

การประเมินความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์โปรตีน ในผลิตภัณฑ์ปรุงรสที่ได้จากการย่อยโปรตีน ของถั่วเหลืองโดยการเปรียบเทียบผล ระหว่างห้องปฏิบัติการที่มีความเชี่ยวชาญ

นิภาภรณ์ ลักษณะสมยา และจินตนา กิจเจริญวงศ์

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ ปริมาณโปรตีนเป็นหนึ่งในข้อกำหนดด้านคุณภาพของผลิตภัณฑ์ปรุงรสที่ได้จากการย่อยโปรตีนของถั่วเหลือง ซึ่งเป็นอาหารควบคุมคุณภาพหรือมาตรฐานตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข แต่ในประเทศไทยยังไม่มีข้อกำหนดวิธีวิเคราะห์ให้เป็นมาตรฐานเดียวกัน ซึ่งอาจทำให้เกิดข้อโต้แย้งถึงผลการวิเคราะห์ที่แตกต่างกันเมื่อใช้วิธีทดสอบที่ต่างกัน จึงได้ศึกษาและคัดเลือกวิธีวิเคราะห์นำมาทดสอบความถูกต้องของวิธีโดยห้องปฏิบัติการเดี่ยว และศึกษาคุณลักษณะเฉพาะของวิธีโดยการส่งตัวอย่างให้ห้องปฏิบัติการหลายแห่งที่มีความเชี่ยวชาญทำการตรวจวิเคราะห์และนำผลมาประเมินทางสถิติ (collaborative study) วิธีวิเคราะห์โปรตีนที่ศึกษาใช้วิธีเคเจดดาห์ล (Kjeldahl method) ใช้เตาหลุม (block digester) ในการย่อยตัวอย่าง มีทองแดงเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา กลิ่นแอมโมเนียลงในกรดบอริก และไตเตรทกับสารมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริก เพื่อเสนอวิธีนี้ให้สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา พิจารณารับและกำหนดเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ดังกล่าว การศึกษาครั้งนี้ได้คัดเลือกห้องปฏิบัติการทั้งภาครัฐและเอกชน ที่ได้รับการรับรองมาตรฐาน ISO/IEC 17025: 2005 เข้าเป็นสมาชิก จำนวน 14 แห่ง จัดส่งวิธีวิเคราะห์ที่ได้ผ่านการทดสอบความถูกต้องของวิธีโดยห้องปฏิบัติการเดี่ยว และผลิตภัณฑ์ปรุงรสที่ได้จากการย่อยโปรตีนของถั่วเหลือง 3 ชนิดคือ ผลิตภัณฑ์ปรุงรสที่ได้จากการไฮโดรไลซ์โปรตีนของถั่วเหลือง ผลิตภัณฑ์ปรุงรสที่ได้จากการหมักที่มีได้ปรุงแต่งรสและที่ปรุงแต่งรสหวาน ที่มีปริมาณโปรตีนในช่วง 1.8 ถึง 12 กรัม ต่อ 100 กรัม รวม 5 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 2 ขวดที่มีรหัสต่างกันโดยที่สมาชิกไม่ทราบว่าเป็นตัวอย่างเดียวกัน (blind duplicate samples) จากการศึกษาและประเมินผลโดยวิธีการทางสถิติคือ Cochran's test, Grubbs' test และ ANOVA พบว่าคุณลักษณะเฉพาะต่างๆ ที่ศึกษาอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ คือค่า repeatability standard deviation (S_r), repeatability relative standard deviation ($RSD_r, \%$) และ repeatability limit (r) อยู่ระหว่าง 0.03-0.16, 0.57-1.72 และ 0.09-0.46 ตามลำดับ ค่า reproducibility standard deviation (S_R), reproducibility relative standard deviation ($RSD_R, \%$) and reproducibility limit (R) อยู่ระหว่าง 0.07-0.21, 1.39-3.78 และ 0.19-0.59 ตามลำดับ โดยสรุปวิธีนี้เหมาะสมที่จะใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในผลิตภัณฑ์ปรุงรสที่ได้จากการย่อยโปรตีนของถั่วเหลือง ซึ่งจะได้นำเสนอต่อสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาพิจารณารับรอง และประกาศใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในผลิตภัณฑ์ดังกล่าว

Accepted for publication, 23 July 2015

บทนำ

ประกาศกระทรวงสาธารณสุข⁽¹⁾ ได้นิยามผลิตภัณฑ์ปรุงรสที่ได้จากการย่อยโปรตีนของถั่วเหลืองว่า หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่เป็นของเหลวได้จากการย่อยโปรตีนของถั่วเหลืองด้วยการหมักหรือกรรมวิธีอื่นที่เหมาะสม และจะแต่งรสหรือสีหรือไม่ก็ได้ เช่น ซีอิ้ว ซอสปรุงรส ทั้งนี้ให้หมายความรวมถึงผลิตภัณฑ์ปรุงรสที่ได้จากการย่อยโปรตีนของถั่วเหลืองที่ได้ออกมาแล้ว ให้เป็นอาหารที่กำหนดคุณภาพหรือมาตรฐาน ผลิตภัณฑ์นี้แบ่งออกเป็น 3 ชนิด ตามลักษณะการผลิต คือ ผลิตภัณฑ์ปรุงรสที่ได้จากการย่อยโปรตีนของถั่วเหลืองด้วยการหมักที่มีได้มีการปรุงแต่งรสหรือสี ผลิตภัณฑ์ปรุงรสที่ได้จากการย่อยโปรตีนของถั่วเหลืองด้วยการหมักที่ไม่ได้มีการปรุงแต่งรสหรือสี และผลิตภัณฑ์ปรุงรสที่ได้จากการไฮโดรไลซ์โปรตีนของถั่วเหลือง นอกจากนี้ยังได้กำหนดคุณภาพของผลิตภัณฑ์ในสภาพที่เป็นของเหลว ให้ต้องมีโปรตีนไม่น้อยกว่า 4, 1.5 และ 10 กรัม ต่อ 100 กรัม ตามลำดับ แต่ยังไม่มีการกำหนดวิธีการตรวจวิเคราะห์โปรตีนในผลิตภัณฑ์ดังกล่าวให้เป็นมาตรฐานเดียวกัน ซึ่งอาจทำให้เกิดข้อโต้แย้งถึงผลการวิเคราะห์ที่แตกต่างกันเมื่อใช้วิธีทดสอบที่ต่างกัน

วิธีวิเคราะห์โปรตีน เป็น empirical method นั่นคือ ผลทดสอบที่ได้จะขึ้นกับวิธีวิเคราะห์ที่ใช้และสอบกลับไปใช้วิธีการทดสอบนั้น ๆ การใช้วิธีที่ต่างกันจะให้ผลทดสอบที่ต่างกัน ไม่สามารถนำผลการทดสอบมาเปรียบเทียบกันได้ ดังนั้นการกำหนดวิธีวิเคราะห์ให้เป็นวิธีมาตรฐานเดียวกันนั้นมีความสำคัญมาก วิธีวิเคราะห์โปรตีนมีหลายวิธีโดยใช้หลักการต่าง ๆ⁽²⁾ เช่น Kjeldahl method, Dumas principle (combustion principle), Formal titration, Colorimetric methods และ spectroscopic method วิธี Kjeldahl method เป็นวิธีที่องค์ระหว่างประเทศ เช่น CODEX, international association for cereal science and technology (ICC) ใช้เป็นวิธีมาตรฐานในหลาย ๆ ผลิตภัณฑ์ เช่น ในนม (AOAC 991.20, ISO 8968-1/IDF 20-1:2014)^(3, 4) ในธัญพืชและผลิตภัณฑ์ (ICC NO.105/2⁽⁵⁾) ในน้ำผักและผลไม้ (DIN EN 12135 (1997-12))⁽⁶⁾ และยังเป็นวิธีที่ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์อาหารในประเทศไทยส่วนใหญ่เลือกใช้และได้รับการรับรองมาตรฐาน ISO/IEC 17025: 2005 จึงได้เลือกเทคนิคนี้มากำหนดเป็นวิธีทดสอบและทดสอบความถูกต้องของวิธีโดยห้องปฏิบัติการเดียวที่ห้องปฏิบัติการของสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นำค่าที่ได้มาประเมินผลทางสถิติ พบว่าเป็นวิธีที่เหมาะสม จึงได้นำวิธีนี้มาทดสอบความถูกต้องของวิธีโดยห้องปฏิบัติการหลายแห่งที่มีความเชี่ยวชาญ (collaborative study) โดยคัดเลือกห้องปฏิบัติการทั้งภาครัฐและเอกชนที่ได้รับการรับรองมาตรฐาน ISO/IEC 17025: 2005 เข้าร่วมโครงการรวม 14 แห่ง เตรียมตัวอย่างที่มีปริมาณโปรตีนในช่วง 1.8 ถึง 12 กรัมต่อ 100 กรัม รวม 5 ตัวอย่างส่งให้ห้องปฏิบัติการพร้อมวิธีวิเคราะห์ที่จัดทำขึ้น ผลที่ได้จากห้องปฏิบัติการนำมาประเมินผลโดยใช้สถิติที่เหมาะสมตามแนวทาง Guidelines for Collaborative Study Procedures To Validate Characteristics of a Method of Analysis⁽⁷⁾ ผลการประเมินจะได้คุณลักษณะเฉพาะของวิธี (method performance characteristic) ที่สำคัญ คือ repeatability และ reproducibility ซึ่งใช้เป็นเกณฑ์การยอมรับสำหรับการทวนสอบ (method verification) สำหรับผู้ที่นำวิธีนี้ไปใช้ต่อไป

