

# การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ความชื้นในน้ำผึ้ง โดยวิธี Refractometer

ภัตตรา นุ่มเอี่ยม คอริเยะ เวะและ และจิราภา อุณหเลขกะ

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี 11000

**บทคัดย่อ** น้ำผึ้งเป็นของเหลวสีเหลืองถึงน้ำตาลเข้ม ชั้นหนืดมีรสหวาน โดยมีส่วนประกอบหลักของน้ำ น้ำตาล ฟรุคโทส และกลูโคส น้ำผึ้งเป็นอาหารที่กำหนดคุณภาพหรือมาตรฐาน ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 211) พ.ศ. 2543 เรื่องน้ำผึ้ง ต้องมีความชื้น ไม่เกินร้อยละ 21 ของน้ำหนักโดยเทคนิค Refractometer เป็นวิธีวัดความชื้นแบบทางอ้อม วิธีนี้ใช้สมการของ Wedmore ในการคำนวณความชื้นจากค่าการหักเหของแสงผ่านความสัมพันธ์ระหว่างความชื้นที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีอบแบบสุญญากาศและการวัดการหักเหของแสงวิธีวัดความชื้นในน้ำผึ้งด้วยเครื่องมือ refractometer ตาม AOAC (2019) 969.38 B วัดเป็นวิธีแบบ Empirical ผลการทดสอบพบความเที่ยงการทดสอบซ้ำ Repeatability ที่ระดับ ความชื้น 17 และ 20 ร้อยละของน้ำหนักมี % RSD เท่ากับ 0.63 และ 0.91 ตามลำดับ ความเที่ยงระหว่างกลาง (Intermediate precision) โดยนักวิเคราะห์ 2 คน พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น ประมาณ ร้อยละ 95 มีค่าความไม่แน่นอนขยาย  $16.6 \pm 0.4$  ( $k=2$ ) และจากการเข้าร่วมทดสอบความชำนาญ มีค่า z-score < 2 จากผลการทดสอบแสดงว่า วิธีทดสอบวิธีวิเคราะห์ความชื้นในน้ำผึ้ง โดยวิธี Refractometer มีความเหมาะสมใช้ได้จริง สามารถนำมาใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการต่อไป

**คำสำคัญ:** ความชื้น, Refractive index, Wedmore

## บทนำ

Refractometer ถูกประดิษฐ์ขึ้นมาโดย Dr. Ernst Abbe นักวิทยาศาสตร์เยอรมัน/ออสเตรีย ในต้นศตวรรษที่ 20 โดยการทำงานของ refractometer เป็นการวัดดัชนีหักเหของแสง (refractive index) เมื่อเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางหนึ่งสู่อีกตัวกลางหนึ่ง เช่น จากอากาศสู่น้ำ จากน้ำสู่คริสตัล ทำให้มุมความเร็ว (velocity,  $v$ ) ของแสงแตกต่างกัน สารละลายที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันเมื่อแสงส่องผ่านจะเกิดการหักเหและให้ค่าดัชนีหักเหของแสงต่างกันซึ่งจากความสัมพันธ์ดังกล่าว จึงนำมาประยุกต์ใช้วัดค่าความเข้มข้นของสารละลายได้ วิธีการวัดค่า ทำได้โดยการหยดสารละลายที่ต้องการทราบค่าบนแผ่นปิด แล้วส่องมองผ่านช่องในที่มีแสง จะมองเห็นเป็นแถบสี โดยอ่านค่าตัวเลขได้ตามสเกลที่เครื่องกำหนดไว้เป็นเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นหรือเป็นค่าความหนาแน่นของเหลวก่อน และหลังการใช้ควรทำความสะอาดแผ่นปริซึม ซึ่งเป็นบริเวณที่ใช้หยดสารละลาย ตัวอย่าง ด้วยกระดาษเช็ดเลนส์ ฝุ่นละออง คราบสกปรกบนแผ่นปริซึม มีผลต่อความถูกต้องของค่าที่อ่านได้ เป็นค่าที่สัมพันธ์กับความเข้มข้นที่อุณหภูมิที่ระบุไว้ในเครื่องคือ 20 องศาเซลเซียส สารละลายที่หยดไม่ควรมีฟองอากาศปน ซึ่งมีผลต่อค่าที่อ่านได้ การวิเคราะห์ความชื้นในน้ำผึ้งด้วยการวัดค่าดัชนีหักเหของแสง หรือ refractive index (RI) ด้วยเครื่องรีแฟรคโตมิเตอร์เป็นการวิเคราะห์ทางอ้อม (Indirect determination) เนื่องจากค่า RI จะเพิ่มขึ้นตามปริมาณของแข็ง (Solids content) ในน้ำผึ้ง จากนั้นนำค่า RI ที่วัดได้ (กำหนดอุณหภูมิการวัดที่ 20°C) ไปเทียบหาความชื้นในหน่วยร้อยละของน้ำหนัก จากตารางความสัมพันธ์ ระหว่างค่า RI กับปริมาณน้ำของน้ำผึ้ง หรือคำนวณโดยการประยุกต์สมการของ Wedmore<sup>(1)</sup>

