

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารฟอร์มาซาน (Formazan) ในนํ้านมดิบ ที่มีการปลอมปนนมผง ด้วยเทคนิค Spectroscopy

นิพัทธา พรหมอินทร์ รมิดา เหลืองประเสริฐ เนาวรัตน์ กำภูศิริ

บทคัดย่อ

การวิเคราะห์ปริมาณ Deoxyketones ด้วยวิธีอ้างอิงจาก Nestle Laboratory Instruction (2001) ถูกนำมาประยุกต์ใช้เพื่อตรวจสอบการปลอมปนนมผงในนํ้านมดิบ ซึ่งวิธีดังกล่าวสามารถรายงานผลการทดสอบในเชิงคุณภาพเท่านั้น จากการศึกษาพบว่า การปลอมปนนมผงมีอิทธิพลต่อการเพิ่มขึ้นของค่าองค์ประกอบในนํ้านมดิบ โดยที่ความเข้มข้นสูงสุด 5% SMP แสดงค่า โปรตีน แล็คโตส ของแข็งไม่รวมไขมัน และของแข็งทั้งหมด คือ 4.63%, 7.15%, 13.02% และ 16.40% ตามลำดับ เพื่อให้สามารถรายงานการปลอมปนนมผงในนํ้านมดิบในเชิงปริมาณได้ จึงมีการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์สาร Formazan ในนํ้านมดิบที่มีการปลอมปนนมผง ด้วยเทคนิค Spectroscopy และตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีตามคุณลักษณะเฉพาะที่แสดงคุณสมบัติของวิธีทดสอบ ดังนี้ กราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างปริมาณ Formazan และการปลอมปนนมผงที่ 0-5% SMP แสดงค่า $R^2 = 0.9984$ และการตรวจสอบความเที่ยงและความแม่นยำของวิธีทดสอบที่การปลอมปนนมผง 1% 3% และ 5% SMP พบว่า ค่า HORRAT ที่คำนวณจาก Abs มีค่า 1.48, 0.95 และ 1.66 ตามลำดับ ซึ่งผ่านเกณฑ์การยอมรับ ในขณะที่ค่า %Recovery มีค่า 90.25%, 85.00% และ 76.24% ตามลำดับ ซึ่งไม่ผ่านเกณฑ์การยอมรับ จากผลการทดลองสรุปว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ เป็นวิธีที่มีความเที่ยงในการหาปริมาณ Formazan แต่ยังขาดความน่าเชื่อถือในเรื่องของความแม่นยำของวิธีการทดสอบ อย่างไรก็ตาม วิธีดังกล่าวสามารถรายงานผลการปลอมปนนมผงในนํ้านมดิบในเชิงปริมาณแบบเบื้องต้นได้ โดยระบุหน่วยในรูปแบบร้อยละ (%) ของปริมาณนมผงที่ปลอมปนในนํ้านมดิบ

คำสำคัญ: Deoxyketones, Formazan, Spectroscopy นมผง นํ้านมดิบ

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นม สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

Method validation for determination of formazan in raw milk adulterated with milk powder by using spectroscopy technique

Nipatthra Phromma-in Ramida Luengprasert Naovarat Kamposiri

Abstract

Detection of Deoxyketones by Nestle Laboratory Instruction (2001) was applied to detect adulteration of milk powder in raw milk. This method can only report qualitative test results. We found that adulteration of skimmed milk powder (SMP) influenced the increase in the composition of milk, where the highest concentration of 5% SMP showed the values of protein, lactose, solids without milk fat and total solids as 4.63%, 7.15%, 13.02% and 16.40%, respectively. The method for determination of Formazan in raw milk added of SMP by using spectroscopy technique was developed and validated. The correlation between Formazan and raw milk added with 0-5% SMP was showed $R^2 = 0.9984$. Therefore, the linearity in this study was reliable and the examination of the precision and accuracy of the test method at 1, 3 and 5% SMP of adulteration found that the HORRAT values calculated from Abs were 1.48, 0.95 and 1.66, respectively. Meanwhile the %Recovery values were 90.25%, 85.00%, and 76.24%, respectively. The results can conclude that this method was shown precision of Formazan determination but the accuracy was not reliable. However, this method can quantitatively report the results by using percentage (%) as a unit for report the amount of powdered milk that is adulterated in raw milk.