การทำ collaborative study จัดเป็น multi-laboratory method validation เป็นการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่สมบูรณ์และน่าเชื่อถือที่สุดซึ่งต้องมีการดำเนินการตามขั้นตอน (protocol) ที่นานาชาติยอมรับ ส่งผลให้วิธีวิเคราะห์ที่ผ่านการทำ collaborative study มีความน่าเชื่อถือและเป็นที่ยอมรับในระดับนานาชาติ⁽⁸⁾

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อให้ได้วิธีวิเคราะห์ที่เหมาะสมและเป็นที่ยอมรับของผู้มีส่วนได้เสียทุกภาคส่วน นำเสนอต่อสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาพิจารณารับรองและประกาศใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในผลิตภัณฑ์ปรุงรสที่ได้จากการย่อยโปรตีนของถั่วเหลืองตามมาตรฐานที่กำหนด

วัสดุและวิธีการ

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์โดยห้องปฏิบัติการเดียว

ทดสอบความถูกต้องของวิธีโดยห้องปฏิบัติการเดียวที่ห้องปฏิบัติการของสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ตัวอย่างทดสอบ

ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ปรุงรสที่ได้จากการย่อยโปรตีนของถั่วเหลืองทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ปรุงรสที่ได้จากการไฮโดรไลซ์โปรตีนของถั่วเหลือง ผลิตภัณฑ์ปรุงรสที่ได้จากการย่อยโปรตีนของถั่วเหลืองด้วยการหมัก และผลิตภัณฑ์ปรุงรสชนิดหวานรวม 5 ตัวอย่าง ที่มีปริมาณโปรตีนในช่วง 1.8 ถึง 12 กรัมต่อ 100 กรัม

วิธีวิเคราะห์

วิธี Kjeldahl method ใช้ block digestion/steam distillation ตัวอย่างถูกย่อยด้วยกรดซัลฟูริกที่อุณหภูมิสูง มี K_2SO_4 ช่วยเพิ่มจุดเดือดของกรดซัลฟูริก ทองแดงเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ใช้กรดบอริกเข้มข้นร้อยละ 4 เป็นตัวดักจับแอมโมเนียที่กลั่นได้ และไตเตรทกับสารมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริก โดยมีรายละเอียดตามวิธีวิเคราะห์ที่ส่งให้ห้องปฏิบัติการในการทำ collaborative study

การทดสอบความเที่ยง (precision)

ทดสอบความเที่ยงของวิธี (repeatability) โดยวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ปรุงรสฯ ทั้ง 5 ตัวอย่างโดยวิธีที่กำหนดตัวอย่างละ 7 ซ้ำ คำนวณค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

การทดสอบความแม่นยำ (accuracy)

ทดสอบร้อยละการคืนกลับของไนโตรเจน โดยการทดสอบประสิทธิภาพการย่อย ทดสอบการสูญเสียไนโตรเจน และทดสอบประสิทธิภาพการกลั่นและการไตเตรท โดยการวิเคราะห์สารมาตรฐานอย่างละ 7 ซ้ำ คำนวณค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

การศึกษาคุณลักษณะเฉพาะของวิธีโดยห้องปฏิบัติการที่มีความเชี่ยวชาญ (collaborative study)

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ได้คัดเลือกห้องปฏิบัติการทั้งภาครัฐและเอกชนเข้าร่วมโครงการรวม 14 แห่ง ทุกห้องปฏิบัติการได้รับการรับรองมาตรฐาน ISO/IEC 17025: 2005 ในรายการตรวจวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธี Kjeldahl

ตัวอย่างทดสอบ

ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ปรุงรสที่ได้จากการย่อยโปรตีนของถั่วเหลืองทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ ผลิตภัณฑ์ปรุงรสที่ได้จากการไฮโดรไลซ์โปรตีนของถั่วเหลือง ผลิตภัณฑ์ปรุงรสที่ได้จากการย่อยโปรตีนของถั่วเหลืองด้วยการหมัก และผลิตภัณฑ์ปรุงรสชนิดหวานโดยคัดเลือกตัวอย่างที่มีปริมาณโปรตีนต่างกัน 5 ระดับ ในช่วง 1.8 ถึง 12 กรัมต่อ 100 กรัม รวม 5 ตัวอย่าง ตัวอย่างละประมาณ 3 ลิตร ผสมให้เข้ากัน เทใส่ขวดพลาสติก ขวดละประมาณ 30 มิลลิลิตร ติดฉลากระบุหมายเลขตัวอย่าง และรหัสที่ต่างกันตัวอย่างละ 2 รหัส ดังนี้ ตัวอย่างที่ 1: sample A และ N, ตัวอย่างที่ 2: sample B และ Q, ตัวอย่างที่ 3: sample C และ S, ตัวอย่างที่ 4: sample F และ X, ตัวอย่างที่ 5: sample M และ Z (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ตัวอย่างซอสปรุงรสที่ใช้ในการทำ collaborative study

Sample No.	Sample code	Sample type	Sample description	Protein content (g/100g)
1	A N	Blind duplicates	ซอสปรุงรส (ชนิดไฮโดรไลซ์โปรตีนของถั่วเหลือง)	10-11
2	B Q	Blind duplicates	ซอสปรุงรส (ชนิดไฮโดรไลซ์โปรตีนของถั่วเหลือง)	มากกว่า 11
3	C S	Blind duplicates	ซอสปรุงรส	5-7
4	F X	Blind duplicates	ซอสปรุงรส (ชนิดหมัก)	8-10
5	M Z	Blind duplicates	ซอสปรุงรสชนิดหวาน	1-2

การทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneity test)

ทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่าง โดยสุ่มตัวอย่างแบบ random ตัวอย่างละ 10 ขวด ตรวจวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยทดสอบแบบสุ่มขวดละ 2 ขวด ผลที่ได้นำมาทดสอบความแตกต่างระหว่างตัวอย่าง (between sample variation) โดยใช้สถิติ One-way ANOVA (Analysis of Variance) ค่า F ที่คำนวณได้จะต้องน้อยกว่า F critical ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

การทดสอบความคงตัว (Stability test)

คัดเลือกตัวอย่างที่ผ่านการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันแล้วที่มีปริมาณโปรตีนประมาณ 5-7 กรัมต่อ 100 กรัม และประมาณ 11-12 กรัม ต่อ 100 กรัม เป็นตัวแทนในการทดสอบความคงตัวของตัวอย่าง โดยสุ่มตัวอย่างละ 5 ขวด ทำการวิเคราะห์หลังจากวันที่ครบกำหนดการส่งผลโดยวิเคราะห์ขวดละ 2 ขวด นำผลวิเคราะห์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์จากการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้สถิติ t-test ค่า t ที่ได้จะต้องน้อยกว่า t critical ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

การส่งตัวอย่างทดสอบและเอกสารให้ห้องปฏิบัติการ (Distribution of samples and documents)

ส่งตัวอย่างและสารเร่งปฏิกิริยา (copper catalyst (Kjeltab Cu/3.5)) 50 เม็ด วิธีวิเคราะห์ แบบตอบรับตัวอย่าง คำแนะนำ แบบรายงานผล และแบบสอบถามรายละเอียดเกี่ยวกับการตรวจวิเคราะห์ พร้อมทั้งแจ้งรหัสให้แต่ละห้องปฏิบัติการทราบ เพื่อใช้ในการติดต่อกับผู้ดำเนินการ ส่งให้ทางไปรษณีย์ลงทะเบียน แต่ละห้องปฏิบัติการจะได้รับตัวอย่าง 5 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 2 ขวดที่มีรหัสต่างกัน โดยไม่ทราบวาทัง 2 ขวด เป็นตัวอย่างเดียวกัน (blind duplicates)

