

การพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบกากในอาหารสัตว์

สุนีย์ คณาพิพัฒน์^{1/} ภิรมภรณ์ เกื่อนถ้ำแก้ว^{1/}

บทคัดย่อ

การพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบกากในอาหารสัตว์ ซึ่งดัดแปลงจากวิธีมาตรฐาน AOAC Official Method 978.10 (2016) เพื่อให้เหมาะสมกับเครื่องมือวิเคราะห์กากแบบกึ่งอัตโนมัติ โดยทำการลดปริมาณตัวอย่างทดสอบจาก 2 กรัม เป็น 1 กรัม และมีการเพิ่มสารช่วยกรอง ใช้อะซิโตนแทนปิโตรเลียมอีเทอร์ในการสกัดไขมัน ลดปริมาณสารละลายกรดซัลฟิวริก 1.25 เปอร์เซ็นต์โดยสัดส่วนมวลต่อปริมาตร และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.25 เปอร์เซ็นต์โดยสัดส่วนมวลต่อปริมาตร จาก 200 มิลลิลิตร เป็น 150 มิลลิลิตร และลดอุณหภูมิที่เผาตะกอนที่ 550 ± 10 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง เป็น 500 ± 10 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้น มีการทดสอบความแม่นยำโดยใช้วัสดุอ้างอิงเป็นตัวอย่างทดสอบ และนำผลทดสอบมาประเมินความแม่นยำ 2 แบบ คือ การทดสอบ bias โดยใช้สถิติ t-test และค่าเปอร์เซ็นต์การกลับคืนของค่ากากเฉลี่ย พบว่าผลการทดสอบ bias ไม่มีนัยสำคัญ และค่าเปอร์เซ็นต์การกลับคืนของค่ากากเฉลี่ยเท่ากับ 99.51 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับทั้ง 2 แบบ ผลทดสอบความเที่ยงแบบ repeatability และความเที่ยงแบบ intermediate precision ประเมินด้วยสถิติ Horwitz equation พบว่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ และวิธีทดสอบนี้มีช่วงการใช้งานที่ปริมาณกากร้อยละ 0.42 ถึง 35.05 ดังนั้น วิธีที่พัฒนาขึ้นจึงมีความเหมาะสมในการนำไปใช้เป็นวิธีทดสอบกากในอาหารสัตว์ นอกจากนี้ การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดตามแนวทางของ EURACHEM/CITAC (2012) โดยใช้ตัวอย่างอาหารโคเป็นตัวแทนของการคำนวณค่าความไม่แน่นอนของการวัดจะได้ปริมาณกากร้อยละ 11.96 ± 0.32 โดยมีเปอร์เซ็นต์ความไม่แน่นอนสัมพัทธ์เท่ากับ 2.7 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

คำสำคัญ : กาก อาหารสัตว์ ทดสอบความใช้ได้ วิธีทดสอบ

เลขทะเบียนผลงานวิชาการ : 60(2)-0404-148

^{1/} กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

ถนนติวานนท์ ตำบลบางกะดี อำเภอเมือง จังหวัดปทุมธานี 12000 โทรศัพท์ 0-2967-9750

Development and validation of analytical method for crude fiber in animal feed

Sunee Kanapipat^{1/} Piromporn Tuantumkaew^{1/}

Abstract

Development and method validation of analysis of crude fiber in feed modified according to AOAC 978.10 (2016) in order to suit the semi-automatic fiber analyzer had been developed by reducing sample portion from two grams to one gram and adding filter aid, utilizing acetone instead of petroleum ether to extract fat out, reducing the volume of 1.25 % w/v sulfuric acid solution and 1.25 % w/v sodium hydroxide solution from 200 ml to 150 ml and decreasing the temperature of ashing from 550 ± 10 °C for 2 hrs. to 500 ± 10 °C for 3 hrs. The method validation result from developed method was checked for accuracy by utilizing reference material as test samples and evaluated the test result for 2 types of bias by using t-test and % recovery of mean value of crude fiber. There was bias showed no significantly and % recovery of mean value of crude fiber equal to 99.51 which were satisfied. Repeatability and intermediate precision by Horwitz equation were within acceptable criteria. Working range of this method were 0.42 - 35.05 % of crude fiber. Therefore, the developed method is suitable for testing of crude fiber in animal feed. Furthermore, the estimation of measurement uncertainty was followed the guideline of EURACHEM/CITAC (2012). Once feed for cattle was representative, measurement uncertainty of the method reported 11.96 ± 0.32 % crude fiber and relative measurement uncertainty equaled to 2.7 % at 95 % confidence level.

Keywords : crude fiber, animal feed, validation, analytical method

Registered No. : 60(2)-0404-148

^{1/} Feed Quality Control Laboratory Division, Bureau of Quality Control of Livestock Products, Department of Livestock Development, Tiwanon Rd., Bangkadi Subdistrict, Muang District, Pathumthani Province, 12000, Tel. 0-2967-9750

คำนำ

ปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการเลี้ยงสัตว์ คือ พันธุ์สัตว์ อาหารสัตว์ โรงเรือนเลี้ยงสัตว์ และโรคของสัตว์ต่าง ๆ เป็นต้น โดยในปัจจุบันการผลิตอาหารสัตว์ได้มีการพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตที่ทันสมัยและถูกต้องตามหลักวิชาการ ทำให้สามารถผลิตอาหารสัตว์ที่มีคุณภาพได้มาตรฐานและมีความปลอดภัยสำหรับใช้ในอุตสาหกรรมเลี้ยงสัตว์ ทั้งนี้ ตามพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2558 ได้กำหนดความหมายของอาหารสัตว์ คือ วัตถุที่มุ่งหมายเพื่อใช้หรือใช้เลี้ยงสัตว์ โดยการให้กิน ต้ม เลี้ยว หรือนำเข้าสู่ร่างกายสัตว์ โดยวิธีการใดๆ หรือ วัตถุที่มุ่งหมายเพื่อใช้หรือใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตอาหารสัตว์ (ราชกิจจานุเบกษา, 2558) ดังนั้น กรมปศุสัตว์ซึ่งเป็นหน่วยงานที่มีหน้าที่ตรวจสอบ กำกับ ดูแล ควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ ได้ดำเนินการตามพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2558 ในการกำหนดคุณภาพและมาตรฐานอาหารสัตว์ให้เหมาะสมเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาอุตสาหกรรมการผลิตอาหารสัตว์และการเลี้ยงสัตว์

กาก (crude fiber) เป็นรายการหนึ่งที่มีการกำหนดคุณภาพและมาตรฐานในอาหารสัตว์ประเภทวัตถุดิบ ซึ่งกำหนดให้วัตถุดิบอาหารสัตว์แต่ละชนิดควรมีปริมาณกากไม่เกินมาตรฐานที่กำหนดตามพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2558 (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2558) สำหรับอาหารสำเร็จรูปสำหรับสัตว์ เช่น ไก่ เป็ด สุกร โค นั้น ผู้ผลิต ผู้นำเข้า และผู้จำหน่ายอาหารสัตว์จะต้องมาขึ้นทะเบียนอาหารสัตว์กับหน่วยงานของกรมปศุสัตว์ ซึ่งต้องมีการกำหนดปริมาณกากในทะเบียนอาหารสัตว์ด้วย นอกจากนี้ ในวงการธุรกิจการค้าอาหารสัตว์ยังมีการใช้ปริมาณกากในอาหารสัตว์เป็นตัวกำหนดราคาซื้อขายอาหารสัตว์ เนื่องจากปริมาณกากใช้วัดคุณค่าทางอาหารสัตว์แต่ละประเภท โดยในสัตว์ปีกมีการใช้ประโยชน์จากกากได้น้อยมาก (Vooren, 2012) ดังนั้นอาหารสัตว์ปีกที่มีกากสูงจัดเป็นอาหารสัตว์คุณภาพต่ำ สำหรับสัตว์เคี้ยวเอื้องมีกระเพาะรูเมน (Rumen) ที่มี fibrolytic bacteria ซึ่งสามารถย่อยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสได้ (Kung, 2014) แต่ถ้ามีปริมาณของกากสูงมากจะมีผลต่อการกินได้ของสัตว์ ดังนั้น การทดสอบหาปริมาณกากในอาหารสัตว์จึงมีความสำคัญและควรใช้วิธีทดสอบที่เหมาะสม และเป็นไปตามความต้องการของอุตสาหกรรมผลิตอาหารสัตว์ เพื่อนำผลการทดสอบมาใช้ประกอบในการพิจารณาคุณภาพอาหารสัตว์ตามที่ขึ้นทะเบียน

การวิเคราะห์หาปริมาณกากในอาหารสัตว์มีหลายวิธีที่มีหลักการเดียวกัน คือ การย่อยตัวอย่างด้วยสารละลายกรดเจือจางและด่างเจือจาง อบตะกอนให้แห้ง ชั่งน้ำหนัก นำตะกอนไปเผาที่อุณหภูมิสูง ส่วนที่หายไปจากการเผา คือ กาก ซึ่งการวิเคราะห์หาปริมาณกากในขั้นตอนการย่อยตัวอย่างด้วยกรดเจือจาง พบว่าวิธีวิเคราะห์ส่วนใหญ่ใช้สารละลายกรดซัลฟิวริก ตามวิธีของ AOAC 962.09 (AOAC, 2016), AOAC 978.10 (AOAC, 2016), AOCS Ba 6a-05 (AOCS, 2017) และ ISO 6865 (ISO, 2000) ส่วนขั้นตอนการย่อยด้วยด่างเจือจางมีการใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ตามวิธีของ AOAC 962.09, AOAC 978.10 และ AOCS Ba 6a-05 สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ตามวิธีของ ISO 6865 การอบตะกอนให้แห้งมีการใช้อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส ตามวิธีของ AOAC 962.09, AOAC 978.10 และ ISO 6865 และอุณหภูมิ 102 องศาเซลเซียส ตามวิธีของ AOCS Ba 6a-05 ส่วนขั้นตอนการเผาทะกอนใช้อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส ตามวิธีของ ISO 6865 อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส ตามวิธีของ AOAC 978.10 และอุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส ตามวิธีของ AOAC 962.09 และ AOCS Ba 6a-05

ห้องปฏิบัติการกลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ดำเนินการทดสอบกากในอาหารสัตว์ ตามพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ.2558 ทั้งนี้ ห้องปฏิบัติการไม่สามารถใช้วิธีมาตรฐานในการทดสอบกากในอาหารสัตว์ได้ เนื่องจากเครื่องมือที่มีในห้องปฏิบัติการเป็นเครื่องมือแบบกึ่งอัตโนมัติ โดยภาชนะบรรจุตัวอย่าง (filter crucible) ที่ใช้กับเครื่องมือมีความจุไม่เหมาะสมสำหรับใส่ตัวอย่างได้ตามที่วิธีมาตรฐานกำหนด และการใช้เครื่องมือแบบกึ่งอัตโนมัติเป็นแบบระบบปิด มีการกรองสารละลายตัวอย่างผ่านแผ่นกรองออกทางด้านล่าง ทำให้อนุภาคของตะกอนตัวอย่างเกาะบนแผ่นกรอง จึงกรองสารละลายตัวอย่างได้ยาก และในวิธีมาตรฐานใช้ปิโตรเลียมอีเทอร์ในการสกัดไขมัน ซึ่งมีความเป็นพิษสูงและมีกลิ่นที่รุนแรง ก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้ปฏิบัติงาน นอกจากนี้ filter crucible หากถูกเผาที่อุณหภูมิสูงเกินไปจะทำให้แผ่นกรองหลุดออกจาก filter crucible ได้ ซึ่งส่งผลต่ออายุการใช้งานของ filter crucible ซึ่งมีราคาแพง

