

การพัฒนาวิธีการทดสอบการหาค่าไดเอสเทสในน้ำผึ้ง

ชัชวาลย์ โรจนทรัพย์ วิษุจน์ สิววรรณ

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อการพัฒนาวิธีการทดสอบการหาค่าไดเอสเทสในน้ำผึ้ง เพื่อควบคุมคุณภาพน้ำผึ้งที่มีขายอยู่ในท้องตลาด เนื่องจากค่าไดเอสเทสบ่งบอกถึงความสดใหม่และการเก็บรักษาน้ำผึ้ง ซึ่งค่าไดเอสเทสวิเคราะห์ตามวิธี AOAC (2023) 958.09 (diastase activity) หรือเรียก schade method โดยใช้หลักการเอนไซม์ diastase (α - และ β -amylase) ในน้ำผึ้ง เร่งการย่อย แป้ง (starch substrate) ให้กลายเป็น maltose และ dextrin ซึ่งใช้ starch solution (เช่น soluble starch) เป็นสารตั้งต้น เมื่อเวลาผ่านไปใช้สารละลายไอโอดีน (I_2/KI) ตรวจการคงเหลือของแป้ง โดยนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตรด้วย UV-Vis spectrophotometer แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณเป็น diastase number (DN) จากการตรวจสอบตัวอย่างทั้งหมด 10 ตัวอย่าง พบว่าค่า diastase number อยู่ในช่วง 7.1-41.6 โกเตสเกล ซึ่งผ่านเกณฑ์ตามค่ามาตรฐาน มกษ. 8003-2556 ที่กำหนดค่าไดเอสเทสไม่น้อยกว่า 3 ดังนั้นเพื่อให้สอดคล้องกับค่ามาตรฐานที่กำหนดควรมีการตรวจสอบคุณภาพของน้ำผึ้ง เพื่อคุ้มครองผู้บริโภค

คำสำคัญ : ค่าไดเอสเทส, UV-Vis spectrophotometer, การพัฒนาวิธีทดสอบ

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

ถ.ติวานนท์ ต.บางกะดี อ.เมือง จ.ปทุมธานี 12000; โทรศัพท์ 0-2967-9727

Method development of Diastase Number in Honey

Chatchawan Rodjanasap Vichunan Leewan

Abstract

This study aimed to develop a testing method for determining diastase activity in honey in order to control the quality of honey available on the market. Diastase activity is an indicator of the freshness and storage conditions of honey. The diastase activity was analyzed using the AOAC (2023) 958.09 method (diastase activity), also known as the Schade method. This method is based on the principle that diastase enzymes (α - and β -amylase) in honey catalyze the hydrolysis of starch substrates (such as soluble starch) into maltose and dextrins. Over time, an iodine solution (I_2/KI) is used to detect the remaining starch. The absorbance of the solution is measured at 660 nanometers using a UV-Vis spectrophotometer, and the value obtained is used to calculate the diastase number (DN). A total of 10 honey samples were tested, and the diastase numbers ranged from 7.1 to 41.6 Gothe units. All samples met the standard criteria of TIS 8003-2556, which specifies a minimum diastase activity of 3. Therefore, to comply with this standard, honey quality should be regularly monitored to protect consumers.

Keywords : diastase activity, UV-Vis spectrophotometer, Method development

Veterinary Public Health Laboratory, Bureau of Quality Control of Livestock Products,
Department of Livestock Development, Tivanont Road, Bangkadi Subdistrict, Muang District,
Pathum Thani Province, 12000; Tel. 0 2967 9727

