การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ใน ยาลูกกลอนด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ปริญญานิพนธ์
ของ
อาทิตย์ กัณฐัศว์กำพล

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
ตุลาคม 2553

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ในยาลูกกลอนด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ปริญญานิพนธ์
ของ
อาทิตย์ กัณฐัศว์กำพล

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
ตุลาคม 2553
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ใน ยาลูกกลอนด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

บทคัดย่อ

ของ

อาทิตย์ กัณฐัศว์กำพล

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

ตุลาคม 2553

อาทิตย์ กัณฐัศว์กำพล. (2553). *การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ในยาลูกกลอนด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง*. ปริญญานิพนธ์ วท.ม. (เคมี). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม: รองศาสตราจารย์ ดร. พรพิมล ม่วงไทย. อาจารย์ ดร. ปิยะดา จิตรตั้งประเสริฐ.

ยาลูกกลอนไทยเป็นยาที่ได้รับความนิยมประเภทหนึ่ง เพราะผลิตจากสมุนไพร ปัจจุบันมีผู้บริโภคลดลง เพราะมีข่าวว่ามีสารประเภทสเตียรอยด์ และสาร 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ (HMF) มีผลทำให้ยาลูกกลอนมีสีดำคล้ำ ทั้งนี้เพราะในยาลูกกลอนมีน้ำผึ้งเป็นตัวประสานผงยา ในน้ำผึ้งทั่วไปจะต้องมีการควบคุมปริมาณ HMF ให้มีปริมาณไม่เกิน 15 ppm ดังนั้นงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อปริมาณการเกิดสารประกอบ HMFในระบบต้นแบบ(model system) และในน้ำผึ้ง ซึ่งได้แก่ ชนิดของกรดอะมิโน ชนิดของน้ำตาล อุณหภูมิที่ให้ความร้อน เวลาที่ให้ความร้อนและระยะเวลาในการเก็บรักษา รวมทั้งพัฒนาวิธิวิเคราะห์หาปริมาณ HMF ในยาลูกกกลอนด้วยเทคนิคโครมาโทรกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูงชนิดรีเวอร์สเฟส โดยทำการศึกษาองค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่เปรียบเทียบ 3 สภาวะ สภาวะที่ 1 ใช้น้ำและอะซีโตไนทริลในอัตราส่วนร้อยละ 90:10 โดยปริมาตร สภาวะที่ 2 ใช้ น้ำและอะซิโตไนทริลในอัตราส่วนร้อยละ 97:3 โดยปริมาตร และสภาวะที่ 3 ใช้น้ำและเมทานอลในอัตราส่วนร้อยละ 90:10 โดยปริมาตร จากผลการศึกษาพบว่า สภาวะที่ 2 เป็นสภาวะที่ดีที่สุดที่ใช้ในการวิเคราะห์ ผลการวิเคราะห์ปริมาณ HMF จากการแปรผันอุณหภูมิและเวลาในการให้ความร้อนกับน้ำผึ้งและเวลาในการเก็บรักษาน้ำผึ้งพบว่า ปริมาณของ HMFแปรผันตามอุณหภูมิและเวลาในการให้ความร้อนและเวลาในการเก็บรักษาน้ำผึ้ง และผลจากการวิเคราะห์ปริมาณ HMF ในยาลูกกลอน พบว่า ในตัวอย่างยาลูกกลอนที่นำมาวิเคราะห์จำนวน 28 ตัวอย่างมีปริมาณ HMF อยู่ในช่วง 1.30-44.94 ppm และมีค่าขีดความสามารถต่ำสุดในการตรวจวัดเท่ากับ 0.65 ppm

ANALYSIS OF 5- HYDROXYMETHYL-2-FURFURALDEHYDE IN HERB PILLS BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

AN ABSTRACT

BY

ARTHID KUNTATKUMPOL

Presented in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Master of Science Degree in Chemistry

at Srinakharinwirot University

October 2010

Arthid Kuntatkumpol. (2010). *Analysis of 5- hydroxymethyl-2-furfuraldehyde in herb pills by high performance liquid chromatography.* Master thesis. M.Sc. (Chemistry). Bangkok :Graduate School. Srinakharinwirot University. Advisor Committee :Associate Professor Dr. Pornpimol Muangthai., Dr. Piyada Jittangprasert.

An herb pill is one of the popular drugs in Thailand. The consumption of Thai herb pills are currently decreased due to carcinogenic 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde (HMF) in honey used as a binder in the pills. HMF is formed during heating honey and attributed to darkening of colour in honey. The quality of honey is controlled by the HMF content which should be less than 15 ppm. In this work, we studied influential factors on HMF accumulation in a model system and in honey. The effects of types of amino acids and sugars, temperature, heating time and shelf life on HMF accumulation were investigated. In addition, we developed an analysis method of HMF content in the pills using RP-HPLC with 3 different mobile phase systems for comparison, including water-acetronitrile 90:10 (v/v) water-acetronitrile 97:3 (v/v) and water-methanol 90:10 (v/v). Results showed that the use of water-acetronitrile 97:3 (v/v) as the mobile phase gave the best analysis. The content of HMF in 28 herb pill samples was in a range of 1.30 - 44.94 ppm and the limit of detection was 0.65 ppm. Moreover, the HMF accumulation increased with increasing temperature, heating time and shelf life.

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากคณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒที่ได้จัดสรรเงินทุนงบประมาณรายได้ประจำปี 2553

ปริญญานิพนธ์
เรื่อง

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์ใน
ยาลูกกลอนด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ของ
อาทิตย์ กัณฐัศว์กำพล

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.สมชาย สันติวัฒนกุล)
วันที่..... เดือน..... พ.ศ. 2553

คณะกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์

..... ประธาน
(รองศาสตราจารย์ ดร. พรพิมล ม่วงไทย)

.....กรรมการ
(ดร. ปิยะดา จิตรตั้งประเสริฐ)

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

…….. ประธาน
(ดร. วินัย อวงพิพัฒน์)

……. กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. พรพิมล ม่วงไทย)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิริธร สโมสร)

..... กรรมการ
(ดร. ปิยะดา จิตรตั้งประเสริฐ)

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี เนื่องจากผู้วิจัยไ ด้รับคำแนะนำ ความช่วยเหลือความอนุเคราะห์จาก รองศาสตราจารย์ ดร.พรพิมล ม่วงไทย ประธานควบคุมปริญญานิพนธ์ และดร.ปิยะดา จิตรตั้งประเสริฐ คณะกรรมการควบคุมปริ ญญานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา และชี้แนะข้อบกพร่องต่างๆ ตลอดจนการแก้ปัญหาอันเกิดจากการวิจัยและการเขียนปริญญานิพนธ์นี้แก่ผู้วิจัยเป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณ ดร.วินัย อวงพิพัฒน์ ที่ให้ความกรุณาในการเป็นประธานกรรมการในการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร . สิริธร สโมสร ที่ให้ความกรุณาในการเป็นกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ ตลอดจนให้คำแนะนำและชี้แนะข้อบกพร่องต่างๆ เพื่อให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น และขอขอบพระ คุณคณาจารย์ภาควิชาเคมีทุกท่าน ที่ได้ถ่ายทอดความรู้และให้ความเมตตาเอาใจใส่แก่ผู้วิจัยด้วยดีเสมอมา

ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ให้ทุนสนับสนุนการทำปริญญานิพนธ์สำหรับนิสิตในระดับบัณฑิตศึกษาจากงบประมาณเงินรายได้ คณะวิทยาศาสตร์ ประจำปี พ .ศ.2553และขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาเคมี ที่ให้คำแนะนำ ช่วยเ หลืออำนวยความสะดวก แก่ผู้วิจัยตลอดการศึกษาและทำวิจัย ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาและขอขอบพระคุณทุกๆ ท่านไว้ ณ โอกาสนี้

ผู้วิจัยขอน้อมรำลึกถึงพระคุณบิดา มารดาและญาติสนิททุกท่านที่ได้ อบรมเลี้ยงดูและให้การสนับสนุนในด้านการศึกษาแก่ผู้วิจัยตลอดมา และขอบพระคุณครู อาจารย์ รวมถึงผู้มีพระคุณทั้งหลายที่มิได้เอ่ยนามมา ณ ที่นี้ ที่มีส่วนช่วยให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้

อาทิตย์ กัณฐัศว์กำพล

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	**บทนำ**.....	1
	ภูมิหลัง……..	1
	ความมุ่งหมายของการวิจัย……..	2
	ความสำคัญของการวิจัย…….	2
	ขอบเขตของการวิจัย……..	3
	ขั้นตอนของการวิจัย……	3
2	**เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**……..	4
	ยาลูกกลอน……	4
	ลักษณะของยาลูกกลอน.....	4
	ขั้นตอนการผลิตยาลูกกลอนน้ำผึ้ง.....	4
	น้ำผึ้ง……..	5
	ลักษณะของน้ำผึ้ง……	5
	องค์ประกอบของน้ำผึ้ง…….....	6
	การนำน้ำผึ้งมาใช้ประโยชน์…….....	6
	การตรวจสอบคุณภาพของน้ำผึ้ง.....	7
	ปฏิกิริยาการเกิดสารสีน้ำตาล.....	7
	การเกิดสีน้ำตาลที่เร่งด้วยเอนไซม์.....	7
	การเกิดสีน้ำตาลที่ไม่อาศัยเอนไซม์.....	7
	คาราเมลไลเซชั่น(caramelization).....	7
	ปฏิกิริยาเมลลาร์ด.....	8
	การเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด……	8
	ผลดีและผลเสียของปฏิกิริยาเมลลาร์ด……..	11
	ประโยชน์และโทษของสาร 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอร์ฟิวราลดีไฮด์……	11
	เทคนิคโครมาโทรกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง…….	11
	งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์ 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง.....	13
3	**วิธีดำเนินการวิจัย**……	17
	อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	17

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
3(ต่อ)		
	การหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์…….……..	19
	การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดสาร HMF ในระบบต้นแบบ…….	20
	การศึกษาผลของชนิดของกรดอะมิโน…..……..	20
	การศึกษาผลของชนิดของน้ำตาล.....	20
	การศึกษาผลของอุณหภูมิในการให้ความร้อน.....	21
	การศึกษาผลของระยะเวลาในการให้ความร้อน.....	22
	การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดสาร HMF ในน้ำผึ้ง.....	22
	การศึกษาผลของอุณหภูมิในการให้ความร้อน.....	22
	การศึกษาผลของระยะเวลาในการให้ความร้อน.....	23
	การศึกษาผลของระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำผึ้ง.....	23
	การวิเคราะห์ HMF ในตัวอย่างยาลูกกลอนด้วย เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง……	24
4	**ผลการทดลอง**……..	25
	การหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์…….……..	25
	การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดสาร HMF ในระบบต้นแบบ…….	28
	การศึกษาผลของชนิดของกรดอะมิโน…..……..	28
	การศึกษาผลของชนิดของน้ำตาล.....	28
	การศึกษาผลของอุณหภูมิในการให้ความร้อน.....	29
	การศึกษาผลของระยะเวลาในการให้ความร้อน.....	30
	การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดสาร HMF ในน้ำผึ้ง.....	30
	การศึกษาผลของอุณหภูมิในการให้ความร้อน.....	30
	การศึกษาผลของระยะเวลาในการให้ความร้อน.....	31
	การศึกษาผลของระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำผึ้ง.....	32
	การวิเคราะห์ HMF ในตัวอย่างยาลูกกลอนด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี ของเหลวสมรรถนะสูง……	32
5	**สรุปผล อภิปรายผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ**……..	37
	การหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์…….……....	37

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
5(ต่อ)	
การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดสาร HMF ในระบบต้นแบบ…….	38
การศึกษาผลของชนิดของกรดอะมิโน……..	38
การศึกษาผลของชนิดของน้ำตาล.....	38
การศึกษาผลของอุณหภูมิในการให้ความร้อน.....	38
การศึกษาผลของระยะเวลาในการให้ความร้อน.....	38
การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดสาร HMF ในน้ำผึ้ง.....	39
การศึกษาผลของอุณหภูมิในการให้ความร้อน.....	39
การศึกษาผลของระยะเวลาในการให้ความร้อน.....	40
การศึกษาผลของระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำผึ้ง.....	41
การวิเคราะห์ HMF ในตัวอย่างยาลูกกลอนด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง……	43
ข้อเสนอแนะ.....	43
บรรณานุกรม……..	44
ภาคผนวก.....	48
ภาคผนวก ก.....	49
ภาคผนวก ข.....	56
ภาคผนวก ค.....	60
ประวัติย่อผู้วิจัย.....	62

บัญชีตาราง

ตาราง		หน้า
1	องค์ประกอบของน้ำผึ้ง……..	6
2	ค่าระยะเวลารีเทนชันของสภาวะของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้ในการทดลอง.....	26
3	ปริมาณของสารประกอบ HMF เมื่อศึกษาปัจจัยชนิดของกรดอะมิโนและน้ำตาล.	28
4	ปริมาณของสารประกอบ HMF ของการแปรผันอุณหภูมิในการให้ความร้อนแก่ระบบต้นแบบ.....	29
5	ปริมาณของสารประกอบ HMF ของการแปรผันเวลาในการให้ความร้อนแก่ระบบต้นแบบ.....	30
6	ปริมาณสารประกอบ HMF ในน้ำผึ้งที่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ.....	31
7	ปริมาณสารประกอบ HMF ในน้ำผึ้งที่ได้รับความร้อนที่เวลาต่างๆ.....	31
8	ปริมาณของสารประกอบ HMF ในน้ำผึ้งที่การเก็บรักษาที่ระยะเวลาต่างๆ.....	32
9	ปริมาณของสารประกอบ HMF ในตัวอย่างยาลูกกลอน.....	34
10	ความสัมพันธ์ของอุณหภูมิในการให้ความร้อนแก่น้ำผึ้งกับปริมาณ HMF.....	39
11	ความสัมพันธ์ของระยะเวลาในการให้ความร้อนแก่น้ำผึ้งกับปริมาณ HMF.....	40
12	ความสัมพันธ์ของปริมาณ HMFกับระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำผึ้ง.....	42

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ		หน้า
1	ปฏิกิริยาเมลลาร์ดแสดงการเกิดไกลโคซิลเอมีน และสารประกอบอะมาโดริ.....	9
2	วิถีของปฏิกิริยาแสดงการสลายตัวของสารประกอบอะมาโดริให้ได้สาร HMF....	10
3	โครมาโทแกรมการวิเคราะห์สารHMFในน้ำผึ้งโดยทดลองด้วยสภาวะที่ 1.....	26
4	โครมาโทแกรมแสดงผลการวิเคราะห์สารมาตรฐานHMFโดยใช้สภาวะที่ 2.....	27
5	โครมาโทแกรมแสดงผลการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำผึ้งโดยใช้สภาวะที่2	27
6	โครมาโทแกรมการวิเคราะห์สารHMFในน้ำผึ้งโดยทดลองด้วยสภาวะที่ 3.....	28
7	กราฟมาตรฐาน HMF.....	33
8	กราฟความสัมพันธ์ของปริมาณสาร HMFกับอุณหภูมิในการให้ความร้อนแก่น้ำผึ้ง.....	40
9	กราฟแสดงความสัมพันธ์ของปริมาณ HMFกับระยะเวลาในการให้ความร้อนแก่น้ำผึ้ง.....	41
10	กราฟแสดงความสัมพันธ์ของปริมาณ HMFกับระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำผึ้ง.....	42
11	เครื่องอังไอน้ำที่สามารถควบคุมอุณภูมิได้ใช้ในการให้ความร้อนแก่ระบบต้นแบบและตัวอย่างน้ำผึ้ง.....	50
12	ชุดกรองที่ใช้ในการกรองสารมาตรฐานและสารตัวอย่างก่อนนำไปฉีดเข้าสู่ระบบโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง.....	51
13	เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง(high performance liquid chromatography)	52
14	เครื่องกรองน้ำเพื่อนำใช้กับระบบโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง.....	53
15	ตัวอย่างน้ำผึ้งที่ใช้ในงานวิจัย.....	54
16	ตัวอย่างยาลูกกลอนที่ใช้ในงานวิจัย.....	55

บทที่ 1
บทนำ

ภูมิหลัง

ยาลูกกลอนเป็นยาสมุนไพรไทยประเภทหนึ่งมีรูปร่างเป็นเม็ดกลม จัดเป็นยาแผนโบราณที่ต้องขออนุญาตผลิตหรือนำเข้า และ ต้องได้รับใบสำคัญการขึ้นทะเบียนตำรับยาก่อนจึงจะจำหน่ายได้ จำหน่ายในร้านขายยาที่มีใบอนุญาตเท่านั้น (สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข. 2541: 7) ในเม็ดยาลูกกลอนทั่วไปประกอบไปด้วยผงยาที่อาจเป็นสมุนไพรชนิดเดียวหรือ หลายชนิดก็ได้ขึ้นกับประเภทของยา นอกจากนี้ยังมีตัวประสานผงยาซึ่งมีหน้าที่ทำให้ผงยาจับตัวกันเป็นเม็ดหรือก้อน ซึ่ง นิยมใช้น้ำผึ้งเนื่องจากน้ำผึ้งมีสรรพคุณทางยาและทำให้เม็ดยามีสี กลิ่น รส ที่ชวนรับประทาน จึงเรียกยาที่ได้ว่ายาลูกกลอนน้ำผึ้ง

ยาลูกกลอนเป็นรูปแบบยาสมุนไพรที่ได้รับความนิยมสูง นิยมใช้เป็นยารักษาโรคเรื้อรังและใช้เป็นยาบำรุงร่างกาย เนื่องจากสามารถรับประทานได้ง่ายและพกพาได้สะดวก รวมทั้งยังสามารถเก็บรักษาได้เป็นเวลานานกว่ายาสมุนไพรรูปแบบอื่น ๆ

น้ำผึ้งเป็นผลผลิตที่ได้จากการเก็บน้ำหวานจากเกสรดอกไม้ของผึ้ง ในน้ำผึ้งจะมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบหลัก นอกจากนี้ยังมีกรดอะมิโนและสารอาหารต่าง ๆ อีกมากมายอยู่ด้วย(แสนนัด หงษ์ทรงเกียรติ. 2531: 223) ด้วยสาเหตุที่องค์ประกอบ หลักของน้ำผึ้งคือน้ำตาล และยังมีกรดอะมิโนทำให้น้ำผึ้งสามารถเกิดปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลแบบไม่ใช้เอนไซม์หรือที่รู้จักกันดีในนามของ “ปฏิกิริยาเมลลาร์ด” (Maillard reaction)

