครั้งที่	น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)	ปริมาณวิตามินบี 1 (มคก/มล)			% Recovery
		ที่วิเคราะห์ได้	ที่เติม	ที่คืนกลับ	
1	20.3603	0.081	0.0325	0.0484	96.72
2	19.9706	0.085	0.0319	0.0534	106.83
3	20.1465	0.081	0.0321	0.0489	97.83
4	19.8959	0.080	0.0317	0.0483	96.62
5	20.1636	0.083	0.0322	0.0505	101.06
6	20.1567	0.087	0.0322	0.0548	109.56
7	20.0608	0.086	0.0320	0.0540	108.01
	Mean	0.083	%Recovery (70-110)		102.38
	SD	0.002782			
	%RSD (≤ 10%)	3.340			

<u>ตารางที่ 3</u> ปริมาณวิตามินบี1 ในตัวอย่างนมที่เติมสารมาตรฐานวิตามินบี 1 ปริมาณ 0.1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ครั้งที่	น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)	ปริมาณวิตามินบี 1 (มคก/มล)			% Recovery
		ที่วิเคราะห์ได้	ที่เติม	ที่คืนกลับ	
1	20.9774	0.131	0.0335	0.0976	97.55
2	20.5675	0.120	0.0328	000875	87.54
3	21.5330	0.131	0.0344	0.0964	96.37
4	20.5627	0.130	0.0328	0.0974	97.36
5	20.9700	0.126	0.0334	0.0928	92.82
6	21.1281	0.134	0.0337	0.1002	100.24
7	22.3795	0.130	0.0357	0.0945	94.46
	Mean	0.129	%Recovery (70-110)		95.21
	SD	0.004405			
%RSD (≤ 10%)		3.416			

<u>ตารางที่ 4</u> ปริมาณวิตามินบี1 ในตัวอย่างนมที่เติมสารมาตรฐานวิตามินบี 1 ปริมาณ 0.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

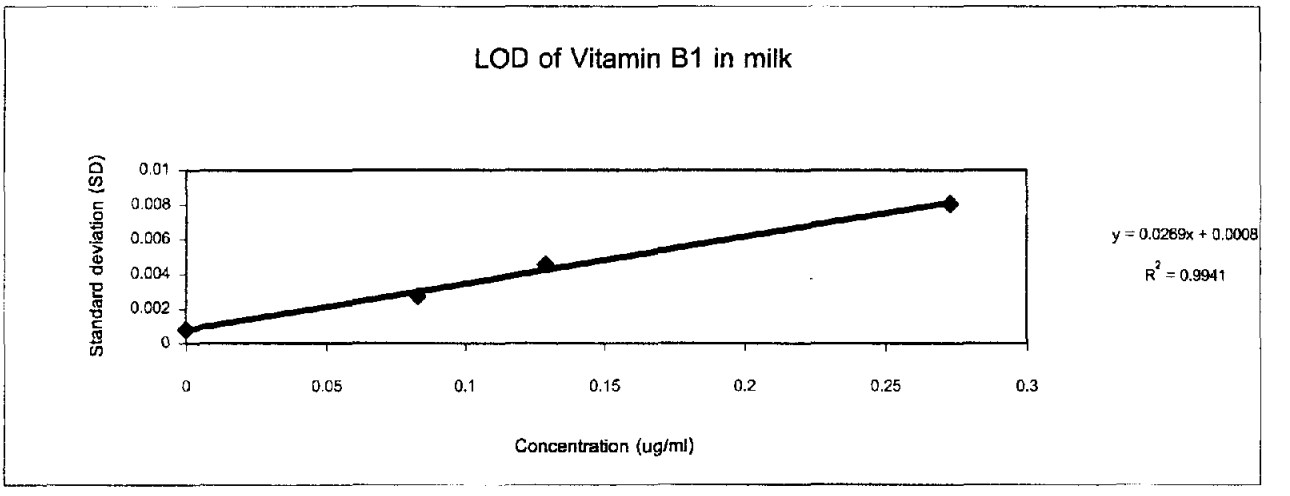
ครั้งที่	น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)	ปริมาณวิตามินบี 1 (มคก/มล)			% Recovery
		ที่วิเคราะห์ได้	ที่เติม	ที่คืนกลับ	
1	22.0502	0.265	0.0352	0.2295	91.82
2	21.3781	0.284	0.0341	0.02499	99.95
3	20.4371	0.266	0.0344	0.2313	92.53
4	21.5961	0.280	0.0332	0.2466	98.64
5	20.8260	0.279	0.0344	0.2447	97.87
6	21.5551	0.266	0.0339	0.2321	92.82
7	21.2307	0.270	0.0340	0.2364	97.57
	Mean	0.273	%Recovery (70-110)		95.46
	SD	0.007966			
% RSD ($\leq$ 10%)		2.920			