การพัฒนาวิธีการทดสอบการหาค่าไดเอสเทสในน้ำผึ้ง

บทนำ

น้ำผึ้ง คือ น้ำหวานที่ผึ้งเก็บจากต่อมน้ำหวานของดอกไม้ หรือส่วนใดส่วนหนึ่งของต้นไม้หรือจากแมลงที่ดูดกินส่วนของของเหลวของพืช ที่ผ่านกระบวนการย่อยภายในตัวผึ้ง ขณะบินกลับรังแล้วคายออกมาเก็บไว้ในหลอดรวง ซึ่งน้ำผึ้งนิยมบริโภคกันอย่างแพร่หลายทั้งภายในประเทศและต่างประเทศจึงทำให้น้ำผึ้งเป็นสินค้าเศรษฐกิจชนิดหนึ่งและเป็นที่ต้องการของตลาดโลก โดยผู้บริโภคสามารถนำน้ำผึ้งไปรับประทานโดยตรงหรือผสมกับส่วนผสมอื่นๆ ของอาหาร เครื่องดื่ม และยา ได้หลากหลายชนิด ตามมาตรฐานสินค้าเกษตร มกษ. 8003-2556 เรื่องน้ำผึ้ง หมายถึง ของเหลวรสหวานซึ่งผึ้งผลิตจากชันโดยให้น้ำผึ้งมีคุณภาพหรือมาตรฐานดังต่อไปนี้ มีสี กลิ่น รส ตามลักษณะเฉพาะของน้ำผึ้ง และค่าไดเอสเทส (diastase activity) ต้องไม่น้อยกว่า 3 โกเตสเกล ซึ่งเป็นค่าที่บ่งชี้ว่าน้ำผึ้งนี้เป็นน้ำผึ้งแท้สดใหม่ มีคุณภาพที่เหมาะสมสำหรับการนำมาบริโภคมีเอนไซม์ตามธรรมชาติที่ผู้บริโภคต้องการรับประทานเพื่อช่วยในกระบวนการย่อยอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรต

การดำเนินการตรวจวิเคราะห์ค่าไดเอสเทสในน้ำผึ้ง จึงมีความสำคัญและจำเป็นเพื่อตรวจสอบคุณภาพน้ำผึ้งให้สอดคล้องกับเกณฑ์มาตรฐาน และการพัฒนาวิธีการทดสอบการหาค่าไดเอสเทสในน้ำผึ้งเป็นวิธีการหนึ่งในระบบคุณภาพ ISO/IEC 17025 ในการควบคุมคุณภาพผลการทดสอบให้ถูกต้องตามมาตรฐาน

1. วัตถุประสงค์

เพื่อการพัฒนาวิธีการทดสอบการหาค่าไดเอสเทสในน้ำผึ้ง เพื่อควบคุมคุณภาพน้ำผึ้งที่มีขายอยู่ในท้องตลาด

2. ขอบข่าย

พัฒนาวิธีทดสอบการหาค่าไดเอสเทสในน้ำผึ้ง

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้วิธีที่ใช้ในการทดสอบค่าไดเอสเทสในน้ำผึ้งอย่างมีประสิทธิภาพถูกต้องและแม่นยำ

4. เครื่องมือและวัสดุวิทยาศาสตร์

4.1 เครื่องมือที่ใช้

4.1.1 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

4.1.2 เครื่อง UV-VIS Spectrophotometer

4.1.3 เครื่องชั่งน้ำหนักความละเอียด 0.001 กรัม สำหรับชั่งตัวอย่างและสารเคมี

4.2 อุปกรณ์ที่ใช้

4.2.1 Quartz cell 10 mm สำหรับเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer

4.2.2 Volumetric flask, Class A สีชาขนาด 25, 50 และ 100 mL

4.2.3 Micropipette ชนิดปรับปริมาตรแบบช่องทางเดียว ขนาด 2-20, 10-100, 20-200, 100-1000 และ 5000 μL

4.2.4 Erlenmeyer flask ขนาด 50 mL

4.2.5 Beaker ขนาด 50 100 และ 250 mL

4.3 สารเคมี

4.3.1 NaCl solution

ชั่ง NaCl 14.5 กรัม แล้วปรับปริมาตรด้วย DI water เป็น 500 mL

4.3.2 Acetate buffer solution

ชั่ง โซเดียมแอซิเตต 87 กรัม ละลายด้วย DI water 400 mL เติมกรดอะซิติก 10.5 mL ปรับปริมาตรด้วย DI water เป็น 500 mL แล้วนำไปวัดค่า pH ($\text{pH} = 5.3$)