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ความชื้นในน้ำผึ้งโดยวิธีวัดด้วยเครื่อง Refractometer ตามวิธีมาตรฐาน AOAC 2019 ( 969.38 B) ตามการตรวจสอบความใช้ได้ เพื่อขอรับการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017

## วัสดุและวิธีการ

### เครื่องมือ

**เครื่องมือ:** เครื่องรีแฟรคโตมิเตอร์ชนิดดิจิทัล (Digital refractometer ยี่ห้อ Bellingham+Stanley รุ่น RFM 970-T Series) ผู้ผลิตประเทศอังกฤษ, แท่งแก้ว (glass stirring rod), ขวดแก้วปากแคบพร้อมฝาปิดสนิทสำหรับใส่ตัวอย่าง, หลอดหยด (dropper), กระดาษเช็ดเลนส์, น้ำบริสุทธิ์สูง (Ultrapure water Type I มีค่า Electrical resistivity  $\geq 18.0$  MegaOhm.cm, 25°C )

**วิธีวิเคราะห์:** เตรียมตัวอย่างน้ำผึ้งประมาณ 50% ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมด นำมาผสมลงในขวดปากแคบที่สะอาด (ปริมาตรรวมประมาณ 300 มิลลิลิตร) คนตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกันอย่างช้าๆ และนุ่มนวล ประมาณ 3 นาที ระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ หรือให้เกิดน้อยที่สุด แล้วปิดฝาให้แน่นสนิทก่อนนำไปวิเคราะห์ทันที กรณีตัวอย่างมีผลึกให้อุ่นตัวอย่างในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 60°C นาน 30 นาที ถ้าจำเป็นให้อุ่นที่ 65°C จนกระทั่งเป็นของเหลวโดยเขย่าเป็นระยะให้เข้ากัน ทิ้งให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้องจนให้เข้ากันอีกครั้ง ก่อนนำไปวิเคราะห์ วัดค่า RI ของน้ำทุกครั้ง โดยค่า RI ของน้ำ ต้องอยู่ในช่วง  $1.3330 \pm 0.0002$  จึงจะวัดตัวอย่างต่อไปได้ หลังจากนั้นเทียบค่า RI ที่อ่านได้กับปริมาณน้ำของน้ำผึ้งที่อุณหภูมิ 20°C ตามตารางที่ 1 หรือคำนวณค่าตามสมการ ความชื้น (ร้อยละของน้ำหนัก) =  $[-0.2681 - \log (RI-1)] / 0.002243$  เมื่อ RI= ค่า refractive index หลังจากวัดตัวอย่างทุกครั้งต้องทำความสะอาดปริซึม และวัดค่า RI ของน้ำทุกครั้ง ตามวิธีมาตรฐาน AOAC 2019 (969.38B) (ตัวอย่างน้ำผึ้งที่นำมาทำการทดสอบเป็นตัวอย่างน้ำผึ้งป่าเดือนห้า และน้ำผึ้งมัลเบอร์รี่ ซึ่งเป็นน้ำผึ้งที่เหลือจากการทดสอบและได้จัดทำกรายงานผลการทดสอบแล้ว)

ตารางที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า RI กับปริมาณน้ำของน้ำผึ้ง

Table 969.38. Relationship between refractive index and water contents of honeys<sup>(2)</sup>