ในคำแนะนำระบุให้ห้องปฏิบัติการเก็บรักษาตัวอย่างที่อุณหภูมิห้อง แต่เมื่อเปิดขวดแล้วให้เก็บรักษาในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 2-8°C ให้ตรวจวิเคราะห์ตามวิธีที่กำหนด ตรวจวิเคราะห์และส่งผลกลับภายใน 3 สัปดาห์ โดยรายงานผลทุกรหัสตัวอย่างในรูปแบบฟอร์มที่กำหนดด้วยทศนิยม 2 ตำแหน่ง

วิธีวิเคราะห์จะประกอบด้วยรายละเอียดของวิธีวิเคราะห์ การทดสอบร้อยละ การคืนกลับของไนโตรเจน และข้อแนะนำในการตรวจวิเคราะห์ต่างๆ ดังนี้

วิธีวิเคราะห์

1. วิธีดำเนินการ (Procedures)

- 1.1 ชั่งตัวอย่างซอสปรุงรส 1-2 กรัม (เทคนิค 4 ตำแหน่ง) ลงในหลอดย่อย
- 1.2 เติม copper catalyst จำนวน 2 เม็ด และกรดซัลฟูริกเข้มข้น 10 มิลลิลิตร แกว่งเบาๆ เพื่อผสมให้เข้ากันอย่างทั่วถึง หยด antifoam 2-3 หยด
- 1.3 นำหลอดย่อยวางลงใน tube rack วาง heat shields แล้วสวม exhaust manifold ลงบนปากของหลอดย่อยให้ปิดพอดีจึงยก rack ไปวางบนเครื่องย่อย (digestor) ซึ่งได้ปรับตั้งอุณหภูมิไว้ที่ $420 \pm 10^{\circ}\text{C}$ ปรับระดับการดูดของ exhaust manifold ในส่วนของ scrubber unit หรืออุปกรณ์อื่นให้เหมาะสมที่สามารถดูดควันที่เกิดจากการย่อย ย่อยจนกระทั่งเกิดควันสีขาว (ประมาณ 5 นาที)
- 1.4 ปรับลดระดับการดูดของ exhaust manifold ในส่วนของ scrubber unit หรืออุปกรณ์อื่น (ให้ควันสีขาววนเวียนอยู่ในหลอดย่อย) ย่อยต่อจนกระทั่งได้ของเหลวใส (ประมาณ 50 นาที)
- 1.5 ยก tube rack ออกจากเครื่องย่อย โดยยังมี exhaust manifold สวมอยู่ ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น (ประมาณ 25 นาที) (ไม่ควรทิ้งไว้ข้ามคืนเพราะอาจทำให้เกิดตะกอนในหลอดย่อย) เมื่อหมดควันยก manifold ออกพร้อมปิด scrubber unit
- 1.6 นำหลอดย่อยที่เย็นแล้วต่อเข้ากับเครื่องกลั่น
- 1.7 เติมกรดบอริก 30 มิลลิลิตร ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ต่อเข้ากับเครื่องกลั่น โดยให้ปลายของหลอดแก้วที่ต่อจาก condenser ของเครื่องกลั่นอยู่ใต้กรดบอริก
- 1.8 เติมน้ำกลั่นลงในหลอดย่อยที่เย็นแล้ว 60 มิลลิลิตร เติม 40% NaOH ในหลอดย่อย 50 มิลลิลิตร กลั่นจนได้ distillate ประมาณ 180 มิลลิลิตร
- 1.9 ไตเตรต distillate ที่ได้ด้วย 0.1 M HCl ถึงจุดยุติ บันทึกปริมาตรของ 0.1 M HCl
- 1.10 ทำ blank โดยใช้น้ำตาลซูโครส 0.25 กรัม แทนตัวอย่าง
- 1.11 คำนวณปริมาณไนโตรเจนและโปรตีน

ข้อแนะนำในการตรวจวิเคราะห์

1. หลังจากทิ้งไว้ให้เย็นแล้วของเหลวที่ได้ควรใสไม่มีตะกอน หรือมีตะกอนเพียงเล็กน้อยที่ก้นของหลอดย่อย การเกิดตะกอนแสดงว่าปริมาณกรดซัลฟูริกที่เหลืออยู่ในหลอดย่อยน้อยเกินไป ซึ่งอาจมีผลทำให้ปริมาณโปรตีนที่วิเคราะห์ได้น้อยกว่าความเป็นจริง
2. การเกิดตะกอนอาจเป็นผลมาจากการใช้เวลาในการย่อยนานเกินไปหรือการดูดของ exhaust manifold ในส่วนของ scrubber unit แรงเกินไป
3. ถ้าเกิดตะกอนในหลอดย่อยให้อุ่นหลอดย่อยใน block digester จนกระทั่งตะกอนละลาย
4. ในกรณีที่มีความจำเป็นต้องตั้งหลอดย่อยที่ยังไม่วิเคราะห์ค้างคืน ให้เติมน้ำลงในหลอดย่อยประมาณ 20 มิลลิลิตร เพื่อป้องกันการตกตะกอนของสารในหลอด

การคำนวณ (calculation)

$$\text{ไนโตรเจน (ร้อยละของน้ำหนัก)} = \frac{1.4007 (V_A - V_B) M}{W}$$

$$\text{โปรตีน (ร้อยละของน้ำหนัก)} = \text{ไนโตรเจน (ร้อยละของน้ำหนัก)} \times CF$$

เมื่อ V_A = ปริมาตรของ 0.1 M HCl ที่ใช้ในการไตเตรตตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

- V_B = ปริมาตรของ 0.1 M HCl ที่ใช้ในการไตเตรต blank (มิลลิลิตร)
 M = ความเข้มข้นของ 0.1 M HCl (โมลาร์)
 W = น้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม)
 CF = แฟกเตอร์ในการเปลี่ยนปริมาณไนโตรเจนเป็นปริมาณโปรตีน มีค่า 6.25

2. การทดสอบร้อยละการคืนกลับของไนโตรเจน (nitrogen recovery verification)

2.1 ทดสอบประสิทธิภาพการย่อย (digestion efficiency)

ชั่ง tryptophan 0.14–0.15 กรัม (หรือ lysine hydrochloride 0.12–0.13 กรัม) และน้ำตาลซูโครส 0.25 กรัม พร้อมสารต่างๆ ทำการย่อย กลั่น และไตเตรต เช่นเดียวกับตัวอย่าง

2.2 ทดสอบการสูญเสียไนโตรเจน (nitrogen loss)

ชั่ง ammonium sulfate (อบที่ 102°C นาน 3 ชั่วโมง เก็บใน desiccator) 0.09–0.1 กรัม น้ำตาลซูโครส 0.25 กรัม พร้อมสารต่างๆ ทำการย่อย กลั่น และไตเตรต เช่นเดียวกับตัวอย่าง

2.3 ทดสอบประสิทธิภาพการกลั่นและการไตเตรต (distillation/titration efficiency)

ชั่ง ammonium sulfate (อบที่ 102°C นาน 3 ชั่วโมง เก็บใน desiccator) 0.09–0.1 กรัม ลงในหลอดย่อย นำไปต่อเข้ากับเครื่องกลั่น ทำการกลั่นและไตเตรต

การคำนวณ

$$\% \text{ recovery} = \frac{\% \text{ ไนโตรเจนที่วิเคราะห์ได้} \times 100}{\% \text{ ไนโตรเจนของสารมาตรฐานที่ใช้} \times P}$$

การประเมินผลด้วยวิธีทางสถิติ (Statistic evaluation of results)

การตรวจสอบข้อมูลเบื้องต้น

ทวนสอบข้อมูลผลการวิเคราะห์และข้อมูลต่างๆ จากห้องปฏิบัติการในเบื้องต้น โดยศึกษาจากข้อมูลในแบบรายงานผลและจากแบบสอบถามรายละเอียดเกี่ยวกับการตรวจวิเคราะห์ของแต่ละห้องปฏิบัติการเพื่อกำจัดผลวิเคราะห์ที่ไม่ถูกต้องหรือผลวิเคราะห์ที่เห็นได้ชัดเจนว่าไม่น่าเชื่อถือ (invalid data) ออกก่อนการประมวลผลทางสถิติ ผลวิเคราะห์ดังกล่าวได้แก่ผลวิเคราะห์ที่คำนวณผิด ผลวิเคราะห์ที่ต่ำหรือสูงกว่าผลจากห้องปฏิบัติการอื่นอย่างชัดเจน ผลวิเคราะห์ที่รายงานหน่วยผิด รวมทั้งผลวิเคราะห์ที่ไม่ได้ทำตามวิธีที่กำหนด เพื่อให้มั่นใจว่าได้ข้อมูลที่ต้องการและน่าเชื่อถือมาใช้ในการประเมินผล