ดังนั้น ห้องปฏิบัติการกลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ จึงได้พัฒนาวิธีทดสอบโดยดัดแปลงจากวิธีมาตรฐาน AOAC Official Method 978.10 (AOAC, 2016) เพื่อให้เหมาะสมกับเครื่องมือวิเคราะห์กากแบบกึ่งอัตโนมัติที่มีในห้องปฏิบัติการ โดยมีการลดปริมาณตัวอย่าง เติมสารช่วยกรอง ลดปริมาณสารละลายกรดเจือจางและด่างเจือจางให้เหมาะสมกับปริมาณตัวอย่างที่ลดลง ลดอุณหภูมิการเผาตะกอนแต่เพิ่มเวลาให้นานขึ้น นอกจากนี้ ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพเครื่องวิเคราะห์กาก 2 เครื่องที่ใช้ในห้องปฏิบัติการว่ามีประสิทธิภาพเท่าเทียมกัน และเพื่อให้มั่นใจว่าวิธีทดสอบที่พัฒนาขึ้นให้ผลทดสอบที่ถูกต้องและน่าเชื่อถือตามข้อกำหนดของ ISO/IEC 17025 (ISO, 2005) จึงต้องทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (method validation) โดยทดสอบพารามิเตอร์ต่างๆ ได้แก่ ความแม่นยำ (accuracy) ความเที่ยง (precision) และช่วงการใช้งาน (working range) ของวิธีทดสอบ นอกจากนี้ ทำการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด (measurement uncertainty) ตามแนวทางของ EURACHEM/CITAC (EURACHEM, 2012) และเข้าร่วมการทดสอบความชำนาญเพื่อประเมินความสามารถของห้องปฏิบัติการ แสดงให้เห็นว่าวิธีทดสอบดังกล่าวมีความน่าเชื่อถือ และตรงวัตถุประสงค์การใช้งาน ซึ่งผลการศึกษาดังนี้สามารถนำไปเป็นแนวทางในการทดสอบความใช้ได้ และประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดในตัวอย่างชนิดอื่น ๆ ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. อุปกรณ์และสารเคมี

1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

- 1.1.1 เครื่องวิเคราะห์กาก จำนวน 2 เครื่อง โดยแต่ละเครื่องประกอบด้วย 2 ส่วน คือ
 - 1.1.1.1 Fibertec cold extractor ยี่ห้อ Foss รุ่น 1021 ใช้สำหรับสกัดไขมัน
 - 1.1.1.2 Fibertec hot extractor ยี่ห้อ Foss รุ่น 2010 ใช้สำหรับย่อยตัวอย่าง
- 1.1.2 เครื่องทำน้ำเย็นหมุนเวียน (cooling bath)
- 1.1.3 เครื่องชั่งอ่านละเอียด 0.0001 กรัม
- 1.1.4 เตาเผา (muffle furnace)
- 1.1.5 ตู้อบลมร้อน (hot air oven)
- 1.1.6 Filter crucible (P2) pore size 40 - 100 ไมโครเมตร
- 1.1.7 โถดูดความชื้น (desiccator) ที่มี silica gel เป็นสารดูดความชื้น

- 1.1.8 บิวเรตต์ (burette) class A หรือ AS ขนาด 25 มิลลิลิตร
- 1.1.9 ปิเปตต์ (pipette) class A หรือ AS ขนาด 25 มิลลิลิตร
- 1.1.10 ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร
- 1.1.11 ขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 5 ลิตร
- 1.1.12 ปีกเกอร์ (beaker) ขนาด 5 ลิตร
- 1.1.13 ขวดชั่งสาร (weighing bottle)

1.2 สารเคมี

- 1.2.1 กรดซัลฟิวริก (sulfuric acid, H_2SO_4) AR grade มีความบริสุทธิ์ 96 % w/w มีค่าความถ่วงจำเพาะ 1.84
- 1.2.2 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide, NaOH) AR grade มีความบริสุทธิ์ 99 %
- 1.2.3 Celite 545 AR grade
- 1.2.4 อะซิโตน (acetone, $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$) AR grade
- 1.2.5 1-ออกทานอล (1-octanol, $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{O}$) AR grade
- 1.2.6 เอทานอล (ethanol, $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$) AR grade มีความบริสุทธิ์ ไม่น้อยกว่า 95 %
- 1.2.7 ฟีนอล์ฟทาลีน (phenolphthalein, $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{O}_4$) AR grade
- 1.2.8 สารละลาย H_2SO_4 1.25 % w/v
- 1.2.9 สารละลาย NaOH 1.25 % w/v
- 1.2.10 สารละลายฟีนอล์ฟทาลีน

1.3 สารมาตรฐาน วัสดุอ้างอิง และวัสดุอ้างอิงรับรอง

- 1.3.1 สารมาตรฐานโพแทสเซียมไฮโดรเจนพาทาเลท (potassium hydrogen phthalate, $\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4$) มีความบริสุทธิ์ไม่น้อยกว่า 99.9 %
- 1.3.2 วัสดุอ้างอิง (Reference Material, RM) LGC7173 ชนิดตัวอย่าง poultry feed โดยกาก มีค่าอ้างอิง $\pm$ ค่าความไม่แน่นอน เท่ากับ 4.1 ± 0.7 กรัม/100 กรัม ($k = 2.26$)
- 1.3.3 วัสดุอ้างอิงรับรอง (Certified Reference Material, CRM) BCR708 ชนิดตัวอย่าง dairy feed โดยกาก มีค่าอ้างอิงรับรอง $\pm$ ค่าความไม่แน่นอน เท่ากับ 9.3 ± 1.4 กรัม/100 กรัม ($k = 2$)

2. การเตรียมสารเคมีและสารมาตรฐาน

2.1 การเตรียมและหาความเข้มข้นของสารละลาย NaOH 1.25 % w/v ดังนี้

2.1.1 การเตรียมสารละลาย NaOH 1.25 % w/v โดยละลาย NaOH ปริมาณ 63.13 กรัม ด้วยน้ำจัดไอออนใส่ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 5 ลิตร เขย่าให้เข้ากัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำจัดไอออน เขย่าให้เข้ากันอีกครั้ง

2.1.2 หาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลาย NaOH 1.25 % w/v

2.1.2.1 นำสารมาตรฐานโพแทสเซียมไฮโดรเจนพาทาเลท ใส่ขวดชั่งสาร นำไปอบที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น

2.1.2.2 ชั่งสารมาตรฐานโพแทสเซียมไฮโดรเจนพาทาเลท ที่ผ่านการอบแล้วประมาณ 0.4000 ± 0.0005 (W_{KHP}) ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำจัดไอออน ปริมาตร 40 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายแล้วเติมสารละลายฟีนอล์ฟทาลีน 2 - 3 หยดไทเทรตด้วยสารละลาย NaOH 1.25 % w/v จุดยุติเปลี่ยนจากสารละลายไม่มีสีเป็นสีชมพู

2.1.2.3 คำนวณหาความเข้มข้นของสารละลาย NaOH 1.25 % w/v (โดยความเข้มข้นของสารละลาย NaOH 1.25 % w/v ต้องอยู่ในช่วง 0.313 ± 0.005 โมล/ลิตร คืออยู่ในช่วง 0.308 – 0.318 โมล/ลิตร) ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC Official Method 962.09 (AOAC, 2016)

$$M_{\text{NaOH}} = \frac{W_{\text{KHP}} \times P_{\text{KHP}} \times 10}{(V_{\text{NaOH}} - V_{\text{B}}) \times M_{\text{KHP}}}$$

เมื่อ M_{NaOH} = ความเข้มข้นของสารละลาย NaOH 1.25 % w/v มีหน่วยเป็น โมล/ลิตร
 W_{KHP} = น้ำหนักของสารมาตรฐานโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟทาเลท มีหน่วยเป็นกรัม
 P_{KHP} = ความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐานโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟทาเลท มีหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์
 V_{NaOH} = ปริมาตรของสารละลาย NaOH 1.25 % w/v ที่ใช้ไทเทรตสารมาตรฐานโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟทาเลท มีหน่วยเป็นมิลลิลิตร
 V_{B} = ปริมาตรของสารละลาย NaOH 1.25 % w/v ที่ใช้ไทเทรต blank มีหน่วยเป็นมิลลิลิตร
 M_{KHP} = น้ำหนักโมเลกุลของสารมาตรฐานโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟทาเลท มีหน่วยเป็นกรัม/โมล

2.2 การเตรียมและการหาความเข้มข้นของ H_2SO_4 1.25 % w/v ดังนี้

2.2.1 การเตรียมสารละลาย H_2SO_4 1.25 % w/v โดยเติมน้ำจัดไอออน ประมาณ 3 ลิตร ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 5 ลิตรค่อย ๆ เติมกรด H_2SO_4 ปริมาตร 35.4 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำจัดไอออน เขย่าให้เข้ากันอีกครั้ง

2.2.2 หาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลาย H_2SO_4 1.25 % w/v

2.2.2.1 ปิเปตต์สารละลาย H_2SO_4 1.25 % w/v ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอล์ฟทาเลอิน 2 - 3 หยด เป็นอินดิเคเตอร์ไทเทรตด้วยสารละลาย NaOH 1.25 % w/v จุดยุติเปลี่ยนจากสารละลายไม่มีสีเป็นสีชมพู

2.2.2.2 คำนวณหาความเข้มข้นของสารละลาย H_2SO_4 1.25 % w/v (โดยความเข้มข้นสารละลาย H_2SO_4 1.25 % w/v ต้องอยู่ในช่วง 0.128 ± 0.003 โมล/ลิตร คืออยู่ในช่วง 0.125 – 0.131 โมล/ลิตร) ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC Official Method 962.09 (AOAC, 2016)

$$M_{\text{H}_2\text{SO}_4} = \frac{M_{\text{NaOH}} \times V_{\text{NaOH}}}{2 \times V_{\text{H}_2\text{SO}_4}}$$

เมื่อ $M_{\text{H}_2\text{SO}_4}$ = ความเข้มข้นของสารละลาย H_2SO_4 1.25 % w/v มีหน่วยเป็น โมล/ลิตร
 $V_{\text{H}_2\text{SO}_4}$ = ปริมาตรของสารละลาย H_2SO_4 1.25 % w/v ที่ใช้ มีหน่วยเป็น มิลลิลิตร
 M_{NaOH} = ความเข้มข้นของสารละลาย NaOH 1.25 % w/v มีหน่วยเป็น โมล/ลิตร

V_{NaOH} = ปริมาตรของสารละลาย NaOH 1.25 % w/v ที่ได้จากการไทเทรต มีหน่วยเป็นมิลลิลิตร