<u>ตารางที่ 5</u> แสดงผลการหาค่า Limit of Detection (LOD) และ Limit of Quantitation (LOQ) ของวิธีวิเคราะห์วิตามินบี 1 ด้วยเทคนิคไธโอโครม ในตัวอย่างนม

ความเข้มข้นของวิตามินบี 1 ในตัวอย่างนมที่เติมสารมาตรฐานวิตามินบี 1 (original +spiked) (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD)
0.083	0.002782
0.129	0.004405
0.273	0.007966

และได้กราฟดังนี้

กราฟที่ 1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นวิตามินบี 1 และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานในตัวอย่างนม



จากกราฟ Extrapolate ไปตัดแกน Y (SD) ได้ค่า $SD_0 = 0.0008$

$$LOD = 3\ SD_0 = \frac{(3 \times 0.0008) \times 200\ \text{มล.} \times 100\ \text{ก.}}{20\ \text{ก}} = 2.4\ \text{มคก./100 ก.}$$

$$LOQ = 10\ SD_0 = \frac{(10 \times 0.008) \times 200\ \text{มล.} \times 100\ \text{ก.}}{20\ \text{ก}} = 8\ \text{มคก./100 ก.}$$

<u>ตารางที่ 6</u> แสดงผลการศึกษาหาค่าความเที่ยง (precision or repeatability) ในการวิเคราะห์วิตามินบี1 ในตัวอย่างข้าวกล้อง (US.520) จำนวน 7 ซ้ำ

ครั้งที่	น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)	ปริมาณวิตามินบี 1 (มคก/มล)			% มคก/มล
		Blank	Sample	Sample+Std.	
1	7.2322	3.5	36.1	74.8	0.1685
2	7.6300	3.6	37.3	75.9	0.1746
3	7.9252	3.9	40.1	78.1	0.1905
4	7.7623	4.2	42.2	81.9	0.1614
5	7.4345	4.3	44.3	86.8	0.1882
6	7.8095	5.3	42.15	82.8	0.1813
7	8.2946	5.5	45.6	83.85	0.2097
				Mean	0.182029
				SD	0.0160
				% RSD ($\leq$ 10%)	8.99

<u>ตารางที่ 7</u> แสดงปริมาณวิตามินบี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้องที่เติมสารมาตรฐานวิตามินบี 1 ความเข้มข้น 0.075 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ครั้งที่	น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)	ปริมาณวิตามินบี 1 (มคก/มล)			% Recovery
		ที่วิเคราะห์ได้	ที่เติม	ที่คืนกลับ	
1	8.0501	0.2762	0.1940	0.0822	109.55
2	6.8801	0.2414	0.1658	0.0756	100.83
3	8.2583	0.2718	0.1990	0.0728	97.12
4	7.9909	0.2593	0.1926	0.0667	88.97
5	8.0573	0.2698	0.1942	0.0756	100.84
6	8.5853	0.2733	0.2069	0.0664	88.55
7	7.7216	0.2618	0.1861	0.0757	100.98
	Mean	0.264813	%Recovery (70-110)		98.12
	SD	0.011985			
% RSD (≤ 10%)		4.5257			

<u>ตารางที่ 8</u> แสดงปริมาณวิตามินบี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้องที่เติมสารมาตรฐานวิตามินบี 1 ความเข้มข้น 0.125 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ครั้งที่	น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)	ปริมาณวิตามินบี 1 (มคก/มล)			% Recovery
		ที่วิเคราะห์ได้	ที่เติม	ที่คืนกลับ	
1	7.6374	0.307263	0.1841	0.123	98.56
2	8.2887	0.324929	0.1997	0.125	100.14
3	7.5687	0.287792	0.1824	0.105	84.31
4	7.3470	0.304125	0.1771	0.127	101.65
5	7.7769	0.31065	0.1874	0.123	98.58
6	7.8793	0.287565	0.1899	0.098	78.14
7	7.4782	0.298387	0.1802	0.118	94.53
Mean		0.302959	%Recovery (70-110)		93.70
SD		0.013226			
% RSD ($\leq$ 10%)		4.36			

<u>ตารางที่ 9</u> แสดงปริมาณวิตามินบี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้องที่เติมสารมาตรฐานวิตามินบี 1 ความเข้มข้น 0.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