การทดสอบค่าสุดต่าง (Outliers test)

ข้อมูลที่มีค่าแตกต่างทั้งมากกว่าและน้อยกว่าจากข้อมูลในชุดเดียวกันที่ทำให้สงสัยว่าเป็นข้อมูลที่ไม่อยู่ในกลุ่มเดียวกัน จะถูกนำมาทดสอบค่าสุดต่าง (outliers) โดยใช้สถิติ Cochran's test และ Grubbs' test โดยดำเนินการตามแนวทางของ Guidelines for Collaborative Study Procedures To Validate Characteristics of a Method of Analysis⁽⁷⁾ โดยมีขั้นตอนดังนี้

นำข้อมูลที่ผ่านมาการตรวจสอบในเบื้องต้นแล้วมาทดสอบค่าสุดต่างในห้องปฏิบัติการเดียวกัน (within-laboratory outliers) โดยสถิติ Cochran's test จากนั้นนำมาทดสอบค่าสุดต่างระหว่างห้องปฏิบัติการ (inter-laboratory outliers) ด้วยสถิติ Grubbs' test โดยเริ่มต้นจาก single Grubbs' test ทดสอบทั้งค่าที่สูงสุดของกลุ่ม 1 ค่า และค่าที่ต่ำสุดของกลุ่ม 1 ค่า ต่อมาจึงทดสอบ double Grubbs' test โดยทดสอบค่าที่ต่ำสุดของกลุ่ม

2 ค่า ทดสอบค่าที่สูงที่สุดของกลุ่ม 2 ค่า และทดสอบค่าที่สูงที่สุดและต่ำสุดของกลุ่ม ในขณะที่ทดสอบ Grubbs's test ถ้ามี outliers เกิดขึ้นให้ตัด outlier นั้นออก แล้วนำข้อมูลที่เหลือย้อนกลับไปทำ Cochran's test และ Grubbs's test ตามลำดับอีกครั้ง (ภาพที่ 1) ให้ทำงานกระทั่งไม่มีข้อมูลที่เป็น outliers หรือมีข้อมูลมากกว่า 2/9 ของข้อมูลทั้งหมดเป็น outlier นำข้อมูลที่เหลือมาคำนวณค่า precision ของวิธี

ทดสอบค่าสุดต่างของห้องปฏิบัติการเดียวกัน (within-laboratory outliers test)

ผลวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการที่มีความแตกต่างของค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ของคู่ตัวอย่างเดียวกันมากที่สุด เมื่อเทียบกับผลวิเคราะห์ของคู่ตัวอย่างเดียวกันจากห้องปฏิบัติการอื่นๆ จะถูกนำมาทดสอบว่าเป็นค่าสุดต่าง (outlier) หรือไม่โดยใช้สถิติ Cochran's test

$$C = \frac{(D_{\max}^2)}{(\sum D_i^2)} \times 100$$

เมื่อ D_i = ค่าแตกต่างของคู่ตัวอย่างคู่ที่ i เมื่อ $i = 1, 2, 3, \dots, n$
 $D_{\max}$ = ค่าแตกต่างของคู่ตัวอย่างที่มีค่าสูงสุด

เปรียบเทียบค่า C ที่คำนวณได้กับค่าวิกฤตในตาราง ที่ระดับ $P = 2.5\%$ (1-tail) เมื่อ L คือ จำนวนห้องปฏิบัติการ หรือจำนวนคู่ของตัวอย่างเดียวกัน ถ้าค่าที่คำนวณได้มากกว่าค่าวิกฤตแสดงว่ามีความแตกต่างของผลการวิเคราะห์คู่ตัวอย่างนั้นถือว่าค่าที่สงสัยนั้นเป็น outlier ให้ตัดค่าผลการวิเคราะห์คู่ตัวอย่างนี้ออกก่อนดำเนินการทดสอบในขั้นต่อไป

ทดสอบค่าสุดต่างระหว่างห้องปฏิบัติการ (inter-laboratory outliers test)

กรณีค่าสงสัยมีค่าเดียว (single Grubbs' test)

คำนวณค่าเฉลี่ยผลวิเคราะห์ของแต่ละห้องปฏิบัติการ คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของข้อมูลทั้งหมด (S) คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของข้อมูลเมื่อไม่มีค่าต่ำสุดของข้อมูล (S_L) และคำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของข้อมูลเมื่อไม่มีค่าสูงสุดของข้อมูล (S_H) คำนวณค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ลดลงดังนี้

$$G_L = 100 \times [1 - (S_L/S)] \text{ และ } G_H = 100 \times [1 - (S_H/S)]$$

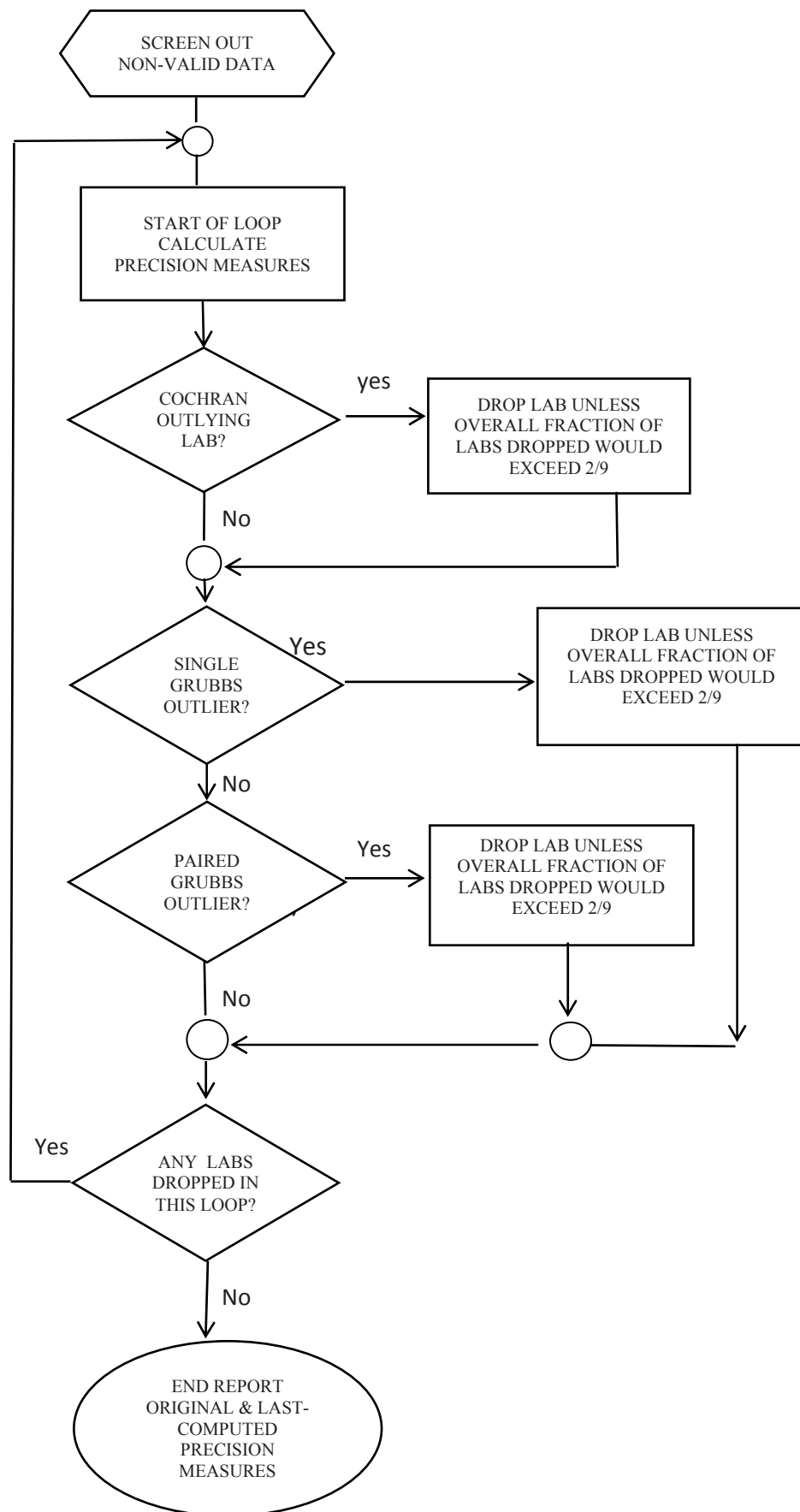
G_L ร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ลดลงเมื่อไม่มีค่าต่ำสุดของข้อมูล