2.3 การเตรียมสารละลายฟีนอล์ฟทาลีน โดยละลายฟีนอล์ฟทาลีน 0.5 กรัม ในเอทานอล 100 มิลลิลิตร

3. ตัวอย่าง

อาหารสัตว์และวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่ผ่านการบดแล้ว มีขนาดอนุภาคไม่เกิน 1 มิลลิเมตร ประกอบด้วย

3.1 ตัวอย่างสำหรับเปรียบเทียบประสิทธิภาพเครื่องวิเคราะห์กาก 2 เครื่อง จำนวน 25 ชนิด ได้แก่ ปลาป่น ปลาและกระดูกปลาป่น มันเส้น อาหารแมว ข้าวโพดป่น อาหารสุนัข อาหารนกกระทากากถั่วเหลือง อาหารกึ่งกลาดำ อาหารเป็ด อาหารสุกร อาหารไก่ กากดีดีจีเอส ถั่วเหลืองอบ อาหารโค กากถั่วเขียว กากปาล์ม อาหารกระต่าย รำละเอียด กากมะพร้าว ทานตะวันอัดเม็ด กากปาล์มรวม กากมันแห้ง รำหยาบ และกากเปียร์

3.2 ตัวอย่างสำหรับทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (ทดสอบความเที่ยงแบบ repeatability และ intermediate precision) จำนวน 21 ชนิด ได้แก่ ปลาป่น ขนสัตว์ปีกป่น โปรตีนข้าวโพด ข้าวโพดเมล็ด มันสำปะหลัง ข้าวสาลี อาหารเป็ด สิ่งปรุงแต่ง ถั่วเหลืองอบ อาหารสุกรระยะอุมท้อง อาหารสุกรน้ำหนัก 60 กิโลกรัมจนถึงส่งตลาด อาหารแมว อาหารไก่ อาหารสุนัข รำละเอียด กากถั่วเหลือง กากดีดีจีเอส อาหารโค กากคาโนลา กากปาล์ม และเปลือกถั่วเหลืองอัดเม็ด

4. การพัฒนาวิธีทดสอบกากในอาหารสัตว์

พัฒนาวิธีทดสอบโดยดัดแปลงจากวิธีมาตรฐาน AOAC Official Method 978.10 เพื่อให้เหมาะสมกับเครื่องมือวิเคราะห์กากแบบกึ่งอัตโนมัติที่มีใช้ในห้องปฏิบัติการ โดยมีการลดปริมาณตัวอย่างทดสอบจาก 2 กรัม เป็น 1 กรัม เติม celite 545 เป็นสารช่วยกรอง ใช้อะซิโตนแทนปิโตรเลียมอีเทอร์ในการสกัดไขมัน ลดปริมาณสารละลาย H_2SO_4 1.25 % w/v จาก 200 มิลลิลิตร เป็น 150 มิลลิลิตร และลดปริมาณสารละลาย NaOH 1.25 % w/v จาก 200 มิลลิลิตร เป็น 150 มิลลิลิตร และลดอุณหภูมิที่เผาตะกอนที่ 550 ± 10 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง เป็น 500 ± 10 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง

พัฒนาวิธีทดสอบกากในอาหารสัตว์ โดยทดสอบตัวอย่างวัสดุอ้างอิงและวัสดุอ้างอิงรับรอง ตัวอย่างละ 12 ซ้ำ ด้วยวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีมาตรฐาน แล้วประเมินผลจากการหาค่า % Recovery ของค่ากากเฉลี่ย และ % RSD, ซึ่งมีขั้นตอนทดสอบ ดังนี้

4.1 ชั่งตัวอย่างวัสดุอ้างอิงและวัสดุอ้างอิงรับรอง ประมาณ 1 กรัม (W_0) และ celite 545 ประมาณ 0.5 กรัม (W_1) ลงใน filter crucible

4.2 นำ filter crucible ที่มีตัวอย่างและ celite 545 เข้าเครื่อง Fibertec cold extractor ทำการสกัดไขมันโดยฉีดอะซิโตนให้ท่วมตัวอย่าง (ประมาณ 15 มิลลิลิตร) แช่นานประมาณ 20 นาที แล้ว vacuum เพื่อดูดอะซิโตนทิ้ง จากนั้นแช่ตัวอย่างด้วยอะซิโตน อีก 2 ครั้ง ๆ ละประมาณ 5 นาที

4.3 เปิดสวิทช์เครื่องทำน้ำเย็นหมุนเวียน รอจนมีอุณหภูมิประมาณ 10 องศาเซลเซียส

4.4 เปิดสวิทช์เครื่อง Fibertec hot extractor และ preheat สารละลาย H_2SO_4 1.25 % w/v โดยระบบของเครื่อง รอจนสารละลาย H_2SO_4 1.25 % w/v มีอุณหภูมิประมาณ 85 องศาเซลเซียส เครื่องจะหยุดการ preheat โดยอัตโนมัติ

- 4.5 นำ filter crucible พร้อมตัวอย่างที่สกัดไขมันแล้วเข้าเครื่อง Fibertec hot extractor
- 4.6 เติมสารละลาย H_2SO_4 1.25 % w/v จนถึงปริมาตรประมาณ 120 มิลลิลิตร
- 4.7 เติม 1-ออกทานอล 2 - 3 หยด เพื่อป้องกันการเกิดฟอง
- 4.8 ปิด reflector และหมุนปุ่มเปิดแผงความร้อน (heater) ให้อุณหภูมิสูงสุด น้ำเย็นจากเครื่องทำน้ำเย็นหมุนเวียนจะไหลเข้า condenser ของ column เครื่อง Fibertec hot extractor โดยอัตโนมัติ จากนั้นรอจนสารละลายเดือด
- 4.9 ปรับลดอุณหภูมิของแผงความร้อน ให้เดือดสม่ำเสมอ
- 4.10 ฉีดล้าง column และปรับปริมาตรด้วยสารละลาย H_2SO_4 1.25 % w/v จนถึงขีดปริมาตร 150 มิลลิลิตรปรับความร้อนให้เดือดสม่ำเสมอ ตั้งเวลาย่อย 30 นาที
- 4.11 เมื่อครบเวลารอให้เปิดระบบ “vacuum” เพื่อถ่ายสารละลายทิ้ง
- 4.12 ล้างและกรองตะกอนให้สะอาดโดยใช้น้ำร้อนอย่างน้อย 5 ครั้ง
- 4.13 เปิดระบบ “pressure” เพื่อพลิกและล้างตะกอนโดยใช้น้ำร้อน อย่างน้อย 2 ครั้ง
- 4.14 ล้างและกรองตะกอนอีกอย่างน้อย 5 ครั้ง
- 4.15 ปิดระบบ “pressure” และ “vacuum”
- 4.16 ทำการทดสอบเช่นเดียวกับข้อ 4.6-4.15 แต่เปลี่ยนเป็นใช้สารละลาย NaOH 1.25 % w/v ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ที่ผ่านการ preheat เช่นเดียวกับข้อ 4.4
- 4.17 นำ filter crucible พร้อมตะกอนที่ย่อยเรียบร้อยแล้วเข้าเครื่อง Fibertec cold extractor เพื่อล้างตะกอนด้วยอะซิโตน 1-2 ครั้ง
- 4.18 นำ filter crucible พร้อมตะกอนไปอบที่อุณหภูมิ 130 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
- 4.19 ทำให้เย็นในโถดูดความชื้นแล้วชั่ง filter crucible พร้อมตะกอน บันทึกน้ำหนัก (W_2)
- 4.20 นำ filter crucible พร้อมตะกอน ไปเผาที่อุณหภูมิ 500 ± 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
- 4.21 ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่ง filter crucible พร้อมถ้ำที่เหลือ บันทึกน้ำหนัก (W_3)
- 4.22 ทดสอบ blank โดยชั่งเฉพาะ celite 545 (ไม่ใช่ตัวอย่าง) ทำการทดสอบเช่นเดียวกับข้อ 4.1 - 4.21

5. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพเครื่องวิเคราะห์กาก

ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพเครื่องวิเคราะห์กากรุ่นเดียวกัน จำนวน 2 เครื่องที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ ว่ามีประสิทธิภาพเท่าเทียมกัน โดยทดสอบตัวอย่างอาหารสัตว์ตามวิธีทดสอบกากในอาหารสัตว์ที่พัฒนาขึ้น และประเมินผลโดยใช้สถิติ paired t-test โดยมีขั้นตอนดังนี้

5.1 ทดสอบสมมติฐาน

$$H_0 : \mu_1 = \mu_2$$

$$H_1 : \mu_1 \neq \mu_2$$

ยอมรับ H_0 แสดงว่าค่าเฉลี่ยของผลทดสอบกากของเครื่องวิเคราะห์กาก 2 เครื่องไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ปฏิเสธ H_0 แสดงว่าค่าเฉลี่ยของผลทดสอบกากของเครื่องวิเคราะห์กาก 2 เครื่องแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

5.2 ทดสอบตัวอย่างอาหารสัตว์จำนวน 25 ชนิด ตามวิธีทดสอบกากในอาหารสัตว์ที่พัฒนาขึ้น โดยทำการทดสอบซ้ำต่างเครื่อง

5.3 หาค่าผลต่างของผลการทดสอบกาก (d_i) ในแต่ละตัวอย่าง

5.4 หาค่าเฉลี่ยของค่าผลต่าง ($\bar{d}$)

$$\bar{d} = \frac{\sum_{i=1}^n d_i}{n}$$

5.5 หาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าผลต่าง (S_d)

$$S_d = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (d_i - \bar{d})^2}{n-1}}$$

5.6 คำนวณหาค่า t จากสูตร

$$t = \frac{\bar{d}}{S_d / \sqrt{n}}$$

5.7 หาค่า t_c จากตาราง t ของการทดสอบแบบ two-tailed ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % เมื่อ degree of freedom (df) = $n - 1$

โดย $t < t_c$ แสดงว่ายอมรับ H_0

$t > t_c$ แสดงว่าปฏิเสธ H_0

6. การทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบกากในอาหารสัตว์

6.1 การทดสอบความแม่นยำ (accuracy) โดยประเมิน trueness และค่า % Recovery ของค่ากากเฉลี่ย

6.1.1 ทดสอบวัสดุอ้างอิง และ blank อย่างละ 10 ซ้ำ

6.1.2 คำนวณค่าเฉลี่ยของ blank และลบออกจากผลทดสอบกากของวัสดุอ้างอิงในแต่ละค่า

6.1.3 คำนวณค่ากากเฉลี่ย ($\bar{C}_{obs}$) และค่าความแปรปรวน (S_{obs}^2)

6.1.4 ประเมิน trueness โดยการทดสอบ bias ตามแนวทางของ VAM project 3.2.1 (VAM, 2000) มีขั้นตอนดังนี้

6.1.4.1 หาค่ากลับคืนของค่ากากเฉลี่ยจากการทดสอบกากของวัสดุอ้างอิง และค่าความไม่แน่นอนของค่ากลับคืน

$$\bar{R}_m = \frac{\bar{C}_{obs}}{C_{RM}}$$

และ

$$u(\bar{R}_m) = \bar{R}_m \times \sqrt{\left(\frac{S_{obs}^2}{n \times \bar{C}_{obs}^2} \right) + \left(\frac{u(C_{RM})}{C_{RM}} \right)^2}$$