4.3.3 Starch Solution (ต้องเตรียมในวันที่ใช้)

ชั่งแป้ง 3 กรัม นำไปอบที่ตู้อบลมร้อนอุณหภูมิ 130°C 1.5 ชั่วโมง แล้วนำไปทำให้เย็นโดยนำไปใส่ desiccator แล้วนำไปชั่งอีกครั้ง จากนั้นนำแป้ง 2 กรัม ลงใน Erlenmeyer flask เติม DI water 90 mL ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปต้ม 3 นาที เทสารละลายที่ร้อนอยู่ลงใน Volumetric flask ขนาด 100 mL ทำให้เย็นลงจากนั้นปรับปริมาตรด้วย DI water เป็น 100 mL

4.3.4 Iodine stock solution

ชั่ง Iodine (sublimated) 8.80 กรัม และ โพแทสเซียมไอโอไดด์ 22 กรัม ละลายด้วย DI water 40 mL แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 L

4.3.5 Iodine solution dilute

ชั่งโพแทสเซียมไอโอไดด์ 20 กรัม เติม Iodine stock solution 5 mL แล้วปรับปริมาตรเป็น 500 mL

5. วิธีการดำเนินการ

5.1 การ Standardization น้ำแป้ง

ปิเปตสารละลายแป้ง 5 mL ใส่ DI water 10 mL ผสมให้เข้ากัน แล้วปิเปต 1 mL ใส่ลงใน Iodine solution dilute 10 mL ใน Volumetric flask สีชาขนาด 50 mL ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 nm. ค่าที่วัดได้อยู่ในช่วง 0.760 ± 0.02 หากไม่ได้ค่านี้อาจต้องเพิ่มหรือลดปริมาณน้ำที่ปรับปริมาตร

5.2 การวิเคราะห์ค่าไดเอสเทสในน้ำแป้ง

ชั่งตัวอย่างน้ำแป้ง 5 กรัม ละลายด้วย DI water 15 mL และเติม acetate buffer solution 2.5 mL เทลงใน Volumetric flask 25 mL ที่มี NaCl solution 1.5 mL อยู่ แล้วปรับปริมาตรด้วย DI water จนถึง 25 mL จากนั้นปิเปตสารละลายแป้ง 5 mL ใส่ลงใน flask ปริมาตร 50 mL และปิเปตสารละลายน้ำแป้งที่เตรียมไว้ 10 mL ใส่ลงใน flask เดียวกัน แล้วนำไปวางใน water bath อุณหภูมิ $40 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเริ่มจับเวลาทุกๆ 5 นาที ปิเปตสารละลายทั้งหมด 1 mL แล้วเติม Iodine solution dilute ปริมาตร 10 mL แล้วเติมน้ำให้มีปริมาตรเท่ากับน้ำที่ใช้ standardization น้ำแป้ง ทำการผสมและปรับปริมาตรใหม่ทุกๆ 5 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 nm. หากค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ต่ำกว่า 0.235 แสดงว่าสิ้นสุดปฏิกิริยา (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงและเวลา

Absorbance	End point, min
0.7	> 25
0.65	20-25
0.6	15-18
0.55	11-13
0.5	9-10
0.45	7-8

7.4 การคำนวณผลการวิเคราะห์

$$\text{ค่า diastase number (DN)} = \underset{\text{tx}}{60} \underset{2.0}{\text{minutes}} \times \underset{\text{tx}}{0.10} \times 1.0 = \underline{300}$$

โดย tx = เวลาที่ทำปฏิกิริยาสิ้นสุด (ค่าดูดกลืนแสงที่ 0.235)

8. ผลการทดสอบ

8.1 การ Standardization น้ำแป้ง

ผลการทดสอบ Standardization น้ำแป้ง โดยการเตรียม 2% starch solution ผสมน้ำและสารละลายไอโอดีนเจือจาง แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 660 nm. พบว่าได้ค่าดูดกลืนแสงอยู่ที่ 0.763 ดังตารางที่ 2 (ควรมีค่าอยู่ในช่วง 0.760 ± 0.02)

ตารางที่ 2 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำแป้ง

ตัวอย่าง	ค่าการดูดกลืนแสง		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย
น้ำแป้ง	0.763	0.763	0.763

8.2 การวิเคราะห์ค่าไดแอสเทสในน้ำผึ้ง

ผลการทดสอบค่าไดแอสเทสในน้ำผึ้ง พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 15 นาที น้ำผึ้งมีค่าไดแอสเทส < 0.235 ถือว่าเวลาที่ปฏิกิริยาสิ้นสุดลงแล้ว ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ค่าไดแอสเทสของตัวอย่างน้ำผึ้ง

	ตัวอย่าง 1	ตัวอย่าง 2	ตัวอย่าง 3	ตัวอย่าง 4	ตัวอย่าง 5
ค่าไดแอสเทส (โกเตสเกล)	12.6	12.4	12.4	41.6	38.5
	ตัวอย่าง 6	ตัวอย่าง 7	ตัวอย่าง 8	ตัวอย่าง 9	ตัวอย่าง 10
ค่าไดแอสเทส (โกเตสเกล)	20.9	21.5	25.0	30.0	7.1

ตารางที่ 4 ค่าดูดกลืนแสงน้ำผึ้งตัวอย่างที่ 8

นาที	1	2	3	ค่าเฉลี่ย
5	0.3702	0.3709	0.3721	0.3711
10	0.2534	0.2544	0.2551	0.2543
15	0.2055	0.206	0.2067	0.2061

การคำนวณหาเวลา tx ที่ Abs = 0.235

$$tx = \frac{t1 + (A1 - 0.235) * (t2 - t1)}{(A1 - A2)}$$

$$= \frac{10 + (0.2543 - 0.235) * (15 - 10)}{(0.2543 - 0.2061)} = 12.0$$

$$\begin{aligned} \text{ค่า diastase number (DN)} &= \frac{60 \text{ minutes} \times 0.10 \times 1.0}{\text{tx} \quad 2.0 \quad \text{tx}} = \frac{300}{12.0} \\ &= 300/12.0 = 25.0 \end{aligned}$$

9. สรุปผลการทดสอบ

ดำเนินการพัฒนาวิธีการทดสอบการหาค่าไดแอสเทสในน้ำผึ้งโดยวิเคราะห์ตามวิธี AOAC (2023) 958.09 (diastase activity) หรือเรียก schade method และได้ผลการทดสอบเป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับ ดังนั้นวิธีทดสอบนี้มีประสิทธิภาพ สามารถนำวิธีดังกล่าวไปใช้ในการทดสอบค่าไดแอสเทสในน้ำผึ้งได้ตามแผนกิจกรรมของกรมปศุสัตว์

9. ข้อเสนอแนะ

วิธีทดสอบที่ได้ ควรทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบนี้ และยังเป็นการตรวจสอบความใช้ได้ของห้องปฏิบัติการเดียว ควรมีการเข้าร่วมทดสอบความชำนาญ (proficiency testing) หรือมีการเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการ (interlaboratory comparison) เพื่อให้วิธีทดสอบนี้สามารถตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างได้ถูกต้อง

10. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ที่สนับสนุนการศึกษาในครั้งนี้ รวมทั้งเจ้าหน้าที่งานเคมีอาหาร สารตกค้างและสารปนเปื้อน กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ที่ช่วยในการศึกษาในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

11. เอกสารอ้างอิง

สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. 2556. มาตรฐานสินค้าเกษตร มกษ. 8003-2556. สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 1-2.
AOAC Official methods of analysis. 2023. AOAC Official method 958.09 Diastatic activity of honey. AOAC Official Methods of Analysis. 22nd eds. Oxford University Press. New York.