Keywords: Deoxyketones, Formazan, Spectroscopy, Skim milk powder, Raw milk

Milk and milk products Quality Control Division, Bureau of Quality Control of Livestock Products, Department of Livestock Development

บทนำ

น้ำนม เป็นของเหลวที่กลั่นออกมาจากเต้านมของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเพื่อใช้ในการเลี้ยงลูกอ่อนของสัตว์ชนิดนั้น ซึ่งโคนม เป็นสัตว์ที่มีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนอาหารให้เป็นน้ำนมได้ดีที่สุด ปัจจุบันพันธุ์โคนมที่นิยมเลี้ยงมากที่สุดในประเทศไทย คือ พันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเซียนหรือโคนมพันธุ์ขาว-ดำ (Holstein Friesian) ซึ่งมีลักษณะเป็นโคพันธุ์ ทนต่ออากาศร้อน ความเครียดได้ดี และให้ผลผลิตน้ำนม 16,648 ปอนด์ (7,542 กก.) ต่อปี ลักษณะสีของน้ำนมจะเป็นสีขาว ไขมันในน้ำนมเฉลี่ย 3.64 เปอร์เซ็นต์ (%) (วิโรจน์, 2546)

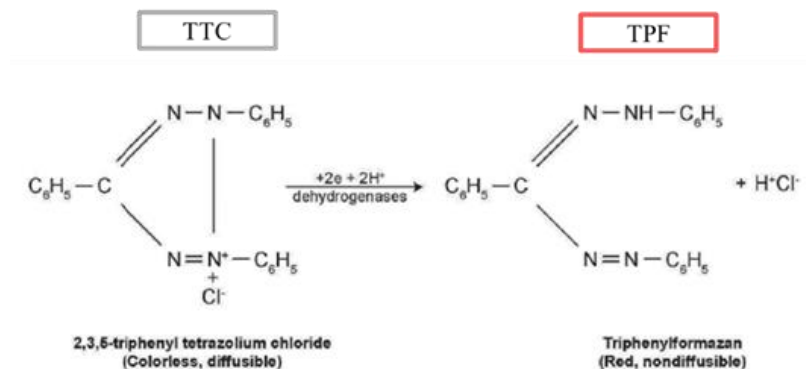
น้ำนมดิบ (raw milk) หมายถึง น้ำนมที่รีดจากแม่โคหลังจากคลอดลูกแล้วไม่น้อยกว่า 3 วัน และต้องปราศจากน้ำนมเหลือง (colostrum) โดยมิได้แยกออกหรือเติมวัตถุอื่นใด และไม่ได้ผ่านกรรมวิธีใดๆ ยกเว้นการทำให้เย็น อย่างไรก็ตาม มาตรฐานสินค้าเกษตร (มกษ. 6003-2553) ได้กำหนดคุณภาพด้านองค์ประกอบของน้ำนมดิบ ดังนี้ ปริมาณโปรตีน ไม่ต่ำกว่า 3.00 % โดยน้ำหนัก ปริมาณไขมัน ไม่ต่ำกว่า 3.35 % โดยน้ำหนัก และปริมาณเนื้อมันรวมไขมันหรือของแข็งไม่รวมไขมันนม ไม่ต่ำกว่า 8.25 % โดยน้ำหนัก ซึ่งปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อองค์ประกอบของน้ำนมดิบนั้น เกิดจากทั้งปัจจัยภายในของตัวโคนมเอง เช่น สายพันธุ์ อายุ ช่วงระยะเวลาของการให้น้ำนม รวมไปถึงปัจจัยภายนอก เช่น ฤดูกาล อาหารที่ใช้เลี้ยง ช่วงเวลาในการรีดน้ำนม เป็นต้น (สุภาวดี และคณะ, 2550)

นมผง หมายความว่า ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำน้ำนมโคดิบที่ผ่านกรรมวิธีฆ่าเชื้อที่ระเหยน้ำออกด้วยกรรมวิธีต่าง ๆ จนเป็นผง และอาจมีการเติมวัตถุอื่นใดที่เป็นองค์ประกอบของนมอีกด้วยก็ได้ ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 350 แบ่งนมผงออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่

1. นมผงชนิดเต็มมันเนย (whole milk powder)
2. นมผงชนิดพร่องมันเนย (partly skim milk powder)
3. นมผงชนิดขาดมันเนย (skim milk powder)

วิธีการพื้นฐานสำหรับการผลิตนมผงในระดับอุตสาหกรรมมี 2 วิธี คือ การผลิตนมผงด้วยเครื่องทำแห้งแบบลูกกลิ้ง (roller drying) และการผลิตนมผงด้วยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray drying) (ปิยวรรณ, 2556) จะเห็นได้ว่าในกระบวนการแปรรูปน้ำนมดิบให้เป็นนมผงแต่ละประเภทนั้นมีความจำเป็นในการใช้ความร้อนเข้ามาเกี่ยวข้อง ซึ่งจะนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของน้ำนมดิบอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ ดังนั้น ไดออกซิคีโตน (Deoxyketones) ซึ่งเป็นสารประกอบหนึ่งที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Maillard reaction) เมื่อน้ำนมดิบได้รับความร้อน (จักรพันธ์, 2559) ดังนั้น Deoxyketones จึงถูกนำมาใช้ในการบ่งชี้การปลอมปนนมผงในน้ำนมดิบโดย Nestle Laboratory Instruction (2001)