เมื่อ

$\bar{R}_m$ = ค่ากลับคืนของค่ากากเฉลี่ยจากการทดสอบกากของวัสดุอ้างอิง
 $\bar{C}_{obs}$ = ค่ากากเฉลี่ยจากการทดสอบวัสดุอ้างอิง
 C_{RM} = ค่าอ้างอิงปริมาณกากของวัสดุอ้างอิงจากใบรับรอง

$u(\overline{R_m})$ = ค่าความไม่แน่นอนของค่ากลับคืน

$u(C_{RM})$ = ค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานของกากในวัสดุอ้างอิงจากใบรับรอง (ในที่นี้ ค่าความไม่แน่นอนเท่ากับ ± 0.7 กรัม/100 กรัม และ $k = 2.26$)

S_{obs}^2 = ค่าความแปรปรวนของผลทดสอบกากในวัสดุอ้างอิง

n = จำนวนซ้ำของการทดสอบ

6.1.4.2 ทดสอบ bias โดยใช้สถิติ t-test จากสูตร

$$t = \frac{|1 - \overline{R_m}|}{u(\overline{R_m})}$$

6.1.4.3 หาค่า t_c จากตาราง t ของการทดสอบแบบ two-tailed ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % เมื่อ degree of freedom (df) = $n - 1$

โดย $t < t_c$ คือ ค่ากลับคืนของผลทดสอบกากไม่แตกต่างจาก 1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่า ค่าเฉลี่ยของผลทดสอบกากในวัสดุอ้างอิงไม่แตกต่างจากค่าอ้างอิงจากใบรับรองของวัสดุอ้างอิง ดังนั้น ผลการทดสอบ bias ไม่นับสำคัญ

$t > t_c$ คือ ค่ากลับคืนของผลทดสอบกากแตกต่างจาก 1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่า ค่าเฉลี่ยของผลทดสอบกากในวัสดุอ้างอิงแตกต่างจากค่าอ้างอิงจากใบรับรองของวัสดุอ้างอิง ดังนั้น ผลการทดสอบ bias มีนัยสำคัญ

6.1.5 ประเมินความแม่นยำจาก % Recovery ของค่ากากเฉลี่ย ต้องอยู่ในช่วง 97 – 103 ตามเกณฑ์การยอมรับของ AOAC, Appendix F (AOAC, 2016)

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\overline{C}_{obs}}{C_{RM}} \times 100$$

6.2 การทดสอบความเที่ยง (Precision)

6.2.1 การทดสอบความเที่ยงแบบ repeatability

โดยทำการทดสอบกากในตัวอย่างอาหารสัตว์ จำนวน 21 ชนิด ซึ่งมีปริมาณกากครอบคลุมช่วงการใช้งาน ดังนี้

6.2.1.1 ทดสอบกากในตัวอย่างอาหารสัตว์ และ blank อย่างละ 10 ซ้ำ

6.2.1.2 คำนวณค่าเฉลี่ยของ blank และลบออกจากผลทดสอบกากของตัวอย่างในแต่ละค่า

6.2.1.3 คำนวณค่ากากเฉลี่ย ($\bar{x}$), ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD_r), % RSD_r , % $PRSD_r$ ที่คำนวณจาก Horwitz equation และคำนวณค่า repeatability limit ตามแนวทางของ EURACHEM (EURACHEM, 2014)

$$\text{โดย } \% PRSD_r = 0.66 \times 2^{(1 - 0.5 \log C)}$$

เมื่อ C = concentration ratio ของปริมาณกากในตัวอย่าง

และค่า repeatability limit = $2.8 \times SD_r$

เมื่อ SD_r = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) ของการทดสอบความเที่ยงแบบ repeatability

6.2.1.4 ประเมินความเที่ยง โดยเกณฑ์การยอมรับ % RSD_r ต้องมีค่าน้อยกว่า % PRSD_r

6.2.2 การทดสอบความเที่ยงแบบ intermediate precision

โดยทำการทดสอบกากในตัวอย่างอาหารสัตว์ จำนวน 21 ชนิด ซึ่งมีปริมาณกากครอบคลุมช่วงการใช้งาน ดังนี้

6.2.2.1 ทดสอบกากในตัวอย่างอาหารสัตว์ 10 ซ้ำ โดยทดสอบซ้ำต่างวัน

6.2.2.2 คำนวณค่ากากเฉลี่ย ($\bar{x}$), ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD_i), % RSD_i, % PRSD_r ที่คำนวณจาก Horwitz equation และคำนวณค่า intermediate precision limit ตามแนวทางของ EURACHEM (EURACHEM, 2014)

โดย ค่า intermediate precision limit = $2.8 \times SD_i$

เมื่อ SD_i = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) ของการทดสอบความเที่ยงแบบ intermediate precision

6.2.2.3 ประเมินความเที่ยง โดยเกณฑ์การยอมรับ % RSD_r ต้องมีค่าน้อยกว่า % PRSD_r

6.3 การทดสอบหาช่วงการใช้งาน (Working range)

พิจารณาปริมาณกากในตัวอย่างจากผลการทดสอบความแม่นยำ (ข้อ 6.1) และการทดสอบความเที่ยงแบบ intermediate precision (ข้อ 6.2.2) ที่อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ เพื่อนำมาสรุปเป็นช่วงการใช้งานของวิธีทดสอบ

7. การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด ตามแนวทางของ EURACHEM/CITAC (EURACHEM, 2012) มีขั้นตอนดังนี้

7.1 แสดงขั้นตอนการทดสอบกากในอาหารสัตว์ที่ชัดเจนในรูปแบบ flow chart

7.2 กำหนดสิ่งที่ต้องการวัด สามารถกำหนดได้จากสูตรคำนวณหาปริมาณกาก

7.3 รวบรวมแหล่งความไม่แน่นอนที่มีผลกระทบต่อผลทดสอบและแสดงเป็นแผนภูมิก้างปลา (fish bone diagram)

7.4 หาค่าความไม่แน่นอนจากแหล่งต่าง ๆ และเปลี่ยนค่าให้เป็นค่าความไม่แน่นอนมาตรฐาน (standard uncertainty, u_x) ดังนี้

7.4.1 ค่าความไม่แน่นอนที่เกิดจากการชั่งน้ำหนัก คือค่า linearity และ readability

โดย linearity คือ ค่าความคลาดเคลื่อนของเครื่องชั่งซึ่งเกิดจากการชั่งน้ำหนัก กำหนดโดยบริษัทผู้ผลิต

$$\text{standard uncertainty} = \frac{\text{linearity}}{\sqrt{3}} \text{ g}$$

Readability คือ ค่าความละเอียดของเครื่องชั่ง

$$\text{standard uncertainty} = \frac{\text{readability}}{2\sqrt{3}} \text{ g}$$

หากมีการ tare เครื่องชั่งจะต้องมีการคิดค่าความไม่แน่นอนจาก linearity และ readability ที่เกิดจากการ tare น้ำหนักด้วย

7.4.2 ค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานจากการทดสอบซ้ำ

จากการหาค่าความไม่แน่นอนของผลทดสอบซ้ำ จะใช้ข้อมูลจากการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบกากในอาหารสัตว์ โดยใช้ผลทดสอบความเที่ยงแบบ Intermediate precision มาหาค่าความไม่แน่นอนมาตรฐาน จากสูตร

$$\text{standard uncertainty} = \frac{SD_i}{\sqrt{n}}, \text{ เมื่อ } n \text{ คือจำนวนซ้ำของการทดสอบ}$$

7.4.3 รวมค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานจากแหล่งค่าความไม่แน่นอนเดียวกันและมีหน่วยเดียวกัน เช่น

$$u(W) = \sqrt{(u(W_1))^2 + (u(W_2))^2 + (u(W_3))^2 + (u(W_{1B}))^2 + (u(W_{2B}))^2 + (u(W_{3B}))^2}$$

7.5 คำนวณค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานรวม (Combined standard uncertainty, u_c)

โดยเปลี่ยนค่าความไม่แน่นอนมาตรฐาน ให้เป็นค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard uncertainty, RSU) และ คำนวณค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานรวมจากสูตร

$$\frac{u_c}{C_{cf}} = \sqrt{\left(\frac{u(W_0)}{W_0}\right)^2 + \left(\frac{u(W)}{W}\right)^2 + \left(\frac{u(\text{Precision})}{C_{cf}}\right)^2}$$

$$u_c = C_{cf} \times \sqrt{(RSU(W_0))^2 + (RSU(W))^2 + (RSU(\text{Precision}))^2}$$

เมื่อ C_{cf} เป็นสัญลักษณ์แทนค่ากาก (g/100g)

7.6 คำนวณค่าความไม่แน่นอนขยาย (Expanded uncertainty, U_E) โดยเปลี่ยนค่า u_c ให้มีระดับความเชื่อมั่นที่ 95 % (coverage factor, $k = 2$)

$$\text{จาก } U_E = 2u_c$$

7.7 คำนวณหาค่า % relative measurement uncertainty

$$\% \text{ relative measurement uncertainty} = \frac{U_E \times 100}{C_{cf}}$$

8. การเข้าร่วมทดสอบความชำนาญ (Proficiency Testing, PT) กับหน่วยงานภายนอก

เข้าร่วมการทดสอบความชำนาญกับหน่วยงานภายนอกต่าง ๆ ได้แก่ FAPAS และกรมวิทยาศาสตร์บริการ จำนวน 4 ครั้ง ในระหว่างปี พ.ศ. 2559 – 2560 โดยใช้วิธีทดสอบที่ได้รับการพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีแล้ว

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ผลการพัฒนาวิธีทดสอบกากในอาหารสัตว์