G_H ร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ลดลงเมื่อไม่มีค่าสูงสุดของข้อมูล

เปรียบเทียบค่า G_L , G_H ที่คำนวณได้กับค่าวิกฤตในตาราง Grubbs' test ที่จำนวน L ข้อมูล ถ้าค่า G สูงกว่าค่าวิกฤตที่ $P = 2.5\%$ (2-tail) แสดงว่าค่าที่สงสัยนั้นเป็น outlier

กรณีค่าสงสัยมี 2 ค่า (double Grubbs' test)

ดำเนินการทำนองเดียวกับกรณีค่าสงสัยมีค่าเดียว โดยคำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเมื่อไม่มีค่าต่ำสุด 2 ค่าของข้อมูล (S_{2L}) เมื่อไม่มีค่าสูงสุด 2 ค่าของข้อมูล (S_{2H}) และเมื่อไม่มีค่าต่ำสุดและสูงสุดของข้อมูล (S_{HL}) คำนวณค่า G_{2L} , G_{2H} , G_{HL} ตามสูตร $G_{2L} = 100 \times [1 - (S_{2L}/S)]$; $G_{2H} = 100 \times [1 - (S_{2H}/S)]$ และ $G_{HL} = 100 \times [1 - (S_{HL}/S)]$ เปรียบเทียบค่า G ที่คำนวณได้กับค่า G จากตารางเช่นเดียวกับกรณีที่ค่าสงสัยมีค่าเดียว



ภาพที่ 1 ลำดับขั้นตอนการประเมินผลทางสถิติ⁽⁷⁾

คำนวณความเที่ยงของวิธี (precision)

ข้อมูลที่เหลือจากการตัดค่าสุดต่างออกแล้วจะนำไปคำนวณค่าทางสถิติอื่นๆ เพื่อแสดงถึง precision ของวิธี ได้แก่ ค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$), repeatability standard deviation (S_r), repeatability relative standard deviation (RSD_r), repeatability limit (r), reproducibility standard deviation (S_R), reproducibility relative standard deviation (RSD_R) และ reproducibility limit (R) โดยการคำนวณ

$$\text{Repeatability standard deviation; } S_r = (\sum d_i^2 / 2L)^{(1/2)}$$

เมื่อ d_i = ความต่างของผลวิเคราะห์ของคู่ตัวอย่างเดียวกัน

L = จำนวนห้องปฏิบัติการ (หรือจำนวนคู่ของตัวอย่างเดียวกัน)

$$\text{Repeatability relative standard deviation ; } \%RSD_r = \frac{(S_r \times 100)}{\text{mean}}$$

$$\text{Repeatability limit; } R = 2.8 S_r$$

$$\text{Reproducibility standard deviation; } S_R = \{(S_d^2 + S_r^2) / 2\}^{1/2}$$

$$\text{เมื่อ } S_d^2 = \frac{\sum (T_i - T)^2}{2(L - 1)}$$

T_i = ผลรวมค่าของคู่ของตัวอย่าง i ของแต่ละห้องปฏิบัติการ

T = ค่าเฉลี่ยของค่า T_i ของทุกห้องปฏิบัติการ

L = จำนวนห้องปฏิบัติการ (หรือจำนวนคู่ของตัวอย่างเดียวกัน)

$$\text{Reproducibility relative standard deviation; } \%RSD_R = \frac{(S_R \times 100)}{\text{mean}}$$

$$\text{Reproducibility limit, } R = 2.8 S_R$$

การทดสอบความแม่นยำของวิธี (Accuracy)

คำนวณค่าร้อยละการคืนกลับของไนโตรเจน (% recovery) จากการวิเคราะห์สารมาตรฐานในการทดสอบประสิทธิภาพการย่อย (digestion efficiency) ทดสอบการสูญเสียไนโตรเจน (nitrogen loss) และทดสอบประสิทธิภาพการกลั่นและการไตเตรต (distillation/titration efficiency)

ผล

การทดสอบความถูกต้องของวิธีโดยห้องปฏิบัติการของสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร

การทดสอบความเที่ยง

จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ปรุงรสที่ได้จากการย่อยโปรตีนของถั่วเหลือง จำนวน 5 ตัวอย่าง ได้ค่าเฉลี่ยปริมาณโปรตีน 10.44, 11.70, 5.98, 8.28 และ 1.86 กรัม ต่อ 100 กรัม %RSD 1.34, 0.26, 0.50, 0.85 และ 2.15 ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 การทดสอบวิธีวิเคราะห์โดยห้องปฏิบัติการเดียว : ความเที่ยงของวิธีโดยการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในตัวอย่างซอสปรุงรส

ลำดับที่	ปริมาณโปรตีน (กรัม/100 กรัม)				
	ตัวอย่างที่ 1	ตัวอย่างที่ 2	ตัวอย่างที่ 3	ตัวอย่างที่ 4	ตัวอย่างที่ 5
1	10.27	11.65	5.94	8.18	1.80
2	10.27	11.66	5.94	8.20	1.80
3	10.38	11.70	5.95	8.26	1.88
4	10.46	11.71	5.99	8.29	1.89
5	10.53	11.71	6.00	8.30	1.89
6	10.54	11.72	6.01	8.32	1.89
7	10.62	11.73	6.02	8.39	1.89
mean	10.44	11.70	5.98	8.28	1.86
SD	0.14	0.03	0.03	0.07	0.04
RSD (%)	1.34	0.26	0.50	0.85	2.15

การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy)

ผลการทดสอบความแม่นยำของวิธีโดยการทดสอบประสิทธิภาพการย่อย ทดสอบการสูญเสียไนโตรเจน และทดสอบประสิทธิภาพการกลั่นและการไตเตรต พบว่าค่าเฉลี่ยร้อยละการคืนกลับของไนโตรเจน (% mean recovery) มีค่า 98.65, 99.91 และ 99.96 ค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เท่ากับ 0.45, 0.22 และ 0.21ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 การทดสอบวิธีวิเคราะห์โดยห้องปฏิบัติการเดียว : ความแม่นยำของวิธีโดยการทดสอบร้อยละการคืนกลับของไนโตรเจน

ลำดับที่	ร้อยละการคืนกลับของไนโตรเจน		
	ประสิทธิภาพการย่อย	การสูญเสียไนโตรเจน	ประสิทธิภาพการกลั่นและการไตเตรต
1	98.32	99.57	99.82
2	98.32	99.79	99.82
3	98.32	99.82	99.82
4	98.32	99.82	99.82
5	98.89	100.04	99.96
6	98.89	100.12	100.12
7	99.46	100.21	100.37
Mean	98.65	99.91	99.96
SD	0.45	0.22	0.21
RSD (%)	0.45	0.22	0.21

การทดสอบความถูกต้องของวิธีโดยห้องปฏิบัติการที่มีความเชี่ยวชาญ (collaborative study)

ทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneity testing)

จากการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของทั้ง 5 ตัวอย่าง โดยใช้ one-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P=0.05$) พบว่าทุกตัวอย่าง มีค่า F น้อยกว่าค่าของ F-critical แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างมีความเป็นเนื้อเดียวกันเพียงพอที่จะใช้ประเมินผลทดสอบวิธีวิเคราะห์ในครั้งนี

การทดสอบความคงตัว (Stability test)

ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ปรุงรส ที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีน 5-7 และ 11-12 กรัม ต่อ 100 กรัม ตัวอย่างละ 5 ขวด ขวดละ 2 ขั้ว เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับผลวิเคราะห์จากการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่าง ด้วยสถิติ t-test พบว่า ค่า t น้อยกว่า t-critical แสดงว่าตัวอย่างมีความคงตัวตลอดช่วงเวลาที่ดำเนินโครงการ