| Refractive index |                   |                   |        | Refractive index |                   |                   |        |
|------------------|-------------------|-------------------|--------|------------------|-------------------|-------------------|--------|
| Water            |                   |                   |        | Water            |                   |                   |        |
| Content, %       | 20°C <sup>b</sup> | 60°F <sup>c</sup> | 40°C   | Content, %       | 20°C <sup>b</sup> | 60°F <sup>c</sup> | 40°C   |
| 13.0             | 1.5044            | 1.5053            | 1.4998 | 19.0             | 1.4890            | 1.4900            | 1.4845 |
| 13.2             | 1.5038            | 1.5048            | 1.4993 | 19.2             | 1.4885            | 1.4895            | 1.4840 |
| 13.4             | 1.5033            | 1.5043            | 1.4988 | 19.4             | 1.4880            | 1.4890            | 1.4835 |
| 13.6             | 1.5028            | 1.5038            | 1.4983 | 19.6             | 1.4875            | 1.4885            | 1.4829 |
| 13.8             | 1.5023            | 1.5033            | 1.4978 | 19.8             | 1.4870            | 1.4880            | 1.4824 |
| 14.0             | 1.5018            | 1.5027            | 1.4973 | 20.0             | 1.4865            | 1.4875            | 1.4819 |
| 14.2             | 1.5012            | 1.5022            | 1.4968 | 20.2             | 1.4860            | 1.4870            | 1.4814 |
| 14.4             | 1.5007            | 1.5017            | 1.4962 | 20.4             | 1.4855            | 1.4865            | 1.4809 |
| 14.6             | 1.5002            | 1.5012            | 1.4957 | 20.6             | 1.4850            | 1.4860            | 1.4804 |
| 14.8             | 1.4997            | 1.5007            | 1.4952 | 20.8             | 1.4845            | 1.4855            | 1.4799 |
| 15.0             | 1.4992            | 1.5002            | 1.4947 | 21.0             | 1.4840            | 1.4850            | 1.4794 |
| 15.2             | 1.4987            | 1.4997            | 1.4942 | 21.2             | 1.4835            | 1.4845            | 1.4788 |
| 15.4             | 1.4982            | 1.4992            | 1.4937 | 21.4             | 1.4830            | 1.4840            | 1.4783 |
| 15.6             | 1.4976            | 1.4986            | 1.4932 | 21.6             | 1.4825            | 1.4835            | 1.4778 |
| 15.8             | 1.4971            | 1.4981            | 1.4927 | 21.8             | 1.4820            | 1.4830            | 1.4773 |
| 16.0             | 1.4966            | 1.4976            | 1.4922 | 22.0             | 1.4815            | 1.4825            | 1.4768 |
| 16.2             | 1.4961            | 1.4971            | 1.4916 | 22.2             | 1.4810            |                   |        |
| 16.4             | 1.4956            | 1.4966            | 1.4911 | 22.4             | 1.4805            |                   |        |
| 16.6             | 1.4951            | 1.4961            | 1.4906 | 22.6             | 1.4800            |                   |        |
| 16.8             | 1.4946            | 1.4956            | 1.4901 | 22.8             | 1.4795            |                   |        |
| 17.0             | 1.4940            | 1.4951            | 1.4896 | 23.0             | 1.4790            |                   |        |
| 17.2             | 1.4935            | 1.4946            | 1.4891 | 23.2             | 1.4785            |                   |        |
| 17.4             | 1.4930            | 1.4940            | 1.4886 | 23.4             | 1.4780            |                   |        |
| 17.6             | 1.4925            | 1.4935            | 1.4881 | 23.6             | 1.4775            |                   |        |
| 17.8             | 1.4920            | 1.4930            | 1.4876 | 23.8             | 1.4770            |                   |        |
| 18.0             | 1.4915            | 1.4925            | 1.4870 | 24.0             | 1.4765            |                   |        |
| 18.2             | 1.4910            | 1.4920            | 1.4865 | 24.2             | 1.4760            |                   |        |
| 18.4             | 1.4905            | 1.4915            | 1.4860 | 24.4             | 1.4755            |                   |        |
| 18.6             | 1.4900            | 1.4910            | 1.4855 | 24.6             | 1.4750            |                   |        |
| 18.8             | 1.4895            | 1.4905            | 1.4850 | 24.8             | 1.4745            |                   |        |
|                  |                   |                   |        | 25.0             | 1.4740            |                   |        |

Values for 20°C and 60°F are Wedmore's calculations [*Bee World* **36**, 197 (1955)]; 40°C values are calculated from Auerbach and Borries equation [*Z. Nahr. Genussm.* **22**, 353-358 (1924)]. Values >22.0% were extended by FAO/WHO Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling (1968).

If refractive index is measured at temperature above (below) 20 °C, add (subtract) 0.00023/ °C above (below) 20 °C before using table.

If refractive index is measured at temperature above (below) 60 °F, add (subtract) 0.00013/ °F above (below) 60 °F before using table.

## การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

### ความเที่ยง (Precision)

#### Repeatability

วิเคราะห์ตัวอย่างน้ำผึ้งที่ระดับความเข้มข้น 2 ระดับ ระดับละ 10 ซ้ำ โดยผู้วิเคราะห์คนเดียวกัน เครื่องมือ เดียวกันในเวลาเดียวกันหรือใกล้เคียงกัน คำนวณค่า SD ของแต่ละความเข้มข้น คำนวณ %RSDr ของแต่ละความเข้มข้น

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

สมการที่ 1

เกณฑ์ยอมรับ : เกณฑ์ยอมรับ  $\% \text{ RSDr} < \% \text{RSDR}_{\text{Exp}}$  (คำนวณจาก Horwitz equation)

#### Within laboratory reproducibility (Intermediate precision)

วิเคราะห์ตัวอย่างน้ำผึ้งที่ระดับความเข้มข้น 2 ระดับ ระดับละ 10 ซ้ำ โดยผู้วิเคราะห์ 2 คน ในเวลาต่างวันกัน คำนวณค่า SD ของแต่ละความเข้มข้น ทดสอบค่าทางสถิติโดยใช้ F-test และ t-test แบบ two tail เพื่อพิจารณาความแปรปรวน และค่าเฉลี่ยของผล การวิเคราะห์จากผู้วิเคราะห์ 2 คน ตามลำดับ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % เกณฑ์ยอมรับ : ค่า t crit น้อยกว่า t stat แสดงว่าผลวิเคราะห์ของผู้วิเคราะห์ทั้ง 2 คน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

## การเข้าร่วมการทดสอบความชำนาญ (Proficiency testing)

เข้าร่วมการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ระหว่างห้องปฏิบัติการในการทดสอบความชำนาญ (Proficiency testing) ในระดับนานาชาติจากหน่วยงาน FAPAS® เกณฑ์ยอมรับ  $\text{IZI} \leq 2$

## การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ (Measurement uncertainty)

การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด ตามหลักการของ EURACHEM โดยคำนึงถึงแหล่งของความไม่แน่นอนทุกแหล่ง รวมค่าความไม่แน่นอนทั้งหมด แล้วคำนวณค่าความไม่แน่นอนขยายที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (k=2) ในการรายงานผล