จากการพัฒนาวิธีทดสอบกากในอาหารสัตว์ โดยดัดแปลงจากวิธีมาตรฐาน AOAC Official Method 978.10 เพื่อให้เหมาะสมกับเครื่องมือวิเคราะห์กากแบบกึ่งอัตโนมัติที่มีใช้ในห้องปฏิบัติการ โดยทำการลดปริมาณตัวอย่างทดสอบจาก 2 กรัม เป็น 1 กรัม เนื่องจาก filter crucible ซึ่งเป็นภาชนะบรรจุตัวอย่างที่ใช้กับเครื่องวิเคราะห์กากแบบกึ่งอัตโนมัติ มีขนาดความจุ 30 มิลลิลิตร จึงจำเป็นต้องลดปริมาณตัวอย่างทดสอบลงให้เหมาะสมกับขนาดของ filter crucible ดังนั้น จึงต้องลดปริมาณของสารละลาย H_2SO_4 1.25 % w/v และสารละลาย NaOH 1.25 % w/v จาก 200 มิลลิลิตร เป็น 150 มิลลิลิตร เพื่อให้เหมาะสมกับปริมาณตัวอย่างทดสอบที่ลดลง และมีการเติม

celite 545 เป็นสารช่วยกรอง เนื่องจากขั้นตอนการย่อยตัวอย่างจะต้องนำ filter crucible เข้าเครื่องวิเคราะห์โดยยึดติดกับคอลัมน์จนแน่น เมื่อทำการย่อยตัวอย่างภายในคอลัมน์จนครบเวลาแล้วจะต้องมีการกรองสารละลายตัวอย่างผ่านแผ่นกรองชนิด sintered glass ของ filter crucible ซึ่งมีความพรุนประมาณ 40 - 100 ไมโครเมตร หากไม่มีการเติมสารช่วยกรองจะทำให้อนุภาคของตะกอนตัวอย่างเกาะบนแผ่นกรอง ทำให้กรองสารละลายตัวอย่างได้ช้า แม้ว่าจะใช้ระบบสุญญากาศของเครื่องในการช่วยกรองก็ตาม และใช้ตัวทำละลายอะซิโตนแทนปิโตรเลียมอีเทอร์ในการสกัดไขมันเนื่องจากอะซิโตนเป็นตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพในการสกัดไขมันได้ (Richardson, 2001) และมีข้อดีคือมีกลิ่นไม่รุนแรง และมีความเป็นพิษต่ำ (OECD SIDS, 1999) ดังนั้น จึงช่วยลดอันตรายต่อสุขภาพของผู้ปฏิบัติงาน นอกจากนี้ ในขั้นตอนหลังจากย่อยตัวอย่างเสร็จแล้ว จะต้องทำการล้างตะกอนด้วยอะซิโตน ซึ่งมีคุณสมบัติที่เหมาะสมสามารถละลายในน้ำได้และระเหยได้เร็ว จึงช่วยให้ตะกอนแห้งก่อนนำไปอบแห้ง และการลดอุณหภูมิในการเผาตะกอนที่ 550 ± 10 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง เป็น 500 ± 10 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง เนื่องจากการใช้อุณหภูมิในการเผาเกิน 500 องศาเซลเซียส อาจทำให้เกิดปัญหา thermal shock (European Commission, 1992) ซึ่งส่งผลต่ออายุการใช้งานของ filter crucible ซึ่งมีราคาแพง ดังนั้นเพื่อยืดอายุการใช้งานของ filter crucible จึงจำเป็นต้องลดอุณหภูมิในการเผาให้เหมาะสม นอกจากนี้ จำเป็นต้องเพิ่มเวลาในการเผาให้นานขึ้นเพื่อให้เหมาะสมกับอุณหภูมิการเผาที่ลดลง

ผลการพัฒนาวิธีทดสอบกากในอาหารสัตว์ โดยทดสอบตัวอย่างวัสดุอ้างอิงและวัสดุอ้างอิงรับรอง ตัวอย่างละ 12 ซ้ำ ด้วยวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีมาตรฐาน ดังตารางที่ 1 นำผลทดสอบมาประเมินความแม่นยำและความเที่ยง พบว่าตัวอย่างวัสดุอ้างอิงชนิด poultry feed มีค่า % Recovery เท่ากับ 97.07 และตัวอย่างวัสดุอ้างอิงรับรองชนิด dairy feed มีค่า % Recovery เท่ากับ 102.69 ซึ่งอยู่ในช่วง 97 - 103 ตามเกณฑ์ของ AOAC, Appendix F (AOAC, 2016) และพบว่าค่า % RSD_r มีค่าน้อยกว่า % PRSD_r จากข้อมูลการทดสอบนี้เป็นข้อมูลเบื้องต้นที่แสดงว่าวิธีทดสอบกากในอาหารสัตว์ที่พัฒนาขึ้นนี้มีความเหมาะสมที่จะใช้เป็นวิธีทดสอบ และเพื่อให้มั่นใจว่าวิธีทดสอบที่พัฒนาขึ้นให้ผลทดสอบที่ถูกต้องและน่าเชื่อถือ จึงดำเนินการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบในขั้นตอนต่อไป

วิธีทดสอบกากในอาหารสัตว์ที่พัฒนาขึ้นนี้มีข้อดี คือ เป็นวิธีที่เหมาะสมกับเครื่องมือวิเคราะห์กากแบบกึ่งอัตโนมัติ โดยเครื่องสามารถให้ความร้อนแก่น้ำ สารละลายกรดเจือจาง และสารละลายต่างเจือจางที่ใช้ย่อยตัวอย่าง และล้างตะกอนด้วยน้ำร้อนโดยระบบสุญญากาศของเครื่อง ทำให้ผู้ปฏิบัติงานไม่ต้องเฝ้าดูการทำงานของเครื่องตลอดเวลา และมีการสัมผัสสารเคมีน้อยลง ดังนั้นผู้ปฏิบัติงานจึงมีความปลอดภัยในการทำงานมากขึ้น

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบวัสดุอ้างอิงและวัสดุอ้างอิงรับรอง และประเมินความแม่นยำและความเที่ยง

ชนิดตัวอย่าง	ค่ากากเฉลี่ย (g/100g)	ค่าอ้างอิงของ RM/CRM (g/100g)	ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD _r) (g/100 g)	% RSD _r	% PRSD _r	% Recovery เกณฑ์ยอมรับ 97 - 103 (AOAC)
RM LGC7173 (Poultry feed)	3.98	4.1	0.0637	1.60	2.13	97.07
CRM BCR708 (Dairy feed)	9.55	9.3	0.1077	1.13	1.89	102.69

2. ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพเครื่องวิเคราะห์กาก

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบกากในอาหารสัตว์ 25 ชนิด ด้วยเครื่องวิเคราะห์กาก 2 เครื่อง

ชนิดตัวอย่าง	ผลทดสอบกาก (g/100g)		ผลต่างของผลทดสอบกาก d_i (g/100g)
	เครื่องที่ 1	เครื่องที่ 2	
ปลาป่น	0.41	0.37	0.04
ปลาและกระดูกปลาป่น	0.64	0.69	-0.05
มันเส้น	1.94	1.89	0.05
อาหารแมว	1.98	1.90	0.08
ข้าวโพดป่น	1.92	1.94	-0.02
อาหารสุนัข	1.96	1.95	0.01
อาหารนกกระทา	3.19	3.12	0.07
กากถั่วเหลือง	3.45	3.47	-0.02
อาหารกุ้งกุลาดำ	3.59	3.57	0.02
อาหารเป็ด	4.07	4.08	-0.01
อาหารสุกร	4.76	4.88	-0.12
อาหารไก่	5.68	5.57	0.11
กากดีดีจีเอส	6.89	6.77	0.12
ถั่วเหลืองอบ	7.68	7.51	0.17
อาหารโค	12.39	12.38	0.01
กากถั่วเขียว	13.92	13.96	-0.04
กากปาล์ม	15.42	15.42	0.00
อาหารกระต่าย	16.53	16.55	-0.02
รำละเอียด	18.22	18.57	-0.35
กากมะพร้าว	20.41	20.06	0.35
ทานตะวันอัดเม็ด	19.69	20.08	-0.39
กากปาล์มรวม	23.64	23.30	0.34
กากมันแห้ง	30.07	29.93	0.14
รำหยาบ	32.33	32.32	0.01
กากเปียรี	37.90	37.48	0.42
ค่าเฉลี่ยของผลต่าง ($\bar{d}$)			0.04
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของผลต่าง (s_d)			0.179
t			1.117
t_c			2.064

จากผลทดสอบปริมาณกากที่มีการทดสอบซ้ำต่างเครื่องดังตารางที่ 2 ได้ประเมินโดยใช้สถิติ paired t-test พบว่าค่า t น้อยกว่า t_c (จากตาราง t) แสดงว่าค่ากากเฉลี่ยที่ได้จากการทดสอบด้วยเครื่องวิเคราะห์กากทั้งสองเครื่องไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นั่นคือเครื่องมือทั้งสองเครื่องมีความเท่าเทียมกันสามารถใช้งานเหมือนเป็นเครื่องมือชุดเดียวกัน ดังนั้น เครื่องมือวิเคราะห์กากทั้งสองเครื่องจึงมีความเหมาะสมในการทดสอบกากและทดสอบความใช้ได้ของวิธีในขั้นตอนต่อไป

3. ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบกากในอาหารสัตว์

3.1 ผลการทดสอบความแม่นยำ (Accuracy)

จากผลการทดสอบความแม่นยำดังตารางที่ 3 โดยทดสอบวัสดุอ้างอิง 10 ซ้ำ และนำผลทดสอบมาประเมินความแม่นยำ 2 แบบ คือ ประเมิน trueness และ ค่า % Recovery ของค่ากากเฉลี่ย พบว่าผลการประเมิน trueness โดยทดสอบ bias ด้วยสถิติ t-test ได้ค่า t น้อยกว่า t_c (จากตาราง t) แสดงว่า ค่ากลับคืนของค่ากากเฉลี่ยไม่แตกต่างจาก 1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % นั่นคือ ค่าเฉลี่ยของผลทดสอบกากในวัสดุอ้างอิงไม่แตกต่างจากค่าอ้างอิงจากใบรับรองของวัสดุอ้างอิง ดังนั้น ผลการทดสอบ bias ไม่มีนัยสำคัญ และค่า % Recovery มีค่าเท่ากับ 99.51 ซึ่งอยู่ในช่วง 97–103 ตามเกณฑ์ของ AOAC, Appendix F (AOAC, 2016) ดังนั้นจากผลการประเมินความแม่นยำทั้งสองวิธี แสดงว่าวิธีทดสอบนี้มีความแม่นยำเป็นที่ยอมรับได้

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบวัสดุอ้างอิง 10 ซ้ำ และการประเมินความแม่นยำ (Accuracy)

ค่ากากเฉลี่ย ($\bar{C}_{obs}$) (g/100g)	ค่าความแปรปรวน ของค่ากาก (S_{obs}^2)	ค่าอ้างอิง ของ RM (C_{RM}) (g/100g)	ค่าความไม่ แน่นอน มาตรฐานของ RM ($u(C_{RM})$) (g/100g)	ค่ากลับคืน ($\bar{R}_m$)	ค่าความไม่ แน่นอนของ ค่ากลับคืน ($u(\bar{R}_m)$)	ผลการประเมิน Trueness t t_c		% Recovery เกณฑ์ยอมรับ 97 - 103 (AOAC)
4.08	0.0071	4.1	0.3	0.9951	0.0731	0.067	2.262	99.51

3.2 ผลการทดสอบความเที่ยง (Precision)

จากการทดสอบความเที่ยง 2 แบบ โดยทดสอบตัวอย่างอาหารสัตว์หลากหลายชนิด จำนวน 21 ตัวอย่าง ทำการทดสอบความเที่ยงแบบ repeatability โดยผู้ทดสอบคนเดียว และทดสอบระยะเวลาเดียวกัน ดังตารางที่ 4 และทดสอบแบบ intermediate precision โดยผู้ทดสอบคนเดียว แต่ทดสอบซ้ำต่างวัน ดังตารางที่ 5 ผลการทดสอบความเที่ยงแบบ repeatability ได้ผลทดสอบปริมาณกากตั้งแต่ 0.38 ถึง 35.13 กรัม/100 กรัม พบว่า % RSD_r มีค่าน้อยกว่า % PRSD_r และผลการทดสอบความเที่ยงแบบ intermediate precision ได้ผลทดสอบปริมาณกากตั้งแต่ 0.42 ถึง 35.05 กรัม/100 กรัม พบว่า % RSD_i มีค่าน้อยกว่า % PRSD_i ดังนั้น จากผลการทดสอบความเที่ยงทั้ง 2 แบบ แสดงว่าวิธีทดสอบปริมาณกากมีความเที่ยงเป็นที่ยอมรับได้ ทั้งนี้ ใช้ค่า % PRSD_r เป็นเกณฑ์ยอมรับการทดสอบความเที่ยงแบบ intermediate precision แบบเดียวกับการทดสอบความเที่ยงแบบ repeatability เนื่องจาก เป็นการทดสอบความเที่ยงโดยห้องปฏิบัติการเดียวกัน ถึงแม้จะมีเงื่อนไขระยะเวลาการทดสอบที่แตกต่างกันก็ตาม นอกจากนี้ ผลการทดสอบปริมาณกากในระดับสูงๆ พบว่ามีแนวโน้มค่า % RSD ลดลง ซึ่งเป็นไปตามทฤษฎีของ Horwitz ที่กล่าวว่าการวิเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้นสูง ๆ จะมีความเที่ยงดีกว่าที่ระดับความเข้มข้นต่ำ ๆ (Horwitz, 1982)