การตรวจสอบเบื้องต้น

จากการตรวจสอบข้อมูลผลวิเคราะห์และรายละเอียดของวิธีการตรวจวิเคราะห์เบื้องต้นจากข้อมูลในแบบรายงานผลและแบบสอบถามรายละเอียดเกี่ยวกับการตรวจวิเคราะห์ของแต่ละห้องปฏิบัติการ ไม่พบข้อมูลที่คิดว่าเป็นการรายงานผิด คำวนผิด หรือรายงานหน่วยผิด แต่พบว่าห้องปฏิบัติการบางแห่งไม่ปฏิบัติตามวิธีวิเคราะห์ที่กำหนด เช่น ในขั้นตอนการดักจับแอมโมเนียที่ได้จากการกลั่น ห้องปฏิบัติการที่ 3 ใช้กรดซัลฟิวริก ห้องปฏิบัติการที่ 12 และ 14 ใช้กรดบอริกเข้มข้นร้อยละ 2 และ 1.5 ตามลำดับ แทนการใช้กรดบอริกเข้มข้นร้อยละ 4 ตามที่กำหนด ในวิธีวิเคราะห์ ดังนั้นผลวิเคราะห์จากห้องปฏิบัติการทั้ง 3 แห่ง จึงไม่ถูกนำมาประมวลผลทางสถิติ ผลการวิเคราะห์ของทุกห้องปฏิบัติการ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในผลิตภัณฑ์ปรุงรสที่ได้จากการย่อยโปรตีนของถั่วเหลืองของแต่ละห้องปฏิบัติการ (กรัมต่อ 100 กรัม)

lab code	Sample 1		Sample 2		Sample 3		Sample 4		Sample 5	
	A	N	B	Q	C	S	F	X	M	Z
1	10.23	10.25	11.57	11.79	5.81	5.95	8.70	8.82	1.81	1.76
2	10.38	10.44	11.56	11.83	5.97	6.02	8.94	8.96	1.92	1.89
3*	10.12	10.18	11.40	11.52	5.85	5.87	8.54	8.88	1.67	1.64
4	10.45	10.38	11.89	11.86	6.06	6.04	9.12	8.98	1.96	1.88
5	10.32	10.26	11.78	11.80	5.99	5.94	8.96	8.90	1.86	1.85
6	9.97	10.31	11.82©	10.82©	5.94	5.86	8.86	8.92	1.74	1.79
7	9.98	10.00	11.48	11.40	5.92	5.95	8.59	8.58	1.76	1.73
8	10.28	10.77	11.78	11.83	5.95	5.95	8.90	8.92	NR	NR
9	10.20	10.25	11.76	11.69	5.74	5.86	8.82	8.89	1.71	1.76
10	10.53	10.06	11.91	11.92	6.01©	5.42©	8.77	8.80	1.85	1.82
11	9.95	9.94	11.69	11.72	5.89	5.78	8.74	8.81	1.88	1.86
12*	10.47	10.30	11.68	11.44	6.04	5.89	9.12	8.81	1.71	1.92
13	10.32	10.35	11.97	12.00	5.87	5.81	8.85	8.90	1.84	1.79
14*	10.50	10.33	11.98	11.75	5.93	5.89	9.03	8.83	1.64	2.04

© = outlier-within lab variation using Cochran's test ($P= 2.5\%$; 1- tail)

NR ห้องปฏิบัติการไม่ได้ส่งผล

*lab No 3, 12 และ 14 ข้อมูลไม่ถูกนำมาคำนวณทางสถิติ

ทดสอบค่าสุดต่าง (outliers test)

จากการทดสอบพบว่า มี 2 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างที่ 2 และ 3 มีค่าสุดต่างเมื่อใช้สถิติ Cochran's ตัวอย่างละ 1 ห้องปฏิบัติการ เมื่อตัดค่าสุดต่างออกแล้ว นำข้อมูลที่เหลือไปหาค่าสุดต่างระหว่างห้องปฏิบัติการ โดยใช้ Grubbs' test ไม่พบค่าสุดต่างระหว่างห้องปฏิบัติการในทุกตัวอย่าง คิดเป็นจำนวนห้องปฏิบัติการที่เป็น outliers ร้อยละ 9 ในตัวอย่างที่ 2 และ 3 (ตารางที่ 4 และตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 จำนวนห้องปฏิบัติการที่มีค่าสุดต่าง

	จำนวนห้องปฏิบัติการ		
	ทั้งหมด	Cochran's test outlier	Grubbs' test outlier
sample 1 (A, N)	11	0	0
sample 2 (B, Q)	11	1 (9%)	0
sample 3 (C, S)	11	1 (9%)	0
sample 4 (F, X)	11	0	0
sample 5 (M, Z)	10	0	0

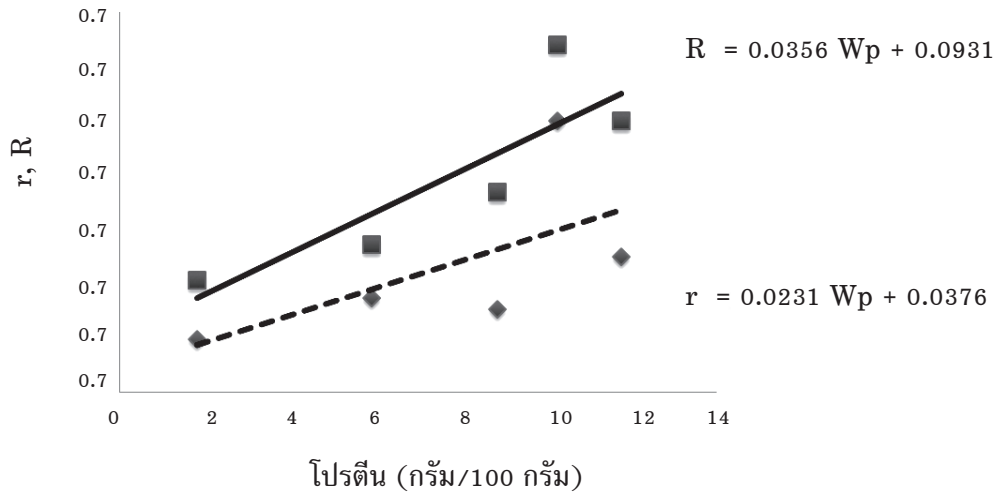
ความเที่ยงของวิธี (precision testing)

จากการคำนวณค่าความเที่ยงของวิธีพบว่า repeatability standard deviation (S_r), repeatability relative standard deviation ($\%RSD_r$) และ repeatability limit (r) เฉลี่ย 0.08 (0.03-0.16), 1.11 (0.57-1.72) และ 0.22 (0.09-0.46) ตามลำดับ ค่า reproducibility standard deviation (S_R), reproducibility relative standard deviation (RSD_R , %) และ reproducibility limit (R) เฉลี่ย 0.13 (0.07-0.21), 2.03 (1.39-3.78) และ 0.37 (0.19-0.59) ตามลำดับ (ตารางที่ 6) ค่า precision ของวิธีที่แสดงด้วย $\%RSD_r$ และ $\%RSD_R$ ทุกตัวอย่างมีค่า RSD_r น้อยกว่า RSD_R คิดเป็นอัตราส่วนของ RSD_r/RSD_R เฉลี่ย 0.55 (0.40-0.78)

ตารางที่ 6 คุณลักษณะเฉพาะของวิธีวิเคราะห์โปรตีนในซอสปรุงรส

	Sample 1 A, N	Sample 2 B, Q	Sample 3 C, S	Sample 4 F, X	Sample 5 M, Z
Laboratories remaining after eliminating outliers (outlier)	11(0)	10(1)	10(1)	11(0)	10(0)
Mean value, g/100g	10.26	11.76	5.93	8.85	1.82
Repeatability standard deviation, S_r , g/100g	0.16	0.08	0.06	0.05	0.03
Repeatability relative standard deviation, RSD_r , %	1.60	0.71	0.94	0.57	1.72
Repeatability limit, r (= $2.8 S_r$), g/100g	0.46	0.23	0.16	0.14	0.09
Reproducibility standard deviation, S_R , g/100g	0.21	0.16	0.09	0.13	0.07
Reproducibility relative standard deviation, RSD_R , %	2.06	1.39	1.49	1.44	3.78
Reproducibility limit, R (= $2.8 S_R$), g/100g	0.59	0.46	0.25	0.36	0.19

ความสัมพันธ์ระหว่างค่า repeatability limit (r) และ reproducibility limit (R) กับความเข้มข้นของปริมาณโปรตีนในตัวอย่างได้กราฟแสดงความสัมพันธ์ $r = 0.0231Wp + 0.0376$; $R = 0.0356Wp + 0.0931$ เมื่อ Wp คือปริมาณโปรตีน (กรัม ต่อ 100 กรัม) (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง r, R และปริมาณโปรตีน

ร้อยละการคืนกลับของไนโตรเจน (Nitrogen recovery verification)