เตตราโซเลียมคลอไรด์ 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) เป็นสีย้อมที่นิยมใช้ในงานวิทยาศาสตร์อย่างกว้างขวาง และหลากหลายด้าน เช่น การแพทย์ เภสัชวิทยา ภูมิคุ้มกันวิทยา และพฤกษศาสตร์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในด้านชีวเคมีและฮิสโตเคมี การทดสอบนี้ใช้หลักการเปลี่ยนสีของ TTC จากของเหลวไม่มีสี เปลี่ยนเป็นสารละลายสีแดง Triphenylformazan (TPF) หรือ Formazan เมื่อมีการรีดิวซ์โปรตอนจาก Reduction system ทำให้การเกิดสีแดงของสาร Formazan ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์ antibacterial activity โดยเปรียบเทียบความเข้มของสีแดงที่เกิดขึ้น ด้วยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 480 nm โดยเครื่อง spectrophotometer (Moussa et al., 2013)



รูปที่ 2 ปฏิกิริยา Tetrazolium/formazan เป็นการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ TTC เป็น TPF เมื่อเกิดปฏิกิริยา Reduction ในระบบ ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงจากสารละลายใส ไม่มีสี เป็นสารละลายสีแดง (de Barros et al., 2019)

เครื่องมือ อุปกรณ์สารเคมี

1. เครื่องวิเคราะห์คุณภาพนม รุ่น Milkoscan TM FT+ ยี่ห้อ FOSS
2. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงในไมโครเพลท รุ่น MR-1000S ยี่ห้อ Biometrics Technologies
3. เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน
4. เครื่องชั่งทศนิยม 3 ตำแหน่ง
5. เครื่องกวนสาร
6. เครื่องผสมสาร
7. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
8. หลอดแก้วพร้อมฝาปิด ขนาด 25 mL
9. กรวยกรองสารละลาย
10. กระจกชั่งกรอง ขนาด 150 mm
11. ซ้อนตักสาร
12. นาฬิกาจับเวลา
13. ขวดแก้วขนาด 250 – 500 mL ภาชนะสำหรับรองน้ำล้างตะกอน
14. Erlenmeyer flask ขนาด 250, 500 และ 4000 mL
15. Beaker ขนาด 50, 100 และ 500 mL
16. Volumetric flask ขนาด 100 mL
17. Micropipette ขนาด 1 และ 5 mL
18. Pipette tip ขนาด 1 และ 5 mL
19. Centrifuge tube ขนาด 15 และ 50 mL
20. 96-well microplate

สารเคมี

1. Glacial acetic acid, AR grade
2. Urea, AR grade
3. Sodium hydroxide, AR grade
4. Triphenyltetrazolium chloride (TTC), AR grade
5. น้ำกลั่น (Reverse osmosis)
6. Skimmed milk powder (SMP)
7. Isobutanol, AR grade
8. น้ำนมโคดิบ

วิธีดำเนินการ

1. การเตรียมตัวอย่างน้ำนมดิบที่มีการปลอมปนนมผง SMP ที่ความเข้มข้น 0-5%

เตรียม Stock น้ำนมดิบที่ความเข้มข้นสูงสุด 5% SMP โดยการชั่งผง SMP ปริมาณ 5g แล้วละลายด้วยน้ำนมดิบปริมาตร 95 mL ทำการผสมตัวอย่างน้ำนมดิบให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องกวนสารเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นใช้น้ำนมดิบ (0%) เป็นตัวเจือจาง เพื่อเตรียมตัวอย่างน้ำนมดิบที่ความเข้มข้นอื่นๆตามที่กำหนด คือ 1, 2, 3 และ 4% SMP ตามลำดับ

2. การวิเคราะห์หองค์ประกอบน้ำนม ในตัวอย่างน้ำนมดิบที่มีการปลอมปนนมผง 0-5% SMP

นำตัวอย่างน้ำนมดิบจากข้อ 1. มาบ่มที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 15 นาที วัดอุณหภูมิตัวอย่างให้อยู่ในช่วง 38-42 °C จากนั้นนำตัวอย่างไปวิเคราะห์หองค์ประกอบน้ำนมด้วยเครื่องวิเคราะห์คุณภาพนมรุ่น Milkoscan TM FT+ ยี่ห้อ FOSS

3. การตรวจสอบปริมาณ Formazan ในตัวอย่างน้ำนมดิบที่มีการปลอมปนนมผง 0-5% SMP

นำตัวอย่างน้ำนมดิบจากข้อ 1. มาวิเคราะห์ปริมาณ Deoxyketones ด้วยวิธีที่อ้างอิงจาก Nestle Laboratory Instruction (2001) จากนั้นสกัด Formazan ด้วยบิวทานอล แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่ความยาวคลื่น 480 nm ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงในไมโครเพลท รุ่น MR-1000S ยี่ห้อ Biometrics Technologies

4. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (Method validation)

4.1 ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (Linearity)

ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของเครื่องมือ เป็นคุณลักษณะที่แสดงความสัมพันธ์อย่างเป็นสัดส่วนโดยตรง ระหว่างสัญญาณจากเครื่องมือวัด (Signal from instrument) แกน Y และความเข้มข้นของสารในช่วงของการใช้งาน (Standard concentration) แกน X ซึ่งค่า Coefficient of Correlation (r) แสดงถึงทิศทางของความสัมพันธ์ และ ค่า Coefficient of Determination (R^2) แสดงถึงเปอร์เซ็นต์ของข้อมูลที่เข้าใกล้เส้นตรงนั้น เกณฑ์การยอมรับ คือ $R^2 > 0.995$ (ดารณี, 2566)

สร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า Absorbance (Abs) ของ Formazan จากตัวอย่างน้ำนมดิบที่มีการปลอมปนนมผง 0-5% SMP เพื่อตรวจสอบหาค่า r และ R^2

4.2 ความเที่ยงของวิธีทดสอบ (Precision)

ความเที่ยง เป็นคุณลักษณะที่แสดงความสามารถในการทำซ้ำแล้วให้ผลการทดลองใกล้เคียงกัน โดยกำหนดการทำซ้ำ 6-15 ซ้ำต่อระดับ และทำการทดสอบ อย่างน้อย 3 ระดับความเข้มข้น (ให้ครอบคลุมช่วงการใช้งาน) โดยทั่วไปการตรวจสอบความเที่ยงใช้สภาวะ (condition) ในการทดสอบ 3 สภาวะ คือ Repeatability, Intermediate precision และ Reproducibility ซึ่งในแต่ละสภาวะจะอยู่ภายใต้เงื่อนไขของการเกณฑ์ค่าการยอมรับที่แตกต่างกัน (นันทนา และนุชนาท. 2555)

ในการศึกษานี้ทำการทดสอบความเที่ยงของวิธีโดยใช้สภาวะ Repeatability โดยทำการตรวจสอบปริมาณ Formazan ในน้ำนมดิบที่มีการปลอมปนนมผงที่ 1, 3 และ 5% SMP จำนวน 15 ซ้ำต่อระดับความเข้มข้น จากนั้นนำค่า Abs ของ Formazan และปริมาณ SMP ที่วัดได้จริงจากการทดลองมาทดสอบความเที่ยงโดยใช้เกณฑ์ Horwitz's Equation และคำนวณหาค่า HORRAT โดยเกณฑ์การยอมรับค่า HORRAT ที่ได้ต้องไม่เกิน 2 (AOAC, 2019)

$$\text{HORRAT} = \frac{(\text{found}) \text{ RSD}}{(\text{predicted}) \text{ RSD}}$$

โดยที่

(found) RSD = %RSD ที่ได้จากการทดลอง

(predicted) RSD = $0.66 \times 2 \times C^{-0.15}$

C = concentration ratio (mass fraction)

4.3 ความแม่นยำของวิธีทดสอบ (Accuracy)

ความแม่นยำ เป็นคุณลักษณะที่ชี้ว่าผลการทดสอบมีค่าเข้าใกล้ค่าจริงหรือค่าอ้างอิงหรือค่าที่ยอมรับ การตรวจสอบความแม่นยำของวิธีทดสอบ ทำได้ 2 แบบ คือ การเปรียบเทียบกับค่าอ้างอิงหรือค่าที่ยอมรับ (reference value) และ การตรวจสอบค่าคืนกลับ (recovery test) (นันทนาและนุชนาท, 2555)

ในการศึกษานี้ทำการทดสอบความแม่นยำของวิธีโดยการตรวจสอบค่าคืนกลับ (recovery test) เนื่องจากเป็นวิธีที่ไม่มีสารมาตรฐาน หรือ วัสดุอ้างอิงที่สามารถนำมาใช้ในการเปรียบเทียบค่าได้โดยตรง โดยทำการตรวจสอบปริมาณ Formazan ในน้ำนมดิบที่มีการปลอมปนนมผงที่ 1% 3% และ 5% SMP จำนวน 15 ซ้ำต่อระดับความเข้มข้น และนำปริมาณ SM ที่วัดได้จริงจากการทดลองมาคำนวณค่า %Recovery

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{ปริมาณที่วัดได้} - \text{ปริมาณที่มีอยู่เดิม}}{\text{ปริมาณที่เติม}} \times 100$$

เกณฑ์การยอมรับ %Recovery ของ CODEX (2013)