ผลการทดสอบความเที่ยงสามารถนำมาคำนวณหา repeatability limit ได้ค่าอยู่ในช่วง 0.03 - 0.79 และค่า intermediate precision limit ได้ค่าอยู่ในช่วง 0.04 - 0.95 ซึ่งสามารถนำค่าทั้งสองมาใช้ประโยชน์ในการประกันคุณภาพผลการทดสอบ โดยใช้เป็นเกณฑ์ของค่าความต่าง (difference) ของการทดสอบตัวอย่างซ้ำในงานประจำได้

3.3 ผลการทดสอบหาช่วงการใช้งาน (Working range)

ผลการทดสอบวัสดุอ้างอิงและการประเมินความแม่นยำและทดสอบตัวอย่างหลายชนิดตั้งแต่ปริมาณการต่ำถึงสูง และประเมินความเที่ยง พบว่าผลการประเมินความแม่นยำและความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ โดยนำช่วงของการทดสอบความเที่ยงแบบ intermediate precision ดังตารางที่ 5 มาใช้เป็นช่วงการใช้งาน เนื่องจากระยะเวลาการทดสอบมีความเหมาะสมกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดสอบแบบ repeatability ดังนั้น ช่วงการใช้งานของวิธีทดสอบนี้ คือ 0.42 - 35.05 กรัม/100 กรัม ตารางที่ 4 ผลการทดสอบกากในตัวอย่างอาหารสัตว์ 21 ชนิด ตัวอย่างละ 10 กรัม และการประเมินความเที่ยงแบบ repeatability

ชนิดตัวอย่าง	ค่ากากเฉลี่ย ($\bar{x}$) (g/100 g)	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD _r) (g/100 g)	% RSD _r	% PRSD _r	Repeatability limit (2.8 x SD _r) (g/100 g)
ปลาป่น	0.38	0.0103	2.71	3.05	0.03
ขนสัตว์ปีกป่น	1.17	0.0289	2.47	2.58	0.08
โปรตีนข้าวโพด	1.37	0.0330	2.41	2.52	0.09
ข้าวโพดเมล็ด	1.59	0.0339	2.13	2.46	0.09
มันสำปะหลัง	2.03	0.0187	0.92	2.37	0.05
ข้าวสาลี	2.60	0.0490	1.88	2.29	0.14
อาหารเป็ด	2.83	0.0531	1.88	2.26	0.15
สิ่งปรุงแต่ง	3.69	0.0393	1.07	2.17	0.11
ถั่วเหลืองอบ	4.15	0.0755	1.82	2.13	0.21
อาหารสุกร*	4.21	0.0761	1.81	2.13	0.21
อาหารแมว	4.86	0.0979	2.01	2.08	0.27
อาหารไก่	5.13	0.0911	1.78	2.06	0.26
อาหารสุนัข	5.26	0.0803	1.53	2.06	0.22
รำละเอียด	6.13	0.0377	0.62	2.01	0.11
กากถั่วเหลือง	7.44	0.1191	1.60	1.95	0.33
กากดีดีจีเอส	7.70	0.1340	1.74	1.94	0.38
อาหารสุกร**	10.24	0.0933	0.91	1.86	0.26
อาหารโค	11.97	0.1983	1.66	1.82	0.56
กากคาโนลา	12.27	0.1557	1.27	1.81	0.44
กากปาล์ม	16.49	0.2512	1.52	1.73	0.70
เปลือกถั่วเหลืองอัดเม็ด	35.13	0.2834	0.81	1.54	0.79

หมายเหตุ * คือ อาหารสุกรระยะอ้วนท้อง

** คือ อาหารสุกรน้ำหนัก 60 กิโลกรัม จนถึงส่งตลาด

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบกากในตัวอย่างอาหารสัตว์ 21 ชนิด ตัวอย่างละ 10 กรัม โดยทดสอบซ้ำต่างวัน และการประเมินความเที่ยงแบบ intermediate precision

ชนิดตัวอย่าง	ค่ากากเฉลี่ย ($\bar{x}$) (g/100 g)	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD) _i (g/100 g)	% RSD _i	% PRSD _r	Intermediate precision limit (2.8 x SD _i) (g/100 g)
ปลาป่น	0.42	0.0125	2.98	3.01	0.04
ขนสัตว์ปีกป่น	1.18	0.0299	2.53	2.57	0.08
โปรตีนข้าวโพด	1.40	0.0348	2.49	2.51	0.10
ข้าวโพดเมล็ด	1.57	0.0374	2.38	2.47	0.10
มันสำปะหลัง	2.01	0.0460	2.29	2.38	0.13
ข้าวสาลี	2.82	0.0578	2.05	2.26	0.16
อาหารเปิด	3.04	0.0663	2.18	2.23	0.19
สิ่งปรุงแต่ง	3.67	0.0760	2.07	2.17	0.21
ถั่วเหลืองอบ	4.22	0.0837	1.98	2.13	0.23
อาหารสุกร*	4.28	0.0808	1.89	2.12	0.23
อาหารแมว	4.81	0.0975	2.03	2.08	0.27
อาหารไก่	5.18	0.0947	1.83	2.06	0.27
อาหารสุนัข	5.27	0.0996	1.89	2.06	0.28
รำละเอียด	6.12	0.0920	1.50	2.01	0.26
กากถั่วเหลือง	7.54	0.1374	1.82	1.95	0.38
กากดีดีจีเอส	7.82	0.1414	1.81	1.94	0.40
อาหารสุกร**	10.06	0.1720	1.71	1.86	0.48
อาหารโค	12.36	0.2209	1.79	1.81	0.62
กากคาโนลา	12.46	0.2243	1.80	1.81	0.63
กากปาล์ม	16.42	0.2631	1.60	1.73	0.74
เปลือกถั่วเหลืองอัดเม็ด	35.05	0.3396	0.97	1.55	0.95

หมายเหตุ * คือ อาหารสุกรระยะอุ้มท้อง

** คือ อาหารสุกรน้ำหนัก 60 กิโลกรัม จนถึงส่งตลาด

4. ผลการประมาณค่าความไม่แน่นอน

จากการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดตามแนวทางของ EURACHEM/CITAC 2012 ได้ใช้ข้อมูลจากการทดสอบปริมาณกากในอาหารโคโดยทดสอบ 2 ซ้ำ มีค่ากากเฉลี่ยเท่ากับ 11.96 กรัม/100กรัม ในขั้นตอนแรกได้แสดงขั้นตอนการทดสอบปริมาณกากในอาหารสัตว์ในรูป flow chart ดังรูปที่ 1 เพื่อช่วยในการหาแหล่งความไม่แน่นอน จากนั้นกำหนดสิ่งที่ต้องการวัด กำหนดได้จากสูตรคำนวณหาปริมาณกากในอาหารสัตว์ และนำมาใช้หาแหล่งความไม่แน่นอน เมื่อได้รวบรวมแหล่งความไม่แน่นอนที่มีผลกระทบต่อผลทดสอบจึงแสดงเป็นแผนภูมิแก๊งปลา (fish bone diagram) พบว่ามีแหล่งความไม่แน่นอน 3 แหล่ง คือ น้ำหนักตัวอย่าง (W_0) น้ำหนักกาก (W) และการทดสอบซ้ำ (precision) ซึ่งแสดงอยู่ในรูปแก๊งปลาหลัก ส่วนแก๊งปลาย่อยจะเป็นแหล่งความไม่แน่นอนของ

ก้างปลาหลักดังรูปที่ 2 ใช้ข้อมูลความไม่แน่นอนจาก 3 แหล่ง และจากการรวบรวมแหล่งความไม่แน่นอนในรูปแบบภูมิศาสตร์ก้างปลา นำมาคำนวณหาค่าความไม่แน่นอนมาตรฐาน และรวมค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานของแต่ละแหล่ง ดังตารางที่ 7 พบว่าความไม่แน่นอนจากน้ำหนักตัวอย่าง (W_0) และน้ำหนักกาก (W) มีสาเหตุมาจากการชั่งน้ำหนัก ซึ่งมีผลให้เกิดค่าความไม่แน่นอนจากค่าความคลาดเคลื่อนของเครื่องชั่งที่เกิดจากการชั่ง (linearity) และค่าความละเอียดของเครื่องชั่ง (readability) ซึ่งจะนำมาใช้คำนวณหาค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานต่อไป ส่วนค่าความไม่แน่นอนจากการทดสอบซ้ำ (precision) จะใช้ค่าจากผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบกากในอาหารสัตว์ โดยใช้ผลทดสอบความเที่ยงแบบ intermediate precision (ตารางที่ 5) โดยผลการทดสอบอาหารโคมีค่ากาก เท่ากับ 11.96 กรัม/100กรัม เมื่อนำผลทดสอบไปเปรียบเทียบกับค่ากากเฉลี่ยจากตารางที่ 5 พบว่ามีผลทดสอบใกล้เคียงกับค่ากากเฉลี่ย 12.36 กรัม/100กรัม และมีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เท่ากับ 0.2209 กรัม/100กรัม เนื่องจากการทดสอบตัวอย่าง 2 ซ้ำ จึงได้ค่าความไม่แน่นอนมาตรฐาน เท่ากับ $0.15620 (0.2209/\sqrt{2})$ กรัม/100กรัม ดังตารางที่ 7 ดังนั้นหากต้องการให้ค่าความไม่แน่นอนของผลทดสอบลดลง ต้องเพิ่มจำนวนการทดสอบซ้ำ นอกจากนี้ การเลือกใช้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากผลการทดสอบความเที่ยงแบบ intermediate precision มาหาค่าความไม่แน่นอนจากการทดสอบซ้ำ จะให้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ครอบคลุมค่าความไม่แน่นอน ซึ่งหากใช้ข้อมูลที่ได้จากการทดสอบความเที่ยงแบบ repeatability อาจได้ค่าความไม่แน่นอนที่น้อยกว่าความเป็นจริงได้ ผลการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดในตัวอย่างอาหารโค เป็นค่าความไม่แน่นอนรวมจาก 3 แหล่ง แต่ไม่สามารถรวมค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานของทั้ง 3 แหล่งได้โดยตรงเนื่องจากมีค่าตั้งต้นและมีหน่วยแตกต่างกัน จึงต้องเปลี่ยนค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานเป็นค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานสัมพัทธ์ก่อนนำไปคำนวณค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานรวม และพบว่าแหล่งความไม่แน่นอนที่ทำให้ค่าความไม่แน่นอนมากที่สุด คือ จากการทดสอบซ้ำ มีค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานสัมพัทธ์ เท่ากับ 0.01306 ดังตารางที่ 8