## ผล

### ความเที่ยง

#### Repeatability

ผลการประเมินตามเกณฑ์ยอมรับ ประเมิน repeatability โดยมีเกณฑ์ยอมรับ คือ ผลการวิเคราะห์ระดับความชื้น 17 และ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ประเมิน Repeatability ด้วยค่า  $\%RPD_{(max-min)}$  โดยมีเกณฑ์การยอมรับดังนี้  $\%RPD_{(max-min)}$  ต้องน้อยกว่า  $\%RPD_{Expected}$  (คำนวณจาก  $\%RPD = 2.8 \times \%RSDr$ ) พบว่า  $\%RPD_{(max-min)}$  มีค่า 1.56 และ 2.42  $\%RPD_{Expected}$  มีค่า 1.75 และ 2.55 ดังนั้น  $\%RPD_{(max-min)} < \%RPD_{Expected}$  จึงผ่านเกณฑ์ยอมรับ

#### ตารางที่ 2 ตารางผลการทดสอบความเที่ยงโดยการทดสอบซ้ำในวันเดียว

| ลำดับ         | ตัวอย่างที่1 | ตัวอย่างที่2 |
|---------------|--------------|--------------|
| 1             | 16.68        | 20.05        |
| 2             | 16.66        | 20.44        |
| 3             | 16.74        | 20.50        |
| 4             | 16.70        | 20.40        |
| 5             | 16.53        | 20.49        |
| 6             | 16.59        | 20.42        |
| 7             | 16.73        | 20.48        |
| 8             | 16.48        | 20.01        |
| 9             | 16.50        | 20.19        |
| 10            | 16.49        | 20.41        |
| avg           | 16.61        | 20.34        |
| sd            | 0.1038       | 0.1850       |
| %rsdr         | 0.63         | 0.91         |
| $\%RPD_{Exp}$ | 1.75         | 2.55         |

### Within laboratory reproducibility (Intermediate precision)

ผลการประเมินตามเกณฑ์ยอมรับ ประเมิน Within laboratory reproducibility<sup>(3)</sup> โดยมีเกณฑ์ยอมรับ คือ ผลการวิเคราะห์จากผู้วิเคราะห์ 2 คน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ พบว่า t-stat น้อยกว่า t-critical ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ทั้ง 2 ตัวอย่าง ดังนั้น ผลการวิเคราะห์ของนักวิเคราะห์ ทั้ง 2 คน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงผ่านตามเกณฑ์ยอมรับ

ตารางที่ 3 ตารางข้อมูลผลการวิเคราะห์ความชื้นในน้ำผึ้ง 2 ตัวอย่าง โดยผู้วิเคราะห์ 2 คน ในเวลาต่างวันกัน

| ลำดับ | ตัวอย่างที่ 1       |                     | ตัวอย่างที่ 2       |                     |
|-------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
|       | ผู้วิเคราะห์คนที่ 1 | ผู้วิเคราะห์คนที่ 2 | ผู้วิเคราะห์คนที่ 1 | ผู้วิเคราะห์คนที่ 2 |
| 1     | 16.68               | 16.60               | 20.05               | 20.32               |
| 2     | 16.66               | 16.61               | 20.44               | 20.41               |
| 3     | 16.74               | 16.56               | 20.50               | 20.21               |
| 4     | 16.70               | 16.61               | 20.40               | 20.36               |
| 5     | 16.53               | 16.62               | 20.49               | 20.24               |
| 6     | 16.59               | 16.48               | 20.42               | 20.38               |
| 7     | 16.73               | 16.57               | 20.48               | 20.15               |
| 8     | 16.48               | 16.46               | 20.01               | 20.21               |
| 9     | 16.50               | 16.43               | 20.19               | 20.32               |
| 10    | 16.49               | 16.48               | 20.41               | 20.17               |
| avg   | 16.61               | 16.54               | 20.34               | 20.28               |
| sd    | 0.1038              | 0.0721              | 0.1850              | 0.0924              |
| %rsdr | 0.63                | 0.44                | 0.91                | 0.46                |
| %RPD  | 1.75                | 1.22                | 2.55                | 1.28                |

ตารางที่ 4 แสดงผลการทดสอบทางสถิติโดยใช้ F-test และ t-test ของตัวอย่างที่ 1

F-test Two-Sample for Variances

|                     | ผู้วิเคราะห์คนที่ 1 | ผู้วิเคราะห์คนที่ 2 |
|---------------------|---------------------|---------------------|
| Mean                | 16.61               | 16.542              |
| Variance            | 0.010777778         | 0.005195556         |
| Observations        | 10                  | 10                  |
| df                  | 9                   | 9                   |
| F                   | 2.074422583         |                     |
| P(F<=f) one-tail    | 0.146064049         |                     |
| F Critical two-tail | 4.025994158         |                     |