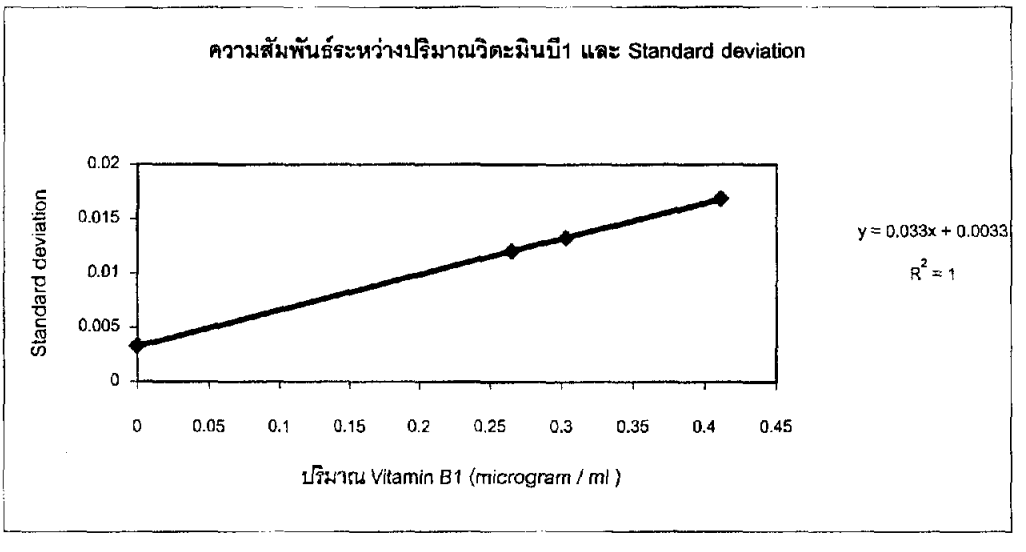
ครั้งที่	น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)	ปริมาณวิตามินบี 1 (มคก/มล)			% Recovery
		ที่วิเคราะห์ได้	ที่เติม	ที่คืนกลับ	
1	8.6059	0.40609	0.2074	0.199	79.48
2	6.4946	0.41223	0.1565	0.256	102.31
3	7.7493	0.42080	0.1867	0.234	93.62
4	7.8711	0.37692	0.1897	0.187	89.02
5	7.5669	0.42768	0.1824	0.245	98.13
6	7.6830	0.40400	0.1852	0.219	87.54
7	7.5828	0.42152	0.1827	0.239	95.51
	Mean	0.40990	%Recovery (70-110)		95.51
	SD	0.016895			
% RSD ($\leq$ 10%)		4.12			

ตารางที่ 10 แสดงผลการหาค่า Limit of Detection (LOD) และ Limit of Quantitation (LOQ) ของวิธีวิเคราะห์วิตามินบี 1 ด้วยเทคนิคไธโอโครม ในตัวอย่างข้าวกล้อง

ความเข้มข้นของวิตามินบี 1 ในตัวอย่างนมที่เติมสารมาตรฐานวิตามินบี 1 (original +spiked) (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD)
0.264813	0.011985
0.302959	0.013226
0.409900	0.016895

และได้กราฟดังนี้

กราฟที่ 2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นวิตามินบี 1 และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานในตัวอย่างข้าวกล้อง



จากกราฟ Extrapolate ไปตัดแกน Y (SD) ได้ค่า $SD_0 = 0.0033$

$$LOD = 3\ SD_0 = (3 \times 0.0033) \times \frac{200\ \text{มล.}}{10\ \text{ก}} \times 100\ \text{ก.} = 19.8\ \text{มคก./100 ก.}$$

$$LOQ = 5\ SD_0 = (5 \times 0.008) \times \frac{200\ \text{มล.}}{10\ \text{ก}} \times 100\ \text{ก.} = 33\ \text{มคก./100 ก.}$$

<u>ตารางที่ 11</u> แสดงปริมาณวิตามินบี 1 ในตัวอย่างข้าวหอมมะลิ (UX.335) เพื่อยืนยันค่า LOQ ของตัวอย่างข้าว ที่ 5 SO_0

ครั้งที่	น้ำหนัก (กรัม)	Emission			วิตามินบี 1
		Blank	Sample	Sample+Std.	มคก/มล
1	7.2665	6.3	15.7	60.1	38.85
2	7.3506	6.6	15.5	58.5	37.54
3	7.3005	6.3	15.3	56.4	39.99
4	7.0505	5.8	13.5	58.5	32.36
5	7.0284	6.8	14.5	56.4	34.95
6	7.3639	7.3	16.3	57.7	39.36
7	7.1342	6.7	14.7	55.9	36.29
				Mean	37.049
				SD	2.7230
				% RSD ($\leq$ 10%)	7.35

<u>ตารางที่ 12</u> แสดงผลการทดลองหาปริมาณวิตามินบี 1 ในตัวอย่างอ้างอิงมาตรฐาน AS-FRM3 (cereal soy) จำนวน 10 ซ้ำ