ปฏิกิริยาเมลลาร์ดมีทั้งประโยชน์และโทษ ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จากปฏิกิริยาเมลลาร์ดเป็นสารสีน้ำตาลที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบเรียกว่า “เมลานอยดิน” (melanoidins) ทำให้ปฏิกิริยานี้มีความสำคัญต่ออาหารบางประเภทเช่น ขนมอบ คาราเมล ทอฟฟี่ เป็นต้น ทั้งนี้เพราะทำให้เกิดสีน้ำตาลในอาหารดังกล่าวและชวนให้บริโภค แต่อย่างไรก็ตามปฏิกิริยานี้ก็มีข้อเสียคือทำให้คุณค่าทางโภชนาการลดลง ถ้าอาหารนั้นมีโปรตีนสูงและได้รับความร้อนสูงด้วยผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเป็นสารก่อมะเร็ง สารผลิตภัณฑ์ชนิดหนึ่งที่สำคัญและเป็นสารพิษดังกล่าวคือ 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ (5-hydroxymethyl-2-furfuraldehyde หรือ HMF) (นิธิยา รัตนาปนนท์. 2549: 324)

ในปัจจุบันแม้ว่าจะมีการควบคุมคุณภาพของยาลูกกลอนอย่างเข้มงวด แต่ก็ยังมีการวางจำหน่ายยาลูกกลอนที่ไม่ได้รับใบสำคัญการขึ้นทะเบียนตำรับยาโดยทั่วไปและยังได้รับความนิยมอย่างมากในหมู่ผู้บริโภค โดยที่ผู้บริโภคส่วนใหญ่มิได้ตระหนักถึงอันตรายจากการ เกิดสารก่อมะเร็งที่เป็นผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลจากน้ำผึ้ง ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของยาลูกกลอน รวมทั้งสารปนเปื้อนต่าง ๆ จากกระบวนการผลิตที่ไม่ได้รับการควบคุมให้ถูกต้องตามมาตรฐาน

ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษากระบวนการเกิดสารก่อมะเร็งจากปฏิกิริยาการเกิดสารสีน้ำตาล และทำการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์สาร 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอร์ฟิวราลดีไฮด์

ซึ่งเป็นสารที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลได้ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง เพื่อนำไปใช้วิเคราะห์ปริมาณสาร HMF ในตัวอย่างยาลูกกลอน โดยที่ปริมาณของ HMF จะเป็นดัชนีชี้วัดการสูญเสียน้ำตาลและกรดอะมิโนจากปฏิกิริยาเมลลาร์ด

ความมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อทำการหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณสาร HMF ในยาลูกกลอน
2. เพื่อศึกษาปัจจัยแปรผันที่มีผลต่อการเกิดสาร HMF ในระบบต้นแบบ โดยศึกษาปัจจัยแปรผัน ต่าง ๆ ดังนี้

2.1 ชนิดของกรดอะมิโน โดยเลือกกรดอะมิโนที่พบปริมาณมากในน้ำผึ้งมาทำการศึกษา 3 ชนิดคือ กรดอะมิโนโพรลีน กรดอะมิโนกลูตามิคและกรดอะมิโนไลซีน

2.2 ชนิดของน้ำตาล โดยเลือกน้ำตาลที่พบปริมาณมากในน้ำผึ้งมาทำการศึกษา 3 ชนิด คือ กลูโคสและฟรักโทส

2.3 อุณหภูมิในการให้ความร้อน โดยทำการแปรผันอุณหภูมิในการให้ความร้อนดังนี้ อุณหภูมิห้อง 40 60 80 100 และ120 องศาเซลเซียส

2.4 เวลาในการให้ความร้อน โดยทำการแปรผันเวลาในการให้ความร้อนดังนี้ ไม่ผ่านการให้ความร้อน 10 20 30 60 และ120นาที

3. เพื่อศึกษาปัจจัยแปรผันที่มีผลต่อการเกิดสาร HMF ในน้ำผึ้ง โดยศึกษาปัจจัยแปรผันต่าง ๆ ดังนี้

3.1 อุณหภูมิในการให้ความร้อน โดยทำการแปรผันอุณหภูมิในการให้ความร้อนดังนี้ อุณหภูมิห้อง 40 60 80 และ100 องศาเซลเซียส

3.2 เวลาในการให้ความร้อน โดยทำการแปรผันเวลาในการให้ความร้อนดังนี้ ไม่ผ่านการให้ความร้อน 20 40 60 80 100 และ120นาที

3.3 ระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำผึ้ง ทำการแปรผันระยะเวลาในการเก็บรักษา ดังนี้ 1 2 3 4 5 6 12 และ 24 เดือน

ความสำคัญของการวิจัย

1. ทราบวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณสาร HMF ที่มีอยู่ในยาลูกกลอน
2. ทราบปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ดในน้ำผึ้งและยาลูกกลอน
3. ทราบผลการแปรผันของชนิดของกรดอะมิโนที่มีผลต่อการเกิดสาร HMF
4. ทราบผลการแปรผันของชนิดของน้ำตาลที่มีผลต่อการเกิดสาร HMF
5. ทราบผลการแปรผันของอุณหภูมิในการให้ความร้อนที่มีผลต่อการเกิดสาร HMF

6. ทราบผลการแปรผันของระยะเวลาในการให้ความร้อนที่มีผลต่อการเกิดสาร HMF
7. ทราบผลการแปรผันของระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำผึ้งที่มีผลต่อการเกิดสาร HMF

ขอบเขตของการวิจัย

1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สาร HMF ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง
2. ศึกษาความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด โดยศึกษาด้วยการใช้กรดอะมิโน 3 ชนิด ได้แก่ โพรลีน, กรดกลูตามิค และไลซีน น้ำตาล 2 ชนิด ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรักโทสและทำการศึกษาผลของอุณหภูมิและเวลาในการให้ความร้อน
3. ศึกษาปัจจัยแปรผันในการเกิดสาร HMF ในน้ำผึ้ง ได้แก่
   3.1 อุณหภูมิในการให้ความร้อน
   3.2 ระยะเวลาในการให้ความร้อน
   3.3 ระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำผึ้ง
4. ทำการวิเคราะห์ปริมาณสาร HMF ในตัวอย่างยาลูกกลอนที่ซื้อจากแหล่งตลาดท่าช้างและท่าพระจันทร์

ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

1. ศึกษาและหาข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับการเกิดสาร HMF ในยาลูกกลอน
2. จัดเก็บตัวอย่างน้ำผึ้ง และยาลูกกลอน
3. เตรียมอุปกรณ์ สารเคมี วัตถุดิบอื่น ๆ ที่ใช้ในการทดลอง
4. วางแผนการทดลองและทำการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สาร HMF ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง
5. ทำการศึกษาปัจจัยในการเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ดในระบบต้นแบบ ได้แก่
   5.1 ชนิดของกรดอะมิโน
   5.2 ชนิดของน้ำตาล
   5.3 อุณหภูมิในการให้ความร้อน
   5.4 ระยะเวลาในการให้ความร้อน
6. ทำการศึกษาปัจจัยในการเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ดในน้ำผึ้ง ได้แก่
   6.1 อุณหภูมิในการให้ความร้อน
   6.2 ระยะเวลาในการให้ความร้อน
   6.3 ระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำผึ้ง
7. ทำการวิเคราะห์ ปริมาณสาร HMF ในตัวอย่างยาลูกกลอน

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ซึ่งจะนำเสนอตามหัวข้อต่อไปนี้

1. ยาลูกกลอน
2. น้ำผึ้ง
3. ปฏิกิริยาเมลลาร์ด
4. งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์สาร HMF ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ยาลูกกลอน

เป็นยาสมุนไพรรูปแบบหนึ่งมีลักษณะเป็นเม็ดกลม ทำจากผงยาสมุนไพรตากแห้งซึ่งอาจเป็นชนิดเดียวหรือหลายชนิดรวมกันก็ได้ จากนั้ นนำมาผสมกับตัวประสานผงยา สำหรับตัวประสานผงยาที่สำคัญและนิยมนำมาใช้มากคือน้ำผึ้ง แล้วจึงนำมาปั้นเป็นเม็ด เหมาะสำหรับสมุนไพรที่มีสารสำคัญละลายในน้ำยาก ทำให้ใช้วิธีต้มหรื อชงไม่ได้หรือใช้กับยาที่มีกลิ่น รสไม่ชวนรับประทาน (สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข. 2541: 7)

ยาลูกกลอนอาจเตรียมไว้ใช้ได้นานถึง 1 เดือน หรือนานกว่านั้น แต่อย่างไรก็ตาม ควรหมั่นตรวจอยู่เสมอว่ายาลูกกลอนยังใช้ได้ ต้องเป็นลูกกลอนที่แห้งสนิท ไม่แตกร่วนหรือเยิ้มติดกันหรือ มีราขึ้น

จากส่วนผสมและกระบวนการผลิตของยาลูกกลอน ทำให้มีน้ำเป็นส่วนประกอบอยู่น้อยจึงให้การแตกตัวของเม็ดยาเกิดได้ช้า ตัวยาจึงออกฤทธิ์ได้นาน น้ำผึ้งที่ใช้ผสมช่วยปรับรสและช่วยบำรุงร่างกายด้วย ยานี้มักใช้เป็นยารักษาโรคเรื้อรังและโรคที่ต้องการบำรุงร่างกายด้วย เนื่องจากมีลักษณะที่รับประทานง่าย พกพาได้สะดวกและเก็บรักษาได้นาน จึงได้รับความนิยมสูงในหมู่ผู้ใช้ยาสมุนไพรไทย แต่มีข้อเสียอยู่ที่ยาลูกกลอนจะต้องใช้น้ำผึ้งเป็นปริมาณมากราคาต้นทุนจึงสูงกว่าปกติ

ขั้นตอนการทำยาลูกกลอนน้ำผึ้ง (ภานุทรรศน์. 2545: 85-92)

1. การเคี่ยวน้ำผึ้ง เพื่อไล่น้ำออกจากน้ำผึ้ง ทำให้เหนียว เม็ดยาจับกันแน่น

1.1 ตวงน้ำผึ้งหนักเท่ากับน้ำหนักของยาผงที่จะใช้ทำลูกกลอนโดยประมาณใส่ลงในหม้อ

1.2 นำหม้อน้ำผึ้งไปตั้งไฟเคี่ยวด้วยไฟแรง คนไปเรื่อยๆจนฟองเดือดเล็กลง ใช้เวลาประมาณ 10-15 นาที ทดลองนำน้ำผึ้งมาหยดลงในน้ำ ถ้าน้ำผึ้งรวมเป็นก้อนแข็งจึงจะใช้ได้ ถ้ายังเหนียวไม่แข็ง ก็เคี่ยวต่อไป ทดลองทำใหม่จนได้ที่ดี

1.3 เติมน้ำสะอาดปริมาณเท่ากับน้ำผึ้งในตอนแรกลงไปเคี่ยวต่อ แล้วลองหยดน้ำผึ้งลงในน้ำ ถ้าน้ำผึ้งจับตัวแข็งเป็นก้อนก็ยกลงจากเตา

1.4 กรองน้ำผึ้งที่เคี่ยวแล้วด้วยผ้ากรอง ในขณะที่ยังร้อนอยู่ และคนต่อไปจนกว่าน้ำผึ้งจะเย็น

2. การผสมน้ำผึ้งกับผงยา

2.1 ชั่งผงยาที่จะทำเม็ดเทลงในภาชนะที่แห้งสะอาด

2.2 ตักน้ำผึ้งที่เคี่ยวแล้วเทราดลงบนผงยาทีละน้อย คลุกเคล้าให้เข้ากับน้ำผึ้งไปเรื่อยๆ จนเนื้อยาเข้ากันดี ทดลองปั้นเม็ดด้วยมือ หากได้ที่ดี ยาจะไม่ติดมือ บีบเม็ดยาดูจะไม่แตกร่วน การคลุกเคล้ายาทำด้วยมือ ควรสวมถุงมือ ถ้ามือไม่แห้ง จะทำให้ยาเกิดเชื้อราได้ง่าย

น้ำผึ้ง

คือน้ำหวานที่ผึ้งเก็บมาจากต่อมน้ำหวานของดอกไม้ (nectar) โดยผึ้งจะกลืนน้ำหวานลงสู่กระเพาะน้ำหวาน ซึ่งจะมีเอนไซม์ช่วยย่อยน้ำหวานแล้วนำมาเก็บไว้ใน หลอดรวงผึ้ง จากนั้นน้ำผึ้งค่อยๆบ่มตัวเองโดยการระเหยน้ำออกไป จนกระทั่งน้ำผึ้งมีปริมาณน้ำตาลที่เข้มข้นขึ้นจนได้ระดับที่เหมาะสมกับการเก็บรักษา ผึ้งงานก็จะปิดฝาหลอดรวง เราเรียกน้ำผึ้งนี้ว่า “น้ำผึ้งสุก” เป็นน้ำผึ้งที่ได้มาตรฐาน จะมีน้ำอยู่ไม่เกิน 20-21 เปอร์เซ็นต์

มนุษย์รู้จักนำน้ำผึ้งมาใช้ในการอุปโภคบริโภคเป็นเวลายาวนานมาก มีการพบหลักฐานยืนยันเป็นภาพวาดบนผนังถ้ำในประเทศสเปนเป็นภาพวาดรูปคนกำลังตีผึ้งเพื่อเอาน้ำผึ้ง ภาพวาดนั้นมีอายุยาวนานกว่า 7,000 ปีก่อนคริสตศักราช นอกจากเป็นอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงแล้วน้ำผึ้งยังมีคุณสมบัติพิเศษอีกมากมาย เช่น สามารถเก็บไว้ได้นานโดยไม่เน่าเสีย เพราะมีความเข้มข้นสูง มีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ ทำให้ชุ่มคอ แก้ไอ ใช้รักษาแผลสดและแผลไฟไหม้

น้ำผึ้งประกอบด้วยน้ำประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลชนิดต่างๆ เช่น กลูโคส ฟรักโทส และเลวูโรส ประมาณ 79 เปอร์เซ็นต์ โดยมีปริมาณน้ำตาล ฟรักโทส มากกว่าน้ำตาลกลูโคสเล็กน้อย ทำให้น้ำผึ้งไม่ตกผลึก และมีรสหวานกว่าน้ำตาลชนิดอื่นๆ กรดชนิดต่างๆ ประมาณ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ทำให้น้ำผึ้งมีรสเปรี้ยวเล็กน้อยโดยกรดที่พบมาก คือ กรดกลูโคนิก วิตามิน (ไรโบเฟลวิน, ไนอะซิน) เอนไซม์ และแร่ธาตุ (แคลเซียม, แมกนีเซียม, โปตัสเซียม, ฟอสฟอรัส) ประมาณ 0.5 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำผึ้งที่มีสีเข้ม จะมีปริมาณแร่ธาตุสูงกว่าน้ำผึ้งที่มีสีอ่อน ซึ่งจะเห็นได้ว่า องค์ประกอบหลักของน้ำผึ้ง คือน้ำตาล และเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ ยวเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งสามารถดูดซึมเข้าสู่ร่างกายและนำไปใช้ประโยชน์ได้ง่าย โดยน้ำผึ้ง 100 กรัม จะให้พลังงาน 303 แคลอรี่ องค์ประกอบหลักของน้ำผึ้งแสดงดังตารางที่ 1

ตาราง 1 องค์ประกอบของน้ำผึ้ง

องค์ประกอบ	ปริมาณ (%)
น้ำ	17.20
ฟรักโทส	38.19
กลูโคส	31.29
ซูโครส	1.31
น้ำตาลอื่น ๆ	8.80
กรดอะมิโน	0.57
เกลือแร่	0.17
ไนโตรเจน	0.04
สารไม่ทราบชนิด	2.43

ที่มา: ดัดแปลงจาก สมนึก บุญเกิด. (2544). *ผึ้ง*. หน้า 109.