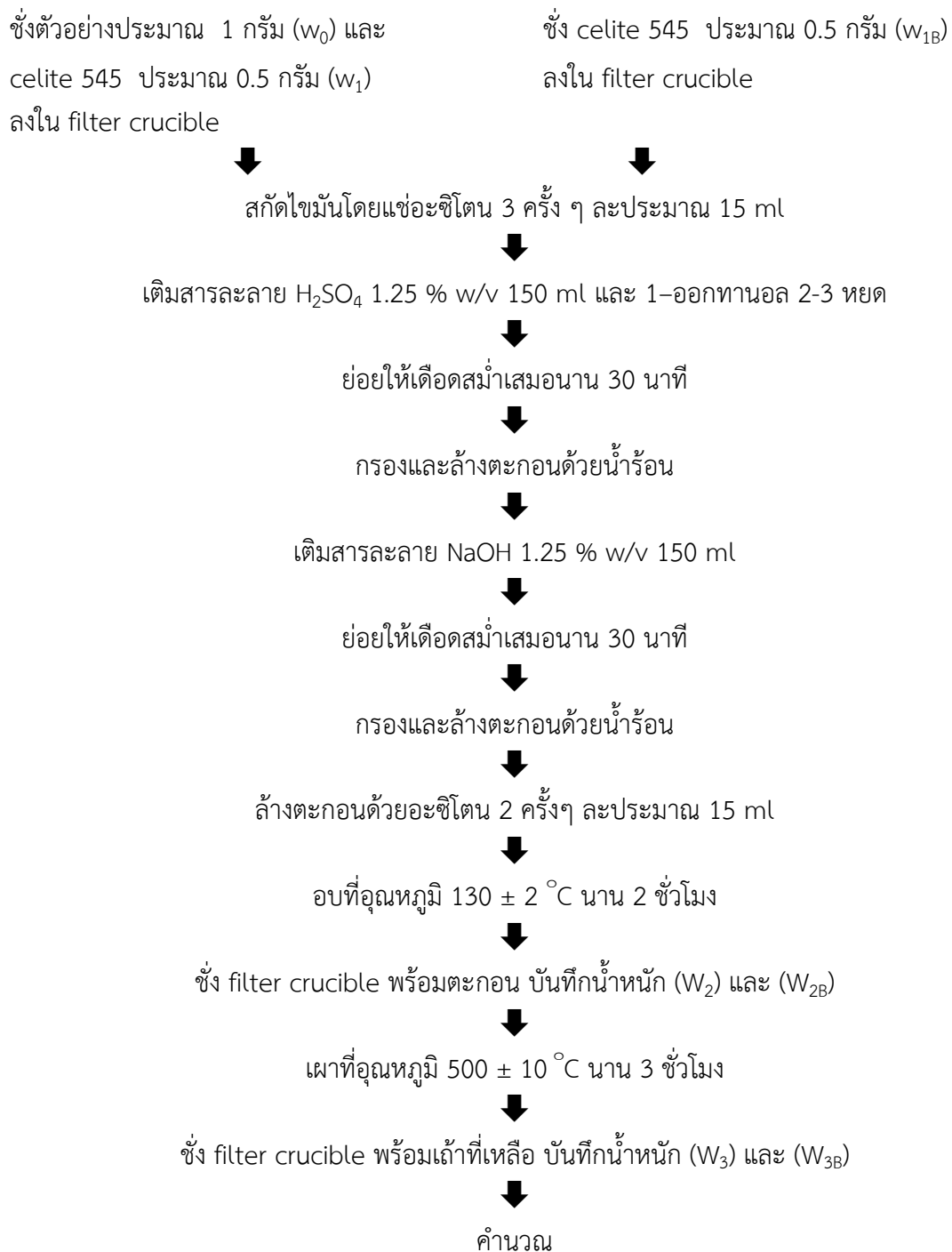
ผลการประมาณค่าความไม่แน่นอนจากการทดสอบอาหารโคครั้งนี้ ได้ค่ากากและค่าความไม่แน่นอน เท่ากับ 11.96 ± 0.32 กรัม/100กรัม และ % Relative measurement uncertainty เท่ากับ 2.7 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 6 ข้อมูลการทดสอบหาปริมาณกากในอาหารโค โดยทดสอบ 2 ซ้ำ ใช้เป็นตัวแทนในการประมาณค่าความไม่แน่นอน

	น้ำหนัก ตัวอย่าง (W_0, g)	น้ำหนัก celite (W_1, g)	น้ำหนัก filter crucible+ ตะกอน (W_2, g)	น้ำหนัก filter crucible+เก้า (W_3, g)	Blank	น้ำหนัก กาก (W, g)	ค่ากาก ($C_{cr, g/100 g}$)
ค่าเฉลี่ย	1.0355	0.5312	30.9052	30.7808	0.0011	0.1238	11.96

หมายเหตุ 1. Blank คือ ปริมาณกากของ celite (ไม่มีตัวอย่าง) ต่อ celite 1 กรัม

$$2. \text{ น้ำหนักกาก (W) } = \left[(w_2 - w_3) - (w_1 \times \text{Blank}) \right]$$



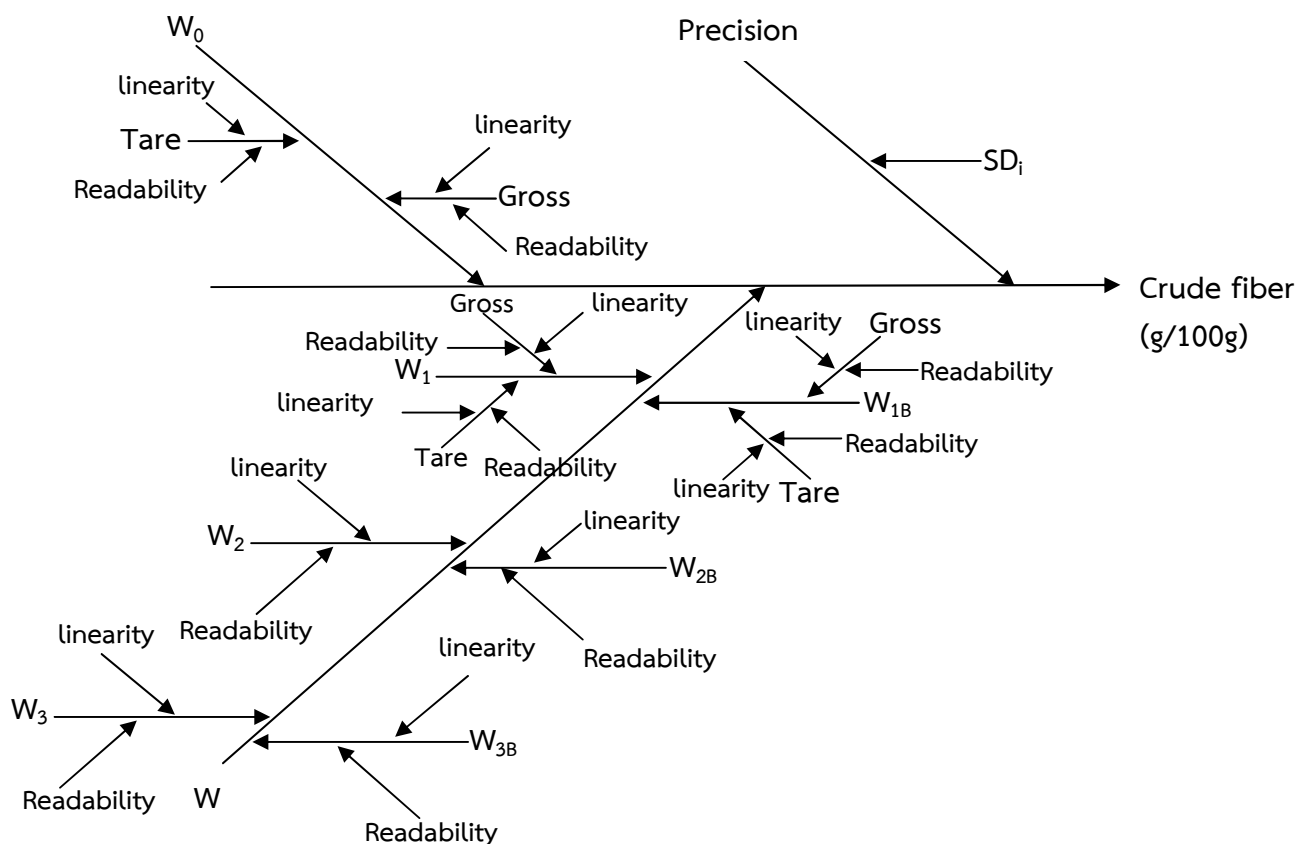
รูปที่ 1 Flow Chart แสดงขั้นตอนการทดสอบหาปริมาณกากในอาหารสัตว์

สูตรการคำนวณหาปริมาณกากในอาหารสัตว์

$$\text{ค่ากาก, } C_{cf} \text{ (g/100 g)} = \frac{[(W_2 - W_3) - (W_1 \times \text{Blank})]}{W_0} \times 100$$

$$\text{ค่ากาก, } C_{cf} \text{ (g/100 g)} = \frac{W}{W_0} \times 100$$

เมื่อ	W	=	น้ำหนักกาก
	W_0	=	น้ำหนักตัวอย่าง
	W_1	=	น้ำหนัก celite ที่ใส่ในตัวอย่าง
	W_2	=	น้ำหนัก filter crucible + ตะกอน (หลังอบ)
	W_3	=	น้ำหนัก filter crucible + เถ้า (หลังเผา)
	blank	=	$\frac{(W_{2B} - W_{3B})}{W_{1B}}$
	W_{1B}	=	น้ำหนัก celite ของ blank (ไม่มีตัวอย่าง)
	W_{2B}	=	น้ำหนัก filter crucible + ตะกอน celite ของ blank (หลังอบ)
	W_{3B}	=	น้ำหนัก filter crucible + เถ้า celite ของ blank (หลังเผา)



รูปที่ 2 Fish bone diagram และแหล่งของความไม่แน่นอน

ตารางที่ 7 ผลการคำนวณ standard uncertainty และ combined standard uncertainty ของแต่ละแหล่ง