Concentration	Unit	Recovery (%)
100	100% (100g/100g)	98-102
≥ 10	≥ 10% (10g/100g)	98-102
≥ 1	≥ 1% (1g/100g)	97-103
≥ 0.1	≥ 0.1% (1mg/g)	95-105
0.01	100 mg/kg	90-107
0.001	10 mg/kg	80-110
0.0001	1 mg/kg	80-110
0.00001	100 µg/kg	80-110
0.000001	10 µg/kg	60-115
0.0000001	1 µg/kg	40-120

ผลการทดลอง

1. การวิเคราะห์องค์ประกอบน้ำนมและตรวจสอบปริมาณ Formazan ในตัวอย่างน้ำนมดิบที่มีการปลอมปนนมผง 0-5% SMP

จากการทดลอง พบว่า องค์ประกอบน้ำนม เช่น โปรตีน (Protein) แล็กโตส (Lactose) ของแข็งไม่รวมไขมัน (Solid not fat) และของแข็งทั้งหมดในน้ำนม (Total solids) มีปริมาณเพิ่มขึ้นสอดคล้องกับความเข้มข้นของการปลอมปนนมผง SMP เมื่อเปรียบเทียบกับ ตัวอย่างควบคุม (control) คือ น้ำนมดิบตั้งต้นที่ไม่มีการเติมนมผง SMP (0%) อย่างไรก็ตาม ไม่มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณไขมัน เนื่องจากนม SMP เป็นนมผงชนิดขาดมันเนย ในขณะเดียวกันปริมาณ Formazan ที่ตรวจสอบจากค่า Abs มีการเพิ่มขึ้นสอดคล้องกับปริมาณของการปลอมปนนมผง SMP ตามลำดับเช่นกัน ดังแสดงในตารางที่ 1

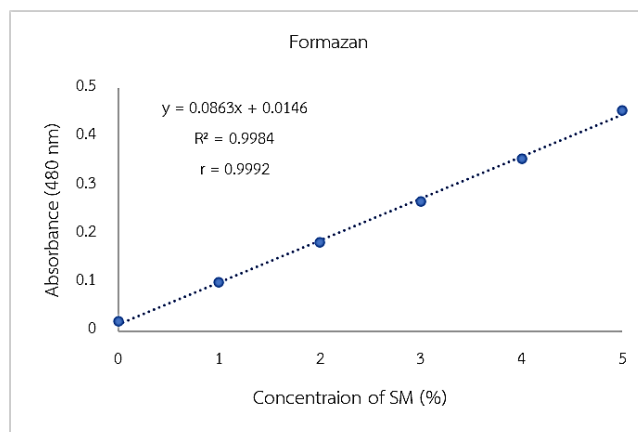
ตารางที่ 1 แสดงค่าองค์ประกอบน้ำนมและปริมาณ Formazan ในน้ำนมดิบที่มีการปลอมปนนมผง 0-5% SMP

ระดับ การปลอมปนนมผง SMP (%)	Fat (%)	Protein (%)	Lactose (%)	Solids not fat (%)	Total solids (%)	Formazan (Abs)
0	3.99	3.14	4.67	8.69	12.62	0.0210
1	3.98	3.44	5.17	9.57	13.39	0.1002
2	3.94	3.73	5.66	10.42	14.11	0.1832
3	3.94	4.04	6.15	11.30	14.90	0.2671
4	3.90	4.32	6.62	12.11	15.59	0.3549
5	3.90	4.63	7.15	13.02	16.40	0.4553

2. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (Method validation)

2.1 ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (Linearity)

กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า Abs ของ Formazan จากตัวอย่างน้ำมันดิบที่มีการปลอมปน 0-5% SMP ผลการทดลองพบว่าค่า Abs ของ Formazan เท่ากับ 0.0210, 0.1002, 0.1832, 0.2671, 0.3549 และ 0.4553 ตามลำดับ แสดงค่า $R^2 = 0.9984$ และ $r = 0.9992$ ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าวมีค่า $R^2 > 0.995$ จึงผ่านเกณฑ์การยอมรับ



กราฟที่ 1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Abs ของ Formazan และความเข้มข้นของการปลอมปนนมผง 0-5% SMP

การคำนวณปริมาณ %SMP ที่วัดได้จริง จากสมการที่ได้จาก Calibration curve คือ $y = 0.0863x + 0.0146$ และตรวจสอบความแม่นยำด้วย %Recovery โดยได้ค่าอยู่ในช่วง 91-97% ซึ่งไม่ผ่านเกณฑ์การยอมรับของ CODEX (2013) ที่ค่าการยอมรับของความเข้มข้นของสารที่เติม $\geq 1\%$ ต้องอยู่ในช่วง 97-103 ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงปริมาณ %SMP ที่วัดได้จริง และ %Recovery จาก Abs ของ Formazan