น้ำผึ้งที่ดีต้องมีลักษณะเป็นของเหลวข้น เป็นเนื้อเดียวกัน ปราศจากสิ่งแปลกปลอม มีสีตามธรรมชาติตั้งแต่สีเหลืองอ่อนถึงสีน้ำตาล มีกลิ่นรสตามธรรมชาติ ปราศจากกลิ่นรสที่น่ารังเกียจอื่นใด และกลิ่นต้องไม่บูดเปรี้ยวหรือมีฟอง องค์ประกอบของน้ำผึ้งจะมีความแตกต่างกันบ้างเล็กน้อยจากปัจจัยหลาย ๆ ด้าน เช่น ชนิดของผึ้ง สภาวะอากาศ พืชที่เป็นแหล่งน้ำหวานในการผลิตน้ำผึ้ง ฯลฯ

แพทย์ไทยแผนโบราณนิยมใช้น้ำผึ้งช่วยในการแต่งรสยา เนื่องจากน้ำผึ้งมีรสหวานฝาดร้อนเล็กน้อย มี สรรพคุณช่วยบำรุงกำลัง บำรุง ธาตุ แก้ปวดหลัง ปวดเอว ใช้ทำยาอายุวัฒนะ จึงใช้น้ำผึ้งแต่งรสยาบางชนิด เช่น ยาแก้ไข้ที่มีรสขมมาก จนคนไข้กินไม่ได้ เราต้อง ใช้น้ำผึ้งผสมให้มีรสหวานขึ้น ทำให้ยารับประทานง่ายขึ้น นอกจากนี้ยังมีการใช้น้ำผึ้งเป็นน้ำกระสายยาช่วยให้ตัวยาออกฤทธิ์ได้เร็วขึ้น เนื่องจากไปทำให้ตัวยาดูดซึมเร็วขึ้น ช่วยกระตุ้นการทำงานของไต และกระจายเลือด ซึ่งทำให้ผู้ป่วยมีกำลังมากขึ้น หรือบางครั้งนำน้ำผึ้งมาผสมกับยาปั้นเป็นลูกกลอน แต่ผู้ปรุงยาควรนำน้ำผึ้งไปเคี่ยวให้เดือดเพื่อฆ่าเชื้อโรค มิฉะนั้น ยาลูกกลอนจะขึ้นราภายหลัง

ในบางครั้งน้ำผึ้งถูกใช้เป็นยาฆ่าเชื้อเพราะน้ำผึ้งมีความเข้มข้นของน้ำตาลสูง ซึ่งความเข้มข้นของน้ำตาลที่สูงนี้เองจะเป็นการลดปริมาณน้ำที่แบคทีเรียใช้ในการเจริญเติบโต นอกจากนี้น้ำผึ้งยังมีความเป็นกรดสูงและมีปริมาณโปรตีนต่ำ ซึ่งทำให้แบ คทีเรียไม่ได้รับไนโตรเจนที่จำเป็น แต่อย่างไรก็ตามในน้ำผึ้งยังมีสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และสารแอนตี้ออกซิแดนท์ซึ่งมีคุณสมบัติในการช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียอีกด้วย ดังนั้นเมื่อเราใช้น้ำผึ้งทาบาดแผลจึงสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้และทำให้แผลไม่เกิดการอักเสบ (แสนนัด หงษ์ทรงเกียรติ. 2531: 221-240)

โดยทั่วไปน้ำผึ้งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องควบคุมคุณภาพ ดังนั้นการตรวจสอบคุณภาพน้ำผึ้งในต่างประเทศนิยมใช้ การตรวจสอบหาปริมาณสารตกค้างประเภทไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ (HMF) เพื่อเป็นดัชนีบ่งบอกคุณภาพของน้ำผึ้ง โดยในน้ำผึ้งธรรมชาติที่เป็นน้ำผึ้งใหม่ไม่ควรมีสารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ แต่ถ้ามีก็ไม่ควรเกิน 1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (Codex Alimantarius. 1993: 23) แต่สารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์จะตรวจพบได้มากในกรณีเก็บน้ำผึ้งเป็นเวลานาน ซึ่งในประเทศแถบทวีปยุโรป เช่น ประเทศเยอรมัน เบลเยี่ยม อิตาลี ออสเตรีย สเปน จะมีกฎหมายควบคุมโดยมีเกณฑ์กำหนดว่าน้ำผึ้งควรมีปริมาณสารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ได้สูงสุดไม่เกิน 15 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (AOAC. 2000: 44)

ปฏิกิริยาการเกิดสารสีน้ำตาล (Brownning reaction)

เป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้กับอาหารหลากหลายชนิด เช่น การปอกเปลือกแอ๊ปเปิ้ลหรือมันฝรั่งทิ้งไว้ หรือการที่เห็ดบางชนิดเปลี่ยนสีไป ปฏิกิริยาการเกิดสารสีน้ำตาลเป็นปฏิกิริยาทางเคมีที่ค่อนข้างสลับซับซ้อนเนื่องจากเกิดจากหลาย ๆ ปฏิกิริยารวมกัน โดยจะแตกต่างกันออกไปตามชนิดของอาหาร แต่สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท คือ การเกิดสีน้ำตาลที่เร่งด้วยเอนไซม์ (enzymatic browning) และการเกิดสีน้ำตาลที่ไม่อาศัยเอนไซม์ (non- enzymatic browning)

การเกิดสีน้ำตาลที่เร่งด้วยเอนไซม์

การเกิดสีน้ำตาลประเภทนี้ พบมากในผัก ผลไม้สด และน้ำผลไม้ โดยเกิดกับผลไม้ที่ช้ำ มีรอยแตก ผลไม้ถูกปอกเปลือกหรือหั่น สารประกอบฟีนอลิกในเซลล์ซึ่งเป็นสับสเตรท (substrate) จะทำปฏิกิริยากับเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส(polyphenoloxidase, PPO) ซึ่งจะเริ่มจากการเกิดไฮดรอกซิเลชันของสารประกอบโมโนฟีนอลิกไปเป็นออโท-ไดฟีนอล (*O*-diphenol) และถูกออกซิเดชันต่อไปเป็นออโท-ควิโนน (*O*–quinone) จากนั้นจะทำปฏิกิริยาแบบไม่มีเอนไซม์เกี่ยวข้องกับสารประกอบต่าง ๆ รวมทั้งสารประกอบฟีนอลิกและกรดอะมิโน ทำให้เกิด ผลิตภัณฑ์เป็นรงควัตถุประเภทต่าง ๆ

การเกิดสีน้ำตาลที่ไม่อาศัยเอนไซม์

เป็นปฏิกิริยาที่ไม่มีเอนไซม์เข้ามาเกี่ยวข้อง สามารถแบ่งได้เป็นสองประเภทคือ ปฏิกิริยาคาราเมลไลเซชัน (caramelization) และปฏิกิริยาเมลลาร์ด (maillard reaction)

คาราเมลไลเซชัน

เป็นปฏิกิริยาที่อาศัยความร้อนในการแยกสลายโมเลกุล (thermolysis) และเกิดพอลิเมอร์ของสารประกอบคาร์บอน ได้เป็นสารสีน้ำตาล โดยมีน้ำตาลเท่านั้นที่เป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยา

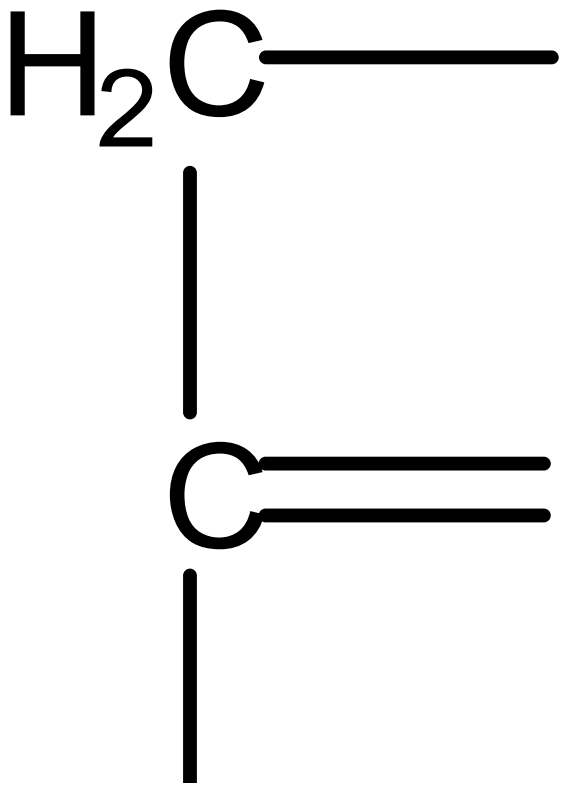
ปฏิกิริยาเมลลาร์ด

เป็นปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลแบบไม่ใช้เอนไซม์แบบหนึ่ง โดยที่ การเปลี่ยนสีเป็นผลมาจากปฏิกิริยาของหมู่คาร์บอนิล (carbonyl group) และหมู่อะมิโนที่เป็นอิสระซึ่งนำไปสู่การเกิดเม็ดสีน้ำตาลของเมลานอยดิน (melanoidin) การเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ดเป็นการจำกัดอายุการเก็บของน้ำผักและผลไม้ ผักและผลไม้แห้งหลายชนิด และผลิตภัณฑ์จากส้ม การเกิดสีน้ำตาลแบบไม่ใช้เอนไซม์ในอาหารนั้นจะเกิดได้มากน้อยขึ้นอยู่กับสารตั้งต้นของการเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด (maillard precursor) หรือวิตามินซี pH ออกซิเจน เวลาและอุณหภูมิในการเก็บรักษา (Wong. 1989: 285-293)

การเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ดเกิดขึ้นตามขั้นตอนดังนี้ น้ำตาลรีดิวก์ทั้งคีโตสและแอลโดสจะรวมกับหมู่อะมิโนได้เป็นไกลโคซิลเอมีน (*N*-substituted glycosylamine) เกิดปฏิกิริยาดีไฮเดรชันได้เป็นอิมีน (imine) จากนั้นมีการจัดเรียงตัวใหม่ เรียกว่า Amadori rearrangement ได้เป็นแอลโดซามีน(aldosamine) หรือ คีโตสเอมีน (ketosamine) เรียกว่า Amadori product เกิดปฏิกิริยา enolization ของ Amadori products แล้วได้เป็นคีโตสเอมีนหรือไดอะมิโนซูการ์ ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยาดีไฮเดรชันต่อไปได้เป็นอนุพันธ์ของฟูแรน (furan) ถ้าเป็นน้ำตาลเฮกโซส อนุพันธ์ฟูแรนที่ได้มีชื่อว่า 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอรัลดีไฮด์ (5-hydroxymethyl-2-furaldehyde หรือ (HMF) (นิธิยา รัตนาปนนท์. 2549. 324) กระบวนการเกิดปฏิกิริยาแสดงดังภาพประกอบ 1และ 2

ภาพประกอบ 1 ปฏิกิริยาเมลลาร์ดเบื้องต้นแสดงการเกิดไกลโคซิลเอมีน และสารประกอบอะมาโดริ

ที่มา: วรรณา ตุลยธัญ. (2549). *เคมีอาหารของคาร์โบไฮเดรต*. หน้า 57



ภาพประกอบ 2 วิถีของปฏิกิริยาแสดงการสลายตัวของสารประกอบอะมาโดริให้ได้สาร HMF

ที่มา: วรรณา ตุลยธัญ. (2549). *เคมีอาหารของคาร์โบไฮเดรต*. หน้า 58

อนุพันธ์วงแหวนฟูแรน เช่น HMF จะเกิดพอลิเมอไรซ์อย่างรวดเร็วได้เป็นสารสีน้ำตาล ที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย และไม่ละลายน้ำ ซึ่งต่างจากการเกิดคาราเมลไลเซชันที่มีน้ำตาลเพียงอย่างเดียวพบได้ในอาหารที่มีน้ำตาลรีดิวส์ซิง กรดอะมิโน โปรตีน หรือสารประกอบไนโตรเจน สารสีน้ำตาลที่เกิดขึ้นนี้เรียกว่า เมลานอยดิน (นิธิยา รัตนาปนนท์. 2549: 324)

ปฏิกิริยาเมลลาร์ดทำให้เกิดสารสีน้ำตาล ซึ่งเป็นการเพิ่มรสชาติและกลิ่นกับผลิตภัณฑ์บางชนิด เช่น ขนมอบ คาราเมล ทอฟฟี่ เป็นต้น นอกจากนี้ยังได้มีการนำสาร HMF มาเปลี่ยนเป็นหน่วยย่อยของโปรตีนของพอลิเอสเตอร์ซึ่งอาจนำไปสู่การผลิตพลาสติกได้ และยังได้มีการนำ HMF มาผลิตเป็นพลังงานทดแทนเพื่อใช้แทนน้ำมันดีเซลอีกด้วย แต่ปฏิกิริยาเมลลาร์ด ทำให้เกิดการสูญเสียคุณค่าทางอาหาร เนื่องจากใช้น้ำตาลและกรดอะมิโนในการเกิดปฏิกิริยา นอกจากนั้นหากเป็นอาหารที่มีโปรตีนสูงและได้รับความร้อนสูงด้วย ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจะเป็นสาร heterocyclic amine ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง (นิธิยา รัตนาปนนท์. 2549: 326)

ปริมาณของสาร 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอรัลดีไฮด์หรือ HMF นั้นจะใช้เป็นดัชนีวัดอัตราการเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด เนื่องจากเป็นสารมัธยันต์ซึ่งเกิดขึ้นในขั้นตอนหนึ่งของปฏิกิริยาเมลลาร์ด ซึ่งค่าที่ได้สามารถแสดงถึงการสูญเสียคุณค่าทางโภชนาการของอาหารที่เกิดขึ้นได้ นอกจากนี้ยังมีการรายงานผลการวิจัยออกมาว่าสาร 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอรัลดีไฮด์ และอนุพันธ์ของมัน (5-chloromethyl and 5-sulphidemethylfurfural) มีความเป็นพิษต่อเซลล์และสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต รวมทั้งยังมีความเกี่ยวพันกับการเกิดโรคมะเร็ งในลำไส้ ตับ และผิวหนังอีกด้วย (Spano, Nadia.; et al. 2006: 1390-1395)

เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

เป็นเทคนิคการวิเคราะห์สารเชิงคุณภาพวิเคราะห์และปริมาณวิเคราะห์ ที่นิยมใช้มากวิธีหนึ่ง โดยสามารถใช้กับงานด้านต่าง ๆ อย่างกว้างขวาง เช่นในการวิเครา ะห์ทางอาหารและยาทางด้านการแพทย์ สมุนไพร และทางด้านสิ่งแวดล้อม เป็นต้น สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณต่ำๆ ได้ในระดับไมโครกรัม (µg) ถึงพิโคกรัม (pg) เมื่อเลือกใช้เครื่องตรวจวัดที่เหมาะสม

เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงทำงานโดยใช้เครื่องสูบแรงดันสูง สูบตัวทำละลายซึ่งทำหน้าที่เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) พาสารตัวอย่างที่ถูกฉีดเข้าทางช่องฉีดสารผ่านอนุภาคที่เป็นวัฏภาคคงที่ (stationary phase) ซึ่งบรรจุอยู่ในคอลัมน์ สารตัวอย่างจะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์และถูกแยกออกมา ผ่านเข้าสู่เครื่องตรวจวัด ในเวลาที่ต่างกัน สัญญาณที่วัดได้จะอยู่ในรูปสัญญาณไฟฟ้าตามเวลาและปริมาณของสารแต่ละตัวที่ตรวจวัดได้ จากนั้นสัญญาณจะถูกส่งไปยังเครื่องบันทึกสัญญาณ เพื่อแสดงผลออกมาเป็นโครมาโทแกรม

กระบวนการแยกจะเกิดขึ้นระหว่างวัฏภาค 2 วัฏภาค คือ สารละลายถูกฉีดเข้าไปยังวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่ไหลผ่านช่องฉีดสาร สารตัวอย่างจะไหลไปพร้อมวัฏภาคเคลื่อนที่ องค์ประกอบสารที่แพร่ไป จะเกิดอันตรกิริยากับวัฏภาคคงที่ทำให้เกิดการแยกตัวขององค์ประกอบในตัวอย่าง

ส่วนประกอบที่สำคัญของเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ได้แก่ ขวดบรรจุ วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase reservoir) ระบบกำจัดฟองก๊าซ (degasser) เครื่องสูบแรงดันสูง (high pressure pump) ระบบฉีดสาร (sample injection) คอลัมน์ (column)และตัวตรวจวัด (detector)

1. ขวดบรรจุวัฏภาคเคลื่อนที่ - เป็นภาชนะใช้บรรจุวัฏภาคเคลื่อนที่
2. ระบบกำจัดฟองก๊าซ- เป็นอุปกรณ์ในการกำจัดฟองอากาศในสารละลาย
3. เครื่องสูบแรงดันสูง เนื่องจากในการแยกสารผสมในเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง จะอาศัยหลักการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ผ่านวัฏภาคคงที่ ที่มีขนาดอนุภาคเล็กมาก จึงทำให้เกิดความต้านทานการไหล ระบบเครื่องสูบแรงดันสูงจึงมีความสำคัญมากในการที่จะทำให้เกิดความดันสูงเพื่อที่จะเอาชนะแรงต้านทาน
4. ระบบฉีดสาร เป็นอุปกรณ์ในการฉีดสารตัวอย่างมีทั้งแบบแมนัล (manual) และแบบอัตโนมัติ (automate)
5. คอลัมน์ มี 2 ชนิดคือ

คอลัมน์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ มีความยาวประมาณ 10-30 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในช่วง 4-10 มิลลิเมตร วัสดุที่ใช้ทำภาชนะบรรจุ เช่น เหล็กไร้สนิม (stainless steel) พอลีเอทิลีน (polyethylene) หรือแก้ว PEEK เป็นต้น สำหรับส่วนที่เป็นสารที่บรรจุภายในคอลัมน์ (packing material) ที่บรรจุอยู่ภายใน ได้แก่ silica-based resins gels bonded-phases เป็นต้น

การ์ดคอลัมน์ นิยมต่อระหว่างส่วนระบบฉีดสารและส่วนของคอลัมน์ซึ่งจะทำหน้าที่กรองอนุภาคหรือสิ่งสกปรกที่ปนเปื้อนมากับสารตัวอย่างรวมทั้งตัวทำละลาย เพื่อช่วยยืดอายุการใช้งานของคอลัมน์ โดยส่วนที่เป็นสารที่บรรจุภายใน จะคล้ายคลึงกับที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์

6. ตัวตรวจวัด เป็นเครื่องตรวจวัดสัญญาณสำหรับเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง เครื่องตรวจวัดที่นิยมใช้ ได้แก่

6.1 อัลตราไวโอเลต-วิสิเบิล ดีเทคเตอร์ (Ultraviolet-Visible detector): เช่น ไดโอดอาร์เรย์ดเทคเตอร์ (diode array detector) เป็นตัวตรวจวัดที่วัดค่าการดูดกลืนแสงของสาร สามารถวัดได้ทีละหลายความยาวคลื่นในเวลาเดียวกัน และวัดได้ตั้งแต่ 190-900 นาโนเมตร ระบบการเดินทางของแสงจะเป็นแบบย้อนแสง แสงจากแหล่งกำเนิดแสงจะผ่านไปยัง flow cell ก่อนที่จะผ่านไปยัง โมโนโครเมเตอร์ (monochromator) คือ สลิท (slit) และเกรตติง (grating) เมื่อแสงตกกระทบบนเกรตติง แสงจะกระจายออกเป็นความยาวคลื่นต่างๆ แล้วไปตกกระทบบนแผงของไดโอดอาร์เรย์ ตรวจวัดสัญญาณออกมาเป็นโครมาโทแกรม ตัวตรวจวัดชนิดนี้สามารถเก็บข้อมูลสเปกตรัมของ พีกต่างๆ ของโครมาโทแกรมและสามารถนำออกมาใช้งานได้ตลอดเวลา