Symbol	Description of uncertainty	Source of uncertainty	Uncertainty	Diviser	Standard uncertainty u(X)	Combined standard uncertainty
u(W ₀)	u(W ₀) gross	น้ำหนักตัวอย่าง(g)	Linearity	0.0002	$\sqrt{3}$	0.00018
			Readability	0.0001	$2\sqrt{3}$	
	u(W ₀) tare		Linearity	0.0002	$\sqrt{3}$	
			Readability	0.0001	$2\sqrt{3}$	
u(W)	u(W ₁) gross	น้ำหนัก celite (ใส่ในตัวอย่าง (g)	Linearity	0.0002	$\sqrt{3}$	0.00035
			Readability	0.0001	$2\sqrt{3}$	
	u(W ₁) tare		Linearity	0.0002	$\sqrt{3}$	
			Readability	0.0001	$2\sqrt{3}$	
	u(W ₂)	น้ำหนัก filter	Linearity	0.0002	$\sqrt{3}$	
			Readability	0.0001	$2\sqrt{3}$	
	crucible + ตะกอน(g)					
	u(W ₃)	น้ำหนัก filter	Linearity	0.0002	$\sqrt{3}$	
			Readability	0.0001	$2\sqrt{3}$	
	crucible + เถ้า(g)					
	u(W _{1B}) gross	น้ำหนัก celite ของ	Linearity	0.0002	$\sqrt{3}$	
			Readability	0.0001	$2\sqrt{3}$	
	u(W _{1B}) tare	Blank(g)	Linearity	0.0002	$\sqrt{3}$	
			Readability	0.0001	$2\sqrt{3}$	
	u(W _{2B})	น้ำหนัก filter	Linearity	0.0002	$\sqrt{3}$	
			Readability	0.0001	$2\sqrt{3}$	
	crucible + ตะกอนของ Blank(g)					
	u(W _{3B})	น้ำหนัก filter	Linearity	0.0002	$\sqrt{3}$	
			Readability	0.0001	$2\sqrt{3}$	
	crucible + เถ้าของ Blank(g)					
u(Precision)	u(Precision)	การทดสอบซ้ำ (g/100g)	SD _i (ใช้ข้อมูลจาก Intermediate precision)	0.2209	$\sqrt{2}$	0.15620

ตารางที่ 8 ผลการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดในตัวอย่างอาหารโค

Symbol	Description	Value (X)	Standard uncertainty (u(X))	Relative standard uncertainty (u(X)/X)	Combined standard uncertainty (u _c)	Expanded uncertainty (U _E)	% relative measurement uncertainty
W ₀	น้ำหนักตัวอย่าง (g)	1.0307	0.00018	0.00017	0.16	0.32	2.7
W	น้ำหนักกาก (g)	0.1238	0.00035	0.00283			
Precision	ค่ากากเฉลี่ย (g/100g)	11.96	0.15620	0.01306			

5. ผลการเข้าร่วมทดสอบความชำนาญ (Proficiency Testing, PT) กับหน่วยงานภายนอก

จากผลการเข้าร่วมการทดสอบความชำนาญ รายการทดสอบกากในอาหารสัตว์กับหน่วยงานต่าง ๆ ได้แก่ FAPAS และกรมวิทยาศาสตร์บริการ จำนวน 4 ครั้ง ในระหว่างปี พ.ศ. 2559 – 2560 ดังตารางที่ 9 โดยใช้วิธีทดสอบกากที่ได้รับการพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีในการทดสอบตัวอย่างพบว่าค่า Z-score มีค่าน้อยกว่า 2 แสดงว่าผลการทดสอบเป็นที่น่าพอใจ ตามเกณฑ์ของ ISO 13528 (ISO, 2015) ดังนั้น วิธีทดสอบกากนี้จึงมีความน่าเชื่อถือและยอมรับได้ นอกจากนี้ ผลการเข้าร่วมการทดสอบความชำนาญใช้ในการประกันคุณภาพผลทดสอบ ตามข้อกำหนดของ ISO/IEC 17025 ข้อ 5.9 (ISO, 2005)

ตารางที่ 9 ผลการเข้าร่วมทดสอบความชำนาญรายการทดสอบกากในอาหารสัตว์

ปีที่เข้าร่วมทดสอบ	หน่วยงานที่จัด (PT provider)	ชนิดตัวอย่าง	ผลทดสอบ (g/100 g)	ค่า Assigned value (g/100 g)	ค่า Z – score
2559	FAPAS	อาหารสัตว์ปีก (Poultry ration)	4.92	5.05	-0.3
	กรมวิทยาศาสตร์บริการ	อาหารสัตว์	4.94	4.77	0.24
2560	FAPAS	อาหารสัตว์ปีก (Poultry ration)	4.17	4.06	0.3
	กรมวิทยาศาสตร์บริการ	อาหารสัตว์	3.32	3.18	0.29

สรุปผลการทดลอง

การพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบกากในอาหารสัตว์ ได้พัฒนาวิธีทดสอบโดยดัดแปลงจากวิธีมาตรฐาน AOAC Official Method 978.10 (2016) เพื่อให้เหมาะสมกับเครื่องมือวิเคราะห์กากแบบกึ่งอัตโนมัติ ซึ่งผลการพัฒนาวิธีได้มีการทดสอบวัสดุอ้างอิงและวัสดุอ้างอิงรับรองพบว่าผลทดสอบอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ จากนั้นได้เปรียบเทียบประสิทธิภาพเครื่องวิเคราะห์กากสองเครื่องที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ พบว่าเครื่องวิเคราะห์กากทั้งสองเครื่องให้ค่าเฉลี่ยของผลทดสอบกากไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่าเครื่องวิเคราะห์กากทั้งสองเครื่องมีประสิทธิภาพเท่า

เทียมกัน ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้น มีการทดสอบความแม่นยำโดยใช้วัสดุอ้างอิงเป็นตัวอย่างทดสอบ และนำผลทดสอบมาประเมินความแม่นยำ 2 แบบ คือ การทดสอบ bias โดยใช้สถิติ t-test และค่า % Recovery ของค่ากากเฉลี่ย พบว่า ค่ากลับคืนของผลทดสอบกากไม่แตกต่างจาก 1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % และ % Recovery ของค่ากากเฉลี่ย เท่ากับ 99.51 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับทั้ง 2 แบบ ผลทดสอบความเที่ยงแบบ repeatability และความเที่ยงแบบ intermediate precision ประเมินด้วยสถิติ Horwitz equation พบว่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ จากผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธี วิธีนี้มีช่วงการใช้งานที่เหมาะสมที่ปริมาณกากร้อยละ 0.42 - 35.05 นอกจากนี้ ได้ประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดตามแนวทางของ EURACHEM/CITAC 2012 โดยใช้ตัวอย่างอาหารโคเป็นตัวแทนของการคำนวณค่าความไม่แน่นอนของการวัดจะได้ปริมาณกากร้อยละ 11.96 ± 0.32 โดยมี % Relative measurement uncertainty เท่ากับ 2.7 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ดังนั้น วิธีที่พัฒนาขึ้นจึงมีความเหมาะสมในการนำไปใช้เป็นวิธีทดสอบกากในอาหารสัตว์ของสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ และเป็นแนวทางในการทดสอบกากในตัวอย่างอื่น ๆ ต่อไป

นอกจากนี้ วิธีวิเคราะห์กากในอาหารสัตว์ที่พัฒนาขึ้นนี้ ช่วยประหยัดงบประมาณในการจัดซื้อวัสดุวิทยาศาสตร์ รวมทั้งผู้ปฏิบัติงานมีความปลอดภัยในการทำงานมากขึ้นเนื่องจากสัมผัสสารเคมีน้อยลง

ข้อเสนอแนะ

ควรมีการทดสอบความเที่ยงในชนิดตัวอย่างอื่น ๆ เพิ่มเติม หรือชนิดตัวอย่างที่ไม่เคยทดสอบหรือชนิดตัวอย่างที่เคยทดสอบแต่มีระดับปริมาณกากที่แตกต่างกัน เพื่อให้ได้ข้อมูลที่น่าเชื่อถือและทันสมัย สามารถนำไปใช้ประโยชน์ด้านการประกันคุณภาพผลการทดสอบ การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดและการขยายขอบข่ายรับรองความสามารถของห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนายไพโรจน์ ชำรงโอภาส ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ นางสุทธิพร พิริยานน หัวหน้ากลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ ที่ให้การสนับสนุนการทำงานวิชาการ คณะกรรมการวิชาการของสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ที่ให้คำแนะนำแก้ไข นางสาวกิมหล่าน กระจางเปล่ง นางสาววัชรพร ปะตังเถาโต นางสาวจารุนันท์ อัจจุตมานัส นางสาววิชชุดา มีอิม และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการงานเคมี ที่ช่วยเหลือในการปฏิบัติงาน

เอกสารอ้างอิง

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2558. ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดคุณภาพหรือมาตรฐานของอาหารสัตว์ควบคุมเฉพาะ ประเภทวัตถุดิบ. 4 ธันวาคม 2558.

- ราชกิจจานุเบกษา. 2558. พระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2558. 5 มีนาคม 2558. ราชกิจจานุเบกษา. หน้า 1.
- AOAC. 2016. AOAC Official Method 978.10 Fiber (Crude) in Animal Feed and Pet Food, Fritted Glass Crucible Method, ch.4 pp. 46-47. AOAC Official Methods of Analysis. 20th ed. **AOAC International**, Gaithersburg, MD.
- AOAC. 2016. AOAC Official Method 962.09 Fiber (Crude) in Animal Feed and Pet Food Ceramic Fiber Filter Method, ch.4 pp. 44-46. AOAC Official Methods of Analysis. 20th ed. **AOAC International**, Gaithersburg, MD.
- AOAC. 2016. Appendix F: Guidelines for standard Method Performance Requirements in Official Methods of analysis of AOAC International. **AOAC International**. Gaithersburg, MD.
- AOCS. 2017. AOCS Ba 6a-05 **Official Method and Recommended Practice of the AOCS 7th edition**.
- EURACHEM. 2012. **EURACHEM/CITAC Guide CG4 Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement 3rd ed**. Available source :<http://eurachem.org>, May 3, 2017.
- EURACHEM. 2014. **EURACHEM Guide The Fitness for Purpose of Analytical Methods A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics 2nd ed**. Available source :<http://eurachem.org>, May 3, 2017.
- European Commission. 1992. Commission Directive 92/89/EEC of 3 November 1992 amending Annex I to Fourth Directive 73/46/EEC establishing Community methods of analysis for the official control of feedingstuffs. Determination of Crude Fibre Commission Directive 92/89/EEC. **Official Journal of European Communities**. L344: 35-37
- Horwitz, W. 1982. Evaluation of Analytical Methods Used for Regulation of Foods and Drugs. **Anal. Chem.** 54(1) : 67A-76A.
- ISO. 2000. ISO 6865 Animal feeding stuffs –Determination of crude fibre content- Method with intermediate filtration. **Internal standard**. Geneva, Switzerland.
- ISO. 2015. ISO 13528 : 2015 Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparison. **Internal standard**. Geneva, Switzerland.
- ISO. 2005. ISO/IEC 17025 : 2005 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. **Internal standard**. Geneva, Switzerland.

- Kung, J.L. 2014. **The Role of Fiber in Ruminant Ration Formulation**, pp. 1-12.
Department of Animal and Food Sciences. Available from:
<https://cdn.canr.udel.edu/wp-content/uploads/2014/02/The-Role-of-Fiber-in-Ruminant-Ration-Formulation.pdf>, June 2, 2017, University of Delaware.
- OECD SIDS. 1999. **SIDS Initial Assessment Report (SIAT) for 9th SIAM**.
UNEP Publications, Paris.
- Richardson, R.K. 2001. Determination of Fat in Dairy Products Using Pressurized Solvent Extraction. **J AOAC International**. 84(5): 1522-1533
- VAM. 2000. VAM Project 3.2.1: development and harmonization of measurement uncertainty principles. Available source: <http://eurachem.org>, May 8, 2017.
- Vooren, N.V. 2012. **Flexible feed formulation with multi enzyme concept**. Pak. Poult., 33: 7-11.