การประเมินผลการทดสอบร้อยละการคืนกลับของไนโตรเจนจะใช้เฉพาะข้อมูลของห้องปฏิบัติการที่ใช้คำนวณทางสถิติเพื่อศึกษาคุณลักษณะเฉพาะของวิธี ดังนั้นข้อมูลของห้องปฏิบัติการ 3, 12 และ 14 จะไม่ถูกนำมาประมวลผล นอกจากนี้ห้องปฏิบัติการ 10 รายงานผลเป็นค่าต่ำสุดและสูงสุดในทุกรายการทดสอบ ห้องปฏิบัติการ 8 ใช้ lysine hydrochloride ในการทดสอบประสิทธิภาพของการย่อย ในขณะที่ห้องปฏิบัติการอื่นใช้ tryptophan ดังนั้นข้อมูลในทุกรายการทดสอบจากห้องปฏิบัติการ 10 และข้อมูลการทดสอบประสิทธิภาพของการย่อยของห้องปฏิบัติการที่ 8 ไม่ถูกนำมาประมวลผลเช่นกัน ผลการทดสอบร้อยละการคืนกลับของไนโตรเจนจากการทดสอบประสิทธิภาพการย่อย การทดสอบการสูญเสียไนโตรเจนและการทดสอบประสิทธิภาพการกลั่นและการไทเตรตเฉลี่ย 99.38, 99.57 และ 99.53 ค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% relative standard deviation) 1.04, 0.54 และ 0.87 ตามลำดับ (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบร้อยละการคืนกลับของไนโตรเจน

lab code	ร้อยละการคืนกลับของไนโตรเจน		
	ประสิทธิภาพการย่อย	การสูญเสียไนโตรเจน	ประสิทธิภาพการกลั่นและการไต่เตรต
1	99.83	99.28	99.93
2	97.80	99.70	99.70
3*	NR	NR	99.06
4	100.04	100.41	100.15
5	100.81	99.71	98.72
6	98.80	99.10	97.50
7	98.60	99.20	99.48
8	88.03*	99.70	100.07
9	99.04	99.06	99.29
10*	99.08-100.99	99.28-100.76	99.97-101.88
11	98.50	99.02	99.94
12*	99.29	100.11	100.08
13	101.01	100.50	100.50
14*	101.37	NR	99.47
Mean	99.38	99.57	99.53
RSD (%)	1.04	0.54	0.87

* ข้อมูลไม่ถูกนำมาคำนวณ

วิจารณ์

การทำ collaborative study จัดเป็น multi-laboratory method validation เป็นการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่สมบูรณ์และน่าเชื่อถือที่สุดซึ่งต้องมีการดำเนินการตามขั้นตอน (protocol) ที่นานาชาติยอมรับ ทำให้วิธีวิเคราะห์ที่ผ่านการทำ collaborative study มีความน่าเชื่อถือและเป็นที่ยอมรับในระดับนานาชาติ⁽⁸⁾ ดังจะเห็นได้จากในปี พ.ศ. 2550 สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้กำหนดวิธีวิเคราะห์ปริมาณของแข็งทั้งหมดและไขมันในกะทิสำเร็จรูป เพื่อสนับสนุนการกำหนดมาตรฐานอาหารระหว่างประเทศของ Codex (Codex Stan 240, 2003) และได้ทดสอบความถูกต้องของวิธีที่กำหนดโดยห้องปฏิบัติการเดี่ยวที่ห้องปฏิบัติการของสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร และทำ collaborative study จนได้คุณลักษณะเฉพาะของวิธีเสนอต่อคณะกรรมการอาหารระหว่างประเทศ สาขาวิธีวิเคราะห์และชักตัวอย่างในการประชุม Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling ที่ประเทศยังการี ระหว่างวันที่ 9-13 มีนาคม 2552 ที่ประชุมได้รับรองให้ทั้งสองวิธีเป็นวิธีมาตรฐาน type I (empirical method) ในการวิเคราะห์กะทิสำเร็จรูปและผลิตภัณฑ์ตามมาตรฐานดังกล่าว นับเป็นความสำเร็จและความภาคภูมิใจของประเทศไทยในการเสนอวิธีวิเคราะห์สู่เวทีโลก

วิธีวิเคราะห์โปรตีนโดย Kjeldahl method ได้มีการพัฒนามาเป็นลำดับ ตั้งแต่การใช้ Kjeldahl flask และเตาย่อยแบบดั้งเดิม (traditional digestion) มาเป็นการใช้หลอดย่อย และย่อยในเตาหลุม (block digestion)

ซึ่งเป็นที่ยอมรับมากในปัจจุบัน เนื่องจากง่ายและสะดวกในการปฏิบัติงาน อีกทั้งเป็นวิธีที่ห้องปฏิบัติการหลายแห่งในประเทศเลือกใช้และได้รับการรับรองมาตรฐาน ISO/IEC 17025 : 2005 จึงได้คัดเลือกให้เป็นวิธีที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

ห้องปฏิบัติการที่ 1,8 และ 10 พบว่า ตัวอย่างแห้งหลังการย่อย แสดงว่ามีการสูญเสียกรดในระหว่างการย่อย ซึ่งอาจจะมีสาเหตุมาจากอัตราการดูดความชื้นเกินไป แต่อย่างไรก็ตามห้องปฏิบัติการที่ 1 แก้ไขโดยเพิ่มปริมาณกรดที่ใช้ย่อย และปรับลดอุณหภูมิที่ใช้ในการย่อย ห้องปฏิบัติการที่ 10 แก้ไขโดยเติมน้ำลงในหลอดย่อย ผลการวิเคราะห์ทั้งสองห้องปฏิบัติการอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ จึงเห็นได้ว่าขั้นตอนการย่อยนั้นปริมาณกรดที่ใช้ อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการย่อย และอัตราการดูดความชื้นกรดต้องสัมพันธ์กันที่จะทำให้ได้ของเหลวที่ใส ไม่แห้งแข็ง และเมื่อหลอดย่อยเย็นลงแล้วให้เติมน้ำลงไปและทำการกลั่นทันที ถ้าไม่สามารถกลั่นได้ทันทีหรือต้องทิ้งไว้ค้างคืนให้เติมน้ำลงในหลอดย่อยเมื่อหลอดย่อยเย็นลงแล้วเช่นกัน

ตัวอย่างที่เตรียมได้นั้นเมื่อนำมาทดสอบโดยสถิติ one-way ANOVA พบว่าทุกตัวอย่างมีความเป็นเนื้อเดียวกันและมีความคงตัวตลอดระยะเวลาที่ทำกิจกรรม จึงเหมาะสมที่จะใช้ในกิจกรรมนี้

การศึกษาครั้งนี้ไม่พบห้องปฏิบัติการที่มีผลการทดสอบเป็น outlier เมื่อใช้สถิติ Grubbs' test แต่พบว่ามีผลการทดสอบเป็น outlier เมื่อใช้สถิติ Cochran's test คิดเป็นร้อยละ 9 ในตัวอย่างที่ 2 และ 3 ซึ่งไม่เกินเกณฑ์ที่กำหนดคือ ร้อยละ 22 แสดงว่าห้องปฏิบัติการสามารถนำวิธีนี้ไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในผลิตภัณฑ์ปรุงรสฯ ได้โดยไม่จำกัดทั้งเวลาและสถานที่ ห้องปฏิบัติการที่มีผลการวิเคราะห์เป็น outlier อาจเกิดข้อผิดพลาดในขั้นตอนการย่อย เช่น อุณหภูมิของแต่ละหลุมย่อยไม่สม่ำเสมอทำให้การย่อยในหลอดย่อยบางหลอดไม่สมบูรณ์ หรือเกิดการรั่วในขั้นตอนการกลั่น ความเที่ยงของวิธีเมื่อแสดงด้วยอัตราส่วนของ RSD_F/RSD_R มีค่าเฉลี่ย 0.55 (0.40-0.78) เป็นค่าที่สอดคล้องกับวิธีมาตรฐานอื่นๆ เช่น การวิเคราะห์โปรตีนในนมโคมีค่า 0.76⁽³⁾

จากสมการแสดงความสัมพันธ์ $r = 0.0231W_p + 0.0376$ เมื่อ W_p คือปริมาณโปรตีน (กรัม ต่อ 100 กรัม) ห้องปฏิบัติการควรนำค่า r ไปกำหนดเป็นเกณฑ์ในการควบคุมคุณภาพผลวิเคราะห์ของการทำ 2 ขั้ว ให้ต่างกันได้ไม่เกินค่า r ที่ระดับปริมาณโปรตีน W_p ซึ่งเกณฑ์ดังกล่าวเป็นเกณฑ์ยอมรับที่เหมาะสมกับวิธีเนื่องจากได้มาจากผลการวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการหลายแห่งที่มีความเชี่ยวชาญ