6.2 ฟลูออเรสเซนซ์ ดีเทคเตอร์ (Fluorescence detector): เป็นตัวตรวจวัดที่มีความไวและความเฉพาะเจาะจง (selective) สูง โดยจะวัดแสงฟลูออเรสเซนซ์ ที่ได้ออกมาจากตัวอย่าง ที่ถูกกระตุ้น (excited) ด้วยแสงยูวี โดยที่แสงยูวีจากแหล่งกำเนิดแสงผ่านโมโนโครเมเตอร์ เพื่อให้แสงที่มีความยาวคลื่นตามต้องการแล้วเข้าไปยังโฟลเซลล์ (flow cell) ที่มีสารตัวอย่างที่ออกมาจากคอลัมน์ เมื่อตัวอย่างถูกกระตุ้นจะปล่อยแสงออกมาทุกทิศทาง แต่จะมีแสงที่ทำมุม 90 องศาเท่านั้นซึ่งเป็นความยาวคลื่นเฉพาะผ่านไปยังฟิลเตอร์ ตัดแสงที่ไม่ต้องการออกจากนั้นจึงผ่านเข้าไปยัง โฟโตเซลล์ (photo cell) ตรวจวัดสัญญาณออกมาเป็นโครมาโทแกรม ดังนั้นทั้งความยาวคลื่นในการกระตุ้น (excitation) และการคายแสง (emission) จึงเป็นความยาวคลื่นที่เป็นลักษณะจำเพาะกับตัวอย่างนั้นๆเท่านั้น

6.3 รีแฟรกทีฟอินเด็กซ์ ดีเทคเตอร์ (Refractive index detectors) (RI detector): ใช้วัดปริมาณสารใดก็ตามที่มีค่าดรรชนีหักเหแตกต่างจากวัฏภาคเคลื่อนที่ นั่นคือจะเกิดความแตกต่างกันระหว่างเซลล์อ้างอิง (reference cell) (มีวัฏภาคเคลื่อนที่ไหลผ่าน) และเซลล์ตัวอย่าง (sample cell) (มีสารตัวอย่าง) ภายในตัวตรวจวัด จึงทำให้ได้ค่าดรรชนีหักเหที่ต่างกัน ทำให้ตรวจวัดสัญญาณได้

6.4 อิเล็กโทรเคมีคอล ดีเทคเตอร์ (Electrochemical detectors): ใช้วัดการสูญเสียหรือได้รับอิเล็กตรอนของสารที่ออกมาจากคอลัมน์

6.5 คอนดักติวิตี้ ดีเทคเตอร์ (Conductivity detectors): ใช้วัดความสามารถในการนำไฟฟ้าของสารที่ต้องการวิเคราะห์

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์ HMF

คาริล และคนอื่น ๆ (Khalil; et al. 2010: 2388-2392) ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ HMF ในน้ำผึ้งที่จำหน่ายในประเทศมาเลเซีย 9 ตัวอย่างโดยผ่านการเก็บรักษาเป็นระยะเวลาต่าง ๆ กัน ด้วยวิธีการวิ เคราะห์ 3 วิธีคือ 1. ใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง 2. ใช้เทคนิคสเปกโทรโฟโตเมทรี และ 3. ใช้วิธีของวิงเคอร์ (Wrinkler method) พบว่าน้ำผึ้งที่ผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 3-6 เดือนมีปริมาณสารประกอบ HMF อยู่ในช่วง 2.80–24.87 mg/kg (ค่ามาตรฐานสากลกำหนดไว้ที่ 80 mg/kg) แต่น้ำผึ้งที่ผ่านการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 12-24 เดือนให้ค่าปริมาณสารประกอบ HMF เกินค่ามาตรฐานกำหนดคืออยู่ในช่วง 128.19–1131.76 mg/kg

ดัวร์แมส และกู๊กเมน (Durmas; & Gokmen 2010: 912-916) ทำการสกัดน้ำมันจากพืชที่มีเมล็ดให้น้ำมัน 7 ชนิด ด้วยเทคนิค การสกัดของเหลว-ของเหลว (liquid–liquid extraction) โดยใช้สารละลายเมทานอลร้อยละ 70เป็นตัวทำละลาย นำไปผ่านความร้อนที่ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ HMF และ 2-เฟอร์ฟิวราล(2-furfural)

ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้ สารละลายกรดฟอร์มิก 10 มิลลิโมล่าห์ กับอะซิโตไนทริล ในอัตราส่วนร้อยละ 90:10 โดยปริมาตร และตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 285 นาโนเมตร พบว่ามีปริมาณสารประกอบ HMF อยู่ในช่วง 0.8-13.8 mg/kg และพบ 2-เฟอร์ฟิวราล อยู่ในช่วง 1.4-8.7 mg/kg

ลาโอควี และคนอื่น ๆ (Laroque; et al. 2008: 1032-1042) ได้ทำการศึกษาอัตราการเกิดปฏิกิริยาเมลล์ลาร์ดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส pH 6.5 โดยใช้ชนิดของน้ำตาลเป็นปัจจัยแปรผันซึ่งใช้น้ำตาล 5 ชนิดในการทดลองคือ ไรโบส ไซโลส อะราบิโนส กลูโคส และฟรักโทส โดยทำปฏิกิริยาที่สภาวะข้างต้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำมาวิเคราะห์ปริมาณสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิค size-exclusion chromatography และทำการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 294 นาโนเมตร พบว่าน้ำตาลทั้ง 5 ชนิดมีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาเป็นลำดับดังนี้ ฟรักโทส ~ กลูโคส <อะราบิโนส < ไซโลส < ไรโบส

สุธาสินี และคนอื่นๆ (Suthasinee; et al. 2550: ไม่ปรากฏเลขหน้า) ได้ศึกษาสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ในน้ำผึ้งด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง และศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดไฮดรอกซีเมทิลเฟอฟูรอลซึ่งเป็นสารมัธยันต์ของปฏิกิริยาเมลลาร์ดในน้ำผึ้งได้แก่ แสงสว่าง เวลา และอุณหภูมิ นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาปริมาณของน้ำตาลและกรดอะมิโนซึ่งเป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยาเมลลาร์ดโดยการวิเคราะห์น้ำตาลใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบแลกเปลี่ยนไอออน และ การวิเคราะห์กรดอะมิโนหลังการทำอนุพันธ์ด้วย 9-ฟลูออรีนิลเมทิล คลอโรฟอร์เมท (FMOC-Cl) โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง พบว่าสีและปริมาณของไฮดรอกซีเมทิลเฟอฟูราลของตัวอย่างน้ำผึ้งเพิ่มขึ้นเมื่อเก็บไว้นาน และเพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิที่เก็บ ในขณะที่น้ำตาลรีดิวซ์ซิ่ง(กลูโคสและ ฟรักโทส) และกรดอะมิโนมีปริมาณลดลง

สปาโน่ และคนอื่นๆ (Spano; et al. 2006: 1390-1395) ได้ทำการวิเคราะห์ 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ในตัวอย่างน้ำผึ้งที่ได้จากต้นสตรอเบอรี่ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง พบว่าในน้ำผึ้งตัวอย่างมีปริมาณ HMF อยู่ในช่วง 5-140 mg/kg โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้อยู่ที่ 1.9 mg/kg

อัลเคเซอร์ และคนอื่นๆ (Alcazar; et al. 2006: 22-28) ได้ทำการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์สารประกอบ 2-เฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ และ5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ในเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้คอลัมน์แบบ C-18 และทำการชะสารด้วยสารละลายผสมของน้ำกับอะซิโตไนทริล พบว่าวิธีการนี้มีค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ในช่วง 98-103% โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้อยู่ที่ 0.005 µg/ml

เอเมอร์ และคนอื่น ๆ (Ameur; et al. 2006: 790-796) สนใจการเกิดสารประกอบ HMF ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการให้ความร้อนอาหาร เนื่องจากมีรายงานการวิจัยอื่น ๆ ว่าเป็นสารก่อมะเร็ง จึงได้ทำการวิเคราะปริมาณสารประกอบ HMF ในผลิตภัณฑ์อาหารจากธัญพืช (cereal) ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 284 นาโนเมตร ผู้วิจัยใช้สารละลายโซเดียมอะซิเตตต่อสารละลายเมทานอลในอัตราส่วนร้อยละ 80:20 โดยปริมาตร

เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ พบว่าปริมาณ HMF มีความสัมพันธ์เชิงเส้นแบบเอ็กโพเนนเชียลกับอุณหภูมิในการให้ความร้อน และปริมาณ HMF ที่ตรวจพบในตัวอย่างอาหารอยู่ในช่วง 0.5-74.6 ppm

ฮีนาเรส และคนอื่น ๆ (Henares; et al. 2006: 63-69) ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ HMF furfural และ glucosylisomaltol (GIM) ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารเช้าจากธัญพืช 60 ชนิดด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยทำการตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และใช้น้ำต่ออะซิโตไนทริลในอัตราส่วนร้อยละ 95:5 โดยปริมาตรเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่

โทซิ และคนอื่น ๆ (Tosi; et al. 2002: 71-74) ทำการศึกษาผลของอุณหภูมิกับเวลาในการให้ความร้อนน้ำผึ้งต่อปริมาณสารประกอบ HMF โดยให้อุณหภูมิในการให้ความร้อนอยู่ในช่วง 100-160 องศาเซลเซียส และเวลาในการให้ความร้อนที่ 0-90 วินาที พบว่าระยะเวลาในการให้ความร้อนกับน้ำผึ้งมีความสัมพันธ์เชิงเส้นแบบเอ็กโพเนนเชียลกับปริมาณสาร HMF แต่ที่อุณหภูมิต่ำ ๆ ความชันของกราฟจะน้อยกว่าที่อุณหภูมิสูง ๆ แสดงว่าที่อุณหภูมิต่ำการเกิดสารประกอบ HMF จะมีปริมาณน้อยกว่าที่อุณหภูมิสูงและมีอัตราการเพิ่มปริมาณต่ำกว่า

เฟอร์เซอร์ และคนอื่น ๆ (Ferrer; et al. 2002: 85-95) ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบเฟอร์ฟิวรารที่เปลี่ยนแปลงไปในกระบวนการให้ความร้อนและการเก็บรักษาน้ำนมด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง จากการศึกษาพบว่าปริมาณสารประกอบ 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ (HMF), 2-เฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ (F) และ HMF+F มีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ โดยผู้วิจัยให้เหตุผลว่ามีสาเหตุมาจากความแตกต่างของโปรตีนและธาตุเหล็กในน้ำนม

พรพิมล และ คนอื่นๆ (Pornpimol; et al. 2547: 811-817) ได้ศึกษาการเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ดที่เกิดขึ้นในระบบต้นแบบโดยใช้น้ำตาลมาตรฐานกลูโคส แลคโทส ซูโครส กับ กรดอะมิโนมาตรฐาน ไลซีน ซิสเตอีน ที่นำมาให้ความร้อนที่อุณห ภูมิต่างๆ เพื่อศึกษาความไวในการเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด โดยวิเคราะห์หาปริมาณ 5–ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอฟิวราลดีไฮด์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง พบว่ากรดอะมิโนซิสเตอีนมีความไวในการทำปฏิกิริยากับน้ำตาลทั้ง 3 ชนิดมากกว่า กรดอะมิโนไลซีน ที่สภาวะเดียวกัน

โนเซล และคนอื่นๆ (Nozal; et al. 2001: 95-103) ทำการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารประกอบ 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอร์ฟิวราลดีไฮด์, 2-เฟอร์ฟิวราลดีไฮด์, ฟิวแรน-2-คาร์บอกซิลิกแอซิด, ฟิวแรน-3-คาร์บอกซิลิคแอซิค, ฟิวแรน-3-คาร์บอกซาลดีไฮด์ และ 2-อะมิโนเบนโซอิคแอซิคเมทิลเอสเทอร์ในน้ำผึ้งด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยได้ทำการกำจัดสิ่งรบกวนและสารปนเปื้อนทิ้งด้วยวิธีการสกัดแบบของแข็งแบบย่อส่วน จากนั้นจึงนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ซึ่ง ทำการชะสารด้วยสารละลายผสม A คือ 1% สารละลายกรดอะซิติกต่ออะซิโตไนทริลในอัตราส่วนร้อยละ 97:3 โดยปริมาตร และสารละลายผสม B คือ อะซิโตไนทริลต่อ น้ำในอัตราส่วนร้อยละ 50:50 โดยปริมาตร ทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยตัว

ตรวจวัดแบบอัลตราไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น 250 นาโนเมตร และยังได้นำไปประยุกต์ใช้กับตัวอย่างยาที่ได้จากพืชอีกด้วย

กู๊กเมนและเอคาร์ (Gokmen; & Acar 1999: 69-74) ได้ทำการตรวจวิเคราะห์สารประกอบ 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ และพาทูลีนในน้ำแอ๊ปเปิ้ลด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดย ตัวตรวจวัดแบบไดโอดอะเรย์ ทำการชะสารด้วยสารละลายผสมของ น้ำต่ออะซิโตไนทริลในอัตราส่วนร้อยละ 99:1 โดยปริมาตร ด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ได้ค่าร้อยละการกลับคืนของ HMF อยู่ในช่วง 86-100 โดยมีค่าเฉลี่ยที่ร้อยละ 94 และมีค่าร้อยละการกลับคืนของพาทูลีนอยู่ในช่วง 94-125 โดยมีค่าเฉลี่ยที่ร้อยละ 103 วิธีนี้ให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ น้อยกว่า 0.01มิลลิกรัมต่อลิตรของสาร HMF และน้อยกว่า 5 ไมโครกรัมต่อลิตรของสารพาทูลีนในตัวอย่างน้ำแอ๊ปเปิ้ล

สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณสาร HMF ในยาต่าง ๆ ยังไม่มีรายงาน โดยเฉพาะในยาลูกกลอนแบบไทย ซึ่งคนไทยยังมีการบริโภคยาประเภทนี้อยู่มาก แต่ยาลูกกลอนส่วนใหญ่มักไม่ได้รับการควบคุมคุณภาพ โด ยเฉพาะอย่างยิ่งการศึกษาหาปริมาณ HMF ที่อาจเป็นผลจากน้ำผึ้งที่เป็นตัวประสานผงยาสมุนไพรเป็นสิ่งที่น่าสนใจเนื่องจากอาจเป็นข้อมูลที่สำคัญเกี่ยวกับระดับสารอันตรายที่อาจตรวจพบได้ในยาลูกกลอน

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมี

- เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง จากบริษัท Hewlett-Packard รุ่น HP 1100 โดยใช้คอลัมน์ C18 (Bondclone 10 μm ขนาด 300 x 3.90 mm) และใช้ตัวตรวจวัดแบบไดโอดอาร์เรย์
- เครื่องผลิตน้ำปราศจากไอออน จากบริษัท Millipore รุ่น Milli-Q
- เครื่องชั่งอย่างละเอียด จากบริษัท PRECISA รุ่น 220A
- เครื่องอังไอน้ำ ยี่ห้อ Buchii
- เยื่อกรองเซลลูโลสอะซิเตตและเยื่อกรองไนลอนขนาด 0.45 ไมครอน
- สารมาตรฐานไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ (จากบริษัท Fuka เกรดโครมาโทกราฟี)
- $K_4Fe(CN)_6 . 3H_2O$ (AR grade จากบริษัท Fuka)
- $Zn(OAc)_2 . 2H_2O$ (AR grade จากบริษัท Fuka)
- อะซิโตไนทริล (acetonitrile) (HPLC grade)
- ตัวอย่างน้ำผึ้ง ยี่ห้อ จิตรลดา
- ตัวอย่างยาลูกกลอนจากตลาดท่าช้างและท่าพระจันทร์จำนวน 28 ตัวอย่าง ดังนี้

  1.ยาคลายเส้นวัดโพธิ์ เม็ดกลมสีดำขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 มิลลิเมตร มีสรรพคุณรักษาโรคปวดเมื่อย อัมพฤกษ์

  2.ยาเหงือกปลาหมอ เม็ดกลมสีดำขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 มิลลิเมตร รักษาอาการปวดเมื่อย

  3.ยาทานตะวัน เม็ดกลมสีดำขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 มิลลิเมตร บำรุงกำลัง แก้อ่อนเพลีย

  4.ยาสมุนไพรกระชายดำ เม็ดกลมสีดำขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 มิลลิเมตร บำรุงร่างกาย แก้ท้องอืดท้องเฟ้อ ขับลม

  5.ยาอมรสฟ้าทลายโจร เม็ดกลมสีดำขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3 มิลลิเมตร บรรเทาอากการไอ แก้เจ็บคอ

  6.ยาฟ้าทะลายโจร เบอร์ 51 เม็ดกลมสีเขียวขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3 มิลลิเมตร รักษาอาการเจ็บคอ ไอ

7.ยาพยัพเมฆ เม็ดกลมสีดำขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 มิลลิเมตร รักษาอาการปวดเมื่อย บำรุงกำลัง
8.ยาสมุนไพรขมิ้นชัน เม็ดกลมสีน้ำตาลแดงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 มิลลิเมตร ช่วยย่อยอาหาร บำรุงตับ
9.ยาสมุนไพรแฮ้ม เม็ดกลมสีเขียวปนดำขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 มิลลิเมตร รักษาอาการอัมพฤกษ์ อัมพาต
10.ยาสมุนไพรหญ้าใต้ใบ เม็ดกลมสีดำขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 7 มิลลิเมตร แก้พิษไข้ นอนไม่หลับ
11.ยาแก้ปวดข้อเบอร์ 7 เม็ดกลมสีดำขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 มิลลิเมตร รักษาอาการปวดเมื่อยตามข้อ
12.ยาแก้เส้นเอ็น กล้ามเนื้อ กระดูก เบอร์ 23 เม็ดกลมสีดำขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 มิลลิเมตร รักษาอาการปวดเมื่อย คลายเส้น คลายกล้ามเนื้อ
13.ยาเก้าทิพย์ แก้ริดสีดวงทวาร เบอร์ 27 เม็ดกลมสีน้ำตาลขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 มิลลิเมตร รักษาอาการริดสีดวงทวาร
14.ยาเหงือกปลาหมอขนานพิเศษ เบอร์ 23 เม็ดกลมสีดำขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 มิลลิเมตร รักษาอาการปวดเมื่อย
15.ยาอมเบญจรส เม็ดกลมสีน้ำตาลขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3 มิลลิเมตร รักษาอาการเจ็บคอ บรรเทาอาการไอ
16.ยาแก้ไอมะขามป้อมเม็ดกลมสีน้ำตาลขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3 มิลลิเมตร แก้ไอ แก้เจ็บคอ
17.ยาอมสมุนไพรรสส้มเม็ดกลมสีส้มขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3 มิลลิเมตร แก้ไอ แก้เจ็บคอ
18.ยาอมมะแว้งเม็ดกลมดำขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3 มิลลิเมตร แก้ไอ แก้เจ็บคอ
19.ยาพิมานทิพย์ เม็ดกลมสีส้มขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 มิลลิเมตร บำรุงกำลัง แก้อัมพฤกษ์ อัมพาต
20.ยาฟ้าฟื้น เม็ดกลมสีส้มขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 มิลลิเมตร บำรุงกำลัง แก้อัมพฤกษ์ อัมพาต
21.ยาแก้ปวดเมื่อย เบอร์ 19 เม็ดกลมสีดำขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 มิลลิเมตร รักษาอาการปวดเมื่อย
22.ยาขับลม 108 เม็ดกลมสีดำขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 มิลลิเมตร ช่วยขับลม แก้จุกเสียด