F-stat น้อยกว่า F-crit ( $2.07 < 4.02$ ) ดังนั้น Variances ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 5 แสดงผลการทดสอบทางสถิติโดยใช้ F-test และ t-test ของตัวอย่างที่ 1

t-Test: Two-Sample Assuming equal Variances

|                              | ผู้วิเคราะห์คนที่ 1 | ผู้วิเคราะห์คนที่ 2 |
|------------------------------|---------------------|---------------------|
| Mean                         | 16.61               | 16.542              |
| Variance                     | 0.010777778         | 0.005195556         |
| Observations                 | 10                  | 10                  |
| Pooled Variance              | 0.007986667         |                     |
| Hypothesized Mean Difference | 0                   |                     |
| df                           | 18                  |                     |
| t Stat                       | 1.70141844          |                     |
| P(T<=t) one-tail             | 0.053037037         |                     |
| t Critical one-tail          | 1.734063607         |                     |
| P(T<=t) two-tail             | 0.106074074         |                     |
| t Critical two-tail          | 2.10092204          |                     |

t-stat น้อยกว่า t-crit ( $1.70 < 2.10$ ) ดังนั้นผลการวิเคราะห์ของผู้วิเคราะห์ทั้ง 2 คน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 6 แสดงผลการทดสอบทางสถิติโดยใช้ F-test และ t-test ของตัวอย่างที่ 2

F-test Two-Sample for Variances

F-Test Two-Sample for Variances

|                     | ผู้วิเคราะห์คนที่ 1 | ผู้วิเคราะห์คนที่ 2 |
|---------------------|---------------------|---------------------|
| Mean                | 20.339              | 20.277              |
| Variance            | 0.034232222         | 0.008534444         |
| Observations        | 10                  | 10                  |
| df                  | 9                   | 9                   |
| F                   | 4.011066267         |                     |
| P(F<=f) one-tail    | 0.025286603         |                     |
| F Critical two-tail | 4.025994158         |                     |

F-stat น้อยกว่า F-crit ( $4.01 < 4.02$ ) ดังนั้น Variances ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 7 แสดงผลการทดสอบทางสถิติโดยใช้ F-test และ t-test ของตัวอย่างที่ 2

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

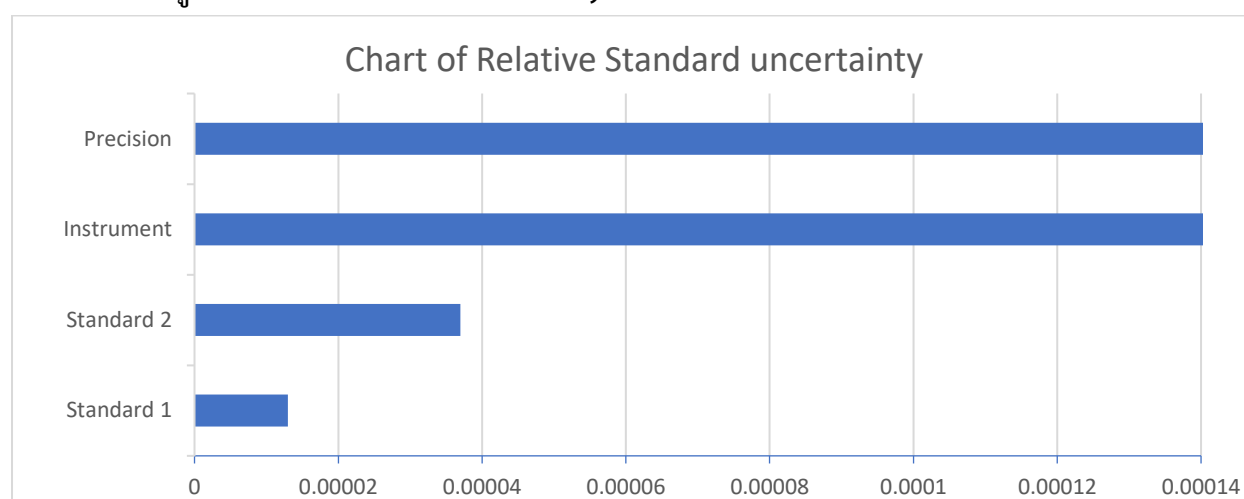
|                              | ผู้วิเคราะห์คนที่ 1 | ผู้วิเคราะห์คนที่ 2 |
|------------------------------|---------------------|---------------------|
| Mean                         | 20.339              | 20.277              |
| Variance                     | 0.034232222         | 0.008534444         |
| Observations                 | 10                  | 10                  |
| Pooled Variance              | 0.021383333         |                     |
| Hypothesized Mean Difference | 0                   |                     |
| df                           | 18                  |                     |
| t Stat                       | 0.94806691          |                     |
| P(T<=t) one-tail             | 0.17782552          |                     |
| t Critical one-tail          | 1.734063607         |                     |
| P(T<=t) two-tail             | 0.355651041         |                     |
| t Critical two-tail          | 2.10092204          |                     |

t-stat น้อยกว่า t-crit ( $0.95 < 2.10$ ) ดังนั้นผลการวิเคราะห์ของผู้วิเคราะห์ทั้ง 2 คน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการประเมินตามเกณฑ์ยอมรับ ประเมิน Within laboratory reproducibility โดยมีเกณฑ์ยอมรับ คือ ผลการวิเคราะห์จากผู้วิเคราะห์ 2 คน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ พบว่า t-stat น้อยกว่า t-critical ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ทั้ง 2 ตัวอย่าง ดังนั้น ผลการวิเคราะห์ของนักวิเคราะห์ ทั้ง 2 คน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงผ่านเกณฑ์ยอมรับ