ปริมาณ SMP ที่เติม (%)	Formazan (Abs 480 nm)	ปริมาณ SMP ที่วัดได้ (%)	%Recovery
0	0.0210	0.07	-
1	0.1002	0.99	97.05
2	0.1832	1.95	92.65
3	0.2671	2.93	91.42
4	0.3549	3.94	91.90
5	0.4553	5.11	95.04

2.2 ความเที่ยงของวิธีทดสอบ (Precision)

ทำการตรวจสอบปริมาณ Formazan ในน้ำมันดิบที่มีการปลอมปนนมผงที่ 1, 3 และ 5% SMP จำนวน 15 ซ้ำต่อระดับความเข้มข้น จากผลการทดลองพบว่าค่า HORRAT ที่คำนวณจาก Abs ของทั้ง 3 ความเข้มข้นมีค่า 1.48, 0.95 และ 1.66 ตามลำดับ ซึ่งผ่านเกณฑ์การยอมรับทั้งหมด เนื่องจากมีค่า HORRAT ไม่เกิน 2 ในขณะที่ค่า HORRAT ที่คำนวณจากความเข้มข้นของ %SMP ที่วัดได้จริงของทั้ง 3 ความเข้มข้นมีค่า 2.47, 1.45 และ 2.49 ตามลำดับ ซึ่งมีเพียงค่า HORRAT ของความเข้มข้น 3%SMP เท่านั้นที่ผ่านเกณฑ์การยอมรับ

ตารางที่ 3 แสดงการทดสอบความเที่ยงของวิธีในสภาวะ Repeatability โดยใช้เกณฑ์ Horwitz's Equation

Repeatability	1% SMP		3% SMP		5% SMP	
	Abs	SMP	Abs	SMP	Abs	SMP
1	0.0969	0.95	0.2390	2.60	0.3568	3.96
2	0.0957	0.94	0.2429	2.65	0.3094	3.42
3	0.0890	0.86	0.2335	2.54	0.3639	4.05
4	0.0982	0.97	0.2320	2.52	0.3542	3.94
5	0.0958	0.94	0.2347	2.55	0.3520	3.91
6	0.0963	0.95	0.2466	2.69	0.3600	4.00
7	0.0897	0.87	0.2399	2.61	0.3188	3.53
8	0.0892	0.86	0.2455	2.68	0.3586	3.99
9	0.0866	0.83	0.2261	2.45	0.3664	4.08
10	0.0968	0.95	0.2272	2.46	0.3468	3.85
11	0.1033	1.03	0.2354	2.56	0.3240	3.59
12	0.1021	1.01	0.2468	2.69	0.3248	3.59
13	0.0880	0.85	0.2389	2.60	0.3529	3.92
14	0.0966	0.95	0.2339	2.54	0.3412	3.78
15	0.0890	0.86	0.2235	2.42	0.3498	3.88
Mean	0.0942	0.92	0.2364	2.57	0.3453	3.83
SD	0.0052	0.0608	0.0074	0.0854	0.0177	0.2055
%RSDr	5.5665	6.5873	3.1169	3.3220	5.1357	5.3625
PRSDr	5.6874	4.0391	4.9543	3.4637	4.6806	3.2622
0.66xPRDSr	3.7537	2.6658	3.2699	2.2860	3.0892	2.1531
HORRAT	1.48	2.47	0.95	1.45	1.66	2.49
เกณฑ์การยอมรับมีค่าไม่เกิน 2	ผ่าน	ไม่ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ไม่ผ่าน

2.3 ความแม่นยำของวิธีทดสอบ (Accuracy)

ทำการตรวจสอบปริมาณ Formazan ในน้ำนมดิบที่มีการปลอมปนนมผงที่ 1, 3 และ 5% SMP จำนวน 15 ซ้ำต่อระดับความเข้มข้น จากผลการทดลองพบว่าค่า %Recovery ที่คำนวณจาก %SMP ที่วัดได้จริงของทั้ง 3 ความเข้มข้นมีค่า 90.25%, 85.00% และ 76.24% ตามลำดับ ซึ่งไม่ผ่านเกณฑ์การยอมรับทั้งหมด เนื่องจาก %Recovery มีค่าเกณฑ์ยอมรับของความเข้มข้นของสารที่เติม $\geq 1\%$ ต้องอยู่ในช่วง 97-103%

ตารางที่ 4 แสดงการทดสอบแม่นยำของวิธี โดยใช้เกณฑ์ยอมรับ %Recovery ของ CODEX (2013)