23.ยาขมชนิดเม็ด เม็ดกลมแบนสีเขียวขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3 มิลลิเมตร แก้ไข้ตัวร้อน เป็นยาระบายอ่อน ๆ

24.ยาบำรุงธาตุ เบอร์ 5 เม็ดกลมสีดำขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 มิลลิเมตร บำรุงร่างกาย บำรุงกำลัง

25.ยาอมรสบ๊วย เม็ดกลมน้ำตาลขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3 มิลลิเมตร แก้ไอ แก้เจ็บคอ

26.ยาคลายเส้น เม็ดกลมสีส้มขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 มิลลิเมตร บำรุงกำลัง แก้อัมพฤกษ์ อัมพาต

27.ยาขมชนิดเม็ด เม็ดกลมแบนสีน้ำตาลเขียวขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 7 มิลลิเมตร แก้ร้อนใน ลดไข้ เป็นยาระบาย

28.ยาประดง เม็ดกลมสีส้มขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 มิลลิเมตร บำรุงธาตุ แก้ผื่นคัน

วิธีดำเนินการวิจัย

ตอนที่ 1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน HMF

ชั่งสารมาตรฐาน HMF 0.5000 กรัม นำมาเติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 500 มิลลิลิตร ผสมจนได้สารละลายที่เป็นเนื้อเดียวกัน จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 1,000 ppm นำไปเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส ก่อนที่จะนำไปใช้เป็นสารละลายมาตรฐานตั้งต้น

วิธีการทดลอง

เตรียมสารละลายมาตรฐานไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์เข้มข้น 100 ppm จากสารละลายมาตรฐานตั้งต้น นำสารละลายไปกรองผ่านเยื่อกรองเซลลูโลสอะซิเตตขนาด 0.45 ไมครอน ก่อนที่จะฉีดเข้าคอลัมน์ โดยทำการปรับปริมาตรการฉีดเป็นครั้งละ 20 ไมโครลิตร แล้วทำการชะสารด้วยระบบวัฏภาคเคลื่อนที่ 3 สภาวะ ดังนี้

สภาวะที่ 1 ใช้ น้ำ : อะซีโตไนทริล ในอัตราส่วนร้อยละ 95 : 5 โดยปริมาตร
สภาวะที่ 2 ใช้ น้ำ : อะซิโตไนทริล ในอัตราส่วนร้อยละ 97 : 3 โดยปริมาตร
สภาวะที่ 3 ใช้ น้ำ : เมทานอล ในอัตราส่วนร้อยละ 90 : 10 โดยปริมาตร

ทำการชะสาร ที่อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ 1 มิลลิลิตรต่อนาที โดยติดตามการเปลี่ยนแปลงสัญญาณด้วยตัวตรวจวัดชนิดไดโอดอะเรย์ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร บันทึกโครมาโทแกรมของสารมาตรฐานและทำการสร้างกราฟมาตรฐาน

ตอนที่ 2 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดสาร 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์ในระบบต้นแบบ (model system)

การเตรียมสารละลาย

1. สารละลายมาตรฐานกรดอะมิโน 3 ชนิดคือ โพรลีน (Proline), กรดกลูตามิค (Glutamic acid) และไลซีน (Lysine) เข้มข้น 1,000 ppm
โดยชั่งสารมาตรฐานของกรดอะมิโน 0.5000 กรัม นำมาเติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 500 มิลลิลิตร ผสมจนได้สารละลายที่เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส ก่อนที่จะนำไปใช้เป็นสารละลายมาตรฐานตั้งต้น
2. สารละลายมาตรฐานน้ำตาล 2 ชนิด คือ กลูโคสและฟรักโทส เข้มข้น 1,000 ppm โดยชั่งสารมาตรฐานของน้ำตาล 0.5000 กรัม นำมาเติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 500 มิลลิลิตร ผสมจนได้สารละลายที่เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส ก่อนที่จะนำไปใช้เป็นสารละลายมาตรฐานตั้งต้น

2.1 การศึกษาผลของชนิดของกรดอะมิโนต่อการเกิดสาร 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์

วิธีการทดลอง

ปิเปตสารละลายกรดอะมิโนโพรลีนเข้มข้น 500 ppm ปริมาตร 10 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองแบบมีฝาปิด ผสมกับสารละลายน้ำตาล กลูโคสเข้นข้น 500 ppm 10 มิลลิลิตรเขย่าให้เข้ากัน นำไปให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำสารละลายที่ได้ไปกรองผ่านเยื่อกรองเซลลูโลสอะซิเตตขนาด 0.45 ไมครอน จากนั้นนำไปฉีดเข้าระบบโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณ HMF ทำการบันทึกโครมาโทแกรม และนำค่าพื้นที่ใต้พีคที่ได้ไปคำนวณความเข้มข้นของสาร HMF โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน ทำซ้ำขั้นตอนข้างต้น แต่เปลี่ยนสารละลายกรดอะมิโนเป็นกรดกลูตามิคและกรดอะมิโนไลซีนตามลำดับ

หมายเหตุ ทำการทดลองตามวิธีการข้างต้นซ้ำอีก 2 ครั้ง เพื่อเก็บข้อมูลทางสถิติ

2.2 การศึกษาผลของชนิดน้ำตาลต่อการเกิดสาร 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์

วิธีการทดลอง

ปิเปตสารละลายกรดอะมิโนโพรลีนเข้มข้น 500 ppm ปริมาตร 10 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองแบบมีฝาปิด ให้เติมสารละลายน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 500 ppm 10 มิลลิลิตร เขย่า

ให้เข้ากัน นำไปให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำสารละลายที่ได้ไปกรองผ่านเยื่อกรองเซลลูโลสอะซิเตตขนาด 0.45 ไมครอน จากนั้นนำไปฉีดเข้าระบบโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณ HMF ทำการบันทึกโครมาโทแกรม และนำค่าพื้นที่ใต้พีคที่ได้ไปคำนวณความเข้มข้นของสาร HMF โดยเทียบกับ กราฟมาตรฐาน ทำซ้ำขั้นตอนข้างต้นแต่เปลี่ยนชนิดสารละลายน้ำตาลเป็นสารละลายฟรักโทสเข้มข้น 500 ppm 10 มิลลิลิตร

หมายเหตุ ทำการทดลองตามวิธีการข้างต้นซ้ำอีก 2 ครั้ง เพื่อเก็บข้อมูลทางสถิติ

2.3 การศึกษาผลของอุณหภูมิในการให้ความร้อนกับระบบต้นแบบต่อการเกิดสาร 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์

วิธีการทดลอง

ปิเปตสารละลายกรดอะมิโนโพรลีนเข้มข้น 500 ppm ปริมาตร 10 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองแบบมีฝาปิด 12 หลอด หลอดที่ 1-6 ให้เติมสารละลายน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 500 ppm 10 มิลลิลิตร และหลอด ที่ 7-12 เติมสารละลายน้ำตาลฟรักโทสเข้มข้น 500 ppm 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 40 60 80 100 และ 120 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เป็นเวลา 30 นาที นำสารละลายที่ได้ไปกรองผ่านเยื่อกรองเซลลูโลสอะซิเตตขนาด 0.45 ไมครอน จากนั้นนำไปฉีดเข้าระบบโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณ HMF ทำการบันทึกโครมาโทแกรม และนำค่าพื้นที่ใต้พีคที่ได้ไปคำนวณความเข้มข้นของสาร HMF โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน ทำซ้ำขั้นตอนข้างต้นแต่เปลี่ยนสารละลายกรดอะมิโนเป็นกรดกลูตามิคและไลซีน ตามลำดับ

หมายเหตุ ทำการทดลองตามวิธีการข้างต้นซ้ำอีก 2 ครั้ง เพื่อเก็บข้อมูลทางสถิติ

ดังนั้น ระบบต้นแบบที่ทำการศึกษา ประกอบด้วย 6 ระบบ ดังนี้

ระบบ A เกิดจากกรดอะมิโนโพรลีนทำปฏิกิริยากับน้ำตาลกลูโคส

ระบบ B เกิดจากกรดอะมิโนกลูตามิคทำปฏิกิริยากับน้ำตาลกลูโคส

ระบบ C เกิดจากกรดอะมิโนไลซีนทำปฏิกิริยากับน้ำตาลกลูโคส

ระบบ D เกิดจากกรดอะมิโนโพรลีนทำปฏิกิริยากับน้ำตาลฟรักโทส

ระบบ E เกิดจากกรดอะมิโนกลูตามิคทำปฏิกิริยากับน้ำตาลฟรักโทส

ระบบ F เกิดจากกรดอะมิโนไลซีนทำปฏิกิริยากับน้ำตาลฟรักโทส

2.4 การศึกษาผลของเวลาในการให้ความร้อนกับระบบต้นแบบต่อปริมาณสาร 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์

วิธีการทดลอง

เติมสารละลายกรดอะมิโนโพรลีนเข้มข้น 500 ppm ปริมาตร 10 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองแบบมีฝาปิด 12 หลอด หลอดที่ 1-6 ให้เติมสารละลายน้ำตาลกลูโคสเข้นข้น 500 ppm 10 มิลลิลิตร และหลอดที่ 7-12 เติมสารละลายน้ำตาลฟรักโทสเข้มข้น 500 ppm 10 มิลลิลิตรเขย่าให้เข้ากัน นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 10 20 30 60 และ120 นาที ตามลำดับ นำสารละลายที่ได้ไปกรองผ่านเยื่อกรองเซลลูโลสอะซิเตตขนาด 0.45 ไมครอน จากนั้นนำไปฉีดเข้าระบบโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณ HMF ทำการบันทึกโครมาโทแกรม และนำค่าพื้นที่ใต้พีคที่ได้ไปคำนวณความเข้มข้นของสาร HMF โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน ทำซ้ำขั้นตอนข้างต้นแต่เปลี่ยนสารละลายกรดอะมิโนเป็นกรดกลูตามิคและไลซีนตามลำดับ

หมายเหตุ ทำการทดลองตามวิธีการข้างต้นซ้ำอีก 2 ครั้ง เพื่อเก็บข้อมูลทางสถิติ

ตอนที่ 3 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณ 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์ในน้ำผึ้ง

การเตรียมสารละลาย

1. สารละลาย Carrez I
   ชั่งสาร $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ 15 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร
2. สารละลาย Carrez II
   ชั่งสาร $Zn(OAc)_2 \cdot 2H_2O$ 15 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

3.1 ผลของอุณหภูมิในการให้ความร้อนน้ำผึ้งต่อปริมาณ 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์

วิธีการทดลอง

ชั่งน้ำผึ้ง 5 กรัม ใส่ในหลอดทดลองแต่ละหลอด จำนวน 5 หลอด โดยหลอดที่1 เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องส่วนหลอดที่ 2-5 นำไปผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 40 60 80 และ 100 องศาเซลเซียส ตามลำดับเป็นเวลานาน 30 นาที นำไปทำให้เย็นทันทีด้วยการแช่ในอ่างน้ำแข็ง นำน้ำผึ้งที่ผ่านการให้ความร้อนมาเติมน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Carrez I 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติมสารละลาย Carrez II 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ปรับปริมาตรสารละลายให้ครบ 50 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ไปกรองด้วยกระดาษกรอง และนำไป กรองผ่านเยื่อกรองเซลลูโลสอะซิเตตขนาด 0.45 ไมครอน จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปฉีดเข้าระบบ

โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณ HMF ทำการบันทึกโครมาโทแกรม และนำค่าพื้นที่ใต้พีคที่ได้ไปคำนวณความเข้มข้นของสาร HMF โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

หมายเหตุ ทำการทดลองตามวิธีการข้างต้นซ้ำอีก 2 ครั้ง เพื่อเก็บข้อมูลทางสถิติ

3.2 ผลของเวลาในการให้ความร้อนน้ำผึ้งต่อปริมาณ 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์

วิธีการทดลอง

ชั่งน้ำผึ้ง 5 กรัม ใส่ในหลอดทดลองแต่ละหลอด จำนวน 7 หลอด โดยหลอดที่ 1 เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องส่วนหลอดที่ 2-7 นำไปผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 20 40 60 80 100 และ 120 นาทีตามลำดับ นำไปทำให้เย็นทันทีด้วยการแช่ในอ่างน้ำแข็ง จากนั้น นำน้ำผึ้งที่ผ่านการให้ความร้อนมาเติมน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Carrez I จำนวน 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติมสารละลาย Carrez II จำนวน 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ปรับปริมาตรสารละลายให้ ครบปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ไปกรองด้วยกระดาษกรอง และนำไปกรองผ่านเยื่อกรองเซลลูโลสอะซิ เตตขนาด 0.45 ไมครอน จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปฉีดเข้าระบบโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณ HMF ทำการบันทึกโครมาโทแกรม และนำค่าพื้นที่ใต้พีคที่ได้ไปคำนวณความเข้มข้นของสาร HMF โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

หมายเหตุ ทำการทดลองตามวิธีการข้างต้นซ้ำอีก 2 ครั้ง เพื่อเก็บข้อมูลทางสถิติ

3.3 ผลของเวลาเก็บรักษาน้ำผึ้งต่อปริมาณ 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์

วิธีการทดลอง

ชั่งน้ำผึ้ง 5 กรัม ใส่ในหลอดทดลอง โดยน้ำผึ้งที่นำมาใช้เป็นน้ำผึ้งที่ผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 1 2 3 4 5 6 12 และ 24 เดือน ตามลำดับ นำน้ำผึ้งมาเติมน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Carrez I จำนวน 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติมสารละลาย Carrez II จำนวน 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ปรับปริมาตรสารละลายให้ครบ 50 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ไปกรองด้วยกระดาษกรอง และนำไป กรองผ่านเยื่อกรองเซลลูโลสอะซิเตตขนาด 0.45 ไมครอน จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปฉีดเข้าระบบโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณ HMF ทำการบันทึกโครมาโทแกรม และนำค่าพื้นที่ใต้พีคที่ได้ไปคำนวณความเข้มข้นของสาร HMF โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

หมายเหตุ ทำการทดลองตามวิธีการข้างต้นซ้ำอีก 2 ครั้ง เพื่อเก็บข้อมูลทางสถิติ

ตอนที่ 4 วิเคราะห์ 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ในตัวอย่างยาลูกกลอนด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

วิธีการทดลอง

นำตัวอย่างยาลูกกลอนมาบดให้ละเอียดด้วยโกร่งบดยา ชั่งตัวอย่างยาลูกกลอนแต่ละชนิดมาชนิดละ 5 กรัม เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร คนจนเม็ดยาละลาย เติมสารละลาย Carrez I จำนวน 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติมสารละลาย Carrez II จำนวน 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ปรับปริมาตรสารละลายให้ครบ 50 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ไปกรองด้วยกระดาษกรอง และนำไปกรองผ่านเยื่อกรองเซลลูโลสอะซิเตตขนาด 0.45 ไมครอน จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปฉีดเข้าระบบโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณ HMFทำการบันทึกโครมาโทแกรม และนำค่าพื้นที่ใต้พีคที่ได้ไปคำนวณความเข้มข้นของสาร HMF โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

หมายเหตุ ทำการทดลองตามวิธีการข้างต้นซ้ำอีก 2 ครั้ง เพื่อเก็บข้อมูลทางสถิติ

บทที่ 4
ผลการทดลอง

ในการวิจัยครั้งนี้ได้ทำการศึกษาการเกิดสารประกอบ HMF โดยศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณการเกิดสาร HMF ในระบบต้นแบบ และตัวอย่างน้ำผึ้ง รวมทั้งนำวิธีวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงมาใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ HMF ในตัวอย่างยาลูกกลอน ผู้วิจัยได้แสดงผลการทดลองดังนี้

1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง
2. ทำการศึกษาปัจจัยในการเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ดในระบบต้นแบบ ได้แก่
   2.1 ชนิดของกรดอะมิโน
   2.2 ชนิดของน้ำตาล
   2.3 อุณหภูมิในการให้ความร้อน
   2.4 ระยะเวลาในการให้ความร้อน
3. ทำการศึกษาปัจจัยในการเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ดในน้ำผึ้ง ได้แก่
   3.1 อุณหภูมิในการให้ความร้อน
   3.2 ระยะเวลาในการให้ความร้อน
   3.3 ระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำผึ้ง
4. ทำการวิเคราะห์ ปริมาณสาร HMF ในตัวอย่างยาลูกกลอน

ตอนที่ 1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

1.1 ผลการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์

จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ โดยทำการเปลี่ยนแปลงวัฏภาคเคลื่อนที่ 3 สภาวะ ซึ่งทุกสภาวะใช้คอลัมน์ชนิดเดียวกันคือ C-18 (Bondclone 10 μm ขนาด300 x 3.90 mm) อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ 1 มิลลิลิตรต่อนาที และทำการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร โดยแต่ละสภาวะใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ ดังนี้