การทดสอบร้อยละการคืนกลับของไนโตรเจนในการศึกษาครั้งนี้ทดสอบทั้ง 3 รายการ คือ การทดสอบประสิทธิภาพการย่อย โดยการใช้สารมาตรฐาน tryptophan ส่วนการทดสอบการสูญเสียไนโตรเจน และการทดสอบประสิทธิภาพการกลั่นและการไตเตรต ใช้สารมาตรฐานแอมโมเนียมซัลเฟต สำหรับน้ำตาลซูโครสที่เติมลงไปในการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยและการทดสอบการสูญเสียไนโตรเจนนั้นเพื่อเป็นตัวแทนของสารอินทรีย์ที่มีธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน เป็นองค์ประกอบ ผลการทดสอบทุกรายการมีค่าเฉลี่ยอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนดในมาตรฐานต่างๆ เช่น ร้อยละ 98-101⁽⁹⁾, 99-101⁽⁹⁾ ของการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยและการทดสอบประสิทธิภาพการกลั่นและการไตเตรตตามลำดับ และไม่น้อยกว่าร้อยละ 98^(3,4) และ 99^(3,4) ของการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยและการสูญเสียไนโตรเจนตามลำดับเมื่อห้องปฏิบัติการนำวิธีนี้ไปใช้อาจจะกำหนดให้มีการทดสอบร้อยละการคืนกลับของไนโตรเจนเพียง 2 อย่าง คือ การทดสอบประสิทธิภาพการย่อย และทดสอบการสูญเสียไนโตรเจน^(3,4) โดยค่าที่ได้ควรอยู่ระหว่างร้อยละ 98-101 และ 99-101 ตามลำดับ ถ้าค่าที่ได้ต่ำกว่าเกณฑ์ให้เพิ่มการทดสอบประสิทธิภาพการกลั่นและการไตเตรต ถ้าการทดสอบนี้ได้ค่าตามเกณฑ์คือร้อยละ 99-101⁽⁹⁾ แสดงว่ามีการสูญเสียไนโตรเจนระหว่างการย่อย ซึ่งอาจจะมีสาเหตุมาจากอุณหภูมิ หรือเวลาที่ใช้ย่อยไม่เหมาะสม หรือการย่อยยังไม่สมบูรณ์ แต่อย่างไรก็ตามการทดสอบที่ได้ค่าร้อยละการคืนกลับต่ำหรือสูงกว่าเกณฑ์ อาจมีสาเหตุมาจากค่าความเข้มข้นของกรดที่ใช้ในการไตเตรตไม่ถูกต้อง

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อให้ได้วิธีที่จะใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ปรุงรสที่ได้จากการย่อยโปรตีนของถั่วเหลืองตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข แต่ห้องปฏิบัติการสามารถนำวิธีนี้ไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในผลิตภัณฑ์ปรุงรสที่ได้จากการย่อยโปรตีนจากพืชตามมาตรฐานอุตสาหกรรม (มอก.) ของกระทรวงอุตสาหกรรมได้ โดย มอก.กำหนดปริมาณโปรตีนไม่ต่ำกว่า 12 กรัมต่อ 100 กรัม⁽¹⁰⁾

สรุป

การประเมินความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์โดยการทำ collaborative study ในครั้งนี้ ทำให้ได้วิธีวิเคราะห์โปรตีนโดย Kjeldahl method ใช้ block digestion/ steam distillation มี K_2SO_4 ช่วยเพิ่มจุดเดือดของกรดซัลฟูริก ทองแดงเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ใช้กรดบอริกเข้มข้นร้อยละ 4 เป็นตัวจับแอมโมเนียที่กลั่นได้ และไตเตรตกับสารมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริก เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในผลิตภัณฑ์ปรุงรสที่ได้จากการย่อยโปรตีนของถั่วเหลืองตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ซึ่งจะได้เสนอให้สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข พิจารณารับและประกาศใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ชนิดนี้ ถือเป็นมาตรการหนึ่งในการลดข้อโต้แย้งถึงผลการวิเคราะห์ที่แตกต่างกันเมื่อใช้วิธีทดสอบที่ต่างกัน และเป็นแนวทางหนึ่งในการคุ้มครองผู้บริโภค

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการทั้งภาครัฐและเอกชนที่ให้ความร่วมมือในการเข้าร่วมการประเมินความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์โปรตีนในผลิตภัณฑ์ปรุงรสฯ ดังรายชื่อต่อไปนี้ บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด และสาขาสงขลา บริษัท เอสจีเอส (ประเทศไทย) จำกัด บริษัท เอแอลเอส แลบบอราทอรี กรุ๊ป (ประเทศไทย) จำกัด บริษัท แอนาไลติกอล แลบบอราทอรีส์ เซอร์วิส จำกัด ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ เชียงใหม่ สุราษฎร์ธานี สงขลา ขอนแก่น นครราชสีมา บริษัท ศูนย์ห้องปฏิบัติการและวิจัยทางการแพทย์และการเกษตรแห่งเอเชีย จำกัด สถาบันอาหาร และสถาบันโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล

เอกสารอ้างอิง

1. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ผลิตภัณฑ์ปรุงรสที่ได้จากการย่อยโปรตีนของถั่วเหลือง. ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 127, ตอนพิเศษ 74 ง. (ลงวันที่ 14 มิถุนายน 2553).
2. Kirk RS, Sawyer R, editors. Pearson's composition and analysis of foods. 9th ed. Singapore: Longman Singapore Publishers; 1991. p. 20-22.
3. Bradley RL, chapter editor. Chapter 33. Dairy products: nitrogen (total) in milk, Kjeldahl method. In: Latimer GW, editor. Official methods of analysis of AOAC international. 19th ed. Gaithersburg, MD: AOAC International; 2012. p.10-12.
4. ISO 8968-1/IDF 20-1: 2014. Milk and milk products - determination of nitrogen content-Part 1: Kjeldahl principle and crude protein calculation 2nd ed. Geneva: ISO/IDF; 2014.'
5. ICC No.105/2. Determination of crude protein in cereals and cereal products for food and for feed. Vienna: International Association for Cereal Science and Technology; 1994.
6. DIN EN 12135 (1997-12). Fruit and vegetable juices - determination of nitrogen content by the Kjeldahl method. Sydney: Deutsch Industrial Norms; 1997.

7. Latimer GW, editor. Official methods of analysis of AOAC international. Appendix D: Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis. 19th ed. Gaithersburg, MD: AOAC International; 2012. p. 1-11.
 8. ทิพวรรณ นิ่งน้อย. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2549. หน้า 10.
 9. ISO 1871: 2009. Food and feed products -- general guidelines for the determination of nitrogen by Kjeldahl method. 2nd ed. Geneva: International Organization for Standardization (ISO); 2009.
 10. สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม มอก. 8-2549 มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม น้ำซอสปรุงรส. ราชกิจจานุเบกษา ฉบับประกาศและงานทั่วไป เล่มที่ 123, ตอนที่ 68 ง. (ลงวันที่ 20 กรกฎาคม 2549).
-

Collaborative Study for Determination of Protein in Seasoning Soy Sauce

Niphaporn Lakshanasomya and Jintana Kitcharoenwong

Bureau of Quality and Safety of Food, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road Nonthaburi 11000, Thailand.

ABSTRACT Protein content is a key requirement for the quality of seasoning soy sauce according to the notification of the Ministry of Public Health. There are various methods available for protein determination in food but no specific method for seasoning soy sauce exists. Since method for protein determination is an empirical method which gives the result that is method-dependent, different method may give different result. This can lead to the disputes among users of the analytical data. It is obvious that a standardized method is needed especially when the result is to be used in law enforcement. The aims of this study is to validate the selected method for protein in seasoning soy sauces using collaborative trial in order to ensure inter-laboratory reproducibility and to characterize the performance of the method that can be used as acceptance criteria when laboratories apply this method in routine work. In this study, Kjeldahl method using block digestion with a copper catalyst followed by steam distillation and titration was validated by single laboratory prior to the collaborative study. The collaborative study involved a series of experiments in 14 selected competent laboratories. Five blind duplicate samples of seasoning soy sauces and sweetening seasoning soy sauces with protein content varied from 1.8 g/100g to 12 g/100g were used. The analytical data were statistical analyzed using Cochran's test, Grubbs' test and ANOVA. The results showed as follows: repeatability standard deviation (S_r), repeatability relative standard deviation ($RSD_r, \%$) and repeatability limit (r) ranged from 0.03–0.16, 0.57–1.72 and 0.09–0.46 respectively. Reproducibility standard deviation (S_R), reproducibility relative standard deviation ($RSD_R, \%$) and reproducibility limit (R) ranged from 0.07–0.21, 1.39–3.78 and 0.19–0.59 respectively. It can be concluded that this method is reproducible and appropriate for the determination of protein in seasoning soy sauces. This method will be proposed for adoption as the standard method attached to the related food standards in the Notification of the Ministry of Public Health.

Key words: collaborative study, Protein determination, Kjeldahl method, seasoning soy sauce