Repeatability	1% SMP		3% SMP		5% SMP	
	SMP	%Recovery	SMP	%Recovery	SMP	%Recovery
1	0.95	93.33	2.60	86.02	3.96	78.90
2	0.94	91.97	2.65	87.50	3.42	67.91
3	0.86	84.21	2.54	83.90	4.05	80.54
4	0.97	94.91	2.52	83.32	3.94	78.31
5	0.94	92.13	2.55	84.36	3.91	77.79
6	0.95	92.71	2.69	88.94	4.00	79.65
7	0.87	85.02	2.61	86.34	3.53	70.11
8	0.86	84.48	2.68	88.53	3.99	79.31
9	0.83	81.47	2.45	81.01	4.08	81.14
10	0.95	93.25	2.46	81.44	3.85	76.59
11	1.03	100.74	2.56	84.63	3.59	71.30
12	1.01	99.35	2.69	89.03	3.59	71.49
13	0.85	83.01	2.60	85.97	3.92	77.99
14	0.95	93.06	2.54	84.02	3.78	75.28
15	0.86	84.17	2.42	80.01	3.88	77.27
Mean	0.92	90.25%	2.57	85.00%	3.83	76.24%
เกณฑ์การยอมรับ 97-103%	-	ไม่ผ่าน	-	ไม่ผ่าน	-	ไม่ผ่าน

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันดิบ เช่น ไซมัน โปรตีน แล็คโตส ของแข็งไม่รวมไขมัน และของแข็งทั้งหมด ถือเป็นตัวบ่งชี้สำคัญในการกำหนดคุณภาพน้ำมันที่ผลิตได้จากเกษตรกรไทยในปัจจุบัน เพื่อให้ทราบคุณภาพที่แท้จริงของน้ำมันดิบ กลุ่มตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นม จึงมีการเฝ้าระวังการปลอมปนนมผงในน้ำมันดิบของเกษตรกร เนื่องจากหากมีการปลอมปนนมผงในน้ำมันดิบเกิดขึ้น จะทำให้ไม่สามารถทราบคุณภาพที่แท้จริงของน้ำมันดิบที่เกษตรกรผลิตได้

การวิเคราะห์ปริมาณ deoxyketones ด้วยวิธีอ้างอิงจาก Nestle Laboratory Instruction (2001) ถูกนำมาประยุกต์ใช้เพื่อตรวจสอบการปลอมปนนมผงในน้ำมันดิบ ซึ่งสามารถรายงานผลเป็นเชิงคุณภาพเท่านั้น ศึกษาและพัฒนาวิธีการรายงานผลของวิธีดังกล่าวเพื่อทำให้สามารถรายงานผลการทดสอบเป็นเชิงปริมาณได้ โดยใช้วิธีการสกัด Formazan และนำไปวิเคราะห์ปริมาณด้วยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 480 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer แต่ผลการทดลองยังไม่น่าเชื่อถือ เนื่องจากความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างปริมาณ Formazan และการปลอมปนนมผง ทั้ง 0-5% และ 0-10% แสดงค่า R^2 เท่ากับ 0.9786 และ 0.9714 ตามลำดับ ซึ่งค่าดังกล่าว ยังไม่ผ่านเกณฑ์การยอมรับ

การศึกษาค้างนี้จึงจัดทำขึ้นเพื่อแสดงอิทธิพลของการปลอมปนนมผงที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าองค์ประกอบในน้ำมันดิบ จากการทดลอง พบว่า ค่าองค์ประกอบของน้ำมันดิบมีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้น สอดคล้องกับปริมาณการปลอมปนนมผง SMP ยกเว้น ค่าไขมันที่ไม่มีการเพิ่มขึ้น เนื่องจากนม SMP เป็นนมผงชนิดขาดมันเนย และจากตัวอย่างชุดเดียวกันที่นำไปวิเคราะห์ Formazan พบว่า มีปริมาณ Formazan

เพิ่มขึ้นสอดคล้องกับปริมาณการปลอมปนนมผงเช่นเดียวกัน จากการทดลองสรุปได้ว่า การปลอมปนนมผงที่ 0-5%SMP มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของทั้งองค์ประกอบน้ำนมและปริมาณ Formazan

กราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างปริมาณ Formazan และตัวอย่างน้ำนมที่มีการปลอมปนนมผงที่ 0-5% SMP แสดงสมการ $y = 0.0863x + 0.0146$, $R^2 = 0.9984$ และ $r = 0.9992$ จากผลการทดลองดังกล่าวมีค่า $R^2 > 0.995$ จึงผ่านเกณฑ์การยอมรับ จากการตรวจสอบความเที่ยงและความแม่นยำของทดสอบในน้ำนมดิบที่มีการปลอมปนนมผงที่ 1, 3 และ 5% SMP จำนวน 15 ซ้ำต่อระดับความเข้มข้น พบว่าค่า HORRAT ที่คำนวณจาก Abs มีค่า 1.48, 0.95 และ 1.66 ตามลำดับ ซึ่งผ่านเกณฑ์การยอมรับทั้งหมด เนื่องจากมีค่า HORRAT ไม่เกิน 2 ในขณะที่ค่า HORRAT ที่คำนวณจาก %SMP ที่วัดได้จริง มีค่า 2.47, 1.45 และ 2.49 ตามลำดับ ซึ่งมีเพียงค่า HORRAT ของความเข้มข้น 3% SMP เท่านั้นที่ผ่านเกณฑ์การยอมรับ และค่า %Recovery ที่คำนวณจาก %SMP ที่วัดได้จริง มีค่า 90.25%, 85.00% และ 76.24% ตามลำดับ ซึ่งไม่ผ่านเกณฑ์การยอมรับทั้งหมด เนื่องจาก %Recovery มีค่าเกณฑ์ยอมรับของความเข้มข้นของสารที่เติม $\geq 1\%$ ต้องอยู่ในช่วง 97-103% จากผลการทดลองสรุปได้ว่า วิเคราะห์สารฟอร์มาซาน (Formazan) ในน้ำนมดิบที่มีการปลอมปนนมผง ด้วยเทคนิค Spectroscopy เป็นวิธีที่มีความเที่ยงในการหาปริมาณ Formazan แต่ยังคงขาดความน่าเชื่อถือในเรื่องของความแม่นยำของวิธีการทดสอบ อย่างไรก็ตาม วิธีดังกล่าวสามารถแสดงผลการปลอมปนนมผงในน้ำนมดิบในเชิงปริมาณแบบเบื้องต้นได้ โดยระบุหน่วยการรายงานในรูปแบบร้อยละ (%) ของปริมาณนมผงที่ปลอมปนในน้ำนมดิบ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ นายสัตวแพทย์ อุดม เจือจันทร์ ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ และบุคลากรทุกท่านในกลุ่มตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นม ที่ช่วยให้การศึกษาในครั้งนี้ประสบความสำเร็จ ครบถ้วนตรงตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้

เอกสารอ้างอิง

- จักรพันธ์ ต้นสุวรรณ. (2559). คุณลักษณะทางเคมีกายภาพของน้ำตาลไอและปัจจัยการผลิตที่ส่งผลต่อคุณสมบัติทางกายภาพของผลิตภัณฑ์น้ำตาลมะพร้าว. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยศิลปากร. นครปฐม: 65 หน้า.
- ดารณี สมบูรณ์จิตต์. (2566). เอกสารประกอบการอบรมเรื่อง การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบทางเคมี วันที่ 21-22 มีนาคม 2566. ศูนย์วิทยาศาสตร์เบทาโกร.
- นันทนา กันยานุวัฒน์ และนุชนาท นาคา. (2555). แนวทางการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบทางเคมี. รายงานวิชาการ ฉบับที่ สอพ 1/2555. สำนักอุตสาหกรรมพื้นฐานกรมอุตสาหกรรมพื้นฐานและการเหมืองแร่.
- นิพัทธา พรหมอินทร์ รมิดา เหลืองประเสริฐ และ เนาวรัตน์ กำภูศิริ. (2565). การพัฒนาวิธีตรวจสอบการปลอมปนนมผงในน้ำนมดิบ ทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณ. สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์. กรมปศุสัตว์.

- ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 350). 2556. นมโค. กระทรวงสาธารณสุข.
- ปิยวรรณ ศุภวิฑิตพัฒนา. 2556. เอกสารประกอบการสอนรายวิชา เทคโนโลยีนมและผลิตภัณฑ์. มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม.
- วันดี ลือสายวงศ์ และ อังสนา ฉั่วสุวรรณ. 2567. เอกสารประกอบการอบรมเรื่อง การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีสอบทางเคมี วันที่ 11-12 มกราคม 2567. กรมวิทยาศาสตร์บริการ.
- วิโรจน์ ภัทรจินดา. 2546. พันธุ์โคนม DAIRY CATTLE. ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. หน้า 29-36.
- สุภาวดี แหยมคง ศกร คุณวุฒิฤทธิธณ Mauricio A. Elzo และ ธนาทิพย์ สุวรรณโสภี. 2550. ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อองค์ประกอบน้ำนมที่ผลิตโดยสมาชิกของศูนย์รวบรวมนมดิบเอกชนแห่งหนึ่งในเขตภาคกลางของประเทศไทย. ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. 2553. นำนมโคดิบ. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- AOAC Official Method of Analysis. 2019. Guidelines for dietary supplements and botanicals. Appendix K, P. 7.
- CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. 2013. PROCEDURAL MANUAL. Twenty-first edition.
- de Barros França-Neto, J., & Krzyzanowski, F. C. 2019. Tetrazolium: an important test for physiological seed quality evaluation¹. Journal of Seed Science, 41(3), 359-366.
- Moussa, S. H., Tayel, A. A., Al-Hassan, A. A., & Farouk, A. (2013). Tetrazolium/formazan test as an efficient method to determine fungal chitosan antimicrobial activity. Journal of Mycology, 2013.
- Nestle Laboratory Instruction. 2001. Fresh milk Detection of added milk powder. Nestle.Ltd.