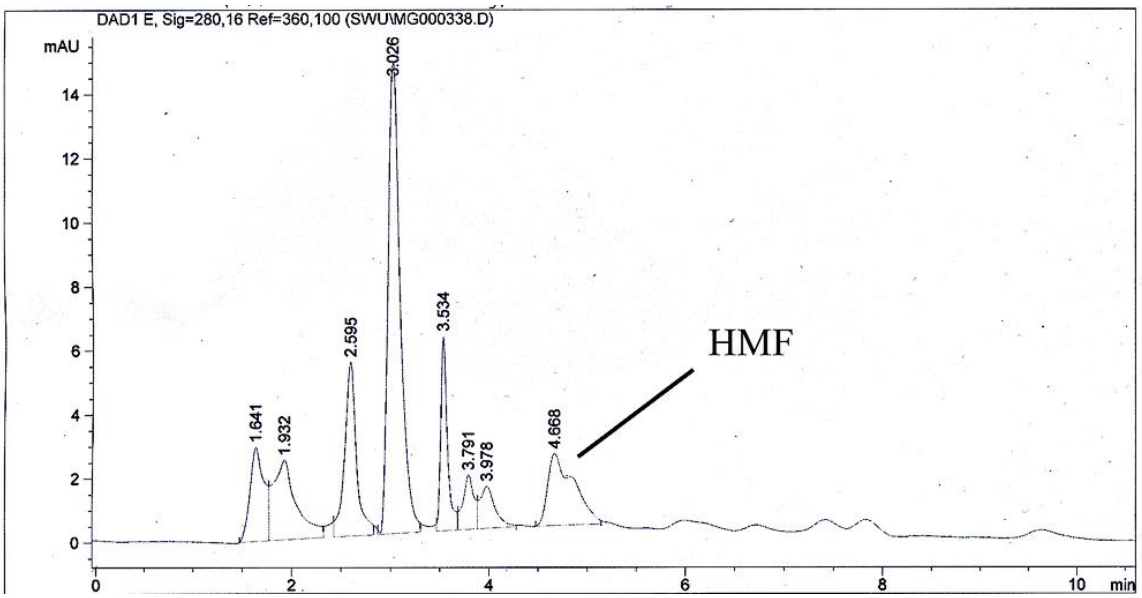
สภาวะที่ 1 ใช้น้ำ:อะซีโตไนทริลในอัตราส่วนร้อยละ 90:10 โดยปริมาตร
สภาวะที่ 2 ใช้ น้ำ:อะซิโตไนทริล ในอัตราส่วนร้อยละ 97:3 โดยปริมาตร
สภาวะที่ 3 ใช้ น้ำ:เมทานอล ในอัตราส่วนร้อยละ 90:10 โดยปริมาตร

ผลการทดลองเกี่ยวกับเวลาในการคงอยู่บนคอลัมน์ (retention time)ของสารละลายมาตรฐาน HMF ดังแสดงในตารางที่ 2

ตาราง 2 ค่าระยะเวลารีเทนชันของ HMF ณ สภาวะต่าง ๆ ของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้ในการศึกษา

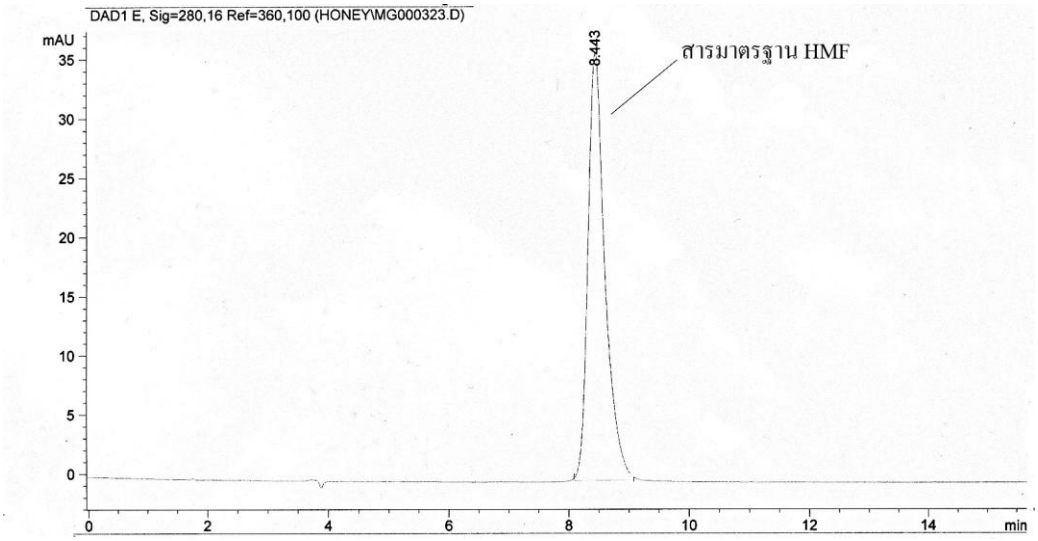
สภาวะที่ทดสอบ	เวลาในการคงอยู่บนคอลัมน์ (นาที)
1	5.16 ± 0.01
2	8.53 ± 0.07
3	7.21 ± 0.01

จากผลการทดลองในตารางที่ 2 พบว่าระยะเวลาในการคงอยู่บนคอลัมน์ ที่เกิดพีคของสาร HMF แตกต่างกัน โดยในสภาวะที่ 1 จะเกิดพีคของสาร HMF เร็วที่สุด แต่เมื่อนำไปประยุกต์ใช้กับตัวอย่างน้ำผึ้งพบว่าการใช้สภาวะที่ 1 โครมาโทแกรมที่ได้จะมีการซ้อนทับระหว่างพีคของสาร HMF กับพีคอื่นๆ ที่อยู่ในตัวอย่าง ดังภาพประกอบ 3 แสดงว่า ไม่ใช่สภาวะที่เหมาะสมในการทดลอง



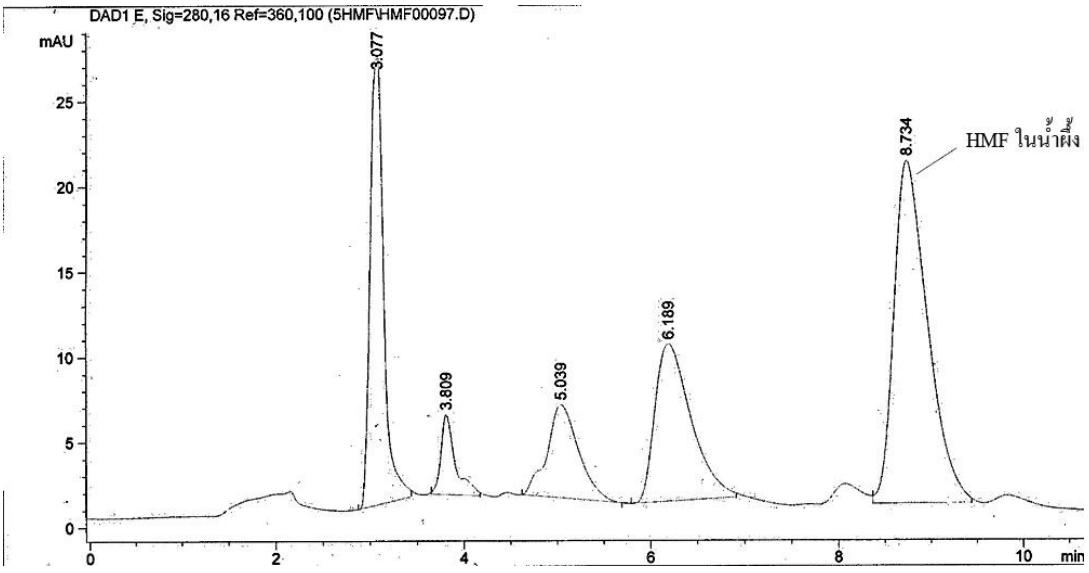
ภาพประกอบ 3 โครมาโทแกรมการวิเคราะห์สารHMFในน้ำผึ้งโดยทดลองด้วยสภาวะที่ 1

แต่เมื่อทำการทดลองด้วยสภาวะที่ 2 จะได้ผลดังแสดงในตัวอย่างโครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน HMF ในภาพประกอบ 4



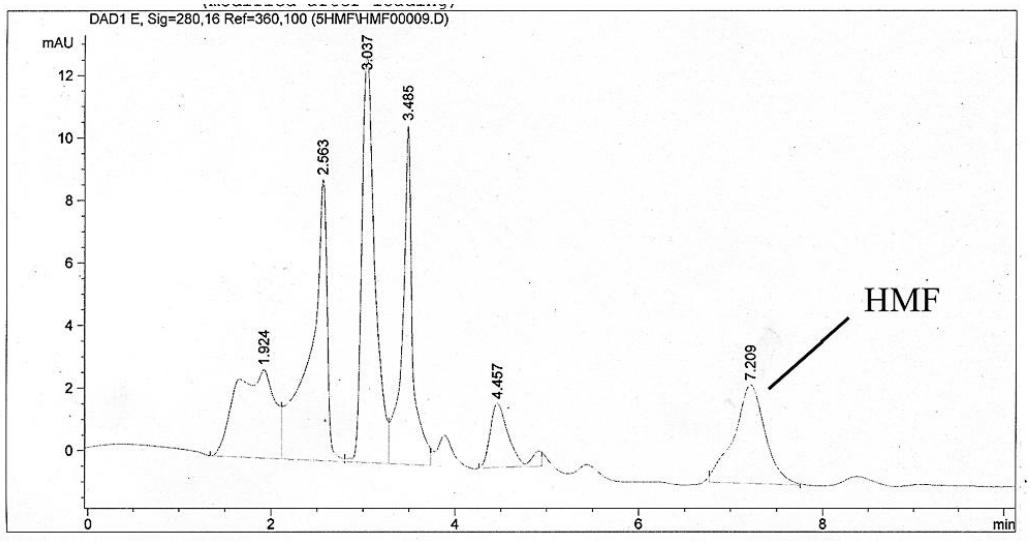
ภาพประกอบ 4 โครมาโทแกรมแสดงผลการวิเคราะห์สารมาตรฐานHMFโดยใช้สภาวะที่ 2

แม้จะใช้เวลาในการวิเคราะห์นานกว่า แต่เกิดการแยกได้อย่างสมบูรณ์จากพีคอื่น เมื่อทดลองกับการวิเคราะห์ในน้ำผึ้งจริง ดังแสดงในภาพประกอบ 5 จึงเลือกใช้สภาวะนี้ในการวิเคราะห์ต่อไป



ภาพประกอบ 5 โครมาโทแกรมแสดงผลการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำผึ้งโดยใช้สภาวะที่ 2

สำหรับผลการทดลองด้วยสภาวะที่ 3 คือใช้น้ำและเมทานอล ในอัตราส่วนร้อยละ 90:10 โดยปริมาตร เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ พบว่าได้พีคที่มีฐานพีคกว้างมาก เนื่องจากอาจเกิดจากการแยกที่ไม่สมบูรณ์ ดังแสดงในภาพประกอบ 6



ภาพประกอบ 6 โครมาโทแกรมการวิเคราะห์สารHMFในน้ำผึ้งโดยทดลองด้วยสภาวะที่ 3

ตอนที่ 2 การศึกษาปัจจัยในการเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ดในระบบต้นแบบ

2.1 - 2.2 ผลของชนิดของกรดอะมิโนและน้ำตาลในระบบต้นแบบ

ผลการทดลอง การศึกษาปัจจัยชนิด ของกรดอะมิโน และน้ำตาล ต่อการเกิด สารประกอบ HMF ในระบบต้นแบบ พบว่ามีปริมาณสาร HMF ดังแสดงผลไว้ในตาราง 3

ตาราง 3 ปริมาณของสารประกอบ HMF เมื่อศึกษาปัจจัยชนิดของกรดอะมิโนและน้ำตาล

ระบบต้นแบบ	ปริมาณสารประกอบ HMF (ppm)
A	-
B	-
C	-
D	1.02
E	1.03
F	1.02

จากผลในตารางที่ 3 พบว่า ในระบบต้นแบบที่มีน้ำตาลกลูโคส กับกรดอะ มิโนทั้ง 3 ชนิด (ระบบ A-C) จะไม่สามารถตรวจพบสารประกอบ HMF ได้ ในขณะที่น้ำตาลฟรักโทสสามารถทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนทุกชนิด (ระบบ D-F) เนื่องจากตรวจพบปริมาณสาร HMF แต่อย่างไรก็ตาม ปริมาณ HMF ที่เกิดขึ้นมีปริมาณน้อยมาก แสดงว่า ชนิด ของน้ำตาลเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญอย่างมากในการเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด โดยข้อน่าสังเกตคือ ในน้ำผึ้งจริงจะมีน้ำตาลฟรักโทสเป็นองค์ประกอบหลัก ทำให้คาดว่าน่าจะเกิดสารประกอบ HMF นี้ได้ง่าย

2.3 ผลของอุณหภูมิในการให้ความร้อนแก่ระบบต้นแบบ

ผลของอุณหภูมิในการให้ความร้อนแก่ระบบต้นแบบต่อ การเกิดสารประกอบ HMF ให้ผลดังแสดงในตารางที่ 4

ตาราง 4 ปริมาณของสารประกอบ HMF ที่เกิดขึ้นจาก การแปรผันอุณหภูมิในการให้ความร้อนแก่ระบบต้นแบบ

อุณหภูมิในการให้ความร้อน (องศาเซลเซียส)	ปริมาณสารประกอบ HMF(ppm) ในระบบ					
	A	B	C	D	E	F
อุณหภูมิห้อง	0	0	0	0.82	0.82	0.82
40	0	0	0	0.82	0.82	0.82
60	0	0	0	0.82	0.82	0.82
80	0	0	0	0.82	0.82	0.82
100	0	0	0	0.82	0.82	0.82
120	0	0	0	0.82	0.82	0.82

จากผลในตาราง 4 พบว่า อุณหภูมิในการให้ความร้อนแก่ระบบต้นแบบมีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด แต่ยังไม่ชัดเจน ทั้งนี้เนื่องจากความเข้มข้นของสารตั้งต้นทั้งสองชนิดน้อยเกินไป จึงอาจเกิดการสลายตัวของสารHMF ที่เกิดขึ้น

2.4 ผลของเวลาในการให้ความร้อนกับระบบต้นแบบ

ผลของเวลาในการให้ความร้อนต่อปริมาณสารประกอบ HMF ในระบบต้นแบบให้ ผลดังแสดงในตาราง 5

ตาราง 5 ปริมาณของสารประกอบ HMF ของการแปรผันเวลาในการให้ความร้อนแก่ระบบต้นแบบ

ระยะเวลาในการให้ความร้อน (นาที)	ปริมาณสารประกอบ HMF(ppm) ในระบบ					
	A	B	C	D	E	F
0	0	0	0	0.82	0.82	0.82
10	0	0	0	0.82	0.82	0.82
20	0	0	0	0.82	0.82	0.82
30	0	0	0	0.82	0.82	0.82
60	0	0	0	0.83	0.84	0.84
120	0	0	0	0.87	0.88	0.88

.

จากผลที่แสดงในตารางที่ 5 พบว่า ระยะเวลาในการให้ความร้อนแก่ระบบต้นแบบมีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด อย่าง ชัดเจน โดยเมื่อให้ความร้อนแก่ระบบนานถึง 120 นาทีจะเกิดปฏิกิริยาได้สาร HMF สูงสุด แต่อย่างไรก็ตามปริมาณที่พบอาจไม่มากนัก ซึ่งเป็นผลจ ากการที่ความเข้มข้นของสารตั้งต้นทั้งสองชนิดน้อยเกินไป จึงอาจเกิดการสลายตัวของสาร HMF ที่เกิดขึ้น

ตอนที่ 3 การศึกษาปัจจัยในการเกิดสารประกอบ HMF ในน้ำผึ้ง

3.1 ผลของอุณหภูมิในการให้ความร้อน

เมื่อทำการศึกษาในระบบของ ตัวอย่างน้ำผึ้ง โดยศึกษาผลของอุณหภูมิในการใ ห้ความร้อนแก่น้ำผึ้ง ที่อุณหภูมิต่างๆตั้งแต่ 40 – 100 องศาเซลเซียส แล้ว นำไปวิเคราะห์หาปริมาณสาร HMF ตามวิธีเดียวกับการทดลองตอนที่ 1-2 ผลการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 6

ตาราง 6 ปริมาณสารประกอบ HMF ในน้ำผึ้งที่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ปริมาณสารประกอบ HMF (ppm)
อุณหภูมิห้อง	0.45
40	0.47
60	0.48
80	0.49
100	0.84

จากการให้ความร้อนแก่น้ำผึ้งที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่า ในขณะเริ่มต้นที่ยังไม่ให้ความร้อนก็สามารถตรวจพบสาร HMF แต่เมื่อให้ความร้อนสูงขึ้น สาร HMF ก็เกิดมากขึ้น โดยจะเกิดในปริมาณมากกว่าเดิมเป็นสองเท่าเมื่อให้ความร้อนสูงถึง 100 องศาเซลเซียส แสดงว่าเมื่อนำน้ำผึ้งมาเคี่ยวให้ความร้อนจะมีโอกาสตรวจพบสาร HMF มากขึ้น

3.2 ผลของเวลาในการให้ความร้อนน้ำผึ้ง

ผลของเวลาในการให้ความร้อนแก่น้ำผึ้งต่อปริมาณสารประกอบ HMF ให้ผลดังแสดงในตาราง 7

ตาราง 7 ปริมาณสารประกอบ HMF ในน้ำผึ้งที่ได้รับความร้อนที่ อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ณ เวลาต่างๆ

เวลา (นาที)	ปริมาณสารประกอบ HMF (ppm)
20	0.59
40	1.60
60	1.49
80	2.16
100	2.97
120	4.20

จากการให้ความร้อนแก่น้ำผึ้งที่เวลาต่างๆ พบว่า มี การเปลี่ยนแปลงกับน้ำผึ้งคล้ายกับการทดลองตอน 3.1 โดยสามารถตรวจพบสาร HMF แต่เมื่อให้ความร้อนเป็นเวลานานมากขึ้น โดยจะเกิดในปริมาณมากกว่าเดิมเป็นสองเท่าเมื่อให้ความร้อนนาน 120 นาที แสดงว่า เมื่อนำน้ำผึ้งมาเคี่ยวให้ความร้อนเป็นเวลานานๆ จะมีโอกาสตรวจพบสาร HMF มากขึ้น

3.3 ผลของเวลาในการเก็บรักษาน้ำผึ้ง

ในการศึกษาผลของเวลาในการเก็บรักษาน้ำผึ้งนั้น จากการนำน้ำผึ้งตัวอย่างมาจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง และสุ่มตัวอย่างวิเคราะห์หาปริมาณสาร HMF ตามระยะเวลาต่างๆ พบว่าได้ผลตามตารางที่ 8