การเข้าร่วมทดสอบความชำนาญ (Proficiency Testing) กับหน่วยงาน Food Analysis Performance Assessment Scheme (FAPAS) ในตัวอย่างน้ำผึ้ง (test No. 2849) พบว่าผลการประเมินอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ โดยผลการทดสอบเท่ากับ 20.2 กรัมต่อ 100 กรัม assigned value เท่ากับ 20.1 กรัมต่อ 100 กรัม ค่าการประเมิน Z-Score เท่ากับ 0.2 มีผลน่าพอใจ ( $z < 2$ )

ภาพที่ 1 แผนภูมิแท่งแสดง Relative uncertainty contributions



การคำนวณหาค่าความไม่แน่นอนรวม (Calculation of combined standard uncertainty)<sup>(4)</sup>

| Components | u        | divisor  | $u(x_i)$    | $u(x_i)^2$     |
|------------|----------|----------|-------------|----------------|
| Standard 1 | 0.000026 | 2        | 0.000013    | 0.000000000169 |
| Standard 2 | 0.000074 | 2        | 0.000037    | 0.000000001369 |
| Instrument | 0.00048  | 2        | 0.00024     | 0.0000000576   |
| Precision  | 0.000733 | 1.414214 | 0.000518309 | 0.000000268645 |
| u(RI)      |          |          |             | 0.000572523    |
| U(RI)      |          |          |             | 0.001145046    |

การคำนวณหาค่าความไม่แน่นอนขยาย (Calculation of expanded uncertainty)

$$\begin{aligned}U(RI) &= u(RI) \times 2 \\&= 0.000573 \times 2 \\&= 0.001145\end{aligned}$$

การรายงานค่าความไม่แน่นอน (Reporting the result and uncertainty)

ค่าที่รายงาน (RI)  $\pm MU = 1.494954 \pm 0.001145$  (1.496099 ถึง 1.493809) นำค่า RI ที่ได้มาแทนค่าในสูตร

$[-0.2681 - \log(RI-1)] / 0.002243$  เพื่อเปลี่ยนค่า RI ให้เป็นค่าความชื้นดังนี้

$$[-0.2681 - \log(1.494954-1)] / 0.002243 = 16.6452$$

$$[-0.2681 - \log(1.496099-1)] / 0.002243 = 16.1978$$

$$[-0.2681 - \log(1.493809-1)] / 0.002243 = 17.0936$$

ดังนั้น ค่าที่รายงาน = % ความชื้น  $\pm MU = 16.6 \pm 0.4$  (k=2)

การควบคุมคุณภาพ (Quality control)

ตรวจสอบความถูกต้องของเครื่องก่อนใช้งานโดยปรับเทียบด้วยน้ำกลั่นทุกครั้งด้วยน้ำ

ค่า RI =  $1.3330 \pm 0.0002$  ที่  $20 \pm 0.05^\circ\text{C}$ , สารมาตรฐาน มีค่า Refractive Index Calibration Standard n=20D อยู่ในช่วง 1.4740-1.5044

วิเคราะห์ตัวอย่างโดยวัดค่า RI 2 ซ้ำ (duplicate) ทุกตัวอย่าง ค่าความแตกต่างของความชื้น (ค่า difference) ที่คำนวณได้ทั้ง 2 ครั้งไม่เกิน 0.2

## วิจารณ์

น้ำผึ้ง มีองค์ประกอบหลัก คือ น้ำ น้ำตาลฟรุกโทส และกลูโคส มีการเสื่อมคุณภาพได้จากสาเหตุหลายประการ ได้แก่ ความร้อน ความชื้นสูง การปลอมปน การบรรจุ การเก็บรักษาที่ไม่เหมาะสม และระยะเวลา การเก็บรักษาที่ยาวนานเกินไป โดยมีความชื้นเป็นหนึ่งในปัจจัยสำคัญที่ใช้แสดงคุณภาพน้ำผึ้ง เนื่องจากความชื้นในน้ำผึ้งเป็นตัวกำหนดความเสถียรต่อการบูด จากกระบวนการหมักของยีสต์ และการเกิดผลึก (granulation) น้ำผึ้งที่มีความชื้นสูงจึงมีความเสื่อมเสียได้ง่ายตามเวลาที่เปลี่ยนไป ดังนั้นในการผลิตน้ำผึ้งต้องผ่านกระบวนการให้ความร้อนด้วยวิธีต่างๆ (treatment) เพื่อลดปริมาณน้ำ จึงสามารถยับยั้งการเกิดการหมัก และยืดเวลาการเกิดผลึกจากการทำลาย sugar nuclei ขนาดใหญ่ได้<sup>(5)</sup> ทำให้น้ำผึ้งต้องมีคุณภาพมาตรฐานของความชื้นในหน่วยร้อยละของน้ำหนักไม่เกิน 21<sup>(6)</sup>