ครั้งที่	น้ำหนัก (กรัม)	Emission			วิตามินบี 1
		Blank	Sample	Sample+Std.	มคก/มล
1	4.0834	10.5	49.5	93.7	0.86
2	4.5510	13.2	54.4	99.0	0.81
3	4.4957	13.6	58.2	102.2	0.90
4	4.0169	10.8	51.6	98.2	0.87
5	4.3717	12.2	52.9	95.1	0.88
6	5.6190	14.5	62.6	103.8	0.83
7	5.3882	14.2	58.9	96.2	0.89
8	3.9340	10.6	50.5	95.4	0.90
9	4.1508	10.0	51.2	95.9	0.89
10	4.3746	11.1	52.3	96.1	0.86
				Mean	0.87
				SD	0.02998
				% RSD ($\leq$ 10%)	3.43

ดังนั้นจะได้ค่า t ดังต่อไปนี้

$$\pm t = (\overline{X} - \mu)(N)^{1/2}(1/S)$$

$$\pm t = (0.87 - 0.85 \pm 0.03)(10)^{1/2}(1/0.03)$$

$$\pm t = 2.108$$

จากตาราง student t-test ค่า t ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และ degree of freedom 9 (10-1) ได้เท่ากับ 2.26

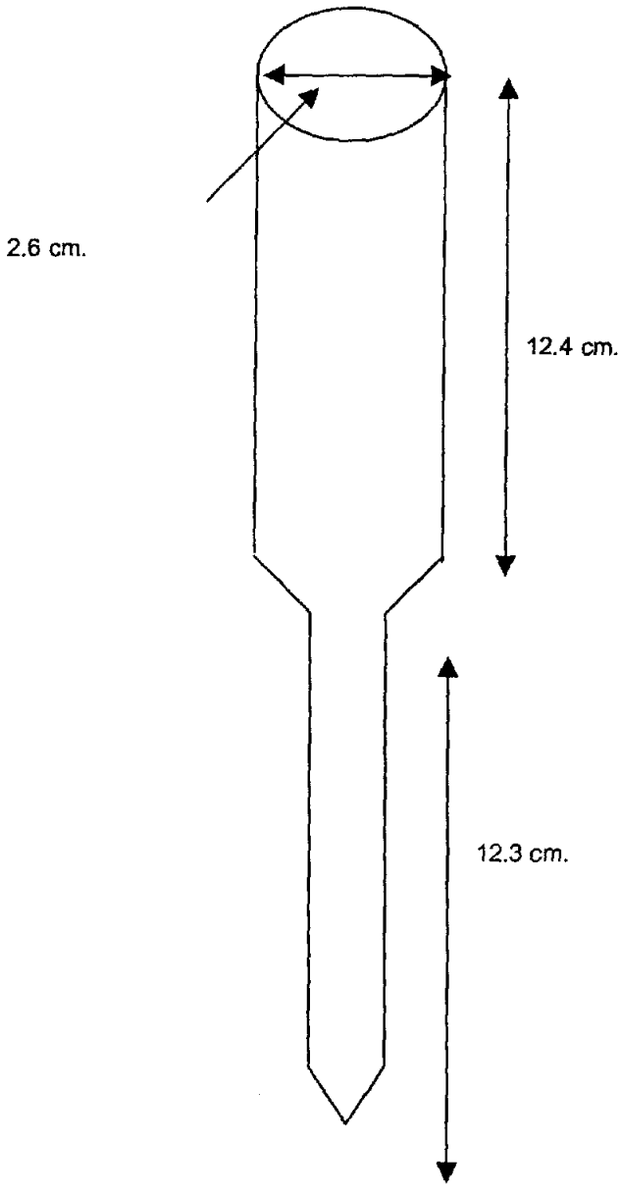
ตารางที่ 13 ตาราง student t-test [3]

ค่า t ที่ระดับความเชื่อมั่นต่าง ๆ

Degree of Freedom	t value for Confidence Limit (%)					
	50	80	90	95	99	99.8
1	1.00	3.08	6.31	12.7	63.7	318.0
2	0.82	1.89	2.92	4.30	9.92	22.3
3	0.76	1.64	2.35	3.18	5.84	10.2
4	0.74	1.53	2.13	2.78	4.60	7.17
5	0.73	1.48	2.02	2.57	4.03	5.89
6	0.72	1.44	1.94	2.45	3.71	5.21
7	0.71	1.42	1.90	2.36	3.50	4.78
8	0.71	1.40	1.86	2.31	3.36	4.50
9	0.70	1.38	1.83	2.26	3.25	4.30
10	0.70	1.37	1.81	2.23	3.17	4.14
12	0.70	1.36	1.78	2.18	3.06	3.93
15	0.69	1.34	1.75	2.13	2.95	3.73
20	0.69	1.32	1.72	2.09	2.84	3.55
30	0.68	1.31	1.70	2.04	2.75	3.38
60	0.68	1.30	1.67	2.00	2.66	3.23
α	0.67	1.29	1.64	1.96	2.58	3.09

ภาคผนวก ข

รูปที่ 1



Chromatographic glass column