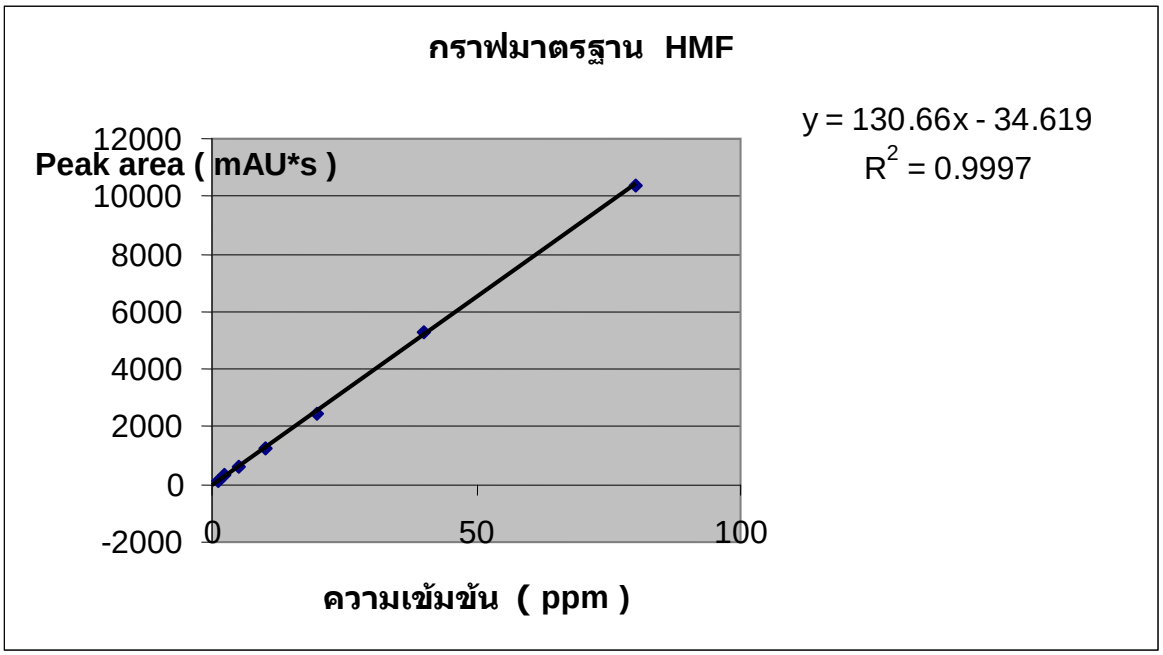
ตาราง 8 ปริมาณของสารประกอบ HMF ในน้ำผึ้งที่การเก็บรักษาที่ระยะเวลาต่างๆ

ระยะเวลาในการเก็บรักษา (เดือน)	ปริมาณสารประกอบ HMF (ppm)
1	1.30
2	1.91
3	2.77
4	3.29
5	4.70
6	5.52
12	18.30
24	50.73

จากการเก็บรักษาน้ำผึ้งนาน 24 เดือน โดยทำการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสาร HMF เป็นระยะ พบว่ามีการเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ดมากขึ้น จึงสามารถตรวจหา สาร HMF ในปริมาณที่มากขึ้นซึ่งการเก็บนานเป็นปียิ่งมีสาร HMF มาก โดยสอดคล้องกับลักษณะทางกายภาพของน้ำผึ้งที่เก็บไว้เป็นเวลานานจะมีสีดำคล้ำมากๆจนไม่น่าบริโภค

ตอนที่ 4 การวิเคราะห์ 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ในตัวอย่างยาลูกกลอนด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

เมื่อนำเทคนิคที่ได้พัฒนาขึ้นมาทำการวิเคราะห์สารมาตรฐาน HMF พบว่าได้กราฟมาตรฐานที่เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 1-80 ppm โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ ($r^2 \rangle 0.999$) โดยตัวอย่างกราฟมาตรฐานแสดงดังภาพประกอบ 7



ภาพประกอบ 7 กราฟมาตรฐานของสารประกอบ HMF โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

จากกราฟมาตรฐาน เมื่อทำการคำนวณหาค่าขีดความสามารถต่ำสุดในการตรวจวัด (LOD) และค่าขีดความสามารถต่ำสุดในการวิเคราะห์ (LOQ) โดยคำนวณจากสามเท่าและสิบเท่าของความเบี่ยงเบนของค่าจุดตัดแกน y ของกราฟมาตรฐานตามลำดับ (Skoog; et al. 1992) พบว่าได้ค่า LOD เท่ากับ 0.65 ppm และค่า LOQ เท่ากับ 2.17 ppm

เมื่อนำเทคนิคนี้มาวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบ HMF ในตัวอย่างยาลูกกลอน โดยสุ่มจัดซื้อตัวอย่างยาลูกกลอน 28 ชนิด แล้วนำมาวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ HMF ให้ผลดังแสดงในตาราง 9

ตาราง 9 ปริมาณของสารประกอบ HMF ในตัวอย่างยาลูกกลอน

ตัวอย่างที่	ปริมาณสารประกอบ HMF (ppm)
1	22.28
2	44.92
3	5.07
4	3.87
5	1.84
6	1.30
7	4.36
8	5.87
9	6.35
10	9.50
11	2.55
12	5.11
13	17.52
14	4.82
15	6.97
16	8.17
17	3.12
18	4.78
19	7.71
20	3.39
21	15.99
22	9.73
23	1.47
24	6.28
25	6.84
26	28.76
27	3.78
28	4.65

จากผลการวิเคราะห์ พบว่ามักพบปริมาณสารประกอบ HMF ในปริมาณสูงในเม็ดยาที่มีลักษณะสีดำคล้ำมาก ๆ ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจากการเก็บรักษาไว้เป็นเวลายาวนานทำให้ปริมาณสารประกอบ HMF มีปริมาณสะสมมากขึ้นเรื่อย ๆ เนื่องจากตัวยาบางตัวที่ฉลากไม่ระบุวันที่ผลิตและหมดอายุทำให้ผู้บริโภคไม่มีข้อมูลในเรื่องของอายุยา

บทที่ 5
สรุปผล อภิปรายผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดสารประกอบ HMF ด้วยระบบต้นแบบกับน้ำผึ้งและพัฒนาวิธีการวิเคราะห์สารประกอบ HMF ในยาลูกกลอนด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง ซึ่งจะสรุปผล อภิปรายผลการวิจัยและให้ข้อเสนอแนะตามหัวข้อต่างๆ ดังนี้

1. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง
2. การศึกษาปัจจัยในการเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ดในระบบต้นแบบ ได้แก่
   2.2 ชนิดของกรดอะมิโน
   2.2 ชนิดของน้ำตาล
   2.3 อุณหภูมิในการให้ความร้อน
   2.3 ระยะเวลาในการให้ความร้อน
3. การศึกษาปัจจัยในการเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ดในน้ำผึ้ง ได้แก่
   3.1 อุณหภูมิในการให้ความร้อน
   3.2 ระยะเวลาในการให้ความร้อน
   3.3 ระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำผึ้ง
4. การวิเคราะห์ ปริมาณสาร HMF ในตัวอย่างยาลูกกลอน

ตอนที่ 1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

จากผลการทดลอง โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ ที่ต่างกัน 3 สภาวะในการวิเคราะห์สารมาตรฐาน HMF พบว่า สภาวะที่ 1 (น้ำและอะซีโตไนทริลอัตราส่วนร้อยละ 90:10) สารถูกหน่วงในคอลัมน์ด้วยเวลาน้อยที่สุดส่วนสภาวะที่ 2 ใช้ (น้ำและอะซีโตไนทริลอัตราส่วนร้อยละ 97:3) พบว่าสารถูกหน่วงในคอลัมน์นานที่สุด และเมื่อนำสภาวะทั้ง 3 สภาวะมาทดสอบในการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำผึ้ง พบว่า

การใช้สภาวะที่ 1 เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ จะให้เวลาในการคงอยู่บนคอลัมน์ แต่พีคเกิดการซ้อนทับกับพีคอื่น ตามที่แสดงในภาพ 3

ในการใช้สภาวะที่ 2 เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ แม้ว่าจะใช้เวลาในการวิเคราะห์นานกว่า แต่เมื่อวิเคราะห์กับตัวอย่างน้ำผึ้งกลับเป็นสภาวะที่เกิดการแยกสาร HMF ออกจากพีคอื่นๆ ได้อย่างสมบูรณ์ ตามที่แสดงในภาพ 5 จึงเลือกใช้สภาวะนี้ในการวิเคราะห์

สำหรับสภาวะที่ 3 จะให้พีคที่มีฐานพีคกว้างมากตามที่แสดงในภาพ 6 อาจเป็นผลมาจากการแยกเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์

จากเหตุผลดังกล่าวข้างต้น ผู้วิจัย จึงได้เลือกใช้สภาวะที่ 2 ซึ่งมีน้ำและอะซิโตไนทริลในอัตราส่วนร้อยละ 97:3 โดยปริมาตรเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ โดยใช้คอลัมน์ชนิด C18 ควบคุมอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่เป็น 1 มิลลิลิตรต่อนาที และติดตามการเปลี่ยนแปลงสัญญาณด้วยตัวตรวจวัดชนิดไดโอดอะเรย์ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ซึ่งเป็นค่าความยาวคลื่นที่สารมีการดูดกลืนพลังงานมากที่สุด

ตอนที่ 2 การศึกษาปัจจัยในการเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ดในระบบต้นแบบ ได้แก่

2.1 ผลของชนิดของกรดอะมิโนในระบบต้นแบบต่อปริมาณสาร 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์

ในหัวข้อนี้ผู้วิจัยได้ทำการแปรผันชนิดของกรดอะมิโนในระบบต้นแบบเพื่อสังเกตความเปลี่ยนแปลงของปริมาณก ารเกิดสารประกอบ HMF เนื่องจากกรดอะมิโนแต่ละชนิดจะมีโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกัน โดยกรดอะมิโนที่เลือกใช้ทั้ง3 ชนิดนี้มีรายงานว่าพบในปริมาณสูงในน้ำผึ้ง จากผลการทดลองที่ได้พบว่า ในระบบต้นแบบที่ใช้น้ำตาลชนิดเดียวกันแต่ใช้กรดอะมิโนต่างชนิดกันจะก่อให้เกิดสารประกอบ HMF ในปริมาณที่แตกต่างกันเพียงเล็กน้อย

2.2 ผลของชนิดของน้ำตาลในระบบต้นแบบต่อปริมาณสาร 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์

ผู้วิจัยได้ทำการแปรผันชนิดของน้ำตาลในระบบต้นแบบเพื่อสังเกตความเปลี่ยนแปลงของปริมาณการเกิดสารประกอบ HMF เนื่องจากน้ำตาลแต่ละชนิดจะมีโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกัน โดยน้ำตาลที่เลือกใช้ทั้ง2 ชนิดนี้มีรายงานว่าพบในปริมาณสูงในน้ำผึ้ง จากผลการทดลองที่ได้พบว่า ในระบบต้นแบบที่ใช้กรดอะมิโนชนิดเดียวกันแต่น้ำตาลต่างชนิดกันจะก่อให้เกิดผลที่แตกต่างกันโดยระบบที่ใช้น้ำตาลฟรักโทสจะเกิดสารประกอบHMF ส่วนน้ำตาลกลูโคสจะไม่เกิดสารประกอบHMF

2.3 ผลของอุณหภูมิในการให้ความร้อนแก่ระบบต้นแบบต่อ ปริมาณสาร 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์

เมื่อทำการแปรผันอุณหภูมิในการให้ความร้อนแก่ระบบต้นแบบเพื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงของปริมาณการเกิดสารประกอบ HMF โดยให้ความร้อนแก่ระบบต้นแบบที่อุณหภูมิต่าง ๆ พบว่าระบบต้นแบบที่เกิดสารประกอบ HMF จะมีปริมาณ HMF ที่แตกต่างกันเพียงเล็กน้อย ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจากปริมาณของสารตั้งต้นที่ค่อนข้างน้อย จึงทำให้เกิดสารผลิตภัณฑ์ในระดับที่ค่อนข้างสมบูรณ์ จึงเห็นความแตกต่างได้ไม่มากนัก

2.4 ผลของเวลาในการให้ความร้อนกับระบบต้นแบบต่อปริมาณสาร 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์

เมื่อทำการแปรผันเวลาในการให้ความร้อนแก่ระบบต้นแบบเพื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงของปริมาณการเกิดสารประกอบ HMF โดยให้ความร้อนแก่ระบบต้นแบบที่เวลาต่าง ๆ พบว่าระบบ

ต้นแบบที่เกิดสารประกอบ HMF จะมีปริมาณ HMF ที่แตกต่างกัน โดยสารประกอบ HMF จะเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาในการให้ความร้อนนานขึ้น

ตอนที่ 3 การศึกษาปัจจัยในการเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ดในน้ำผึ้ง

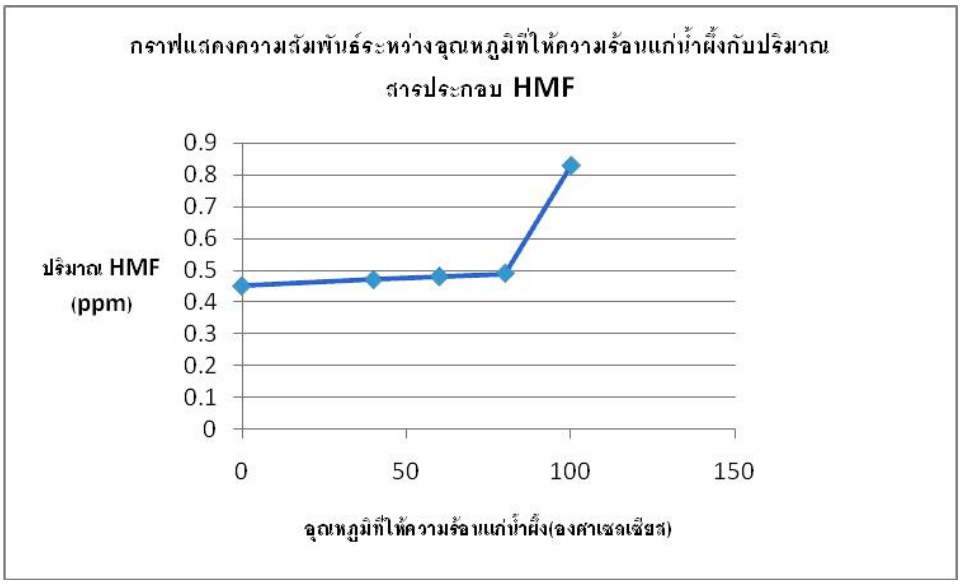
3.1 ผลของอุณหภูมิในการให้ความร้อนแก่น้ำผึ้ง

เมื่อทำการศึกษาโดยทำการแปรผันอุณหภูมิในการให้ความร้อนแก่น้ำผึ้ง ที่อุณหภูมิ 40, 60, 80, 100 องศาเซลเซียส และไม่ให้ความร้อนแก่น้ำผึ้ง เป็นเวลา 30 นาทีพบว่าอุณหภูมิที่ให้ความร้อนแก่น้ำผึ้งมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารประกอบ HMF ดังแสดงในตารางที่ 10

ตาราง 10 ความสัมพันธ์ของอุณหภูมิในการให้ความร้อนแก่น้ำผึ้งกับปริมาณ HMF

อุณหภูมิในการให้ความร้อน (องศาเซลเซียส)	ปริมาณ HMF (ppm)	%RSD (n = 6)
อุณหภูมิห้อง	0.45±0.02	3.90
40	0.47±0.02	4.86
60	0.48±0.02	5.41
80	0.49±0.02	3.11
100	0.83±0.01	2.43

จากตาราง 10 จะพบว่าเมื่ออุณหภูมิในการให้ความร้อนต่อน้ำผึ้งมากขึ้น ปริมาณสารประกอบ HMF จะเพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย จึงสามารถสรุปได้ว่าปริมาณสารประกอบ HMF แปรผันโดยตรงกับอุณหภูมิในการให้ความร้อน ดังแสดงในภาพ 8



ภาพประกอบ 8 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสาร HMFกับอุณหภูมิในการให้ความร้อนแก่น้ำผึ้ง

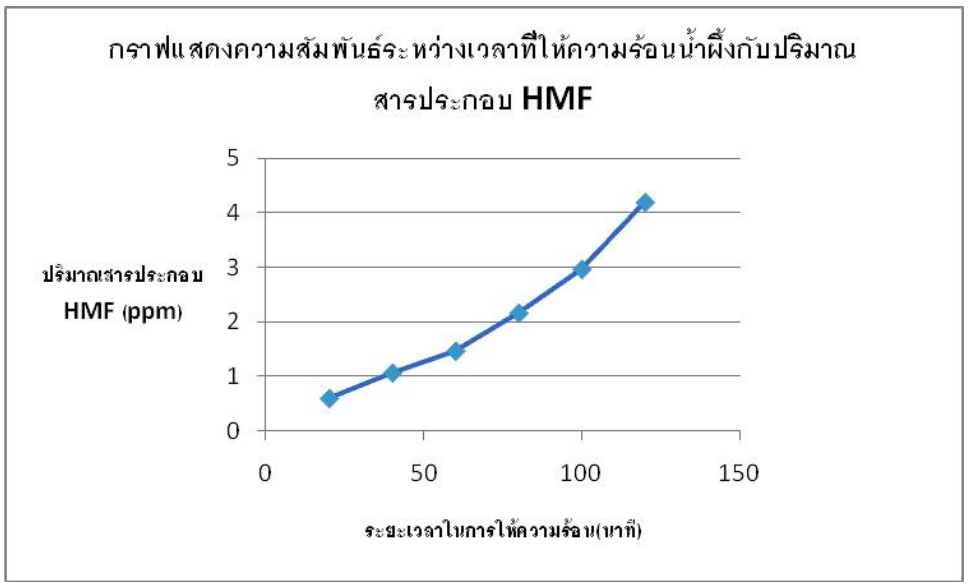
3.2 ผลของเวลาในการให้ความร้อนน้ำผึ้ง

เมื่อทำการศึกษาโดยทำการแปรผันอุณหภูมิในการให้ความร้อนแก่น้ำผึ้ง ที่เวลา 20, 40, 60, 80, 100, 120 นาที โดยให้ความร้อนแก่น้ำผึ้งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส พบว่าเวลาที่ให้ความร้อนแก่น้ำผึ้งมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารประกอบ HMF ดังตารางที่ 11

ตาราง 11 ความสัมพันธ์ของระยะเวลาในการให้ความร้อนแก่น้ำผึ้งกับปริมาณ HMF

ระยะเวลา (นาที)	ปริมาณสารประกอบ HMF (ppm)	%RSD (n = 6)
20	0.59 ± 0.03	4.51
40	1.06 ± 0.07	6.68
60	1.46 ± 0.07	4.60
80	2.16 ± 0.13	6.14
100	2.97 ± 0.15	4.88
120	4.20 ± 0.13	3.10