โดยทั่วไป การวิเคราะห์ความชื้นสามารถทำได้หลายวิธีโดยอาศัยหลักการต่างๆ ได้แก่ การกลั่นมีประโยชน์กับอาหารที่เป็นสารอินทรีย์ที่ไม่ละลายน้ำ มีจุดเดือดสูงกว่าน้ำ และ วัดปริมาณน้ำที่ได้ มีประโยชน์สำหรับอาหารที่มีความชื้นต่ำ และมีน้ำมันหอมระเหยเป็นส่วนประกอบ ได้แก่ สมุนไพร เครื่องเทศ<sup>(7)</sup> การไทเทรตด้วย Karl-fisher reagent โดยวัดจุดยุติด้วยสี dark red-brown มีประโยชน์สำหรับอาหารที่มีปริมาณน้ำตาลสูงระเหยง่ายมีความชื้นต่ำ ได้แก่ กาแฟ ผลไม้และผักแห้ง<sup>(7)</sup> และการวัดด้วยเครื่อง Refractometer ได้แก่ AOAC Method 969.38(B) ใช้สำหรับน้ำผึ้ง<sup>(7)</sup>

ในการศึกษาครั้งนี้มีหลักเกณฑ์ในการเลือกวิธีวิเคราะห์และการทวนสอบ (selection and verification of methods) ให้สอดคล้องตามข้อกำหนด ISO/IEC 17025:2017 ที่ห้องปฏิบัติการ ต้องเลือกวิธีและขั้นตอนการดำเนินงานที่เหมาะสม โดยเป็นวิธีการที่มีการตีพิมพ์ในมาตรฐานระหว่างประเทศ หรือ เป็นวิธีที่มีการตีพิมพ์ทั้งในระดับภูมิภาคและระดับประเทศ หรือโดยองค์การทางวิชาการที่มีชื่อเสียงเป็นต้น ดังนั้นจึงเลือกวิธีวัดความชื้นด้วยเครื่อง Refractometer เนื่องจากจัดเป็นวิธีมาตรฐานที่ได้รับการยอมรับในระดับนานาชาติ และเป็นการวัดใน Matrix น้ำผึ้ง ซึ่งตรงกับวัตถุประสงค์การใช้งานจริง

สำหรับวิธีวิเคราะห์นี้ จัดเป็น Type I : Empirical method คือเป็นวิธีวิเคราะห์ที่ผลการวิเคราะห์ขึ้นกับวิธีการที่กำหนด เพื่อการตัดสินใจโดยไม่เน้นหาค่าจริง และผลการวิเคราะห์สอบกลับไปที่วิธีวิเคราะห์ (Traceable to the method or the procedure)

ในการใช้เครื่อง refractometer เพื่อให้ค่า Refractive index ในการคำนวณความชื้นจำเป็นอย่างยิ่งที่เครื่องมือต้องผ่านการสอบเทียบก่อนนำมาใช้งาน เนื่องจากเป็นเครื่องมือวัดที่ให้ค่าผลการวิเคราะห์ และในระหว่างการวัดต้องควบคุมคุณภาพค่าที่อ่านได้ (Reading Quality) เนื่องจากถ้าค่าคุณภาพที่อ่านได้มีค่าสูงแสดงว่ารูปแบบแสงเป็นไปตามที่กำหนด ซึ่งโดยปกติมีค่าเป็น 100 เมื่อใช้น้ำกลั่น แต่เมื่อวัดค่า RI ของน้ำผึ้งคุณภาพค่าที่อ่านได้มักอยู่ในช่วง 75-97 จึงนำค่านี้มาเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการควบคุมคุณภาพการวิเคราะห์ เพราะหากค่านี้ต่ำหรือสูงเกินไปควรเตรียมตัวอย่างใหม่เพื่อวัดซ้ำ เพราะอาจแสดงถึงสภาพตัวอย่างที่ไม่มีความเป็นเนื้อเดียวกัน เช่น อาจมี granule ในตัวอย่างทำให้เกิดการสะท้อนแสง หรือ กระจ่างแสงที่ผิดปกติ ส่งผลให้ผลวิเคราะห์ (ค่า RI) คลาดเคลื่อน แม้ว่าบริษัทผู้ผลิตเครื่องมือนี้ไม่มีการกำหนดคุณภาพค่าที่อ่านได้สำหรับตัวอย่างน้ำผึ้งก็ตาม<sup>(8)</sup>

การศึกษาวิธีวิเคราะห์ความชื้นในน้ำผึ้งโดยวัดด้วยเครื่อง Refractometer ตาม AOAC 2019 (969.38B) ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานและทันสมัย โดยมีการทวนสอบความเที่ยงแสดงด้วยค่า Repeatability และ Within laboratory reproducibility และประเมินความไม่แน่นอนของการวัด ก่อนนำวิธีการนั้นมาใช้โดยมั่นใจ และสามารถปฏิบัติตามวิธีได้อย่างถูกต้อง วิธีนี้มีผลการประเมิน Repeatability ด้วยค่า %RSDr โดยมีเกณฑ์การยอมรับดังนี้ %RSDr ต้องน้อยกว่า Expected %RSDr (คำนวณจาก Horwitz,s equation) เป็นไปตามเกณฑ์ของ Codex และ EU กำหนดไว้ Within laboratory reproducibility ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ พบว่า t-stat น้อยกว่า t-critical ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แสดงให้เห็นว่าวิธีที่ได้ทวนสอบนี้มีความเหมาะสมในการใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ความชื้นในน้ำผึ้งด้วยเครื่องรีแฟรคโตมิเตอร์ในห้องปฏิบัติการได้

ได้นำวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่ได้วิเคราะห์ตัวอย่าง proficiency test เพื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ระหว่างห้องปฏิบัติการในการทดสอบความชำนาญกับหน่วยงานทั้งภายในและภายนอกประเทศ ซึ่งพบว่าผลการ ประเมินอยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ ( $|ZI| < 2$ ) ซึ่งการเข้าร่วมทดสอบความชำนาญหรือเปรียบเทียบผลระหว่างห้อง ปฏิบัติการเป็นการบ่งชี้ประสิทธิภาพวิธีว่าเป็นวิธีที่ยอมรับได้เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่นๆ ที่เข้าร่วมการทดสอบในรอบเดียวกัน ทำให้ยอมรับได้ว่าวิธีที่ได้พัฒนานี้มีความแม่นยำเพียงพอสำหรับการวิเคราะห์ความชื้นในน้ำผึ้ง วิธีนี้ได้รับการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 จากสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ

## สรุป

การศึกษานี้ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ความชื้นในน้ำผึ้งตาม AOAC 2019 (969.38 B) สรุปได้ว่า วิธีนี้มีความเที่ยงแสดงด้วยค่า Repeatability และ Within laboratory reproducibility ผ่านเกณฑ์ยอมรับของสากล ทำให้ผลการทดสอบถูกต้อง เชื่อถือได้ โดยการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (method validation) โดยใช้น้ำผึ้ง ซึ่งเป็นไปตามระบบคุณภาพ ISO/IEC 17025:2017 และเป็นไปตามหลักเกณฑ์และเงื่อนไขของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ดังนั้นวิธีนี้จึงเหมาะสมที่จะนำมาใช้วิเคราะห์ความชื้นในน้ำผึ้งด้วยเครื่องรีแฟรคโตมิเตอร์ในห้องปฏิบัติการได้

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ นางจิราภา อุนหเลขกะ หัวหน้าฝ่ายส่วนประกอบอาหาร สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ที่ให้คำแนะนำปรึกษาในการศึกษาวิจัยและการเขียนผลงานครั้งนี้ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการฝ่ายส่วนประกอบอาหารทุกท่านที่มีส่วนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

### เอกสารอ้างอิง

1. Giulio Sesta, Lorenzo Lusco. Refractometric determination of water content in royal jelly. *Apidologie* 2008; 39: 225-232
2. Mary AG, Chapter editor. Chapter 44, Sugars and Sugar Products, 44.4.04. 969.3)8B) Moisture in Honey: By Means of refractometer. In: Dr.Latimer, Jr. GW, Editor. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 21<sup>st</sup> ed. Maryland: AOAC International, 2019. p. 26-27
3. สุวรรณ จารุณช และคณะ. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข แนวปฏิบัติการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดทางเคมี กันยายน ปี พ.ศ. 2554
4. Ellison SLR, Rosslein M, Williams A, editors. *EURACHEM/CITAC Guide: quantifying uncertainty in analytical measurement*. 2nd ed. United Kingdom: EURACHEM; 2000.
5. Igbal Singh and Sukhmeet Singh. Honey moisture reduction and its quality. *J Food Sci Technol*. 2018 Oct ; 55 (10) : 3861-71.
6. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 211) พ.ศ. 2543 เรื่อง น้ำผึ้ง หน้า 342 รวบรวมโดย ส่วนพัฒนามาตรฐานอาหารและสนับสนุนการกำกับดูแล กองควบคุมอาหาร สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา มีนาคม 2545
7. A. H. Boyd. *Principles and Methods of Moisture Measurement*. Seed Technology Papers, 2021; p.132
8. Frequently Asked Questions, FAQ No : FAQ – GRP-109 Title : Reading Quality Bellingham+Stanley, Release date 25/10/2011

## Method Verification of Moisture in Honey by Refractometer

Phadsara Numaiem, Koriyoh Wohleh, and Jirapa Unahalekhaka

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

**ABSTRACT** Honey is sweet, viscous and yellow to dark brown liquid. It composed primarily of water, fructose and glucose. It is prescribed food to have qualities or standard according to Notification of the Ministry of Public Health (No. 211) B.E.2543 (2000) Re :Honey, Moisture content not more than 21 percent by weight. Refractometer measures moisture by indirect method. This method uses Wedmore's equation to calculate moisture content was determined by vacuum drying and refractive index technique from refractive index via through the relationship between moisture The determination of moisture in honey by refractometer is an AOAC (2019) 969.38B method which is defined as Empirical method. The Repeatability at 17 and 20 percent by weight was represented with % RSD value was 0.63 and 0.91 respectively. The intermediate precision by 2 analysts showed that was no significant difference at 95 percent confidence. There is uncertainty value  $16.6 \pm 0.4$  ( $k=2$ ) Also the z-score  $\leq 2$  by participating in Proficiency Testing Program. The result of the verification showed that the moisture determination in honey by refractometer method is suitable and valid. It can be used as an analytical method in the laboratory.

**Keywords:** Moisture, Refractive index, Wedmore