จากตาราง 11 จะพบว่าเมื่อเวลาในการให้ความร้อนต่อน้ำผึ้งมากขึ้น ปริมาณสารประกอบ HMF จะเพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย จึงสามารถสรุปได้ว่าปริมาณสารประกอบ HMFมีความสัมพันธ์แบบแปรผันโดยตรงกับระยะเวลาในการให้ความร้อนแก่น้ำผึ้ง ตามแสดงในภาพ 9



ภาพประกอบ 9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ HMFกับระยะเวลาในการให้ความร้อนแก่น้ำผึ้ง

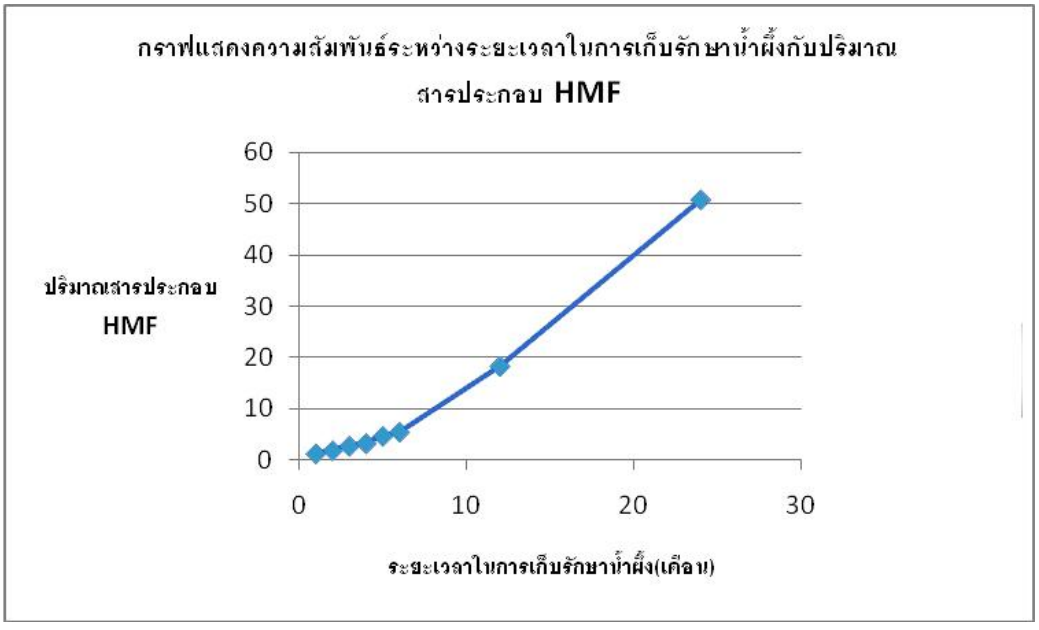
3.3 ผลของระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำผึ้ง

เมื่อทำการศึกษาปัจจัยด้านเวลาในการเก็บรักษาน้ำผึ้ง โดยทำการตรวจวัดปริมาณสารประกอบ HMF ในน้ำผึ้งที่ผ่านเวลาในการเก็บรักษาต่าง ๆ กันดังนี้ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 24 เดือน พบว่า เมื่อระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำผึ้งมากขึ้น ปริมาณสารประกอบ HMF ที่ตรวจพบมีมากขึ้นตามไปด้วย ดังตาราง 12

ตาราง 12 ความสัมพันธ์ของปริมาณ HMFกับระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำผึ้ง

เวลาในการเก็บรักษาน้ำผึ้ง (เดือน)	ปริมาณสารประกอบ HMF (ppm)
1	1.31
2	1.91
3	2.77
4	3.29
5	4.70
6	5.51
12	18.30
24	50.73

เมื่อสร้างกราฟเพื่อพิจารณาหาความสัมพันธ์ของปริมาณสารประกอบ HMF กับระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำผึ้ง จะได้ผลตามแสดงในภาพ 10



ภาพประกอบ 10 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ HMFกับระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำผึ้ง

จากภาพ 10 พบว่าแนวโน้มที่จะตรวจพบสารประกอบ HMF ในน้ำผึ้งมีการเปลี่ยนแปลงแบบเชิงเส้น หรืออาจเป็นเอกซ์โพเนนเชียล

ตอนที่ 4 การวิเคราะห์ 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ในตัวอย่างยาลูกกลอนด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ผู้วิจัยได้ทำการเก็บตัวอย่างยาลูกกลอนจำนวน 28 ตัวอย่าง มาทำการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบHMF พบว่า ตัวอย่างยาลูกกลอนที่นำมาวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ HMF นั้นมีปริมาณสารประกอบ HMF อยู่ในช่วง 1.30 - 44.94 ppm โดยมีค่าขีดความสามารถต่ำสุดในการวิเคราะห์ (LOD) เท่ากับ 0.65 ppm แสดงให้เห็นว่าในยาลูกกลอนที่มีวางจำหน่ายสามารถตรวจพบสารประกอบ HMF ในทุกตัวอย่าง และจัดว่ามีปริมาณมาก เนื่องจากตรวจพบสารประกอบ HMF ในปริมาณมากกว่าการทดลองในระบบต้นแบบ ทั้งนี้เพ าะการทดลองในระบบต้นแบบได้จำลองระบบของสารตั้งต้นด้วยความเข้มข้นต่ำ จึงตรวจพบน้อย แต่ในความจริงจากผลการ ทดลองในตอนที่ 2 และ 3 พบว่าในน้ำผึ้งเองสามารถจะถูกตรวจพบสารนี้ในระดับหนึ่ง แต่เมื่อถูกนำมาเป็นตัวประสานผงยาในขบวนการผลิตยาลูกกลอนและเก็บรักษาไว้ระยะหนึ่งก่อนจะจำหน่ายได้ ซึ่งถ้ายาถูกเก็บรักษาไว้นานมากๆ ก็มีโอกาสที่จะพบสารประกอบ HMF ได้ในปริมาณสูง

5. ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการปรับปริมาณและอัตราส่วนของกรดอะมิโนและน้ำตาล ในระบบต้นแบบเพื่อศึกษาตัวแปรอื่น ๆ ที่เป็นปัจจัยในการแปรผันของปริมาณสารประกอบ HMF
2. ควรมีการทดสอบสภาวะการเก็บรักษาตัวอย่างน้ำผึ้ง เช่น เก็บในที่มืด ในที่โดนแสงแดด และ/หรือ อุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษา เพื่อสังเกตตัวแปรอื่น ๆ ที่เป็นปัจจัยในการแปรผันของปริมาณสารประกอบ HMF
3. ควรมีการแยกลักษณะบรรจุภัณฑ์ของยาลูกกลอน เช่น แบบซองทึบ-ใส แบบขวดทึบ-ใส หรือวัสดุที่เป็นบรรจุภัณฑ์ ในการวิเคราะห์เพื่อดูผลของปัจจัยจากบรรจุภัณฑ์ที่ใช้เก็บยาลูกกลอน
4. ควรมีการศึกษาตัวอย่างในวงกว้างมากขึ้น เพื่อประโยชน์ทางด้านสุขภาพของผู้บริโภค โดยศึกษาจากตัวอย่างยาประเภทอื่น ๆ

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

ชยันต์ พิเชียรสุนทร; และ วิเชียร วีรวงส์. (2545). *คู่มือเภสัชกรรมแผนไทย เล่ม 1 น้ำกระสายยา*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์อมรินทร์.

ชยันต์ พิเชียรสุนทร; และ วิเชียร วีรวงส์. (2545). *คู่มือเภสัชกรรมแผนไทย เล่ม 3 เครื่องยาสัตววัตถุ*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์อมรินทร์.

นิธิยา รัตนาปนนท์. (2549). *เคมีอาหาร*. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.

พงศ์เทพ อัครธนกุล. (2527). *ว่าด้วยผึ้งและการเลี้ยงผึ้ง*. กรุงเทพฯ: ไทยวัฒนาพานิช.

ภานุทรรศน์. (2545). *ผึ้ง*. กรุงเทพฯ: น้ำฝน.

รัชนี ตัณฑะพานิชกุล. (2547). *เคมีอาหาร*. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง.

วรรณา ตุลยธัญ. (2549). *เคมีอาหารของคาร์โบไฮเดรต*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ศิริวัฒน์ วงษ์ศิริ. (2532). *ชีววิทยาของผึ้ง*. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: ต้นอ้อ.

ศิวาพร ศิวเวชช. (2546). *วัตถุเจือปนอาหาร เล่ม 1*. นครปฐม: โรงพิมพ์ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ.

สมเกียรติ พิกุลแก้ว. (2531). *การวิเคราะห์หาปริมาณขององค์ประกอบบางชนิดและวัตถุมีพิษที่ตกค้างในน้ำผึ้งที่ได้จากสวนพรรณไม้ต่างชนิดกัน*. ปริญญานิพนธ์ กศ.ม. (เคมี) กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.

สมนึก บุญเกิด; และ ธนานิธ เสือวรรณศรี. (2544). *ผึ้ง*. กรุงเทพฯ: มติชน.

สมพร ภูติยานันต์. (2542). *ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับแพทย์แผนไทย ว่าด้วยสมุนไพรกับการแพทย์แผนไทย*. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์สงเคราะห์ทหารผ่านศึก.

สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ. (2528). *หลักการเลี้ยงและขยายพันธุ์ผึ้งในประเทศไทย*. กรุงเทพฯ: ฟันนี่พับบลิชชิ่ง.

สุธาสินี บุญเชียงมา; และคนอื่นๆ. (2550). *การวิเคราะห์เชิงปริมาณของไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลในน้ำผึ้ง*. ใน การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 33(วทท. 33). นครศรีธรรมราช: สมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์และมหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์.

สุภาภรณ์ ครัดทัพ ฮาร์เวล. (2550). *การคำนวณขั้นพื้นฐานสำหรับเคมีวิเคราะห์*. เชียงใหม่: สถานบริการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (สวท.-มช.) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

แสนนัด หงษ์ทรงเกียรติ. (2531). *เทคโนโลยีการเลี้ยงผึ้ง*. กรุงเทพฯ: คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข. (2541). *ยาลูกกลอน*. (เอกสารเผยแพร่). กรุงเทพฯ: ม.ป.พ. อัดสำเนา.

Alcazar, Angela.; et al. (2006). *HPLC determination of 2-furaldehyde and 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde in alcoholic beverages*. Microchemical Journal. 82: 22-28.

Ameur, Lamia Ait.;et al. (2006). *Accumulation of 5-hydroxymethyl-2-furfural in cookies during the backing process: Validation of an extraction method*. Food Chemistry. 98: 790-796.

AOAC.Official. 2000. *Methods of Analysis.* JAOAC. 44 .

Codex Alimentarius. 1993. *Standard for Honey*. Ref.Nr.Cl . 1993/14-SH FAO and WHO. Rome.

Durmaz, Gokhan & Gokmen Vural (2010). *Determination of 5-hydroxymethyl-2-furfural and 2-furfural in oils as indicators of heat pre-treatment*. Food Chemistry. 123: 912-916.

Ferrer, E.; et al. (2002). *High-performance liquid chromatographic determination of furfural compounds in infant formulas changes during heat treatment and storage.* Journal of Chromatography A. 947: 85-95.

Gokmen, Vural.; & Acar, Jale. (1999). *Simultaneous determination of 5-hydroxymethylfurfural and patulin in apple juice by reversed-phase liquid chromatography*. Journal of Chromatography A. 847: 69-74.

Henares, J.A. Rufian.; et al. (2006). *Analysis of heat-damage indices in breakfast cereals:Influence of composition*. Journal of Cereal Science. 43: 63-69.

Khalil, M.I.; et al. (2010). *High 5-hydroxymethylfurfural concentrations are found in Malaysian honey samples stored for more than one year.* Food and Chemical Toxicology. 48: 2388-2392.

Labuza, Theodore P.; et al. (1993). *Maillard reactions in chemistry, food and health.* Bodmin: Hortnolls.

Laroque, Delphine.; et al. (2008). *Kinetic study on the Maillard reaction. Consideration of sugar reactivity.* Food Chemistry. 111: 1032-1042.

Lee, Chang Y.; & Whitaker, John R. (1995). *Enzymatic browning and its prevention*. Washington, D.C.

Muangthai, P.; et al. (2004). *Study of Maillard reaction in model systems between standard sugar and amino acid.* In 30 th Congress on Science and Technology of Thailand, 19 –21 October 2004. pp.11.

Muangthai, P.; & Surapat, S. (2004). *Quantitative analysis of hydroxy-2-methylfurfural in heated raw milk and reconstituted milk.* In International conference on Environment and Safety SECOTOX 2004. pp.64.

Murano, Peter S. (2003). *Understanding food science and technology.* Belmont: Wadsworth/Thomson Learning.

Nozal, Maria J.; et al. (2001). *High-performance liquid chromatographic determination of methyl anthranilate, hydroxymethylfurfural and related compounds in honey.* Journal of Chromatography A. 917: 95-103.

Nursten, Harry. (2005). The *maillard reaction chemistry, biochemistry and implications*. Gateshead: Athenaeum Press Ltd.

Parliament, Thomas H.; et al. (1994). *Thermally generated flavors Maillard, Microwave and Extrusion Processes*. Washington, D.C.

Skoog, Douglas A.; West, Donald M.; & Holler , James F. (1992). *Fundamental of Analytical Chemistry.* 6th ed. Orlan: Saunders College.

Spano, Nadia.; et al. (2006). *An RP-HPLC determination of 5-hydroxymethylfurfural in honey The case of strawberry tree honey.* Talanta. 68: 1390-1395.

Teixid, Erika.; et al. (2008). *Liquid chromatography multi-stage mass spectrometry for the analysis of 5-hydroxymethylfurfural in foods*. Journal of Chromatography A. 1185: 102-108.

Tosi, E.; et al. (2002). *Honey thermal treatment effects on hydroxymethylfurfural content*. Food Chemistry. 77: 71-74.

Wong, D. W. S. (1989). *Mechanism and Theory in Food Chemistry.* New York: Van Nostrand Reinhold.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
เครื่องมือ อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

ภาพประกอบ 11 เครื่องอังไอน้ำที่สามารถควบคุมอุณภูมิได้ใช้ในการให้ความร้อนแก่ระบบต้นแบบและตัวอย่างน้ำผึ้ง

ภาพประกอบ 12 ชุดกรองที่ใช้ในการกรองสารมาตรฐานและสารตัวอย่างก่อนนำไปฉีดเข้าสู่ระบบโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ภาพประกอบ 13 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง(high performance liquid chromatography)

ภาพประกอบ 14 เครื่องกรองน้ำเพื่อนำใช้กับระบบโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ภาพประกอบ 15 ตัวอย่างน้ำผึ้งที่ใช้ในงานวิจัย

ภาพประกอบ 16 ตัวอย่างยาลูกกลอนที่ใช้ในงานวิจัย

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ และค่าพารามิเตอร์ในการวิเคราะห์

ภาคผนวก ข
การวิเคราะห์ผลทางสถิติ และค่าพารามิเตอร์ในการวิเคราะห์

พารามิเตอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ผลทางสถิติของงานวิจัยนี้ ได้แก่ ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจหาสัญญาณได้และความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้ในการทำปริมาณวิเคราะห์ได้ มีสูตรการคำนวณดังนี้

1. ค่าเฉลี่ย (mean; $\bar{X}$)

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^{n} X_i}{N}$$

เมื่อ $\bar{X}$ แทนค่าเฉลี่ย
X_i แทนค่าที่ได้จากการทดลองในแต่ละครั้ง
N แทนจำนวนครั้งในการทดลอง

2. ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation; SD)

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (X_i - \bar{X})^2}{N-1}}$$

เมื่อ SD แทนค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
$\bar{X}$ แทนค่าเฉลี่ย
X_i แทนค่าที่ได้จากการทดลองในแต่ละครั้ง
N แทนจำนวนครั้งในการทดลอง

3. ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative of standard deviation; %RSD)

$$\%RSD = \frac{SD}{\bar{X}} x100$$

เมื่อ RSD แทนค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์
SD แทนค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
$\bar{X}$ แทนค่าเฉลี่ย

4. ค่าขีดความสามารถต่ำสุดในการตรวจวัด(LOD) และขีดความสามารถต่ำสุดในการวิเคราะห์ (LOQ)

$$S_{xx} = \sum X_i^2 - \frac{(\sum X_i)^2}{N}$$

$$S_{yy} = \sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{N}$$

$$S_{xy} = \sum x_i y_i - \frac{\sum x_i \sum y_i}{N}$$

$$S_r = \sqrt{\frac{S_{yy} - m^2 S_{xx}}{N-2}}$$

$$S_b = S_r \sqrt{\frac{1}{N - (\sum X_i)^2 / \sum X_i^2}}$$

$$LOD = \frac{3S_b}{m}$$

$$LOQ = \frac{10S_b}{m}$$

เมื่อ S_r แทนค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการถดถอย (Regression)

S_b แทนค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของส่วนตัด (Intercept) หรือแบลงค์

m แทนความชันของกราฟมาตรฐาน

LOD แทนความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจหาได้

LOQ แทนค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้ในการทำปริมาณวิเคราะห์

ภาคผนวก ค

คุณสมบัติของสารประกอบ **5-hydroxymethyl-2-furfuraldehyde**

ภาคผนวก ค

คุณสมบัติของสารประกอบ 5-hydroxymethyl-2-furfuraldehyde

IUPAC name	5-(hydroxymethyl) -2-furaldehyde
CAS number	67-47-0
Molecular formula	$C_6H_6O_3$
Structural Formula	
Molar mass	126.11 g/mol
Density	1.29 g/cm^3
Melting point	30-34 ^{0}C
Boiling point	114-116 ^{0}C (1 mbar)

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ	นายอาทิตย์ กัณฐัศว์กำพล
วันเดือนปีเกิด	2 พฤษภาคม พ.ศ. 2525
สถานที่เกิด	จังหวัดชลบุรี
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 54/184 หมู่ 9 ตำบล บ้านสวน อำเภอ เมือง จังหวัดชลบุรี 20000
ตำแหน่งหน้าที่การงานในปัจจุบัน	-
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2543	มัธยมศึกษาตอนปลาย จากโรงเรียนชลบุรี “ สุขบท ” อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี
พ.ศ. 2548	วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเคมี จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร
พ.ศ. 2553	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเคมี จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร