

การวิเคราะห์หาปริมาณกรดออร์โทคูมาริกและกรดแกลลิกในน้ำผึ้ง
โดยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตเมตรี

อัญญรัตน์ คีละพงษ์
อารีรัตน์ บุญโย

การศึกษาอิสระ เสนอเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาเคมี

มีนาคม 2563

มหาวิทยาลัยพะเยา

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยพะเยา

การวิเคราะห์หาปริมาณกรดออร์โทคูมาริกและกรดแกลลิกในน้ำผึ้ง
โดยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตเมตรี

อัญญรัตน์ คีละพงษ์
อารีรัตน์ บุญโย

การศึกษาอิสระ เสนอเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาเคมี

มีนาคม 2563

มหาวิทยาลัยพะเยา

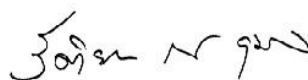
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยพะเยา

คณะกรรมการสอบการศึกษาอิสระ อาจารย์ที่ปรึกษา และคณบดีคณะวิทยาศาสตร์ ได้พิจารณาการศึกษาเรื่อง “การวิเคราะห์หาปริมาณกรดออร์โทคูมาริกและกรดแกลลิกในน้ำผึ้งโดยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตเมตรี” เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี มหาวิทยาลัยพะเยา



(ดร.วิไลวรรณ ภาคทอง)

ประธานกรรมการ



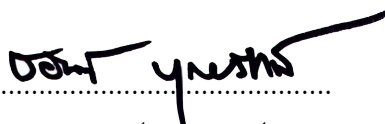
(ดร.รัตติยา ณ อุบล)

กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา



(ดร.ชัยพัฒน์ ลาพิน)

กรรมการ



(รองศาสตราจารย์ ดร.ชัยันต์ บุญรักษ์)

คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

มีนาคม 2563

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยพะเยา

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาครั้งนี้ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ดร.รัตยา ณ อุบล อาจารย์ที่ปรึกษางานวิจัย ที่ได้ให้คำแนะนำปรึกษาและข้อคำต่าง ๆ อันเป็นประโยชน์เกี่ยวกับงานวิจัย และได้ตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องตลอดระยะเวลาดำเนินการศึกษา ทำให้การศึกษาครั้งนี้สำเร็จได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ดร.วิไลวรรณ ภาคทอง และ ดร.ชัยพัฒน์ ลาพิณี คณะกรรมการในการสอบครั้งนี้ที่ให้คำแนะนำ ตลอดจนให้ความรู้ ข้อเสนอแนะและตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ

ขอขอบพระคุณคณาจารย์สาขาเคมีทุกท่านที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ให้ข้าพเจ้าตลอดมา รวมถึงเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา ที่อำนวยความสะดวกในเรื่องอุปกรณ์ เครื่องมือต่าง ๆ ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการและคอยให้คำปรึกษาตลอดการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และผู้มีพระคุณที่คอยให้กำลังใจและคอยสนับสนุนให้ความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้วยจนประสบความสำเร็จการศึกษาในระดับอุดมศึกษา รวมถึงขอบคุณเพื่อน ๆ ที่คอยให้กำลังใจและคอยช่วยเหลือมาโดยตลอด

อัญญรัตน์ ศีละพงษ์

อารีรัตน์ บุญโย

ชื่อเรื่อง	การวิเคราะห์หาปริมาณกรดออร์โทคูมาริกและกรดแกลลิกในตัวอย่างน้ำผึ้งโดยเทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตเมตรี	
ผู้ศึกษาคนคว้า	นางสาวอัญญรัตน์ ศีละพงษ์	
	นางสาวอารีรัตน์ บุญโย	
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.รัตติยา ณ อุบล	
วิทยาศาสตร์บัณฑิต	สาขาเคมี	
คำสำคัญ	กรดออร์โทคูมาริก กรดแกลลิก น้ำผึ้ง ยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตเมเตอร์	

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและตรวจสอบเทคนิคที่ง่ายและรวดเร็วสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณกรดออร์โทคูมาริกและกรดแกลลิกในตัวอย่างน้ำผึ้งซึ่งซื้อจากผู้เลี้ยงผึ้งโพรงป่าในท้องถิ่นจังหวัดพะเยา ทำการสกัดตัวอย่างน้ำผึ้งตามด้วยการตรวจวัดโดยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ 272 และ 266 นาโนเมตร ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดกรดออร์โทคูมาริกและกรดแกลลิก ได้แก่ ชนิดของตัวทำละลาย ปริมาณตัวทำละลายและเวลาในการบั่นเหวียง ซึ่งการสกัดกรดออร์โทคูมาริกและกรดแกลลิกโดยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน 3 ชนิด (เมทานอล เอทานอล และเมทานอล : เอทานอล (1 : 1)) พบว่าเอทานอลเป็นตัวทำละลายที่ดีที่สุดในการสกัด เพื่อหาปริมาณกรดออร์โทคูมาริกและกรดแกลลิก วิธีที่น่าเสถรมีช่วงความเป็นเส้นตรงที่ดี ($R^2 = 0.9980$ และ $R^2 = 0.9962$) ในช่วงความเข้มข้น 0.05–30.00 และ 0.10–80.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ มีความแม่นยำที่ดีโดยมีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์น้อยกว่า 7.3 % ซีดจำกัดการตรวจวัดและขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณของกรดออร์โทคูมาริกมีค่าเท่ากับ 0.01 และ 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแกลลิกมีค่าเท่ากับ 0.03 และ 0.10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร้อยละการได้กลับคืนที่เต็มสารมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริกและกรดแกลลิก 5.00 มิลลิกรัมต่อลิตรในตัวอย่าง อยู่ในช่วง 93–96 % และ 82–84% จากงานวิจัยพบปริมาณกรดออร์โทคูมาริกและกรดแกลลิกในตัวอย่างน้ำผึ้งที่แตกต่างกัน โดยพบปริมาณกรดออร์โทคูมาริกและกรดแกลลิกในตัวอย่างน้ำผึ้ง อยู่ในช่วง 282.91–497.93 และ 615.15–1051.28 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ เทคนิคนี้สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณกรดออร์โทคูมาริกและกรดแกลลิกในตัวอย่างน้ำผึ้งได้ เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ง่าย น่าเชื่อถือ รวดเร็ว และราคาไม่แพง

Title	Determination of <i>o</i> -coumaric acid and gallic acid in honey sample by UV-Visible spectrophotometry	
Author	Anyarat	Silapong
	Areerat	Boonyo
Advisor	Dr.Rattiya	Na Ubol
Bachelor of Science	Program in Chemistry	
Key word	<i>o</i> -Coumaric acid, Gallic acid, Honey, UV-Visible spectrophotometer	

ABSTRACT

This study aimed to develop and validate a simple, rapid and low cost analytical method for the determination of *o*-coumaric acid and gallic acid in honey samples collected from local beekeeper of Phayao province. Honey samples were extracted under optimum conditions followed by UV-Vis spectrophotometric measurement at 272 and 266 nm. The optimum conditions for extraction *o*-coumaric acid and gallic acid including types of solvents, solvent volumes and centrifuge times were also investigated. *o*-Coumaric acid and gallic acid were extracted using three different solvents (Methanol, Ethanol and Methanol : Ethanol (1:1)) in which ethanol appears to be an excellent extractant. For determination of *o*-coumaric acid and gallic acid, the proposed method showed good linearity ($R^2 = 0.9980$ and $R^2 = 0.9962$) in a range of 0.05–30.00 and 0.10–80.00 mg/L, respectively. Precision was good with relative standard deviation of less than 7.3 %. The limit of detection and the limit of quantitation of *o*-coumaric acid were 0.01 and 0.05 mg/L, gallic acid were 0.03 and 0.10 mg/L. Recovery of the analyte at 5.00 mg/L *o*-coumaric acid and gallic acid standard in spiked samples was in the range of 93–96 % and 82–84 %. *o*-Coumaric acid and gallic acid was found to be present in varied concentrations in the honey samples. The concentrations of *o*-coumaric acid and gallic acid in honey samples range from 282.91–497.93 and 615.15–1051.28 mg/kg, respectively. The proposed method could be applied to the analysis of *o*-coumaric acid and gallic acid in honey samples with the advantages of simple, reliable, rapid and inexpensive method.

สารบัญ

หน้าอนุมัติ.....	ก
กิตติกรรมประกาศ.....	ข
บทคัดย่อ.....	ค
ABSTRACT.....	ง
สารบัญเรื่อง.....	จ
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญภาพ.....	ต

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.1.1 ความเป็นมาของน้ำผึ้ง.....	1
1.1.2 ความสำคัญของน้ำผึ้ง.....	1
1.1.3 ความสำคัญของสารต้านอนุมูลอิสระในน้ำผึ้ง.....	2
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.3 สมมติฐานของการวิจัย.....	3
1.4 ขอบเขตของการวิจัย.....	3
1.5 ระยะเวลาที่ทำการวิจัย.....	3
1.6 สถานที่ทำการวิจัย.....	3
1.7 นิยามศัพท์เฉพาะ.....	3
1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ผึ้ง	5
2.1.1 ชนิดของผึ้ง.....	5
2.2 น้ำผึ้ง	6
2.2.1 วิธีการผลิตน้ำผึ้ง	6
2.2.2 ความแตกต่างของน้ำผึ้งตามชนิดของพืช.....	7
2.2.3 คุณสมบัติของน้ำผึ้ง.....	7
2.2.4 ส่วนประกอบในน้ำผึ้ง	8

สารบัญ (ต่อ)

2.2.5 ลักษณะที่ดีของน้ำผึ้ง.....	10
2.2.6 ประโยชน์ของน้ำผึ้ง.....	10
2.2.7 วิธีการทดสอบน้ำผึ้งแท้.....	11
2.3 อนุมูลอิสระ.....	11
2.4 สารต้านอนุมูลอิสระ.....	12
2.4.1 การแบ่งประเภทสารต้านอนุมูลอิสระตามลักษณะการออกฤทธิ์.....	13
2.4.2 แหล่งที่มาของสารต้านอนุมูลอิสระ.....	16
2.4.3 กลไกการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ.....	18
2.5 เทคนิคอัลตราไวโอเลตและวิสิเบิลสเปกโตรสโคปี (Ultraviolet-visible spectroscopy)	19
2.5.1 หลักการทำงาน.....	19
2.5.2 ส่วนประกอบของเครื่อง.....	19
2.5.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการดูดกลืนแสง.....	21
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	22
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	
3.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....	31
3.2 วัสดุ อุปกรณ์และเครื่องมือ.....	31
3.3 ตัวอย่างน้ำผึ้ง.....	31
3.4 การศึกษาหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณกรด ออร์โทคูมาริกและกรดแกลลิกในตัวอย่างน้ำผึ้ง.....	33
3.4.1 การศึกษาหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณ กรดออร์โทคูมาริก.....	33
3.4.2 การศึกษาหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณ กรดแกลลิก.....	34
3.5 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการสกัดตัวอย่าง.....	34
3.5.1 วิธีการสกัดตัวอย่างด้วยตัวทำละลาย.....	34

สารบัญ (ต่อ)

3.6 การตรวจสอบประสิทธิภาพของการวิเคราะห์หากรดออร์โทคูมาริก (Analytical performance).....	34
3.6.1 การศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity).....	34
3.6.2 การศึกษาความแม่นยำของการวิเคราะห์ (Precision).....	35
3.6.2.1 Repeatability.....	35
3.6.2.2 Reproducibility.....	35
3.6.3 การศึกษาขีดจำกัดการตรวจวัด (Limit of Detection) และขีดจำกัด การตรวจวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation).....	35
3.6.4 การศึกษาร้อยละการการได้กลับคืนของเครื่องมือใช้ใน การวิเคราะห์ (%Recovery).....	35
3.6.5 การศึกษาร้อยละการการได้กลับคืนของวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์ (%Recovery).....	36
3.6.6 การสร้างกราฟมาตรฐาน (Calibration Curve).....	36
3.6.7 การวิเคราะห์หาปริมาณกรดออร์โทคูมาริก.....	36
3.7 การตรวจสอบประสิทธิภาพของการวิเคราะห์หากรดแกลลิก (Analytical performance).....	37
3.7.1 การศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity).....	37
3.7.2 การศึกษาความแม่นยำของการวิเคราะห์ (Precision).....	37
3.7.2.1 Repeatability.....	37
3.7.2.2 Reproducibility.....	37
3.7.3 การศึกษาขีดจำกัดการตรวจวัด (Limit of Detection) และขีดจำกัด การตรวจวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation).....	37
3.7.4 การศึกษาร้อยละการการได้กลับคืนของเครื่องมือที่ใช้ ในการวิเคราะห์ (%Recovery).....	38
3.7.5 การศึกษาร้อยละการการได้กลับคืนของวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์ (%Recovery).....	38

สารบัญ (ต่อ)

3.7.6 การสร้างกราฟมาตรฐาน (Calibration Curve).....	38
3.7.6 การวิเคราะห์หาปริมาณกรดแกลลิก.....	39

บทที่ 4 ผลการวิจัย

4.1 ผลของการหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการวิเคราะห์กรดออร์โทคูมาริก โดยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตเมตรี.....	40
4.2 ผลของการหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการวิเคราะห์กรดแกลลิก โดยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตเมตรี.....	45
4.3 สภาพที่เหมาะสมในการสกัดกรดออร์โทคูมาริก.....	50
4.3.1 ผลการศึกษาชนิดของตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด (Types of solvent).....	50
4.3.2 ผลการศึกษาปริมาตรตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด (Solvent volumes).....	52
4.3.3 ผลการศึกษาเวลาที่ใช้ในการปั่นเหวี่ยงที่เหมาะสมในการสกัด (Mixing times).....	53
4.4 สภาพที่เหมาะสมในการสกัดกรดแกลลิก.....	55
4.4.1 ผลการศึกษาชนิดของตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด (Types of solvent).....	55
4.4.2 ผลการศึกษาปริมาตรตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด (Solvent volumes)	56
4.4.3 ผลการศึกษาเวลาที่ใช้ในการปั่นเหวี่ยงที่เหมาะสมในการสกัด (Mixing times).....	58
4.5 สมรรถนะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์กรดออร์โทคูมาริก (Analytical performance).....	60
4.5.1 ผลการหาช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity).....	60
4.5.2 ผลการหาขีดจำกัดการตรวจวัด (Limit of Detection, LOD) และ ขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantization, LOQ).....	63
4.5.3 ผลการตรวจสอบความแม่นยำ (Precision).....	63

สารบัญ (ต่อ)

4.5.3.1 ความแม่นยำของเครื่องมือ (Repeatability).....	63
4.5.3.2 ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (Reproducibility).....	64
4.5.4 ผลการหาร้อยละการได้กลับคืนของเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ (%Recovery).....	65
4.5.5 ผลการหาร้อยละการได้กลับคืนของวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์ (%Recovery).....	67
4.6 สมรรถนะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์กรดแกลลิก (Analytical performance).....	68
4.6.1 ผลการหาช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity).....	68
4.6.2 ผลการหาขีดจำกัดการตรวจวัด (Limit of Detection, LOD) และ ขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantization, LOQ).....	71
4.6.3 ผลการตรวจสอบความแม่นยำ (Precision).....	71
4.6.3.1 ความแม่นยำของเครื่องมือ (Repeatability).....	71
4.6.3.2 ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (Reproducibility).....	72
4.6.4 ผลการหาร้อยละการได้กลับคืนของเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ (%Recovery).....	73
4.6.5 ผลการหาร้อยละการได้กลับคืนของวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์ (%Recovery).....	74
4.7 การวิเคราะห์หาปริมาณกรดออร์โทคูมาริกในตัวอย่างน้ำผึ้งโดย เทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตเมตรี.....	76
4.8 การวิเคราะห์หาปริมาณกรดแกลลิกในตัวอย่างน้ำผึ้งโดยเทคนิค ยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตเมตรี.....	77
บทที่ 5 บทสรุป	
5.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดตัวอย่างน้ำผึ้งในการวิเคราะห์ หาปริมาณกรดออร์โทคูมาริกและกรดแกลลิก.....	78
5.2 การตรวจสอบสมรรถนะในการวิเคราะห์กรดออร์โทคูมาริก (Analytical performance).....	78

สารบัญ (ต่อ)

5.3 การตรวจสอบสมรรถนะในการวิเคราะห์กรดแกลลิก (Analytical performance).....	80
5.4 การหาปริมาณกรดออร์โทคูมาริกและกรดแกลลิกในตัวอย่างน้ำผึ้ง.....	81
5.5 ข้อเสนอแนะ.....	81
บรรณานุกรม.....	83
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก.....	88
ภาคผนวก ข.....	128
ภาคผนวก ค.....	135

สารบัญตาราง

1	ลักษณะทางกายภาพตัวอย่างน้ำฝิ่งโพรงป่า.....	32
2	สมการเส้นตรงและค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของสารละลายมาตรฐานกรด ออร์โทคูมาริกที่ความยาวคลื่น 267, 268, 270, 271, 272, 273, 274 และ 275 นาโนเมตร	45
3	สมการเส้นตรงและค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของสารละลายมาตรฐานกรด แกลลิกที่ความยาวคลื่น 261-268 นาโนเมตร.....	50
4	ผลการศึกษานิตของตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด.....	51
5	ผลการศึกษาปริมาตรตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับการสกัด	52
6	ผลการศึกษาเวลาที่ใช้ในการปั่นเหวี่ยงที่เหมาะสมสำหรับการสกัด	54
7	ผลการศึกษานิตของตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด	55
8	ผลการศึกษาปริมาตรตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับการสกัด	57
9	ผลการศึกษาเวลาที่ใช้ในการปั่นเหวี่ยงที่เหมาะสมสำหรับการสกัด	59
10	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริกในการหา ช่วงความเป็นเส้นตรง.....	60
11	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริก (กราฟมาตรฐาน).....	62
12	ความแม่นยำ (Repeatability) โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน กรดออร์โทคูมาริกที่ความเข้มข้น 1.00, 5.00 และ 10.00 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	64
13	ความแม่นยำ (Reproducibility) โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย มาตรฐานกรดออร์โทคูมาริกที่ความเข้มข้น 1.00, 5.00 และ 10.00 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	65
14	ร้อยละการได้กลับคืนของเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ (%Recovery) ของกรดออร์โทมาริกในตัวอย่างน้ำฝิ่ง.....	66
1	ร้อยละการได้กลับคืนของวิธีการวิเคราะห์ (%Recovery) ของกรดออร์โทมาริกในตัวอย่าง น้ำฝิ่ง.....	67
16	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกในการหาช่วงความเป็น เส้นตรง.....	68
17	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (กราฟมาตรฐาน).....	70

สารบัญตาราง (ต่อ)

18 ความแม่นยำ (Repeatability) โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน
กรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 1.00, 20.00 และ 40.00 มิลลิกรัมต่อลิตร.....72

19 ความแม่นยำ (Reproducibility) โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย
มาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 1.00, 20.00 และ 40.00 มิลลิกรัมต่อลิตร.....73

20 ร้อยละการได้กลับคืนของเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ (%Recovery) ของ
กรดออร์โทมาริกในตัวอย่างน้ำผึ้ง.....74

21 ร้อยละการได้กลับคืนของวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์ (%Recovery) ของกรดแกลลิก
ในตัวอย่างน้ำผึ้ง.....75

22 ปริมาณกรดออร์โทมาริกที่พบในตัวอย่างน้ำผึ้ง.....76

23 ปริมาณกรดแกลลิกที่พบในตัวอย่างน้ำผึ้ง.....77

24 สภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการสกัดตัวอย่างน้ำผึ้งในการวิเคราะห์หาปริมาณ
กรดออร์โทมาริกและกรดแกลลิก.....78

25 การตรวจสอบสมรรถนะในการวิเคราะห์กรดออร์โทมาริก
(Analytical performance).....79

26 การตรวจสอบสมรรถนะในการวิเคราะห์กรดแกลลิก (Analytical performance)80

27 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทมาริกที่ความยาวคลื่น
267 นาโนเมตร88

28 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทมาริกที่ความยาวคลื่น
268 นาโนเมตร89

29 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทมาริกที่ความยาวคลื่น
270 นาโนเมตร91

30 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทมาริกที่ความยาวคลื่น
271 นาโนเมตร.....92

31 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทมาริกที่ความยาวคลื่น
272 นาโนเมตร93

32 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทมาริกที่ความยาวคลื่น
273 นาโนเมตร94

สารบัญตาราง (ต่อ)

33	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริกที่ความยาวคลื่น 274 นาโนเมตร	95
34	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริกที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร.....	96
35	ค่าการดูดกลืนแสงของเมทานอล.....	97
36	ค่าการดูดกลืนแสงของเอทานอล.....	98
37	ค่าการดูดกลืนแสงของเมทานอลต่อเอทานอล อัตราส่วน 1 ต่อ 1 โดยปริมาตร.....	98
38	ค่าการดูดกลืนแสงของเอทานอล ปริมาตร 5.00 มิลลิลิตร	100
39	ค่าการดูดกลืนแสงของเอทานอล ปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร.....	100
40	ค่าการดูดกลืนแสงของเอทานอลที่เวลาปั่นเหวี่ยง 3 นาที.....	101
41	ค่าการดูดกลืนแสงของเอทานอลที่เวลาปั่นเหวี่ยง 5 นาที.....	102
42	ค่าการดูดกลืนแสงของเอทานอลที่เวลาปั่นเหวี่ยง 10 นาที	103
43	ค่าการดูดกลืนแสงของเอทานอลต่อน้ำปราศจากไอออน (5:1 v/v) ที่ความยาวคลื่น 272 นาโนเมตร.....	105
44	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความยาวคลื่น 261 นาโนเมตร.....	106
45	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร.....	108
46	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความยาวคลื่น 263 นาโนเมตร.....	109
47	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความยาวคลื่น 264 นาโนเมตร	111
48	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความยาวคลื่น 265 นาโนเมตร	112
49	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความยาวคลื่น 266 นาโนเมตร	114
50	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความยาวคลื่น 267 นาโนเมตร	115

สารบัญตาราง (ต่อ)

51	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความยาวคลื่น 268 นาโนเมตร.....	117
52	ค่าการดูดกลืนแสงของเมทานอล.....	119
53	ค่าการดูดกลืนแสงของเอทานอล.....	120
54	ค่าการดูดกลืนแสงของเมทานอลต่อเอทานอล อัตราส่วน 1 ต่อ 1 โดยปริมาตร.....	120
55	ค่าการดูดกลืนแสงของเอทานอล ปริมาตร 5.00 มิลลิลิตร.....	122
56	ค่าการดูดกลืนแสงของเอทานอล ปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร.....	122
57	ค่าการดูดกลืนแสงของเอทานอลที่เวลาบ่มเหวี่ยง 3 นาที.....	123
58	ค่าการดูดกลืนแสงของเอทานอลที่เวลาบ่มเหวี่ยง 5 นาที.....	124
59	ค่าการดูดกลืนแสงของเอทานอลที่เวลาบ่มเหวี่ยง 10 นาที.....	125
60	ค่าการดูดกลืนแสงของเอทานอลต่อน้ำปราศจากไอออน (5:1 v/v) ที่ความยาวคลื่น 266 นาโนเมตร.....	127
61	ค่าการดูดกลืนแสงของเอทานอลต่อน้ำปราศจากไอออน (5:1 v/v) ที่ความยาวคลื่น 272 นาโนเมตร.....	129
62	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทโทคูมาริกความเข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	132

สารบัญภาพ (ต่อ)

15	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน กรดแกลลิกกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 266 นาโนเมตร.....	48
16	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน กรดแกลลิกกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 267 นาโนเมตร	49
17	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน กรดแกลลิกกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 268 นาโนเมตร.....	49
18	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของตัวทำละลายกับค่าการดูดกลืนแสง.....	51
19	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาตรของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด กับค่าการดูดกลืนแสง.....	53
20	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ใช้ในการสกัดกับค่าการดูดกลืนแสง.....	54
21	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของตัวทำละลายกับค่าการดูดกลืนแสง.....	56
22	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาตรของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด กับค่าการดูดกลืนแสง.....	58
23	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ใช้ในการสกัดกับค่าการดูดกลืนแสง.....	59
24	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน กรดออร์โทคูมาริกกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 272 นาโนเมตร.....	62
25	กราฟมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริกแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ สารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริกกับค่าการดูดกลืนแสง.....	63
26	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน กรดแกลลิกกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 266 นาโนเมตร.....	70
27	กราฟมาตรฐานกรดแกลลิกแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย มาตรฐานแกลลิกกับค่าการดูดกลืนแสง.....	71
28	กราฟมาตรฐานของสารละลายกรดออร์โทคูมาริก เพื่อคำนวณหาขีดจำกัด การตรวจวัด (Limit of Detection, LOD) และขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantization, LOQ).....	104
29	กราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก เพื่อคำนวณหาขีดจำกัดการตรวจวัด (Limit of Detection, LOD) และขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantization, LOQ).....	126

สารบัญภาพ (ต่อ)

30	น้ำผึ้ง (Honey) อำเภอเมือง.....	135
31	น้ำผึ้ง (Honey) อำเภอปง.....	135
32	น้ำผึ้ง (Honey) อำเภอเชียงคำ.....	136
33	น้ำผึ้ง (Honey) อำเภอเชียงม่วน.....	136
34	น้ำผึ้ง (Honey) อำเภอภูกามยาว.....	136
35	น้ำผึ้ง (Honey) อำเภอแม่ใจ.....	137
36	ลักษณะสีของตัวอย่างน้ำผึ้ง.....	137
37	เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (UV-Visible Spectrophotometer).....	138
38	การสแกนหาความยาวคลื่นสูงสุดของสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริก ที่ความเข้มข้น 0.10-60.00 ppm.....	138
39	การสแกนหาความยาวคลื่นสูงสุดของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ ความเข้มข้น 0.10-100.00 ppm.....	139
40	ตัวอย่างน้ำผึ้ง 1.66 กรัม (หลังละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน 1 มิลลิลิตร).....	139
41	ตัวอย่างน้ำผึ้งที่สกัดด้วยเมทานอล 5 มิลลิลิตร (หลังการเขย่า).....	140
42	ตัวอย่างน้ำผึ้งที่ทำการสกัดด้วยเมทานอล (หลังการปั่นเหวี่ยง).....	140
43	ตัวอย่างน้ำผึ้งหลังการสกัดด้วยเอทานอล.....	141
44	ตัวอย่างน้ำผึ้งที่เจือจางลง 10 เท่า	141

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

1.1.1 ความเป็นมาของน้ำผึ้ง

น้ำผึ้ง เป็นสารให้ความหวาน ชนิดแรกที่มนุษย์ใช้เป็นอาหาร เป็นผลผลิตของน้ำหวานจากดอกไม้และแหล่งน้ำหวานอื่น ๆ ในธรรมชาติที่ผึ้งงานนำมาเก็บสะสมไว้ในรังผึ้ง จากนั้นผึ้งจะกินน้ำหวานเข้าไป และน้ำหวานที่ผ่านการย่อยและผ่านเอนไซม์ในท้องผึ้งก็จะกลายมาเป็นน้ำผึ้งอยู่ในรังผึ้ง โดยน้ำผึ้งที่ได้มาจากแต่ละแห่งนั้นจะมีรสชาติ ความหอมหวาน และสีที่แตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับวัตถุดิบหรือชนิดของเกสรดอกไม้ที่ผึ้งไปเก็บ รวมถึงแหล่งของพืชและพื้นดินในบริเวณที่ผึ้งอาศัยอยู่ เพราะฉะนั้นน้ำผึ้งที่ได้จากรังผึ้งในป่าใหญ่ก็จะประกอบไปด้วยน้ำหวานจากดอกไม้หลากหลายพันธุ์ ส่วนน้ำผึ้งจากผึ้งเลี้ยงอาจมีน้ำหวานจากดอกไม้ชนิดเดียวหรือเพียงไม่กี่พันธุ์เท่านั้น

1.1.2 ความสำคัญของน้ำผึ้ง

น้ำผึ้งประกอบไปด้วยน้ำตาลประมาณ 78% น้ำอีก 17% และส่วนที่เหลือจะประกอบไปด้วยใยอาหาร วิตามินและแร่ธาตุ ที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย น้ำผึ้งมีสรรพคุณชำระล้างบาดแผล รักษาแผล สมานเนื้อเยื่อ บำรุงหัวใจ บำรุงสายตา บำรุงผิวพรรณให้เปล่งปลั่งมีน้ำมีนวล เสริมสร้างสติปัญญา นิยมใช้ในการแก้อาการไอ แก้หอบหืด รังกาย ชูบโบทรม รักษาอาการบาดเจ็บจากการถูกระแทก ทั้งยังใช้แก้แอสมาติก แก้สะอึก วิงเวียน มึนงง แก้ท้องเสีย แก้อาการเลือดออกง่าย แก้กระหาย เป็นลม รักษาโรคเกี่ยวกับตา แก้วพิษ และรักษาโรคพยาธิ เป็นต้น ส่วนใหญ่มักไม่ใช้น้ำผึ้งอย่างเดียว แต่จะผสมในยาหวาน ยาตอง หรืออาจใช้เป็นกระสายยา และยังใช้น้ำผึ้งผสมกับยาเพื่อให้ง่ายขึ้น จากรายงาน FAO ปี 2560 ไทยผลิตน้ำผึ้งเป็นอันดับ 2 ของเอเชีย รองจากเวียดนาม และเป็นอันดับ 36 ของโลก โดยไทยผลิตน้ำผึ้งได้ในปริมาณครึ่งหนึ่งของปริมาณที่เวียดนามผลิตได้ แต่เมื่อคำนวณอัตราการเลี้ยงผึ้งของเกษตรกรไทยแล้ว สามารถมีกำลังผลิตน้ำผึ้งได้ถึง 2 ใน 3 ของผลผลิตน้ำผึ้งจากเวียดนาม

1.1.3 ความสำคัญของสารต้านอนุมูลอิสระในน้ำผึ้ง

สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants) เป็นสารที่ช่วยต่อต้านหรือกำจัดอนุมูลอิสระ (Free Radicals) ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาออกซิเดชันภายในร่างกาย ซึ่งสามารถพบได้หลากหลายรูปแบบตามธรรมชาติ เช่น กระจับปวยออกซิเดชันที่ทำให้เหล็กกลายเป็นสนิม น้ำมันพืชที่มีกลิ่นเหม็นหืน ผลแอปเปิลเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลคล้ำ แต่หากเป็นในร่างกายจะพบได้จากการย่อยสลายโปรตีนและไขมัน ซึ่งมาจากอาหารที่รับประทานเข้าไป การรับเอามลพิษทางอากาศ คาร์บอนบูรี เชื้อโรค ฟันละออง การรับเอารังสียูวีจากแสงแดด รวมทั้งการหายใจทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ กลายเป็นสารอนุมูลอิสระล่องลอยอยู่ในร่างกายและสร้างความเสียหายให้กับเซลล์ต่าง ๆ กลายเป็นอาการเจ็บป่วยและโรคต่าง ๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคหัวใจ โรคปอด โรคตับแข็ง และโรคเบาหวาน เป็นต้น สารต้านอนุมูลอิสระจะเข้าไปจับกับตัวรับที่สามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน สารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยาต่อเนื่อกันเป็นลูกโซ่ เข้าไปทำลายเซลล์ต่าง ๆ ของร่างกาย สารต้านอนุมูลอิสระจะตรงเข้าขัดขวางปฏิกิริยาดังกล่าวเข้าจับกับสารอนุมูลอิสระ ยับยั้งไม่ให้เกิดการทำลายเซลล์ในปฏิกิริยาออกซิเดชัน และถูกออกซิไดซ์ โดยมีสารต้านอนุมูลอิสระเป็นตัวรีดิวซ์ สารต้านอนุมูลอิสระ เป็นสารอาหารที่สำคัญแม้ร่างกายจะสามารถสร้างขึ้นมาได้เองตามธรรมชาติ แต่ไม่เพียงพอกับปริมาณของสารอนุมูลอิสระที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว การได้รับจากอาหารที่มีประโยชน์ร่วมด้วย จึงจะช่วยให้เรามีสุขภาพที่แข็งแรงสมบูรณ์ได้

ในอาหารหลากหลายชนิดมีสารต้านอนุมูลชนิดต่าง ๆ อยู่ เช่น มะเขือเทศ กระจับปวย ส้ม ฝรั่ง ถั่วเหลือง นม ไข่และน้ำผึ้ง เป็นต้น การบริโภคน้ำผึ้งที่มีสารต้านอนุมูลอิสระจึงสามารถช่วยบำรุงร่างกาย ลดอาการเจ็บป่วยและโอกาสในการเกิดโรคเรื้อรังต่าง ๆ ได้และยังเป็นการสนับสนุนเกษตรกรผู้เลี้ยงผึ้งภายในประเทศ ในปัจจุบันน้ำผึ้งมีหลากหลายชนิดให้เลือกซื้อ เช่น น้ำผึ้งจากดอกทานตะวัน น้ำผึ้งจากดอกลาไยและน้ำผึ้งจากดอกลิ้นจี่ เป็นต้น ผู้วิจัยจึงทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในน้ำผึ้ง^[2]

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดกรดออร์โทคูมาริกและกรดแกลลิกในตัวอย่างน้ำผึ้งทั้ง 6 ตัวอย่างโดยใช้เทคนิคอัลตราไวโอเลตและวิลลิเบิลสเปกโทรโฟโตเมตรี

1.2.2 เพื่อศึกษาการวิเคราะห์หาปริมาณกรดออร์โทคูมาริกและกรดแกลลิกในน้ำผึ้งโดยใช้เทคนิคอัลตราไวโอเลตและวิลลิเบิลสเปกโทรโฟโตเมตรี

1.3 สมมติฐานของการวิจัย

เทคนิคอัลตราไวโอเลตและวิธีเบิลสเปกโทรโฟโตเมตรีในการวิเคราะห์หาปริมาณกรดออร์โทคูมาริกและกรดแกลลิกในน้ำผึ้งได้

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

1.4.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดด้วยน้ำผึ้ง

- ก. การศึกษาชนิดของตัวทำละลายในการสกัด
- ข. การศึกษาปริมาตรของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด
- ค. การศึกษาเวลาที่ใช้ในการปั่นเหวี่ยง

1.4.2 การทดสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์

- ก. การหาความเป็นเส้นตรง (Linearity)
- ข. การหาขีดจำกัดการตรวจวัดต่ำสุด (Limit of detection, LOD) และขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)
- ค. การตรวจสอบความแม่นยำของการวิเคราะห์ (Precision)
- ง. การหาการย่อยและการได้กลับคืน (%Recovery)

1.5 ระยะเวลาที่ทำการวิจัย

เดือนพฤศจิกายน 2562 – เดือนมีนาคม 2563

1.6 สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการทางเคมี SC 4311 และ SC 4314 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา

1.7 นิยามศัพท์เฉพาะ

อนุมูลอิสระ (Free Radicle) เป็นตัวทำลายภูมิคุ้มกันและเซลล์ต่าง ๆ เมื่อรวมตัวกับไขมันไม่ดี จะก่อให้เกิดเป็นสารพิษที่ทำลายเนื้อเยื่อ หรืออาจไปเปลี่ยนแปลงข้อมูลทางพันธุกรรมภายในเซลล์ ทำให้เซลล์ปกติแปรสภาพเป็นเซลล์มะเร็งได้

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) เป็นสารประกอบที่สามารถป้องกันหรือชะลอการเกิดกระบวนการออกซิเดชัน แต่กระบวนการอาจต้องใช้สารต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกันไป และไม่สามารถใช้แทนกันได้ ซึ่งสามารถลดความเสี่ยงต่อโรคเรื้อรังที่สัมพันธ์กับอาหาร เช่น โรคมะเร็ง โรคเบาหวาน โรคหัวใจ โรคสมอง เป็นต้น

1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.8.1 ได้รับความรู้และกระบวนการทางวิทยาศาสตร์เพิ่มขึ้น

- 1.8.2 เพิ่มทักษะในการใช้อุปกรณ์และเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์
- 1.8.3 ทำให้ทราบปริมาณกรดออร์โทคูมาริกที่มีอยู่ในตัวอย่างน้ำผึ้ง
- 1.8.4 ทำให้ทราบปริมาณกรดแกลลิกที่มีอยู่ในตัวอย่างน้ำผึ้ง

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ผึ้ง

ผึ้ง เป็นแมลงที่จัดอยู่อันดับ (Order) ไฮมีนอพเทรา (Hymenoptera) ได้แก่ แมลงพวก ผึ้ง ต่อ แตน มด รวมทั้งพวกต่อห้า และแตนเบียน (Predator and Parasitic Wasps) เป็นแมลงสังคม ที่มีการแบ่งวรรณะสำหรับทำหน้าที่ที่แตกต่างกันอีกทั้งยังเป็นแมลงเศรษฐกิจที่ผลิตน้ำผึ้ง สำหรับอุตสาหกรรมอาหาร และเครื่องสำอางต่าง ๆ รวมถึงเป็นแมลงที่มีบทบาทสำคัญสำหรับการผสมเกสรของพืช

ผึ้งเป็นแมลงที่มีวรรณะ ภายใน 1 รัง ประกอบไปด้วย ผึ้งนางพญา (Queen) ผึ้งตัวผู้ (Drone) และผึ้งงาน (Worker) ซึ่งทำหน้าที่ต่างกันภายในรัง โดยผึ้งนางพญา เป็นผึ้งที่มีลำตัวใหญ่ที่สุด มีอายุขัยมากกว่า 1 ปี อาจได้มากถึง 7 ปี โดยทั่วไป ใน 1 รังจะมีผึ้งนางพญา 1 ตัว ยกเว้นบางรังที่มีขนาดใหญ่ อาจพบได้ 2-3 ตัว ทำหน้าที่สำคัญคือวางไข่ภายในรัง ผึ้งตัวผู้มีขนาดใหญ่รองลงมาจากผึ้งนางพญา แต่อ้วนสั้นกว่าผึ้งนางพญา ภายใน 1 รัง มีจำนวน 200-500 ตัว มีอายุขัย 4-6 สัปดาห์ ทำหน้าที่คอยผสมพันธุ์กับผึ้งนางพญา ผึ้งงานเป็นผึ้งที่มีขนาดเล็กที่สุด แต่มีปริมาณมากที่สุดในรัง มีจำนวนมากถึง 5,000-30,000 ตัวต่อรัง มีอายุขัย 6-8 สัปดาห์ เป็นผึ้งเพศเมีย เกิดจากไข่ที่ได้รับการผสมจากผึ้งตัวผู้ แต่เป็นเพศเมียที่ไม่สมบูรณ์เพศ ทำหน้าที่ออกหาอาหาร หาน้ำหวาน สร้างรังจากไขที่ผลิตจากต่อมคอยเลีย ทำความสะอาดนางพญา และรัง นอกจากนี้ยังทำหน้าที่ป้อนอาหารให้แก่ผึ้งนางพญา และผึ้งตัวผู้^[1]

2.1.1 ชนิดของผึ้ง

1. ผึ้งหลวง (Apis dorsata) ตัวใหญ่และดุที่สุดในบรรดาผึ้งชนิดอื่น ๆ ที่พบในประเทศไทย รสชาติของน้ำผึ้งที่ได้มีรสหวานมาก มักทำรังเป็นครึ่งวงกลมใหญ่ ๆ ตามที่สูงในบริเวณที่อุดมสมบูรณ์มาก ๆ

2. ผึ้งโพรง (Apis Cerana) ตัวเล็กกว่าผึ้งหลวง ชอบอยู่ตามซอกหลืบทั้งโพรงดิน หรือโพรงไม้ ย้ายที่อยู่บ่อย หากมีสิ่งรบกวนเพียงเล็กน้อยจะพากันย้ายรังหายไปทันที เลี้ยงยาก แต่ก็เลี้ยงได้หากเข้าใจนิสัยของผึ้งชนิดนี้ดี

3. ผึ้งพันธุ์ (Apis Mellifera) บางครั้งเรียกว่าผึ้งโพรงฝรั่ง เป็นผึ้งที่นิยมเลี้ยงกันมากในประเทศไทย แหล่งกำเนิดอยู่ที่อิตาลี และมีการนำมาเพาะพันธุ์ต่อ ๆ กันมาจนถึงได้วันเลี้ยงง่าย นิยสดูอยู่เป็นที่ ไม่ดุร้าย ให้น้ำผึ้งปริมาณมาก

4. ผึ้งมัม (Apis florea) เป็นผึ้งที่ไม่มีเหล็กใน ตัวเล็ก ก้นปล้องบนสุดจะเป็นสีเหลืองส้ม เห็นชัดเจน ทำรังขนาดประมาณฝ่ามืออยู่บนกิ่งไม้ ไม่เป็นอันตราย ปัจจุบันมีการทำวิจัยว่าผึ้งชนิดนี้สามารถเลี้ยงให้อยู่ในรังเดียวกันกับผึ้งพันธุ์ได้โดยไม่ทำร้ายกันด้วย^[9]

2.2 น้ำผึ้ง

น้ำผึ้งเป็นผลผลิตของน้ำหวานจากดอกไม้และจากแหล่งน้ำหวานอื่น ๆ ที่ผึ้งงานนำมาเก็บสะสมและผ่านขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและทางกายภาพบางประการแล้วสะสมไว้ในรังผึ้ง น้ำผึ้งที่ได้มาจากแต่ละแห่งนั้นจะมีรสชาติ ความหอมหวาน และสีที่แตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับวัตถุดิบหรือชนิดของเกสรดอกไม้ที่ผึ้งได้ไป รวมถึงแหล่งของพืชและพื้นดินในบริเวณที่ผึ้งอาศัยอยู่ เพราะฉะนั้นน้ำผึ้งที่ได้จากรังผึ้งในป่าใหญ่ก็จะประกอบไปด้วยน้ำหวานจากดอกไม้ นานาพันธุ์ ส่วนน้ำผึ้งจากผึ้งเลี้ยงอาจมีน้ำหวานจากดอกไม้ชนิดเดียวหรือเพียงไม่กี่พันธุ์เท่านั้น

2.2.1 วิธีการผลิตน้ำผึ้ง

เมื่อผึ้งงานเก็บน้ำหวานจากดอกไม้ลงสู่กระเพาะน้ำหวานจะมีเอนไซม์จากต่อมน้ำลายขับออกมาเปลี่ยน หรือเมตาบอลิซึมน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโทสให้เป็นน้ำตาลแปรรูป (Invert Sugar) คือน้ำตาลสิวโลส เดกซ์โทรสและมอลโทส นอกจากนั้นยังมีน้ำตาลอื่น ๆ อีกแต่มีจำนวนน้อยมาก ปฏิบัติการเปลี่ยนแปลงนี้เกิดขึ้นตั้งแต่ผึ้งเริ่มบินกลับรังในขณะที่ผึ้งกระพือปีกจะเกิดพลังงานความร้อนช่วยเร่งการทำงานของเอนไซม์ตลอดจนช่วยเผาผลาญลดความชื้นในน้ำหวานให้กลายเป็นน้ำผึ้งเร็วขึ้น เมื่อผึ้งงานกลับถึงรังจะคายน้ำหวานแปรรูปนี้ให้กับผึ้งงานประจำรังซึ่งจะรับกันด้วยปากต่อกัน น้ำหวานแปรรูปนี้ยังไม่เป็นน้ำผึ้งที่สมบูรณ์เพราะยังมีความชื้นหรือน้ำในน้ำหวานจำนวนมากถึง 30-40% ต่อมาผึ้งงานประจำรังจะนำน้ำหวานนี้ไปเก็บในหลอดรวงน้ำผึ้ง ตอนเย็นผึ้งกลับรังกันเป็นส่วนใหญ่จะช่วยกันกระพือปีกช่วยให้มีการระเหยของน้ำหวานอีกจนได้น้ำผึ้งที่สมบูรณ์คือมีน้ำเหลืออยู่เพียง 20-25% เท่านั้น หลังจากนั้นผึ้งงานจะใช้ไขผึ้งปิดหลอดรวงที่เก็บน้ำผึ้งไว้ใช้เพื่อให้พลังงานในชีวิตประจำวันและยามขาดแคลนอาหารต่อไป เมื่อผึ้งงานสร้างฝาขี้ผึ้งปิดฝาหลอดรวงแล้วแสดงว่าน้ำผึ้งเข้มข้นได้ที่แล้วผู้เลี้ยงจะนำรวงผึ้งมาปาดฟารวงด้วยมีดปาดฝาแล้วจึงนำรวงผึ้งนั้นเข้าเครื่องสกัดหมุนให้น้ำผึ้ง

ไหลออกจากทรงโดยแรงเหวี่ยงจะได้น้ำผึ้งที่สะอาดแต่อาจมีเศษไขผึ้งหรือชิ้นส่วนต่าง ๆ ติดมา จึงต้องกรองด้วยผ้ากรองแล้วเก็บไว้ในถังสูงที่มีฝาปิดมิดชิดป้องกันมดและฝุ่นละอองตกลงไปใน ถังการบรรจุน้ำผึ้งจากถังลงสู่ขวดจะไขกอกให้น้ำผึ้งจากถังถึงลงสู่ขวดบรรจุทั้งนี้เพื่อป้องกันไม่ให้มีฟองอากาศติดปนเข้ามา

2.2.2 ความแตกต่างของน้ำผึ้งตามชนิดของพืช

เป็นธรรมชาติของรังผึ้งที่จะเก็บน้ำหวานสะสมไว้ภายในรัง ดังนั้นหากผู้เลี้ยงมีกรรมวิธีจัดการดูแลที่ดีและมีรังผึ้งอยู่ในบริเวณที่ในช่วงเวลาหนึ่งที่มีพืชชนิดเดียวกันออกดอกบานพร้อม ๆ กันน้ำหวานที่ผึ้งงานดูดเก็บสะสมแปรรูปเป็นน้ำผึ้งไว้ภายในรังส่วนใหญ่ก็มาจากแหล่งพืช เดียวกัน โดยปกติแล้วน้ำหวานที่ปล่อยออกมาจากต่อมน้ำหวานของพืชแต่ละชนิดจะมีกลิ่นรสสี แตกต่างกันออกไปเฉพาะตัวและองค์ประกอบโครงสร้างของน้ำตาลก็อาจผิดแผกจากกันไป จึง ทำให้สามารถระบุชนิดของน้ำผึ้งตามชนิดของพืชอาหารได้ เช่น น้ำผึ้งจากดอกลิ้นจี่ น้ำผึ้งจาก ดอกส้ม น้ำผึ้งจากดอกลำไย น้ำผึ้งจากดอกสบเสื่อ ฯลฯ ซึ่งน้ำผึ้งแต่ละชนิดจะมีลักษณะ แตกต่างกันดังนี้

1. ความแตกต่างในเรื่องกลิ่นรสและสีของน้ำผึ้ง ซึ่งขึ้นอยู่กับน้ำหวานจากดอกไม้ที่ผึ้ง เก็บมามีตั้งแต่สีเหลืองอ่อนน้ำตาลอ่อนไปจนถึงน้ำตาลไหม้ ตัวอย่างเช่น น้ำผึ้งที่ได้จากดอกลำ ไยจะมีสีเข้มมีกลิ่นหอมและมีรสหวานกว่าน้ำผึ้งที่ได้จากดอกลิ้นจี่ ดอกเงาะ ดอกทุเรียนหรือ ดอกนุ่น

2. องค์ประกอบของน้ำตาล เช่น สัดส่วนของน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุกโทสไม่ เท่ากันซึ่งมีผลถึงความแตกต่างทางด้านคุณสมบัติทางกายภาพของน้ำผึ้ง เช่น

- การตกผลึกน้ำผึ้งที่ได้จากการเลี้ยงผึ้งในสวนยางพาราสามารถตกผลึกได้ ทั้งหมด เมื่อนำไปแช่ในตู้เย็นหลายชั่วโมง ในขณะที่น้ำผึ้งจากดอกลิ้นจี่ตกผลึกได้น้อยกว่า หรือน้ำผึ้งจากดอกลำไยและนุ่นไม่ค่อยตกผลึกในสภาพเดียวกัน

- ความสามารถในการอุ้มน้ำซึ่งน้ำผึ้งบางชนิดจะอุ้มน้ำไว้ในปริมาณมากกว่า น้ำผึ้งอีกชนิดหนึ่ง

2.2.3 คุณสมบัติของน้ำผึ้ง

คุณสมบัติทางกายภาพของน้ำผึ้ง คือ ที่อุณหภูมิ 20°C จะมีค่าความ ถ่วงจำเพาะ เท่ากับ 1.4225 และน้ำผึ้งปริมาตร 3,785 มิลลิลิตร (1 แกลลอน) มีน้ำหนัก 5,375 กรัมและน้ำผึ้งที่หนัก 0.453 กิโลกรัม (1 ปอนด์) จะมีปริมาตร 318.9 มิลลิลิตร โดยน้ำผึ้ง 0.453

กิโลกรัม (1 ปอนด์) ให้พลังงานประมาณ 1,380 แคลอรีหรือน้ำผึ้ง 100 กรัม ให้พลังงานประมาณ 303 แคลอรี

2.2.4 ส่วนประกอบในน้ำผึ้ง

1. ปริมาณความชื้น น้ำผึ้งที่ดีควรมีปริมาณความชื้นไม่เกินร้อยละ 21 เพื่อให้มีรสชาติที่เข้มข้นสามารถเก็บไว้ได้นานโดยจะเปลี่ยนแปลงสภาพและป้องกันไม่ให้น้ำผึ้งเสียคุณค่าจากการหมัก

2. น้ำตาลของน้ำผึ้ง เป็นแหล่งของสารอาหารคาร์โบไฮเดรตที่สำคัญ เพราะ ถ้าไม่รวมปริมาณน้ำหรือความชื้นแล้ว ร้อยละ 95-99 ที่เหลือจะเป็นน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ชนิดที่สำคัญคือน้ำตาลสปีกูลอส (ฟรุคโทส) และเดกซ์โทรส (กลูโคส) ที่ผึ้งย่อยสลายจากน้ำตาลซูโครสในน้ำหวาน น้ำตาลทั้งสองชนิดเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่ร่างกายสามารถดูดซึมไปสร้างพลังงานได้ทันทีและทำให้น้ำผึ้งมีคุณสมบัติทางกายภาพอื่น ๆ อีก เช่น ดูดความชื้นจากบรรยากาศได้น้ำผึ้งที่ดีควรมีน้ำตาลทั้งสองชนิดไม่น้อยกว่าร้อยละ 65 นอกจากนี้ น้ำตาลสปีกูลอสยังมีความหวานมากกว่าน้ำตาลทราย 1.6 เท่า ขณะที่ร่างกายดูดซึมได้ช้า จึงสามารถใช้น้ำผึ้งเป็นสารให้ความหวานแทนน้ำตาลทั่วไปได้ สำหรับผู้ที่ต้องการควบคุมน้ำหนักในระดับที่ไม่เคร่งครัดนัก น้ำผึ้งที่ได้จากน้ำหวานดอกไม้จะมีน้ำตาลสปีกูลอสมากกว่าน้ำตาลเดกซ์โทรส นอกจากนี้ น้ำตาลทั้งสองชนิดแล้วน้ำผึ้งยังประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส, มอลโทส, แล็กโทสและน้ำตาลอื่น ๆ รวม 17 ชนิด

3. กรดในน้ำผึ้ง เนื่องจากน้ำผึ้งมีรสหวานจัด รสเปรี้ยวของสภาพความเป็นกรด จึงถูกปิดบังเอาไว้ กรดในน้ำผึ้งมีหลายชนิด เช่น กรดฟอรั่มิก, อะซีติก, มิวทาร์ค, ซิตริก, มาลิก และซัคซินิก กรดที่สำคัญที่สุดในน้ำผึ้ง คือ กรดกลูโคนิก ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของน้ำตาลเดกซ์โทรส ในน้ำผึ้งยังมีกรดอะมิโนถึง 16 ชนิด นอกจากนี้ยังมีกรดอินทรีย์ คือ กรดฟอสฟอริกและกรดเกลือ (ไฮโดรคอลลริก)

4. แร่ธาตุในน้ำผึ้ง ปริมาณแร่ธาตุ (ส่วนของแร่ธาตุต่าง ๆ) ในน้ำผึ้งมีค่าเฉลี่ยประมาณ 0.17% ของน้ำหนักน้ำผึ้ง แร่ธาตุที่พบในน้ำผึ้ง ได้แก่ แคลเซียม, โพแทสเซียม, ฟอสฟอรัส, แมกนีเซียม, โซเดียม, สังกะสี, เหล็ก, แมงกานีสและทองแดง ปริมาณแร่ธาตุต่าง ๆ ในน้ำผึ้งแม้จะมีไม่มาก แต่ก็อยู่ในสัดส่วนที่เหมาะสม การเติมน้ำผึ้งลงไปแทนน้ำตาลในอาหารชนิดต่าง ๆ เป็นการเพิ่มปริมาณแร่ธาตุที่จำเป็นและเป็นการเพิ่มคุณค่าทางอาหารให้แก่ร่างกาย

5. เอนไซม์ในน้ำผึ้ง เอนไซม์คือสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตมีหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาต่าง ๆ ภายในเซลล์นั้น ๆ เอนไซม์สำคัญที่สุดที่พบในน้ำผึ้งคือ “อินเวอร์เทส” ซึ่งมีหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาลซูโครสในน้ำหวานของดอกไม้ให้เป็นน้ำตาลแปรสภาพ คือ น้ำตาลเดกซ์โทรสและลิวโลส ในน้ำผึ้งมีเอนไซม์ที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งคือ “ไดแอสเทส” (หรือ อะไมเลส) เอนไซม์ชนิดอื่น ๆ เช่น คาตาเลสและฟอสฟาเทส และในรายงานล่าสุดพบว่าในน้ำผึ้งมีเอนไซม์อีกชนิดหนึ่ง คือ กลูโคสออกซิเดส เป็นเอนไซม์จากฟาริงเกลส แกลนด์ของผึ้ง ทำหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดกลูโคนิกและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์หรือ “อินฮิบิท” ที่ทำหน้าที่ยับยั้งและทำลายเชื้อโรค

6. วิตามินในน้ำผึ้ง ในน้ำผึ้งมีวิตามินอยู่หลายชนิด ได้แก่ ไทอามีน (B1), ไรโบฟลาวิน (B2), กรดแอสคอร์บิก (C), ไพริดอกซิน (B6), กรดแพนโทนิค, กรดนิโคตินิกหรือที่เรียกรวมกลุ่มว่าวิตามินบีคอมเพล็กซ์ ปริมาณวิตามินในน้ำผึ้งแต่ละชนิดแตกต่างกันตามที่มาของน้ำผึ้ง เดกซ์ทรินในน้ำผึ้งเป็นสารประกอบที่มีโมเลกุลของกลูโคสต่อกันเป็นโซ่ยาว เป็นส่วนที่ทำให้ให้น้ำผึ้งชุ่มคอและเคลือบผิว

7. สารแขวนลอยในน้ำผึ้ง สารแขวนลอย หมายถึง โมเลกุลขนาดใหญ่ที่เกิดจากการรวมกลุ่มกันของโมเลกุลขนาดเล็กและกระจายตัวอยู่ในของเหลวนั้น ๆ โมเลกุลของสารแขวนลอยจะไม่ตกตะกอน สารแขวนลอยส่วนใหญ่ในน้ำผึ้งจะเป็นเกสรดอกไม้ทั้งที่ไม่ถูกย่อยและที่ถูกย่อยเพียงบางส่วนและพบว่ามีโปรตีน 47 ชนิด ในปริมาณที่แตกต่างกัน ปริมาณโปรตีนในน้ำผึ้งจะมีอยู่ประมาณ 0.1-0.6%

8. อินฮิบิทหรือคุณสมบัติในการต่อต้านเชื้อโรคของน้ำผึ้ง สารอินฮิบิทมีผลต่อต้านเชื้อโรค เพราะมีการผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในปฏิกิริยาเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นกลูโคสในแลคโตน โดยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส จึงมีการนำน้ำผึ้งมาใช้ในการรักษาบาดแผลสด, ไฟไหม้, น้ำร้อนลวก, แผลติดเชื้อ วิตามินและแร่ธาตุต่าง ๆ ในน้ำผึ้งถือว่าเป็นส่วนหนึ่งของสารที่กระตุ้นปฏิกิริยาทางชีวภาพ แต่ในปัจจุบันได้มีการทดลองหลายอย่างเพื่อพิสูจน์ว่าน้ำผึ้งมีส่วนในการกระตุ้นปฏิกิริยาทางชีวภาพ เช่น ช่วยการสร้างรากของกิ่งไม้ ช่วยในการเจริญเติบโตของยีสต์ ช่วยเร่งน้ำย่อย ช่วยให้เจริญอาหารและช่วยในการเจริญเติบโตตามภาวะปกติหรือยามเจ็บป่วย

2.2.5 ลักษณะที่ดีของน้ำผึ้ง

1. มีความข้นและเหนียวพอสมควร ซึ่งแสดงว่ามีน้ำน้อย น้ำผึ้งที่ดีไม่ควรมีน้ำเกินร้อยละ 21 หากมีน้ำเจือปนมากกว่านั้น จะทำให้จุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตและทำลายคุณค่าทางอาหารของน้ำผึ้งได้
2. มีสีตามธรรมชาติ ตั้งแต่สีเหลืองอ่อนถึงสีน้ำตาลใส ไม่ขุ่นทึบ
3. มีกลิ่นหอมของน้ำผึ้งและดอกไม้ตามแหล่งที่ได้มา ปกติพืชที่ใช้ผลิตน้ำผึ้งมีหลายชนิดที่นิยมคือลำไย, ลิ้นจี่และสาบเสือ น้ำผึ้งลำไยนับเป็นน้ำผึ้งที่มีรสหอมหวานเป็นพิเศษเหนือกว่าน้ำผึ้งจากพรรณไม้อื่น
4. ปราศจากกากไขผึ้งหรือเศษตัวผึ้งปะปนอยู่
5. ปราศจากกลิ่นรสที่ไม่พึงประสงค์หรือกลิ่นบูดเปรี้ยวและไม่มีฟอง
6. ไม่มีการใส่สารปรุงแต่งสีกลิ่นรสใด ๆ ลงในน้ำผึ้ง

2.2.6 ประโยชน์ของน้ำผึ้ง

1. ช่วยคลายความเหน็ดเหนื่อยอ่อนเพลียจากการทำงานหนัก, เล่นกีฬา, อดนอนหรือดื่มสุรา
2. ช่วยเสริมสร้างสุขภาพให้แก่ผู้สูงอายุผู้ป่วยระยะพักฟื้น
3. บำรุงประสาทและสมองให้สดชื่นแจ่มใส
4. ช่วยระงับประสาท อาการหงุดหงิด นอนไม่หลับ แก้กะตุ๋ว
5. บรรเทาอาการไอและหวัด
6. ลดกรดในกระเพาะ ช่วยให้อย่อยอาหารได้ดีขึ้น แก้อท้องไม่ผูก เนื่องจากน้ำผึ้งถูกดูดซึมได้ทันทีเมื่อสัมผัสกับน้ำต่างจากน้ำตาลชนิดอื่นที่คงค้างอยู่และถูกเปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์หรือกรด
7. แก้อาการปวดศีรษะเนื่องจากน้ำผึ้งมีน้ำตาลฟรุคโตส ซึ่งมีคุณสมบัติดูดความชื้นได้ดีกว่าน้ำตาลชนิดอื่น จึงสามารถดูดน้ำกลับและอุ้มน้ำไว้ ทำให้เด็กไม่ปวดศีรษะที่นอน
8. แก้อาการไอหืดจาง เนื่องจากน้ำผึ้งมีธาตุเหล็ก ซึ่งเป็นองค์ประกอบของฮีโมโกลบินช่วยเพิ่มเม็ดเลือดแดง
9. แก้อาการความดันโลหิตสูง^[2]

2.2.7 วิธีการทดสอบน้ำฝิ่งแท้

1. ทดสอบด้วยนิ้วหัวแม่มือ โดยเทน้ำฝิ่งลงบนนิ้วหัวแม่มือ ถ้าเหนียวหนืดแสดงว่า คือ น้ำฝิ่งแท้ แต่ถ้าไหลผ่านนิ้วไป แสดงว่าเป็นน้ำฝิ่งปลอม
2. ทดสอบด้วยน้ำ โดยการเทน้ำฝิ่งลงในแก้วที่ใส่น้ำประมาณ 1 ช้อนโต๊ะ และสังเกตดูว่าน้ำฝิ่งละลายหรือจมลงไปด้านล่าง ถ้าน้ำฝิ่งจมลงไป แสดงว่าเป็นน้ำฝิ่งแท้
3. ทดสอบด้วยไฟ น้ำฝิ่งแท้จะติดไฟได้ง่ายกว่า น้ำฝิ่งปลอมจะไม่ติดไฟ เพราะมีปริมาณความชื้นอยู่สูง
4. ทดสอบด้วยกระดาษทิชชู โดยหยดน้ำฝิ่งลงบนกระดาษทิชชู ถ้าเป็นน้ำฝิ่งแท้เมื่อหยดลงไปจะคงรูปอยู่บนทิชชู ไม่ซึมลงไปใเยื่อกระดาษ แต่ถ้าเป็นน้ำฝิ่งปลอม น้ำฝิ่งจะซึมลงกระดาษทิชชูที่หยดลงไป
5. ทดสอบด้วยการแช่เย็น โดยการนำน้ำฝิ่งเข้าช่องแช่แข็ง ถ้าเป็นน้ำฝิ่งแท้จะไม่จับตัวเป็นก้อน แต่จะมีลักษณะเหมือนเดิมทุกประการ ส่วนน้ำฝิ่งปลอมจะจับตัวแข็งเหมือนน้ำแข็ง^[4]

2.3 อนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระเป็นสารที่มีอิเล็กตรอนอิสระอยู่ในวงนอกของอะตอมหรือโมเลกุล จึงมีความว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยา โดยรับอิเล็กตรอนจากสารอื่น ๆ เพื่อให้ตัวเองเสถียรขึ้น ในขณะที่เดียวกันก็ชักนำให้สารที่ให้อิเล็กตรอนไปมีอิเล็กตรอนที่ไม่ครบคู่ จนอาจกลายเป็นสารที่มีความรุนแรง ซึ่งถ้าเกิดในระบบสิ่งมีชีวิต อาจทำอันตรายกับส่วนประกอบของเซลล์รอบ ๆ ไม่ว่าจะเป็นโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรตหรือดีเอ็นเอ ทำให้สารชีวโมเลกุลเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและเสียหายที่การทำงาน ดังนั้นในสภาวะที่มีการสร้างอนุมูลอิสระเป็นจำนวนมากจะก่อให้เกิดการเสียหายของเซลล์ ซึ่งก่อให้เกิดโรคต่าง ๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคหลอดเลือดหัวใจ ไชข้ออักเสบและต้อกระจก

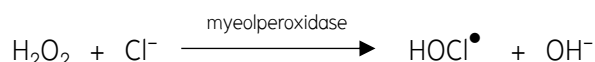
อนุมูลอิสระที่สำคัญ ได้แก่

1. อนุมูลเปอร์ออกไซด์ ($O_2^{\bullet-}$) เป็นอนุมูลอิสระที่พบได้ภายในเซลล์ทั่วไป ส่วนใหญ่เกิดขึ้นระหว่างการขนส่งอิเล็กตรอนจากโมเลกุลของออกซิเจนไปยังโมเลกุลของน้ำภายในไมโทคอนเดรีย อนุมูลนี้จะไม่เข้าทำปฏิกิริยาทำลายเซลล์โดยตรง แต่เมื่อทำปฏิกิริยากับ Fenton จะได้เป็นอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล (OH^{\bullet}) ซึ่งเป็นสารออกซิไดซ์ที่มีความไวสูง นอกจากนี้สิ่งมีชีวิต

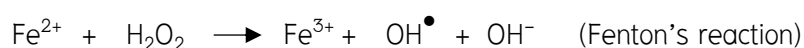
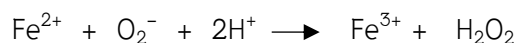
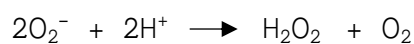
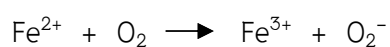
สามารถสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) จากซูเปอร์ออกไซด์ ($\text{O}_2^{\bullet-}$) ได้โดยตรง จากปฏิกิริยา dismutation ของเอนไซม์ Superoxide dismutase (SOD) ดังสมการ



ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ได้ ถึงแม้จะไม่ได้เป็นอนุมูลอิสระแต่จัดเป็นสารออกซิไดซ์ที่ไม่ทำปฏิกิริยากับเซลล์ แต่เป็นสารตั้งต้นที่ทำให้เกิดอนุมูลไฮดรอกซิล และยังเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างอนุมูลไฮโปคลอไรต์ (HOCl^{\bullet}) ของเม็ดเลือดขาว



2. อนุมูลไฮดรอกซิล (OH^{\bullet}) จัดเป็นสารออกซิไดซ์แรงสูงที่มีความว่องไวสูงสุดสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับสารต่าง ๆ ที่อยู่รอบข้างในทันทีที่ถูกสร้างขึ้น ดังนั้นอนุมูลนี้จึงเป็นอันตรายต่อสารชีวโมเลกุลในชีวิตประจำวันมากกว่าอนุมูลชนิดอื่น ๆ โดยอนุมูลนี้สร้างขึ้นจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ที่มีโลหะทรานซิชันอยู่ในระบบ โดยเหล็ก (Fe^{2+}) จะทำลายพันธะที่ยึดเหนี่ยวระหว่างออกซิเจนของสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ได้เป็นอนุมูลไฮดรอกซิลและไฮดรอกไซด์ไอออน ในปฏิกิริยาดังล่าง



3. อนุมูลไนตริกออกไซด์ (NO^{\bullet}) เป็นอนุมูลขนาดเล็กที่เป็นพิษกับเซลล์ปอด สามารถรวมตัวกับโลหะทรานซิชันหรือโปรตีนที่มีโลหะชนิดนี้เป็นองค์ประกอบได้ อนุมูลไนตริก ออกไซด์สามารถเข้าจับกับฮีโมโกลบินได้เร็วกว่าโมเลกุลของออกซิเจน จนอาจขัดขวางกระบวนการส่งก๊าซออกซิเจน นอกจากนี้ยังทำปฏิกิริยากับอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ได้อย่างรวดเร็วเกิดเป็นอนุมูล peroxynitrite (ONOO^{\bullet}) ที่มีความว่องไวสูง ในสภาวะที่มีออกซิเจน NO^{\bullet} จะถูกออกซิไดซ์เป็น NO_2 ซึ่งเป็นสารมลพิษสามารถทำลายเซลล์ของถุงลมปอดและผนังหลอดเลือดภายในปอดได้^[3]

2.4 สารต้านอนุมูลอิสระ

ในทางเคมีสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) คือ สารประกอบที่สามารถป้องกันหรือชะลอการเกิดกระบวนการออกซิเดชัน กระบวนการออกซิเดชันมีได้หลายรูปแบบ เช่น กระบวนการออกซิเดชันที่ทำให้เหล็กกลายเป็นสนิม ทำให้แอมป์เปลเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหรือทำให้น้ำมันพืชเหม็นหืน หรือกระบวนการออกซิเดชันที่เกิดในร่างกาย เช่น การย่อยสลายโปรตีน

และไขมันจากอาหารที่กินเข้าไป มลพิษทางอากาศ การหายใจ คาร์บอนหรือ รังสียูวี ล้วนทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นในร่างกายของซึ่งสร้างความเสียหายต่อร่างกาย แต่ละกลไกอาจต้องใช้สารต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกันในการหยุดกระบวนการออกซิเดชัน ในอีกทางหนึ่งกระบวนการออกซิเดชันเป็นกระบวนการที่สำคัญต่อร่างกาย เช่น เราใช้ออกซิเจนจากอากาศที่หายใจเข้าไปไปเผาผลาญอาหารที่ร่างกายได้รับให้เป็นพลังงานสำหรับการทำงานของเซลล์ต่าง ๆ แต่ก็ทำให้เกิดอนุมูลอิสระเป็นผลพลอยได้ อนุมูลอิสระต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับโมเลกุลที่สำคัญในร่างกาย เช่น ไขมัน โปรตีน ดีเอ็นเอ ทำให้เกิดความเสียหายต่อโมเลกุลดังกล่าว ตัวอย่างเช่น เมื่ออนุมูลอิสระทำปฏิกิริยากับแอลดีแอล (LDL : low-density lipoprotein) ซึ่งเป็นคอเลสเตอรอลไม่ดีทำให้เกิดออกซิไดซ์แอลดีแอล (oxidized LDL) ซึ่งมีหลักฐานยืนยันว่าออกซิไดซ์แอลดีแอลเป็นสาเหตุของการเกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็งทำให้เกิดการอุดตันของหลอดเลือดและเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคหัวใจ

2.4.1 การแบ่งประเภทสารต้านอนุมูลอิสระตามลักษณะการออกฤทธิ์

1. สารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิ เป็นสารที่หยุดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระโดยการให้อนุมูลไฮโดรเจน (H) หรืออิเล็กตรอนแก้อนุมูลอิสระโดยตรง ทำให้อนุมูลนั้นกลายเป็นสารที่มีความเสถียรขึ้นสารออกฤทธิ์ในลักษณะดังกล่าว ได้แก่ สารประกอบกลุ่ม phenolic เช่น flavonoids, eugenol และ verilin เป็นต้น มีรายงานว่าสารต้านอนุมูลอิสระชนิดนี้จะทำหน้าที่ได้ดีที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ แต่เมื่อมีความเข้มข้นสูงขึ้นอาจกลายเป็นสารเสริมฤทธิ์ออกซิเดชันได้^[2]

กรดฟีนอลิกเป็นกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกกลุ่มหนึ่งที่ถูกสร้างขึ้นโดยพืช สามารถแบ่งกรดฟีนอลิกได้ 2 ชนิด ได้แก่

1.1 กรดไฮดรอกซีซินนามิก (hydroxycinnamic acids) เป็นกรดฟีนอลิกกลุ่มใหญ่ที่สุดพบทั่วไปในพืช กรดฟีนอลิกที่พบมาก ได้แก่ *p*-coumaric, caffeic, ferulic และ sinapic acid โดยปกติเกิดขึ้นจากหลาย ๆ รูปแบบ เช่น เกิดจากการย่อยของเอนไซม์ หรือการเชื่อมกันของเอสเทอร์ของ hydroxyacids ตัวอย่างเช่น quinic, shikimic และ tartaric acid

- *p*-coumaric acid เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่เป็นอนุพันธ์ของกรดไฮดรอกซีของกรดซินนามิก มีลักษณะเป็นผลึกแข็งสีขาวละลายในน้ำได้ แต่ละลายได้ดีในเอทานอลและไดเอทิลเอสเทอร์ กรดนี้พบได้ 3 ไอโซเมอร์ คือ *o*-coumaric acid, *m*-coumaric acid และ *p*-coumaric acid โดยแตกต่างกันที่ตำแหน่งไฮดรอกซี ซึ่งทั้ง 3 ไอโซเมอร์จะมีค่าการละลายน้ำ

อยู่ที่ 1.15, 1.02 และ 1.04 กรัมต่อลิตร^[26, 27, 28] ตามลำดับ ซึ่ง *p*-coumaric acid เป็นไอโซเมอร์ที่พบมากที่สุดในธรรมชาติ เช่น ถั่วลิสง แครอท พริกสีเขียว สตอเบอร์รี่ สับปะรด มะเขือเทศ และกระเทียม ฤทธิ์ทางชีวภาพของกรดชนิดนี้คือ สามารถต้านการออกซิเดชันของ low-density lipoprotein (LDL) และเชื่อว่าสามารถลดภาวะเสี่ยงต่อการเป็นโรคมะเร็งในกระเพาะอาหารโดยลดการเกิด carcinogenic nitrosamines ทำให้มะเร็งในกระเพาะอาหารไม่พัฒนา ซึ่งไนโตรซามีนเป็นกลุ่มสารประกอบอินทรีย์ที่โครงสร้างประกอบด้วยครึ่งหนึ่งเป็นไนโตรเจน (N=O) มีการค้นพบมากกว่า 100 ปี แล้ว แต่จนกระทั่งปี 1950 จึงพบว่าป็นสารที่มีคุณสมบัติในการก่อมะเร็งอย่างแรงในสัตว์ทดลอง นักวิจัยพบว่า 90% ของไนโตรซามีนทั้งหมดเป็นสาเหตุของการเกิดมะเร็งในผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น เนื้อสัตว์ อาหารดอง และปลาเค็มแห้ง ซึ่งเป็นอาหารที่มีการใช้ไนโตรซามีน ผู้บริโภคจึงมีความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็ง เชื่อกันว่ากระบวนการเริ่มต้นเกิดขึ้นที่กระเพาะอาหาร เมื่อเกลือไนเตรทถูกย่อยกลายเป็นไนไตรต์ จากนั้นไนไตรต์จะไปจับกับเอมีนซึ่งเป็นสารที่ถูกสร้างขึ้นจากโปรตีนโดยแบคทีเรียในเนื้อ ผลสุดท้ายจะได้สารก่อมะเร็ง

- กรดคาเฟอิก (caffeic acid) เป็นสารทุติยภูมิที่พืชสร้างขึ้น จัดเป็นกรดคาร์บอกซิลิก ซึ่งอาจอยู่ในรูปกรดอิสระหรือจับกันเป็นโอลิโกเมอร์ หรือเชื่อมด้วยสารประกอบอินทรีย์ในรูปของกลูโคไซด์และเอสเทอร์ เป็นสารเมตาโบไลต์ที่เกิดขึ้นในวิถีฟีนอลิโพรพานอยด์ และเป็นฟิเคอร์เซอรส์สำหรับวิธีชีวสังเคราะห์ลิกันิน กรดคาเฟอิกพบในผลไม้ ผัก เครื่องเทศ และเครื่องดื่ม กรดคาเฟอิกฟีนิลเอสเทอร์ (caffeic acid phenylester, CAPE) ใช้ประโยชน์ทางยา โดยเป็นสารประกอบโดยเป็นสารประกอบที่มีฤทธิ์ต้านสารก่อมะเร็ง ต้านภาวะการอักเสบ และมีคุณสมบัติในการช่วยปรับระบบภูมิคุ้มกัน จากการศึกษาพบว่ากรดคาเฟอิกสามารถต้านออกซิเดชัน สามารถกำจัดอนุมูลอิสระและโครงสร้างมีความเสถียร สามารถป้องกันการเกิดออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก (linoleic acid) และ low-density lipoprotein (LDL) ป้องกันเนื้อเยื่อและดีเอ็นเอจากการถูกทำลายด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชัน

- กรดวานิลลิก (vanillic acid) เป็นสารประกอบหลักของ biovanillin กรดนี้ประกอบด้วยหมู่อัลดีไฮด์และฟีนอลิก กรดวานิลลิกถูกสร้างขึ้นโดยพืช เช่น ฝักรวานิลลา และสามารถสังเคราะห์ได้ในอุตสาหกรรมอาหาร เพื่อใช้เป็นสารให้กลิ่นในลูกกวาด อาหารและเครื่องดื่ม นอกจากนี้ยังสามารถพบได้ในไวน์ที่บ่มนาน ๆ และได้จากการผลิตเคอร์คิวมิน (curcumin) จากขมิ้น กรดวานิลลิกมีกลิ่นแรง ใช้มากในอุตสาหกรรมอาหาร และนิยมใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ยาในยุโรป อนุพันธ์ของกรดวานิลลิกถูกใช้เป็นยาบำรุงกำลัง กรดวานิลลิก

มีคุณสมบัติในการต้านสารก่อมะเร็ง โดยลดจำนวนเซลล์มะเร็งในลำไส้เล็ก สามารถต้านออกซิเดชัน ป้องกันเซลล์จากการทำลายของ H_2O_2 ป้องกันเซลล์ไม่ให้เกิดการกลายพันธุ์ในเซลล์ที่ได้รับความเสียหาย ช่วยให้การใช้ยาต้านมะเร็งมีประสิทธิภาพมากขึ้น

1.2 กรดไฮดรอกซีเบนโซอิก (hydroxybenzoic acids) มีโครงสร้างโดยทั่วไปคือ C6-C1 เป็นอนุพันธ์ของกรดเบนโซอิก ความแปรผันโครงสร้างของกรดนี้ขึ้นอยู่กับการเกิดปฏิกิริยา hydroxylations และ methylations ของวงแหวนอะโรมาติก เช่น phydroxybenzoic, vanillic, น้ำตาลหรือกรดอินทรีย์ ถูกสะสมอยู่บริเวณผนังเซลล์ของพืชในส่วนที่เรียกว่า “ลิกนิน” ตัวอย่างกรดไฮดรอกซีเบนโซอิก เช่น กรดซาลิไซลิก (2-hydroxybenzoate) และกรดแกลลิก ซึ่งมีหมู่ไฮดรอกซิล 3 หมู่ อยู่ในโมเลกุล ซึ่งมีส่วนร่วมในการสร้าง hydrolysable gallotannins 9 ทำให้ได้ hexahydroxydiphenic acid และ dilactone, ellagic acid โดยปกติแล้ว ellagic acid พบใน ellagitannins เช่น เอสเทอร์ของ diphenic acid

- กรดเอลลาจิก (ellagic acid) เป็นสารประกอบฟีนอลิกที่ประกอบด้วยวงแหวนเบนซีน 4 วง และเป็นอนุพันธ์ไดเมอร์ของกรดแกลลิก เมื่อบริสุทธิ์จะเป็นผลึกสีขาวครีมถึงอมเหลือง กรดนี้พบในไวน์แดงจากผลไม้ เช่น องุ่นและผลไม้ตระกูลเบอร์รี่ ได้แก่ ราสเบอร์รี่ สตรอเบอร์รี่ แปรดเบอร์รี่ แครนเบอร์รี่ ทับทิม เกาลัดบางชนิดและมันฮ้อ พบกรดนี้มากที่สุดในผลราสเบอร์รี่ พืชหลายชนิดพบกรดนี้ในรูปของ ellaginnin ซึ่งเป็นกรดเอลลาจิกจับกับโมเลกุลของน้ำตาล กรดเอลลาจิกมีฤทธิ์ทางชีวภาพมากมาย กล่าวคือเป็นสารต้านออกซิเดชันสามารถต้านไวรัส กำจัดอนุมูลอิสระ ต้านการเกิดการกลายพันธุ์ ต้านการสร้างหรือเกิดเนื้อเยื่อผิดปกติ ต้านภาวะอักเสบ และต้านมะเร็ง จากการศึกษาคุณสมบัติของกรดเอลลาจิกในการต้านมะเร็ง พบว่ามีฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็งหลายชนิด ได้แก่ มะเร็งเต้านม มะเร็งหลอดอาหาร มะเร็งผิวหนัง มะเร็งลำไส้ มะเร็งต่อมลูกหมากและมะเร็งตับ คุณสมบัติที่เฉพาะอย่างหนึ่งของกรดนี้คือสามารถป้องกันการทำงานของยีนของเซลล์มะเร็งไม่ให้ทำลายเซลล์ เนื่องจากกรดนี้สามารถจับกับเซลล์มะเร็งทำให้เซลล์มะเร็งไม่ทำงาน กรดเอลลาจิกที่แยกได้จาก *Phyllanthus urinaria* สามารถยับยั้งการหลั่ง HBeAg ในเซลล์มะเร็ง ดังนั้นจึงถือว่ากรดเอลลาจิกเป็นกรดที่สามารถป้องกันและเหนี่ยวนำเซลล์มะเร็งหลายชนิดได้อย่างแท้จริง นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติในการต้านไวรัสและแบคทีเรียอีกด้วย เช่นคุณสมบัติในการ ต้านเชื้อพลาสโมเดียม (*Plasmodium falciparum*) ในพืชกรดนี้จะช่วยในการต้านการรุกรานจากเชื้อจุลินทรีย์และป้องกันยาฆ่าแมลง

- กรดแกลลิก (gallic acid) เมื่อบริสุทธิ์ จะเป็นผงผลึกอินทรีย์ ไม่มีสี กรดนี้อยู่ในรูปโมเลกุลอิสระหรือเป็นส่วนของโมเลกุลแทนนิน มีค่าการละลายน้ำเท่ากับ 4.94 กรัมต่อลิตร^[25] ซึ่งกรดแกลลิกพบมากในพืชหลายชนิด พืชที่มีกรดนี้ในปริมาณมาก ได้แก่ สมอ องุ่น ชา ฮอบและเปลือกต้นโอ๊ก กรดแกลลิกมีคุณสมบัติที่น่าสนใจหลายอย่าง เช่น คุณสมบัติในการต้านเชื้อราและต้านเชื้อไวรัส นอกจากนี้ยังสามารถต้านทานการเกิดออกซิเดชันไม่ให้เซลล์ถูกทำลาย และยังสามารถต้านเซลล์มะเร็งไม่ให้มีอันตรายต่อเซลล์ได้ กรดแกลลิกสามารถใช้ในการป้องกันสาเหตุของเลือดไหลออกที่ลำไส้ นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในการรักษาภาวะที่กระเพาะปัสสาวะมีอัลบูมิน (albumin) สูง โรคเบาหวาน บางครั้งใช้เป็นครีมรักษาโรคเรื้อนงวง และภาวะเลือดออกง่าย

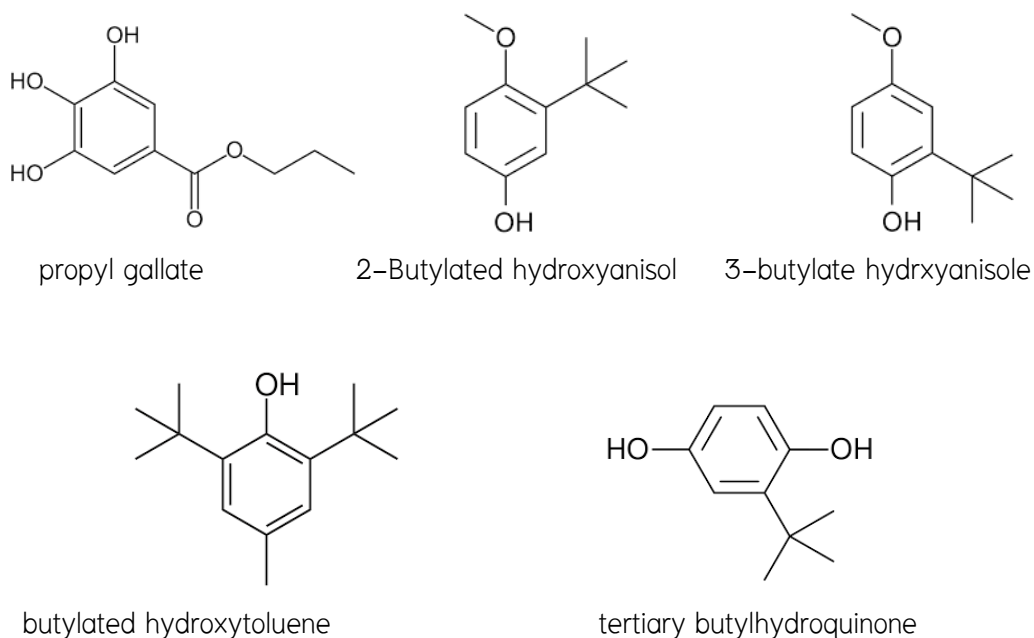
- *p*-hydroxybenzoic acid (parabens) เป็นกรดที่อยู่ในกลุ่ม hydroxybenzoic acid ใช้ประโยชน์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ พาราบีนส์มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายอย่าง แต่โดยทั่วไปเชื่อว่า จะมีผลยับยั้งเนื้อเยื่อขนส่งสารและยับยั้งการทำงานของไมโทคอนเดรีย พาราบีนนำมาใช้ครั้งแรกเพื่อใช้เป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ในการผลิตยาในช่วงปี 2013 จากนั้นพาราบีนจึงปรับปรุงให้สามารถต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้กว้างขวาง และมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น เช่น การเพิ่มหมู่เอสเทอร์ในสายพาราบีนส์ ทำให้สามารถต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีขึ้น อย่างไรก็ตามความสามารถในการละลายน้ำก็ลดลง ในปัจจุบันมีการใช้ประโยชน์มากมาย เช่น ใช้เติมในเครื่องสำอาง ยา ใช้ในการต้านเชื้อยีสต์และราในผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น ลินค้าอบแห้ง เครื่องดื่ม ผลิตภัณฑ์จากผลไม้ น้ำสลัด ไชร์รับ และน้ำมันมะกอกเป็น มีรายงานว่าความเข้มข้นต่ำสุดของพาราบีนในการยับยั้งเชื้อ *S. cerevisiae* และ *Klebsiella pneumoniae* ได้ 50% คือ 1.29 และ 4.28 mM ตามลำดับ พาราบีนมีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียในช่องปาก Steinberg และคณะรายงานว่าเมธิลและโพรพิลพาราบีนที่ความเข้มข้น 0.6% และ 0.3% ในน้ำยาบ้วนปากมีผลเพียงเล็กน้อยต่อจำนวนแบคทีเรียในปาก แต่ก็สามารถช่วยลดจำนวนแบคทีเรียในช่องปากได้ดี^[7]

2. สารต้านอนุมูลอิสระทุติยภูมิ สารต้านอนุมูลอิสระประเภทนี้ไม่ทำปฏิกิริยาโดยตรงกับอนุมูลอิสระแต่จะช่วยการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิในลักษณะต่าง ๆ เช่น จับกับ Fe^{2+} ดักจับออกซิเจนดูตหรือซัปรังสียูวี

2.4.2 แหล่งที่มาของสารต้านอนุมูลอิสระ

1. สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์

สารประกอบฟีนอลิกสังเคราะห์มี 5 ชนิด ได้แก่ propyl gallate, 2-butylated, hydroxyanisole, 3-butylate hydrxyanisole, BHT (butylated hydroxytoluene) และ tertiary butylhydroquinone ซึ่งมีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 1 เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันที่เป็นสาเหตุให้อาหารมีกลิ่นสีและรสชาติที่เปลี่ยนแปลง สารสังเคราะห์เหล่านี้มีประสิทธิภาพและความคงตัวสูงกว่าสารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติทั่วไป แต่มีข้อจำกัดของการใช้เนื่องจากปัญหาด้านความปลอดภัยในการบริโภค



ภาพ 1 โครงสร้างทางเคมีของสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์

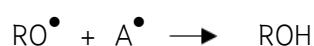
2. สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ

สารกลุ่มนี้ได้รับความสนใจและมีการพัฒนาค้นคว้ากันอย่างมากในปัจจุบัน เนื่องจากแนวคิดเรื่องการกลับคืนสู่ธรรมชาติ ประกอบกับความเชื่อมั่นว่ามีความปลอดภัยในการบริโภค สารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้พบได้ทั้งในจุลชีพ สัตว์และพืช ซึ่งมีทั้งที่เป็นวิตามิน อย่างเช่น วิตามินซี วิตามินอี บีตาแคโรทีนและสารที่ไม่ให้คุณค่าทางโภชนาการ (non-nutrient) ซึ่งมีโครงสร้างเป็นสารประกอบ phenolic โดยเฉพาะ polyphenols เช่น แชนโธนและฟลาโวนอยด์ ซึ่งประกอบด้วยหมู่ aromatic hydroxy ตั้งแต่ 2 หมู่ขึ้นไป หมู่ฟังก์ชัน (functional group)

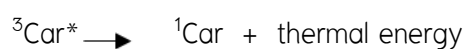
เหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการดักจับอนุมูลอิสระต่าง ๆ ไม่ให้ไปกระตุ้นหรือก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้โดยการให้อนุมูล H แก่อนุมูลอิสระเหล่านั้น นอกจากนี้สารประกอบ polyphenols ที่มีโครงสร้างของ ortho-dihydroxyl phenol อยู่ในโมเลกุลยังสามารถยับยั้งการเกิดอนุมูล OH[•] ในปฏิกิริยาที่มีอนุมูลโลหะทรานซิชัน คือ Fe²⁺ และ Cu²⁺ เป็นตัวเหนี่ยวนำ โดยการเข้าจับกับโลหะดังกล่าวเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน (complex)

2.4.3 กลไกการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ

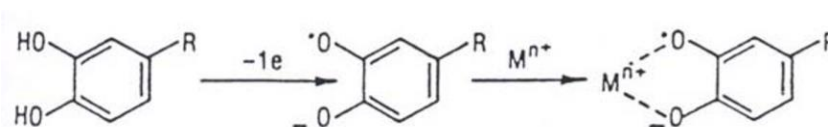
1. การดักจับอนุมูลอิสระ (Radical Scavenging) โดยการให้ไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ ดังปฏิกิริยา



2. การยับยั้งการทำงานของ Single Oxygen (Singlet Oxygen Quenching) สารกลุ่มแคโรทีนอยด์สามารถยับยั้งการทำงานของ Single Oxygen โดยการเปลี่ยน Single Oxygen (¹O₂^{*}) ให้อยู่ในรูป Triplet Oxygen (³O₂) และปล่อยพลังงานที่ได้รับออกไปในรูปความร้อน โดยที่แคโรทีนอยด์ (Car) 1 โมเลกุล สามารถทำปฏิกิริยากับ Single Oxygen ได้ถึง 1000 โมเลกุล ดังปฏิกิริยา



3. การจับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (Metal Chelation) สารที่สามารถจับโลหะ Fe²⁺ และ Cu²⁺ คือ ฟลาโวนอยด์ กรดฟอตฟอริกและกรดซิตริก เป็นต้น ดังปฏิกิริยา



4. การหยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (Chain-breaking) โดยวิตามินอี สามารถป้องกันเยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลายจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน โดยทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนจากอนุมูลอิสระ^[3]

2.5 เทคนิคอัลตราไวโอเลตและวิสิเบิลสเปกโตรสโคปี (Ultraviolet-visible spectroscopy)

2.5.1 หลักการทำงาน

สารที่นำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่องอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-Vis) ต้องมีคุณสมบัติดูดกลืนแสงได้ เช่น สารประกอบอินทรีย์ สารประกอบเชิงซ้อน และสารอนินทรีย์ ซึ่งสารประกอบดังกล่าวมักเป็นสารที่เรียกว่า “Chromophores” เช่น สารประกอบไฮโดรคาร์บอนชนิดไม่อิ่มตัว คือ มีหมู่ $C=C$, $C=O$, $N=O$, $C-X$ ($X=Br, I$), Benzene ring และมี Lone pair electron เป็นต้น หลักการทำงานของเครื่องมือ อาศัยการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น UV และ Visible ที่ความยาวคลื่นประมาณ 190–800 นาโนเมตร ซึ่งการวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเครื่องอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ต้องเลือกความยาวคลื่นที่เหมาะสม เนื่องจากสารแต่ละชนิดจะมีการดูดกลืนคลื่นแสงที่มีความยาวคลื่นเฉพาะ เมื่อนำค่าความเข้มข้นเริ่มต้นของแสง (I_0) และค่าความเข้มข้นสุดท้ายหลังจากถูกดูดกลืนแสง (I_t) มาคำนวณผล จะได้ “ค่าการดูดกลืน (Absorbance, A)” ซึ่งค่าการดูดกลืนแสงจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารตัวอย่าง ดังนั้นในการวิเคราะห์หาปริมาณของสารตัวอย่างทำได้โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน 3–5 ความเข้มข้น และนำมาวิเคราะห์หาค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ จากนั้นสร้างกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนและค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (Calibration curve) ซึ่งเมื่อนำค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของตัวอย่างมาเปรียบเทียบกับสมการที่ได้จากกราฟของสารละลายมาตรฐาน ก็จะสามารถวิเคราะห์หาปริมาณสารตัวอย่างได้^[6]

2.5.2 ส่วนประกอบของเครื่อง

ส่วนประกอบหลักของเครื่องอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์มีอยู่ 5 ส่วน คือ

1. แหล่งกำเนิดแสง (light source)

แหล่งกำเนิดแสงในเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์จะต้องให้รังสีในช่วงความยาวคลื่นที่ต้องการอย่างต่อเนื่องและคงที่ตลอดเวลา รวมทั้งมีความเข้มแสงที่มากพอ สำหรับความยาวคลื่นในช่วงอัลตราไวโอเลตจะใช้หลอดดีวเทอเรียม (deuterium lamp) เป็นแหล่งกำเนิดแสง ซึ่ง

ให้แสงในช่วง 185–375 nm หลักการคือทำให้อะตอมดีวเทอเรียมที่อยู่ในสภาวะเร้าคายพลังงานออกมา ส่วนหลอดทังสเตน (tungsten filament lamp) จะให้ความยาวคลื่นครอบคลุมช่วงแสงที่มองเห็นได้ คือตั้งแต่ 320–2500 nm หลักการจะคล้ายกับหลอดไฟทังสเตนธรรมดา คือให้กระแสไฟฟ้าผ่านเข้าไปจนกระทั่งหลอดทังสเตนร้อนและเปล่งรังสีออกมา โดยปกติจะเปิดเครื่องทิ้งไว้ก่อนใช้งานประมาณ 30 นาที เพื่อให้แน่ใจว่า หลอดดีวเทอเรียมหรือหลอดทังสเตนให้แสงที่มีความเข้มสม่ำเสมอ

2. ส่วนเลือกความยาวคลื่น (wavelength selector)

เป็นส่วนที่ใช้แยกความยาวคลื่นที่ออกมาจากแหล่งกำเนิดแสง ซึ่งเป็นแสงที่มีหลาย ๆ ความยาวคลื่น (polychromatic wavelength) ให้เป็นแถบแสงในช่วงแคบ ๆ หรือเป็นความยาวคลื่นเดี่ยว (monochromatic wavelength) เครื่องมือสมัยก่อนจะใช้ปริซึมหรือ ฟิลเตอร์สำหรับแยกความยาวคลื่น แต่ปัจจุบันเปลี่ยนมาใช้โมโนโครเมเตอร์ (monochromator) แบบเกรตติ้ง (grating) สะท้อนแสงซึ่งมีลักษณะเป็นร่องเล็ก ๆ ขนาดกันจำนวนมาก แสงจากแหล่งกำเนิดแสงจะตกกระทบลงบนผิวหน้าของร่อง แล้วสะท้อนออกมาที่มุมต่าง ๆ เฉพาะความยาวคลื่นที่เราเลือกเท่านั้นจึงจะผ่าน ช่องแสงออก (exit slit) ไปสู่สารตัวอย่าง

3. ภาชนะใส่สาร (cell หรือ cuvette)

ภาชนะใส่สารตัวอย่างสำหรับสเปกโทรโฟโตมิเตอร์จะเรียกว่า เซลล์หรือคิวเวทท์ (cuvette) มีหลายแบบหลายขนาดด้วยกันขึ้นกับการใช้งาน หลักสำคัญในการเลือกใช้ก็คือ การวัดในช่วงแสงอัลตราไวโอเล็ต จะต้องใช้เซลล์ที่ทำจากควอตซ์ (quartz) เท่านั้น เนื่องจากแก้วสามารถดูดกลืนแสงในช่วงอัลตราไวโอเล็ตได้ ส่วนเซลล์ที่ทำจากแก้วจะใช้วัดในช่วงแสงที่มองเห็นได้ นั้นหมายความว่าถ้าต้องการวัดสารในช่วงแสงที่มองเห็นได้ก็ควรจะใช้เซลล์ที่ทำจากแก้ว การใช้เซลล์ควอตซ์ไม่ได้มีผลให้การวัดแสงดีขึ้น แต่จะสิ้นเปลืองเปล่าประโยชน์เพราะควอตซ์ราคาแพงกว่าแก้วมาก ส่วนการทำความสะอาดเซลล์เพียงแค่อั้วด้วยน้ำกลั่นหรืออั้วด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมตามด้วยน้ำกลั่นก็เพียงพอ ห้ามขัดถูเพราะจะทำให้เซลล์มีรอยขีดข่วน

4. ตัวตรวจจับสัญญาณ (detector)

เครื่องตรวจจับสัญญาณที่ดีต้องมีสภาพไวสูง คือแม้ปริมาณแสงจะเปลี่ยนไปเล็กน้อยก็สามารถตรวจจับสัญญาณความแตกต่างได้ ปัจจุบันเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ส่วนใหญ่นิยมใช้ตัวตรวจจับสัญญาณ 2 ชนิดคือ

- หลอดโฟโตมัลติพลายเออร์ (photomultiplier tube; PMT)

หลอด PMT ประกอบไปด้วยแคโทด (cathode) ที่ฉาบผิวด้วยสารที่สามารถให้อิเล็กตรอนได้เมื่อถูกแสงจำนวน 9 ชุด เรียกว่า ไดโนด (dynode) แต่ละไดโนดจะมีศักย์ไฟฟ้าสูงขึ้นเรื่อย ๆ เมื่อแสงตกกระทบกับไดโนดตัวที่หนึ่งสารที่ฉาบผิวจะเกิดอิเล็กตรอนขึ้น แล้ววิ่งไปกระทบไดโนดที่สอง สาม สี่ จนครบทั้งเก้าตัว ดังนั้นปริมาณอิเล็กตรอนจะเพิ่มขึ้นถึง 10^6-10^7 เท่า แล้วจึงชนแอโนดให้กระแสไฟฟ้าออกมาเข้าเครื่องขยายสัญญาณต่อไป

- โฟโตไดโอดอาร์เรย์ (photodiode arrays; PDA)

ตัวตรวจจับสัญญาณชนิดนี้สามารถจับสัญญาณได้ครอบคลุมทั้งสเปกตรัมโดยใช้ไดโอดมาเรียงต่อกันเป็นแถว ซึ่งสามารถวัดครอบคลุมสเปกตรัมได้ตั้งแต่ 200–1100 nm ตัวตรวจจับสัญญาณนี้ประกอบไปด้วยโฟโตไดโอดและตัวเก็บประจุ (capacitor) ประมาณ 200–4000 ตัวเรียงต่อกันเป็นแถว หลักการเริ่มต้นด้วยการให้ประจุผ่านผิวหน้าไดโอด ซึ่งไดโอดก็จะเก็บประจุไว้ที่ตัวเก็บประจุ เมื่อแสงตกลงบนไดโอดจะทำให้เกิดประจุไฟฟ้าไปทำลายประจุที่เก็บไว้ที่ตัวเก็บประจุ ทำให้ต้องใส่ประจุเพิ่มเข้าไปใหม่ซึ่งเป็นช่วงของการสแกนแต่ละครั้ง ปริมาณของประจุที่ต้องใส่เข้าไปใหม่จะเป็นปฏิกิริยาโดยตรงกับความเข้มแสงที่วัดได้ของแต่ละไดโอด ดังนั้นจากการวัดปริมาณแสงที่แตกต่างกันตลอดช่วงความยาวคลื่นจะได้เป็นสเปกตรัมการดูดกลืนของสารนั้นออกมา

5. ส่วนบันทึกและแปรผลสัญญาณ (recorder and processor)

ทำหน้าที่ขยายสัญญาณ และแปรผลสัญญาณให้ออกมาในมาตราส่วนแบบล็อก (log scale) ^[8]

2.5.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการดูดกลืนแสง

1. โครโมฟอร์ (Chromophore) คือโมเลกุลของสารอินทรีย์ที่มีหมู่ฟังก์ชันแบบไม่เสถียร (Unsaturated functional group) ซึ่งดูดกลืนแสงในช่วงอัลตราไวโอเล็ต-วิสิเบิลและแสดงสมบัติของมัน มีด้วยกัน 3 แบบ

- โครโมฟอร์ที่มี multiple bond ระหว่าง 2 อะตอมของธาตุ โดยไม่มีอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยว เช่น C=C
- โครโมฟอร์ที่มี multiple bond ระหว่าง 2 อะตอมของธาตุ โดยมีอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยว เช่น C=O

- โครโมฟอร์ที่มี benzene ring ได้แก่ สารประกอบพวกอโรมาติก ไฮโดรคาร์บอน เช่น benzene, phenol

2. ออกโซโครม (auxochrome) เป็นกลุ่มของธาตุที่ไม่ดูดกลืนแสง แต่สามารถมีผลต่อ absorption spectrum ของโครโมฟอร์ที่มีออกโซโครมเกาะอยู่ ทำให้เกิดผลดังต่อไปนี้

- เกิด Bathochromic shift (red shift) ทำให้ spectrum เคลื่อนไปทางที่มีความยาวคลื่นมากขึ้น (λ_{\max} เพิ่ม)

- เกิด Hypsochromic shift (blue shift) ทำให้ spectrum เคลื่อนไปทางที่มีความยาวคลื่นลดลง (λ_{\max} ลด)

- เกิด Hyperchromic effect ทำให้เกิดการดูดกลืนแสงมากขึ้น (ϵ_{\max} เพิ่มขึ้น)

- เกิด Hypochromic effect ทำให้เกิดการดูดกลืนแสงน้อยลง (ϵ_{\max} น้อยลง)

3. ตัวทำละลาย (Solvent effect) ตัวทำละลายที่มีขั้ว เช่น สารอินทรีย์บางตัวที่มีหมู่คาร์บอนิล (C=O) ทำให้เกิดการเคลื่อนไปของแถบการดูดกลืนพลังงานเรียกว่า solvent shift

4. สเตอริกของโมเลกุล (Steric effect) ผลของโครงสร้างที่มีความเกะกะทำให้เกิดอันตรกิริยาของอิเล็กตรอนเปลี่ยนแปลง ส่งผลให้การวัดการดูดกลืนแสงเปลี่ยนแปลง เช่น สารประกอบที่มีหมู่ฟังก์ชันใหญ่ ๆ จะทำให้ λ_{\max} เคลื่อนไปทางที่สั้นกว่าและค่า ϵ_{\max} ลดลง^[6]

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในปี ค.ศ. 2009 Augustin M. และคณะ^[12] ได้ทำการความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากตัวอย่างกาบผึ้ง โดยใช้เทคนิค FT-IR และ UV-Vis spectroscopy โดยทำการแช่แข็งและเก็บตัวอย่างกาบผึ้งที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และนำตัวอย่างที่ได้มาบดเป็นผงจากนั้นเติม 95% เอทานอล ให้ได้เป็นความเข้มข้นสุดท้ายที่ 1.66 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปอัลตราโซนิเคตเป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในเครื่องเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1600 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปกรองและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงพบว่าที่ความ

ยาวคลื่น 353 นาโนเมตรให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ดีที่สุดและมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุดและที่ค่าสัญญาณสำหรับ FT-IR ที่ 1515 cm^{-1} , 1633 cm^{-1} และ 1683 cm^{-1} ของสารสกัดตัวอย่าง สอดคล้องกับสารสกัดเฉพาะของกาบผึ้ง และที่ค่าสัญญาณ 1630 cm^{-1} มีความสัมพันธ์กับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่เป็นสารประกอบกลุ่มฟลาโวนอยด์ โดยสามารถใช้เป็นพารามิเตอร์ในการหาปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระได้

ในปี ค.ศ. 2013 N P Pawar และ V R Salunkhe^[24] ได้ทำการศึกษาการหาปริมาณรูตินและกรดแกลลิกจากตัวอย่างตรีผลาในประเทศอินเดียที่ทำการสกัดด้วยสารละลายแอลกอฮอล์ในน้ำ โดยทำการชั่งตัวอย่าง 50 กรัม และนำมาสกัดด้วยเมทานอล จากนั้นนำไปกรอง และนำสารละลายที่ได้มาทำการลดความเข้มข้นโดยใช้เมทานอล และนำไปวัดค่าการดูดกลืนของรูตินและกรดแกลลิกที่ความยาวคลื่น 359 และ 273 นาโนเมตร ตามลำดับ ซึ่งได้ค่าขีดจำกัดการตรวจวัดต่ำสุดของรูตินและกรดแกลลิกอยู่ที่ 0.023 และ 0.014 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และขีดจำกัดการตรวจวัดต่ำสุดเชิงปริมาณของรูตินและกรดแกลลิกอยู่ที่ 0.068 และ 0.045 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และพบว่าในตัวอย่างตรีผลามีปริมาณรูตินและกรดแกลลิกอยู่ที่ 0.67 ± 0.005144 และ 0.76 ± 0.01171 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และมีร้อยละได้กลับคืนของรูตินและกรดแกลลิกอยู่ในช่วง $100.73-101.73\%$ และ $102.36-103.4\%$ ตามลำดับ

ในปี ค.ศ. 2017 Jose T, และคณะ^[19] ได้ทำการศึกษาสารกลุ่มฟีนอลิกในตัวอย่างไวน์จากองุ่น โดยใช้เทคนิค UV-Visible spectroscopy โดยทำการเก็บตัวอย่างจาก Welgevallen cellar (Stellenbosch, South Africa) สามสายพันธุ์ ได้แก่ Cabernet Sauvignon, Shiraz และ Pinotage ซึ่งเก็บตัวอย่างทุก ๆ 3 วันและทุก ๆ 15 วัน เป็นเวลา 2 เดือน จากนั้นทำการสกัดตัวอย่างโดยการนำผลองุ่น 50 กรัมใส่ถุง บีบด้วยมือเบาๆ จากนั้นเทใส่ขวดสีชาและห่อด้วยฟอยล์ จากนั้นเติมตัวทำละลายสกัด (40% เอทานอล (%v/v), 10 กรัมต่อลิตรของกรดทาร์ทาริก ปรับ pH เป็น 3.4) หลังจากนั้นทำการเติมแก๊สไนโตรเจน ทำการสกัดทิ้งไว้ 40 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปกรองและก่อนการวิเคราะห์จะนำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 5 นาที โดยพบว่าในตัวอย่างมีค่าเฉลี่ยของปริมาณกรดแกลลิกอยู่ที่ 23 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยตัวอย่างที่มีปริมาณกรดแกลลิกสูงที่สุดและต่ำที่สุดอยู่ที่ 88 และ 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร และพบปริมาณ *p*-Coumaric acid มีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยตัวอย่างที่พบปริมาณ *p*-Coumaric acid สูงที่สุดอยู่ที่ 18 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีบางตัวอย่างที่ตรวจไม่พบ

ในปี ค.ศ. 2004 Lihu Y. และคณะ^[21] ได้ทำการศึกษาหาปริมาณกรดฟีนอลิกและวิตามินซีในตัวอย่างน้ำผึ้งจากดอกยูคาลิปตัสในประเทศออสเตรเลีย ซึ่งกรดฟีนอลิกที่ศึกษาได้แก่ Gallic acid, Chlorogenic acid, Caffeic acid, Coumaric acid, Ferulic acid, Ellagic acid และ Unknown phenolic acid โดยใช้ตัวอย่างน้ำผึ้ง 100 กรัม ผสมกับน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ปรับให้เป็น pH 2 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก จากนั้นนำไปกรองผ่านสำลีและนำไปกรองด้วย Amberlite XAD-2 และนำไปกวนด้วยเครื่องเป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้เกิดการดูดซับที่ผิวของตัวดูดซับ จากนั้นล้างด้วย น้ำที่มีกรด (pH 2 ที่มีกรดไฮโดรคลอริก ปริมาตร 250 มิลลิลิตร) และล้างด้วยน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร เพื่อล้างน้ำตาลและองค์ประกอบอื่น ๆ ที่มีขั้วอื่น ๆ จากนั้นชะกรดฟีนอลิกทั้งหมดออกด้วยเมทานอล 400 มิลลิลิตร นำไปเพิ่มความเข้มข้นด้วยเครื่องระเหยแบบหมุนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ส่วนที่เหลือถูกละลายด้วยน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร และสกัดด้วย ไดเอทิลอีเทอร์ 5 มิลลิลิตร 3 ครั้ง นำไประเหยด้วยเครื่องระเหยแบบหมุนอีกครั้ง จากนั้นละลายด้วยเมทานอล 1 มิลลิลิตร และนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง จากการวิเคราะห์พบปริมาณกรดแกลลิกในตัวอย่างอยู่ในช่วง 0.34–6.62 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของน้ำผึ้ง โดยตัวอย่างที่มีปริมาณกรดแกลลิกสูงที่สุดคือ ตัวอย่างจาก Maryborough, QLD และตัวอย่างที่มีปริมาณกรดแกลลิกน้อยที่สุด คือ ตัวอย่างจาก New England, NSW ซึ่งกรดแกลลิก (Gallic acid) เป็นกรดฟีนอลิกที่พบได้มากที่สุดจากกรดฟีนอลิกทั้งหมดที่ทำการศึกษานี้ และจากการวิเคราะห์พบปริมาณกรดคูมาริก (Coumaric acid) ในตัวอย่างอยู่ในช่วง 0.18–1.43 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของน้ำผึ้ง โดยตัวอย่างที่มีปริมาณกรดคูมาริกสูงที่สุดคือ ตัวอย่างจาก Kempsey, NSW และตัวอย่างที่มีปริมาณกรดคูมาริกน้อยที่สุดเป็นตัวอย่างที่ไม่ทราบแหล่งที่มา

ในปี ค.ศ. 2010 Krisina R. และคณะ^[20] ได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในน้ำผึ้งจากดอกอาเคเซีย ดอกราสเบอร์รี่ ดอกบักวีต ดอกยูคาลิปตัสและดอกไม้ป่าในประเทศลิทัวเนีย โดยทำการสกัดตัวอย่างน้ำผึ้งด้วยเอทานอลและนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC–UV/VIS โดยในน้ำผึ้งจากดอกอาเคเซียพบปริมาณ coumaric acid มากที่สุด คือ 3.674 ± 0.009 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และพบปริมาณ gallic acid และ vanillic acid น้อยที่สุด ซึ่งน้อยกว่าค่าขีดจำกัดการตรวจวัดต่ำสุด และในน้ำผึ้งจากดอกราสเบอร์รี่พบปริมาณ chlorogenic acid มากที่สุด อยู่ที่ 5.751 ± 0.051 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และพบ cinnamic acid น้อยที่สุด อยู่ที่ 0.023 ± 0.054 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และในน้ำผึ้งจากดอกบักวีตพบปริมาณ coumaric acid มากที่สุดอยู่ที่ 43.676 ± 0.051 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และพบ rosmarinic acid น้อยที่สุด อยู่ที่ 0.500 ± 0.028 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และในน้ำผึ้งจากดอกไม้ยูคาลิปตัสพบปริมาณ

gallic acid มากที่สุด คือ 5.150 ± 0.041 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และพบปริมาณ cinnamic acid น้อยที่สุด คือ 0.274 ± 0.047 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และในน้ำผึ้งจากดอกไม้ป่าพบปริมาณ chlorogenic acid มากที่สุด อยู่ที่ 79.106 ± 0.026 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และพบปริมาณ cinnamic acid น้อยที่สุด คือ 0.104 ± 0.058 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยจะพบปริมาณ gallic acid ในน้ำผึ้งจากดอกยูคาลิปตัส อยู่ที่ 5.150 ± 0.041 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และพบปริมาณ coumaric acid สูงที่สุดในน้ำผึ้งจากดอกบักวีต อยู่ที่ 43.676 ± 0.051 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ในปี ค.ศ. 2013 Izabela M. และคณะ^[16] ได้ทำการศึกษาศาสตร์ประกอบฟีนอลิกและกรดแอบไซซิกในตัวอย่างน้ำผึ้งจากดอกบักวีตและจากทุ่งหญ้าในประเทศโปแลนด์ โดยทำการสกัดตัวอย่างน้ำผึ้งด้วยตัวดูดซับของแข็ง โดยใช้ Amberlite-XAD-2 เป็นตัวดูดซับ และนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC-DAD และศึกษาปริมาณฟีนอลิกรวมด้วยเทคนิค Folin-Ciocalteu และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ผลการศึกษาพบว่าน้ำผึ้งจากทุ่งหญ้ามีปริมาณฟีนอลิกรวมอยู่ในช่วง 59.9–76.2 มิลลิกรัมแกลลิกต่อ 100 กรัม และจาก 8 ใน 15 ตัวอย่าง มีปริมาณฟีนอลิกรวมมากกว่า 70.0 มิลลิกรัมแกลลิกต่อ 100 กรัม และพบสารประกอบฟีนอลิก 15 ชนิด คือ 3-hydroxybenzoic acid, chlorogenic acid, 4-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, caffeic acid, syringic acid, ferrulic acid, *p*-coumaric acid, rosmarinic acid, ellagic acid, myricetin, quercetin, kaempferol, chrysin และ galangin ซึ่งพบว่าในทุกตัวอย่างมีปริมาณ *p*-coumaric acid มากที่สุด อยู่ในช่วง 2.8 ถึง 8.9% ซึ่งสามารถใช้ระบุได้ว่าน้ำผึ้งที่มีปริมาณ *p*-coumaric acid สูงอาจเป็นน้ำผึ้งจากทุ่งหญ้า และน้ำผึ้งจากดอกบักวีตจะมีความเข้มข้นมากกว่าตัวอย่างน้ำผึ้งจากทุ่งหญ้า โดยมีปริมาณฟีนอลิกรวมอยู่ในช่วง 98.3–121.4 มิลลิกรัมแกลลิกต่อ 100 กรัม และพบ *p*-hydroxybenzoic, ferulic และ vanillic acids เป็นองค์ประกอบหลัก โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 28.79%, 13.26% และ 8.46% ตามลำดับ ตัวอย่าง 5 ใน 7 มีปริมาณ *p*-hydroxybenzoic สูงกว่า 30% และพบ *p*-coumaric acid ในตัวอย่างที่ 1 ถึง 4 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 20.85%

ในปี ค.ศ. 2013 Isnandia S. และคณะ^[15] ได้ทำการศึกษาศาสตร์ประกอบฟีนอลิก, ปริมาณฟีนอลิก รวม, ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและความสามารถในการต้านจุลชีพของน้ำผึ้งจากชันโรงในรัฐอามาโซนัสของประเทศบราซิล จากดอกไม้ทั้งหมด 22 ชนิด ผลการศึกษาพบว่า ปริมาณฟีนอลรวมจากสารสกัดเมทานอลของตัวอย่างน้ำผึ้งจากชันโรงอยู่ในช่วง 17 ถึง 66 มิลลิกรัมแกลลิกต่อกรัม โดยปริมาณฟีนอลิกรวมจะมีความสัมพันธ์กับแหล่งที่มาของน้ำผึ้งและสายพันธุ์ของผึ้ง โดยตัวอย่างน้ำผึ้งจาก Maues, Labrea และ Rio Preto

da Eva มีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงที่สุด และตัวอย่างน้ำผึ้งที่มีปริมาณฟีนอลิก รวมต่ำที่สุดคือ ตัวอย่างน้ำผึ้งจาก Pauini และ Boca do Acre โดยในตัวอย่างจาก Boca do Acre และ Pauini มีปริมาณ Gallic acid สูงที่สุด อยู่ที่ 0.02 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม และตัวอย่างจาก Lábrea มีปริมาณ Catechol สูงที่สุด อยู่ที่ 8.76 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม นอกจากนี้ยังเป็นตัวอย่างเดียวที่ ตรวจพบ Naringenin และ Luteolin อยู่ที่ 1.30 และ 2.26 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ตามลำดับ และ ตัวอย่างที่พบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุดคือตัวอย่างจาก Manaus ซึ่งพบ 3,4-Dihydroxybenzoic acid, 4-Hydroxybenzoic acid, Vanillic acid, Salicylic acid, Syringic acid, Coumaric acid, Cinnamic acid, *trans,trans*-Abscisic acid และ *cis,trans*-Abscisic acid โดย ตัวอย่างจาก Rio Preto da Eva พบปริมาณ Taxifolin สูงที่สุดเท่ากับ 1.58 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม

ในปี ค.ศ. 2014 Luca C. และคณะ^[221] ได้ทำการศึกษาการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในน้ำผึ้งโดยใช้การสกัดระดับจุลภาคด้วยของเหลวแบบกระจาย งานนี้อธิบายแนวทางใหม่ในการวิเคราะห์หาของกรดฟีนอลิก 5 ชนิดและฟลาโวนอยด์ 10 ชนิดในน้ำผึ้งจากเมืองคาลาเบรีย 7 ตัวอย่างอย่างรวดเร็ว สารประกอบฟีนอลิกสกัดอย่างรวดเร็วและมีการเข้มข้นด้วยการสกัดระดับจุลภาคด้วยของเหลวแบบกระจาย (DLLME) โดยใช้ CHCl_3 เป็นตัวทำละลายสกัด และใช้ Me_2CO เป็นตัวทำละลายช่วยกระจายจากนั้นทำการวิเคราะห์โดยใช้ HPLC-UV โดยจะตรวจพบสารประกอบฟีนอลิก 5 ชนิด คือ caffeic acid (CAA), ferulic acid (FEA), *p*-coumaric acid (*p*-COA), syringic acid (SYA) และ vanillic acid (VAA), และฟลาโวนอยด์ 10 ชนิด คือ apigenin (API), chrysin (CHR), galangin (GAL), hesperetin (HES), kaempferol (KAE), luteolin (LUT), myricetin (MYR), pinobanksin (PNB), pinocembrin (PNC) และ quercetin (QUE) ในตัวอย่างน้ำผึ้งทั้ง 7 ตัวอย่าง โดยจะพบ *p*-coumaric acid, chrysin และ *cis, trans*-abscisic acid มากที่สุดในน้ำผึ้งตัวอย่างที่ 1 พบ kaempferol และ Galangin มากที่สุดในน้ำผึ้งตัวอย่างที่ 2 พบ pinobanksin, luteolin, apigenin และ pinocembrin มากที่สุดในน้ำผึ้งตัวอย่างที่ 3 พบ myricetin มากที่สุดในน้ำผึ้งตัวอย่างที่ 5 พบ vanillic acid, caffeic acid, ferulic acid, myricetin และ quercetin มากที่สุดในน้ำผึ้งตัวอย่างที่ 6 และพบ syringic acid และ hesperetin มากที่สุดในน้ำผึ้งตัวอย่างที่ 7 โดยมีค่าขีดจำกัดการตรวจวัดต่ำสุดอยู่ในช่วง 1.4 – 12.0 นาโนกรัมต่อกรัม และมีค่าขีดจำกัดการตรวจวัดต่ำสุดเชิงปริมาณอยู่ในช่วง 4.7–40.0 นาโนกรัมต่อกรัม

ในปี ค.ศ. 2015 Walter S. และคณะ^[29] ได้ทำการวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิก 13 ชนิด ใน ตัวอย่างฝรั่ง (*Psidium guajava* L.) จากซัลวาดอร์ บาร์เฮีย บราซิล งานแสดงสินค้า

ห้วงสรรพสินค้าและสวนที่ปลอดสารพิษ ทำการแบ่งตัวอย่างเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีสีเขียว (G), กลุ่มที่มีสีขาว (WG) และกลุ่มที่สีสุก (R) โดยใช้เทคนิค HPLC-DAD โดยทำการสกัดตัวอย่างด้วยเมทานอล และกรองด้วย PTFE จากนั้นนำไปวิเคราะห์ พบว่า ตัวอย่างของฝรั่งสีขาวมีปริมาณ gallic acid มากที่สุด คือ 7.28 ± 1.57 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม และในตัวอย่างฝรั่งสีเขียว พบปริมาณ chlorogenic acid และ ellagic acid 15.75 ± 0.28 และ 30.60 ± 1.75 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ตามลำดับ ซึ่งในตัวอย่างฝรั่งสุก จะพบปริมาณ caffeic acid, transcinnamic acid, vanillic acid, *p*-coumaric acid, syringic acid และ ferulic acid อยู่ที่ 0.74 ± 0.05 , 4.13 ± 0.31 , 3.37 ± 0.42 , 4.10 ± 0.08 , 2.20 ± 0.13 และ 3.45 ± 0.47 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ตามลำดับ และพบปริมาณฟีนอลิกรวมในตัวอย่างฝรั่งสีขาวอยู่ที่ 55.23 ± 1.34 มิลลิกรัมแกลลิกต่อ 100 กรัม และพบปริมาณฟีนอลิกรวมในตัวอย่างฝรั่งสุกและฝรั่งสีเขียว อยู่ในช่วง 186.89–448.54 และ 246.60–516.50 มิลลิกรัมแกลลิกต่อ 100 กรัม ตามลำดับ

ในปี ค.ศ. 2016 Gulzer N. และคณะ^[14] ได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก สารต้านอนุมูลอิสระและปริมาณแร่ธาตุในตัวอย่างน้ำผึ้งจากดอกแอปเปิล ดอกเชอร์รี่ ดอกหญ้าฝรั่งและดอกไม้ป่าในเมืองแคชเมียร์ ประเทศอินเดีย โดยทำการชั่งตัวอย่างน้ำผึ้ง 5 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 2 ด้วย กรดไฮโดรคลอริก วางไว้ในอ่างน้ำที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำมากรองด้วย PTFE ขนาด 0.45 ไมโครเมตร โดยสารประกอบฟีนอลิกจะติดอยู่ในคอลัมน์ โดยจะชะออกด้วยเมทานอล 250 มิลลิลิตร จากนั้นนำไประเหยแบบหมุนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยสกัดสารตกค้างด้วยไดเมทิลอีเทอร์ 5 มิลลิลิตร 3 ครั้ง จากนั้นนำกากที่เหลือไปละลายด้วยเมทานอล 1 มิลลิลิตร (เกรด HPLC) และนำไปกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค High Performance liquid chromatography ควบคู่กับ photodiode-array detector โดยจากการวิเคราะห์พบว่าในตัวอย่างจากดอกแอปเปิลมีปริมาณ gallic acid มากที่สุด อยู่ที่ 0.24 ± 0.06 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม และพบน้อยที่สุดจากดอกหญ้าฝรั่ง อยู่ที่ 0.11 ± 0.05 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม และพบปริมาณ *p*-coumaric acid สูงที่สุดจากดอกแอปเปิล อยู่ที่ 0.25 ± 0.05 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม และพบน้อยที่สุดจากดอกหญ้าฝรั่ง อยู่ที่ 0.17 ± 0.12 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ซึ่งน้ำผึ้งจากดอกไม้ทั้ง 4 ชนิดพบปริมาณ Naringenin มากที่สุด คือ 1.64 ± 0.08 , 2.04 ± 0.10 , 1.84 ± 0.09 และ 1.71 ± 0.15 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ตามลำดับ และพบ Ferulic acid น้อยที่สุด อยู่ที่ 0.07 ± 0.04 , 0.17 ± 0.06 , 0.10 ± 0.04 และ 0.09 ± 0.04 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ตามลำดับ

ในปี ค.ศ. 2016 Janaína S. และคณะ^[17] ได้ทำการศึกษาโพลีฟีนอลิกและสารต้านอนุมูลอิสระของน้ำผึ้งที่มาจากเกสรดอกไม้ชนิดเดียวกันโดย *Meliponini* จากภูมิภาคกิ่งบราซิล ซึ่งทำการหาปริมาณฟีนอลิกรวมโดยใช้ Folin-Ciocalteu phenol reagent หาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมโดยใช้ colorimetric assay และศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธีการทดสอบด้วย Oxygen radical absorption capacity (ORAC), ABTS•⁺ free radical-scavenging assay, Ferric reducing antioxidant power (FRAP) และ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical assays (DPPH) ในการหาสารประกอบฟีนอลิกจะทำการสกัดด้วย Amberlite XAD-2 resin จากนั้นวิเคราะห์ด้วย HPLC-DAD จากผลการทดลองพบว่าน้ำผึ้งจาก *Ziziphus joazeiro* Mart (juazeiro) และ *Croton heliotropiifolius* Kunth (velame branco) แสดงปริมาณฟีนอลิกรวมสูงสุด (TPCs) และมีผลการต้านอนุมูลอิสระที่สูงที่สุดในการทดสอบด้วย DPPH และ ABTS•⁺ radicals ส่วนน้ำผึ้งจาก *Mimosa quadrivalvis* L. (malícia) แสดงผลการต้าน peroxyl ที่สูงที่สุดในการทดสอบ ORAC และในน้ำผึ้ง Juazeiro แสดงปริมาณสูงสุดของ trans-cinnamic, *p*-coumaric, ellagic และ ferulic acid รวมถึง catechin, rutin, hesperetin และ chrysin เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำผึ้งอื่น ๆ ที่ผลิตโดยผึ้งสายพันธุ์เดียวกัน และน้ำผึ้ง Malícia แสดงจำนวน myricetin, quercetin และ kaempferol ในปริมาณที่มากที่สุด โดยฟีนอลิกรวมเฉลี่ยสำหรับการตรวจวิเคราะห์ทั้งหมดคือ 56.32 ± 28.5 มิลลิกรัมแกลลิกต่อ 100 กรัม และค่าเฉลี่ยฟลาโวนอยด์รวม สำหรับการวิเคราะห์ทั้งหมด คือ 2.97 ± 0.9 มิลลิกรัมเคอเซตินต่อ 100 กรัม ซึ่งน้ำผึ้งที่มีฟีนอลิกรวมสูงสุดจะมีความสามารถในการต้านจุลชีพที่สูงที่สุด ทั้งนี้ผลการวิจัยพบว่าแหล่งที่มาของดอกไม้มีผลต่อโพลีฟีนอลิกเช่นเดียวกับคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระและคุณสมบัติต้านจุลชีพของน้ำผึ้ง *Meliponini*

ในปี ค.ศ. 2017 Fabíola B. และคณะ^[13] ได้ทำตรวจหาสารประกอบฟีนอลิกในโดยการสกัดสารฟีนอลิกตามวิธีที่อธิบายไว้ใน Trautvetter et al. (2009) จากนั้นทำการตรวจวัดด้วย Liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS) และหาสารต้านอนุมูลอิสระ ของน้ำผึ้งชันโรง (*Meliponinae*) 13 ตัวอย่างจากผึ้งชันโรง (*Meliponinae*) 9 ชนิดที่แตกต่างกันด้วยการทดสอบ Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) จากการผลการทดลองพบสารประกอบฟีนอลิก 26 ชนิด ได้แก่ กรดฟีนอลิก 12 ชนิด, ฟลาโวนอยด์ 9 ชนิด, ฟีนอลิกแอลดีไฮด์ 3 ชนิด, คูมารินและไดเทอร์พีน สารประกอบฟีนอลิกที่สำคัญ ได้แก่ กรดซาลิไซลิก (8.02 – 94.8 ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม), *p*-coumaric acid (4.54 – 64.3 ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม), naringin (4.00 – 32.0 ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม) และ taxifolin (12.0–1920 ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม) ผลของ ORAC ของตัวอย่างน้ำผึ้งนั้นแตกต่างกันไปจาก

199 ถึง 667 μmol เทียบเท่า Trolox (TE) 100 กรัม ($p < 0.05$) เมื่อเทียบความสัมพันธ์ของ ORAC กับฟีนอลิกแต่ละชนิด จะเห็นถึงความสัมพันธ์เชิงบวกที่สำคัญกับกรด *p*-coumaric ($r = 0.83$; $p < 0.001$), syringaldehyde ($r = 0.73$; $p < 0.005$), naringenin ($r = 0.61$; $p < 0.001$) และ caffeic, ferulic, syringic และ aromadendrin ($r = 0.51$ ถึง $r = 0.56$; $p < 0.005$) ความสัมพันธ์เหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าสารประกอบฟีนอลิกมีส่วนช่วยในการต้านอนุมูลอิสระของน้ำผึ้งชันโรง

ในปี ค.ศ. 2018 Jianling D. และคณะ^[18] ได้ทำวิเคราะห์หาสารต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ของน้ำผึ้งบักวีทเปรียบเทียบกับน้ำผึ้งมานูก้า โดยหาปริมาณฟีนอลิกรวมด้วย Folin-Ciocalteu method จากผลการวิเคราะห์พบว่าน้ำผึ้งบักวีทมีปริมาณฟีนอลิก 1498 ± 37.3 ($P < 0.05$) ในขณะที่น้ำผึ้งมานูก้ามีปริมาณฟีนอลิก 561 ± 2.82 ปริมาณฟีนอลิกของน้ำผึ้งบักวีทสูงกว่าน้ำผึ้งมานูก้ามาก ซึ่งแสดงให้เห็นว่าน้ำผึ้งบักวีทมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่าน้ำผึ้งมานูก้า และหาสารประกอบฟีนอลิกถูกสกัดโดย Amberlite XAD-2 resin ตามด้วยการทำให้บริสุทธิ์ด้วย ethyl acetate ซึ่งกรดฟีนอลิก 9 ชนิด ได้แก่ protocatechuic acid, chlorogenic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, caffeic acid, syringic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid, isoferulic acid และ benzoic acid และ ฟลาโวนอยด์ 6 ชนิด ได้แก่ quercetin, apigenin, kaempferol, isorhamnetin, chrysin, galangin ถูกนำมาใช้เป็นมาตรฐานสำหรับการจำแนกสารประกอบฟีนอลิกของน้ำผึ้ง จากผลการทดลองพบว่ากรดฟีนอลิกทั้งหมดถูกพบในปริมาณที่สูงกว่าฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในน้ำผึ้งบักวีท ซึ่งผลลัพธ์นี้สอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ แสดงว่าน้ำผึ้งสีเข้มมีกรดฟีนอลิกมากกว่าฟลาโวนอยด์ (Moniruzzaman et al., 2013) ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดน้ำผึ้งบักวีท (110 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม) สูงกว่าในสารสกัดจากน้ำผึ้งมานูก้า (7.39 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม) ดังนั้นน้ำผึ้งบักวีทจึงมีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าน้ำผึ้งมานูก้า

ในปี ค.ศ. 2019 Mitra Z. และคณะ^[23] ได้ทำการศึกษา การประยุกต์ใช้สารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดการอัลตราไซคลิกกับ α -cyclodextrin สำหรับการวิเคราะห์สเปกโทรโฟโตเมตริกของกรดแกลลิกและกรดวานิลลิกในตัวอย่างน้ำผลไม้ 5 ตัวอย่างจากห้างสรรพสินค้า โดยการนำน้ำผลไม้ตัวอย่างละ 5 มิลลิลิตรไปปั่นเหวี่ยงที่ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร และนำไปเจือจางเป็น 50 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำสารละลายตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร เติม α -cyclodextrin ปรับ pH เป็น 3 ปรับปริมาตรด้วย 10% เอทานอลในน้ำนำไปโซนิเคตเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วย

HPLD-DAD ซึ่งจากทั้ง 5 ตัวอย่างพบปริมาณกรดแกลลิกอยู่ในช่วง 1.32–5.00 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีร้อยละการได้กลับคืนอยู่ในช่วง 96–105% และพบปริมาณกรดวานิลลิกอยู่ในช่วง 2.59–5.92 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีร้อยละการได้กลับคืนอยู่ในช่วง 97.5–105% และเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคการวิเคราะห์ด้วย HPLC-UV จะพบปริมาณกรดแกลลิกและกรดวานิลลิกอยู่ในช่วง 1.30–4.98 และ 2.60–5.10 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งจะพบว่าเทคนิคนี้ที่มีการสร้างสารประกอบเชิงซ้อนกับ α -cyclodextrin ให้ผลการวิเคราะห์ที่ดีกว่า โดยมีการตรวจพบปริมาณกรดแกลลิกและกรดวานิลลิกมากกว่า

ในปี ค.ศ. 2019 Zuoyi Z. และคณะ^[30] ได้ทำการศึกษาการสกัดสารประกอบฟีนอลิก 17 ชนิดในน้ำผึ้งด้วยของเหลวและนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยทำการวิเคราะห์หาปริมาณ gallic acid, protocatechuic acid, caffeic acid, vanillic acid, sinapic acid, ferulic acid, rosmarinic acid, 3,4-dimethoxycinnamic acid, rutin, myricetin, quercetin, luteolin, kaempferol, apigenin, pinocembrin, chrysin และ galangin ในตัวอย่างน้ำผึ้ง 7 ตัวอย่าง โดยชั่งตัวอย่างน้ำผึ้ง 0.5 กรัม เติมน้ำละลายกรด (1 โมลต่อลิตรของสารละลายกรดไฮโดรคลอริก pH 2) 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเติมอะซิโตนไธล์ 1 มิลลิลิตร นำไปผสมด้วยเครื่องผสมสารเป็นเวลา 1 นาที เก็บสารละลายชั้นบนนำไปทำให้แห้งในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และนำมาละลายด้วย 200 มิลลิลิตรของเมทานอลในน้ำ (1:1 v/v) จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยทั้ง 7 ตัวอย่าง พบปริมาณกรดแกลลิกอยู่ในช่วง 657–1450 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่ง 6 ใน 7 ตัวอย่างพบปริมาณ chrysin สูงที่สุดอยู่ในช่วง 1785–3364 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และจาก 5 ใน 7 ตัวอย่างตรวจไม่พบปริมาณ rosmarinic acid ที่อยู่ในตัวอย่างน้ำผึ้ง แต่อีก 2 ตัวอย่างพบอยู่ที่ 85 ± 2 และ 207 ± 6 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดยข้อดีของเทคนิคนี้คือ เป็นการวิเคราะห์ที่ง่าย รวดเร็ว และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

- 3.1.1 กรดคอปริก (o-Coumaric acid) Sigma-Aldrich สหรัฐอเมริกา
- 3.1.2 กรดแกลลิก (Gallic acid) Sigma-Aldrich สหรัฐอเมริกา
- 3.1.3 เมทานอล (Methanol) เกรดวิเคราะห์ RCI Labscan ประเทศไทย
- 3.1.4 เอทานอล (Ethanol) เกรดวิเคราะห์ RCI Labscan ประเทศไทย

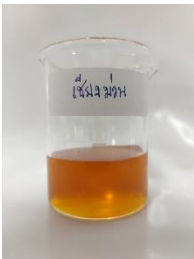


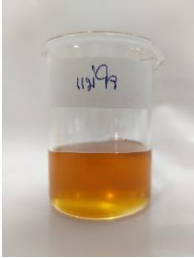
3.2 วัสดุ อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 3.2.1 เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์แบบยูวี-วิสิเบิล (UV-visible spectrophotometer) รุ่น V-530, Jasco, สหรัฐอเมริกา
- 3.2.2 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น AB 204-S, Mettler Toledo, เยอรมัน
- 3.2.3 เครื่องผสมสารอัตโนมัติ
- 3.2.4 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
- 3.2.5 หลอดเซนติฟิวก์พลาสติก (Centrifuge tube) ขนาด 15 มิลลิลิตร
- 3.2.6 ช้อนตักสาร (Spatula)
- 3.2.7 กระดาษกรอง (Filter paper) ยี่ห้อ Whatman เบอร์ 1
- 3.2.8 ชุดเครื่องแก้ว
 - ปีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 100 และ 250 มิลลิลิตร
 - ขวดวัดปริมาตร (Volumetric flask) ขนาด 50 และ 250 มิลลิลิตร
 - ปิเปต (pipette) ขนาด 5 และ 10 มิลลิลิตร
 - หลอดหยดสารและจุกยาง (Dropper)
 - แท่งแก้วคนสาร (Stirring rod)

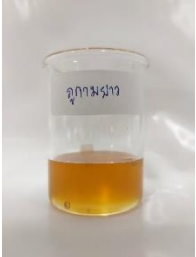
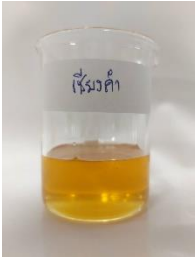
3.3 ตัวอย่างน้ำผึ้ง

ตัวอย่างน้ำผึ้งที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์มีจำนวน 6 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างทั้งหมดเป็นตัวอย่างน้ำผึ้งโพรงป่าที่ได้จากผู้เลี้ยงผึ้งโพรงป่าในอำเภอเขียงม่วน (H1) อำเภอปาง (H2) อำเภอเมืองพะเยา (H3) อำเภอแม่ใจ (H4) อำเภอภูกามยาว (H5) และอำเภอเชียงคำ (H6) จังหวัดพะเยา ซึ่งลักษณะทางกายภาพของตัวอย่างน้ำผึ้ง แสดงดังตาราง 1

ตาราง 1 ลักษณะทางกายภาพตัวอย่างน้ำฝิ่งโพรงป่า

ชื่อตัวอย่างน้ำฝิ่ง	สี	ลักษณะ	ลักษณะตัวอย่างน้ำฝิ่ง
H1	สีเหลือง อมน้ำตาล	ขุ่น ใส	
H2	สีเหลือง อมน้ำตาล	ขุ่น ใส	
H3	สีเหลือง อมน้ำตาล	เหลวเล็กน้อย ใส	
H4	สีเหลือง อมน้ำตาล	ขุ่น ใส	

ตาราง 1 (ต่อ)

ชื่อตัวอย่างน้ำผึ้ง	ชนิดน้ำผึ้ง	อำเภอ	ลักษณะตัวอย่างน้ำผึ้ง
H5	สีเหลือง อมน้ำตาล	ชั้น ใส	
H6	สีเหลือง	ชั้น ใส	

3.4 การศึกษาหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณกรดออร์โทคูมาริก และกรดแกลลิกในตัวอย่างน้ำผึ้ง

3.4.1 การศึกษาหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณกรดออร์โทคูมาริก

- ปิเปตสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริกความเข้มข้น 100.00 ppm ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ให้ได้ความเข้มข้น 1.00, 2.00, 3.00, 4.00, 5.00, 6.00, 7.00, 8.00, 9.00, 10.00, 15.00, 20.00, 25.00 และ 30.00 ppm
- ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนถึงขีดวัดปริมาตร
- นำไปสแกนหาความยาวคลื่นที่เหมาะสม

3.4.2 การศึกษาหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณกรด

แกลลิก

- ปิเปตสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกความเข้มข้น 100.00 ppm ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ให้ได้ความเข้มข้น 1.00, 2.00, 3.00, 4.00, 5.00, 6.00, 7.00, 8.00 9.00, 10.00, 15.00, 20.00, 25.00 และ 30.00 ppm
- ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนถึงขีดวัดปริมาตร
- นำไปสแกนหาความยาวคลื่นที่เหมาะสม

3.5 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการสกัดตัวอย่าง

3.5.1 วิธีการสกัดตัวอย่างด้วยตัวทำละลาย

- ชั่งตัวอย่างน้ำผึ้ง 1.66 กรัม ลงในหลอดเซนติฟิกพลาสติก ขนาด 15 มิลลิลิตร
- ละลายตัวอย่างด้วยน้ำปราศจากไอออน 1 มิลลิลิตร เขย่าด้วยมือให้ผสมกัน
- เติมตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ เมทานอล เอทานอลและเมทานอลต่อเอทานอล (1:1) ปริมาตร 5 และ 10 มิลลิลิตรลงในหลอด
- นำไปหมุนเหวี่ยงเป็นเวลา 1 นาที
- นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3, 5 และ 10 นาที
- นำสารละลายไปกรองด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 1
- เก็บสารตัวอย่างที่สกัดได้ในหลอดเซนติฟิกพลาสติก

3.6 การตรวจสอบประสิทธิภาพของการวิเคราะห์หากรดออร์โทคูมาริก (Analytical performance)

3.6.1 การศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity)

- ปิเปตสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริกความเข้มข้น 100.00 ppm ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ให้ได้ความเข้มข้น 0.05, 1.00, 2.00, 3.00, 4.00, 5.00, 6.00, 7.00, 8.00 9.00, 10.00, 15.00, 20.00, 25.00, 30.00, 40.00, 50.00 และ 60.00 ppm
- ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนถึงขีดวัดปริมาตร
- นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 272 นาโนเมตร

3.6.2 การศึกษาความแม่นยำของการวิเคราะห์ (Precision)

3.6.2.1 Repeatability

- บีเปตสารละลายมาตรฐานกรดออกอร์โทคูมาริกความเข้มข้น 100.00 ppm ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ให้ได้ความเข้มข้น 1.00, 5.00 และ 10.00 ppm
- ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนถึงขีดวัดปริมาตร
- นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 272 นาโนเมตร
- ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงซ้ำจำนวน 7 ครั้ง (ความเข้มข้นละ 1 ขวด)

3.6.2.2 Reproducibility

- บีเปตสารละลายมาตรฐานกรดออกอร์โทคูมาริกความเข้มข้น 100.00 ppm ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ให้ได้ความเข้มข้น 1.00, 5.00 และ 10.00 ppm
- ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนถึงขีดวัดปริมาตร
- นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 272 นาโนเมตร
- ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงซ้ำจำนวน 3 ครั้ง (ความเข้มข้นละ 7 ขวด)

3.6.3 การศึกษาขีดจำกัดการตรวจวัด (Limit of Detection) และขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation)

- บีเปตเอทานอล 5.00 มิลลิลิตร และบีเปตน้ำปราศจากไอออน 1.00 มิลลิลิตร
- นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 272 นาโนเมตร
- วัดซ้ำจำนวน 11 ครั้ง คำนวณหาค่า LOD และ LOQ
- สร้างกราฟมาตรฐานที่ความเข้มข้น 1.00–19.00 ppm โดยมีความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดออกอร์โทคูมาริกและค่าการดูดกลืนแสง

3.6.4 การศึกษาร้อยละการการได้กลับคืนของเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ (%Recovery)

- บีเปตสารตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร (ตัวอย่างเริ่มต้น (Original sample))

- ปิเปตสารตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตรและสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริกให้ได้ความเข้มข้น 5 ppm (Spiked sample) ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร
- ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนถึงขีดวัดปริมาตร
- นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 272 นาโนเมตร

3.6.5 การศึกษาร้อยละการการได้กลับคืนของวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์

(%Recovery)

- ชั่งตัวอย่างน้ำผึ้ง 1.66 กรัมต้วนเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตรด้วยน้ำปราศจากไอออน (ตัวอย่างเริ่มต้น (Original sample))
- ชั่งตัวอย่างน้ำผึ้ง 1.66 กรัมต้วนเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
- ปิเปตสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริกให้ได้ความเข้มข้น 5 ppm (Spiked sample) ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร
- ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนถึงขีดวัดปริมาตร
- นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 272 นาโนเมตร

3.6.6 การสร้างกราฟมาตรฐาน (Calibration Curve)

- ปิเปตสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริกความเข้มข้น 100.00 ppm ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ให้ได้ความเข้มข้น 1.00, 3.00, 5.00, 7.00 และ 9.00 ppm
- ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนถึงขีดวัดปริมาตร
- นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 272 นาโนเมตร
- ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงซ้ำจำนวน 3 ครั้ง
- สร้างกราฟมาตรฐานโดยมีความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริกและค่าการดูดกลืนแสง

3.6.7 การวิเคราะห์หาปริมาณกรดออร์โทคูมาริก

- ปิเปตสารละลายที่ได้จากการสกัดตัวอย่าง 1.00 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10.00 มิลลิลิตร
- ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน

- นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 272 นาโนเมตร

3.7 การตรวจสอบประสิทธิภาพของการวิเคราะห์หาคาร์บอนกลไก (Analytical performance)

3.7.1 การศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity)

- บีเปตสารละลายมาตรฐานกรดกลไกความเข้มข้น 100.00 ppm ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ให้ได้ความเข้มข้น 1.00, 2.00, 3.00, 4.00, 5.00, 6.00, 7.00, 8.00, 9.00, 10.00, 15.00, 20.00, 25.00, 30.00, 40.00, 50.00, 60.00, 70.00, 80.00, 90.00 และ 100.00 ppm
- ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนถึงขีดวัดปริมาตร
- นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 266 นาโนเมตร

3.7.2 การศึกษาความแม่นยำของการวิเคราะห์ (Precision)

3.7.2.1 Repeatability

- บีเปตสารละลายมาตรฐานกรดกลไกความเข้มข้น 100.00 ppm ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ให้ได้ความเข้มข้น 1.00, 20.00 และ 40.00 ppm
- ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนถึงขีดวัดปริมาตร
- นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 266 นาโนเมตร
- ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงซ้ำจำนวน 7 ครั้ง (ความเข้มข้นละ 1 ขวด)

3.7.2.2 Reproducibility

- บีเปตสารละลายมาตรฐานกรดกลไกความเข้มข้น 100.00 ppm ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ให้ได้ความเข้มข้น 1.00, 20.00 และ 40.00 ppm
- ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนถึงขีดวัดปริมาตร
- นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 266 นาโนเมตร
- ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงซ้ำจำนวน 3 ครั้ง (ความเข้มข้นละ 7 ขวด)

3.7.3 การศึกษาขีดจำกัดการตรวจวัด (Limit of Detection) และขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation)

- บีเปตเอทานอล 5.00 มิลลิลิตร และบีเปตน้ำปราศจากไอออน 1.00 มิลลิลิตร

- นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 266 นาโนเมตร
- วัดซ้ำจำนวน 11 ครั้ง คำนวณหาค่า LOD และ LOQ
- สร้างกราฟมาตรฐานที่ความเข้มข้น 1.00–19.00 ppm โดยมีความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริกและค่าการดูดกลืนแสง

3.7.4 การศึกษาร้อยละการการได้กลับคืนของวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์

(%Recovery)

- บีบอัดสารตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร (ตัวอย่างเริ่มต้น (Original sample))
- บีบอัดสารตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตรและสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกให้ได้ความเข้มข้น 5 ppm (Spiked sample) ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร
- ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนถึงขีดวัดปริมาตร
- นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 266 นาโนเมตร

3.7.5 การศึกษาร้อยละการการได้กลับคืนของวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์

(%Recovery)

- ชั่งตัวอย่างน้ำผึ้ง 1.66 กรัมตวงเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน (ตัวอย่างเริ่มต้น (Original sample))
- ชั่งตัวอย่างน้ำผึ้ง 1.66 กรัมตวงเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
- บีบอัดสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกให้ได้ความเข้มข้น 5 ppm (Spiked sample) ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร
- ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนถึงขีดวัดปริมาตร
- นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 266 นาโนเมตร

3.7.6 การสร้างกราฟมาตรฐาน (Calibration Curve)

- บีบอัดสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกความเข้มข้น 100.00 ppm ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ให้ได้ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 1.00, 5.00, 10.00, 15.00, 20.00 และ 25.00 ppm

- ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนถึงขีดวัดปริมาตร
- นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 266 นาโนเมตร
- ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงซ้ำจำนวน 3 ครั้ง
- สร้างกราฟมาตรฐานโดยมีความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริกและค่าการดูดกลืนแสง

3.7.7 การวิเคราะห์หาปริมาณกรดแกลลิก

- บีบเปิดสารละลายที่ได้จากการสกัดตัวอย่าง 1.00 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10.00 มิลลิลิตร
- ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน
- นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 266 นาโนเมตร

บทที่ 4

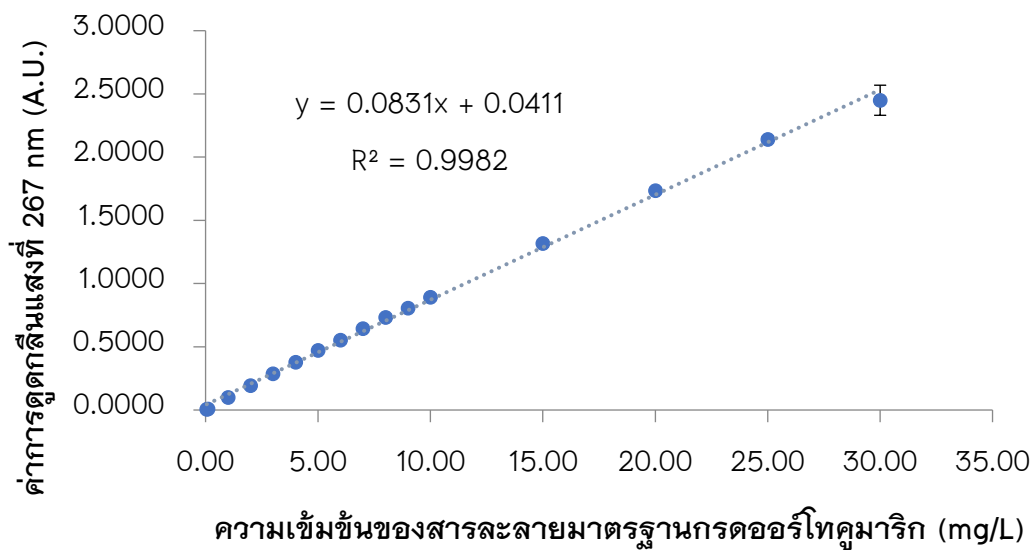
ผลการวิจัย

ก่อนทำการวิเคราะห์จำเป็นต้องหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัด เนื่องจากสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดจะทำให้ผลการทดลองมีประสิทธิภาพ ถูกต้อง และแม่นยำ โดยสภาวะที่ศึกษา ได้แก่ ชนิดของตัวทำละลาย ปริมาตรตัวทำละลาย และเวลาที่ใช้ในการปั่นเหวี่ยง โดยเกณฑ์ที่ใช้ในการเลือกสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์จะพิจารณาจากค่าการดูดกลืนแสงที่สูง เนื่องจากค่าการดูดกลืนแสงแสดงถึงปริมาณกรดออร์โทคูมาริกและกรดแกลลิกที่สกัดได้สูงด้วย

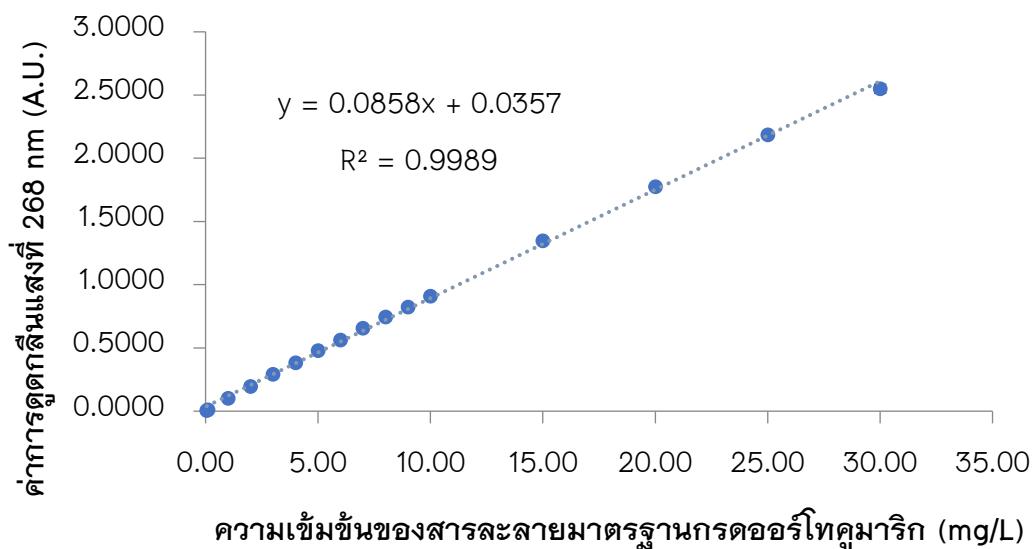
4.1 ผลของการหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการวิเคราะห์กรดออร์โทคูมาริกโดย

เทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตเมตรี

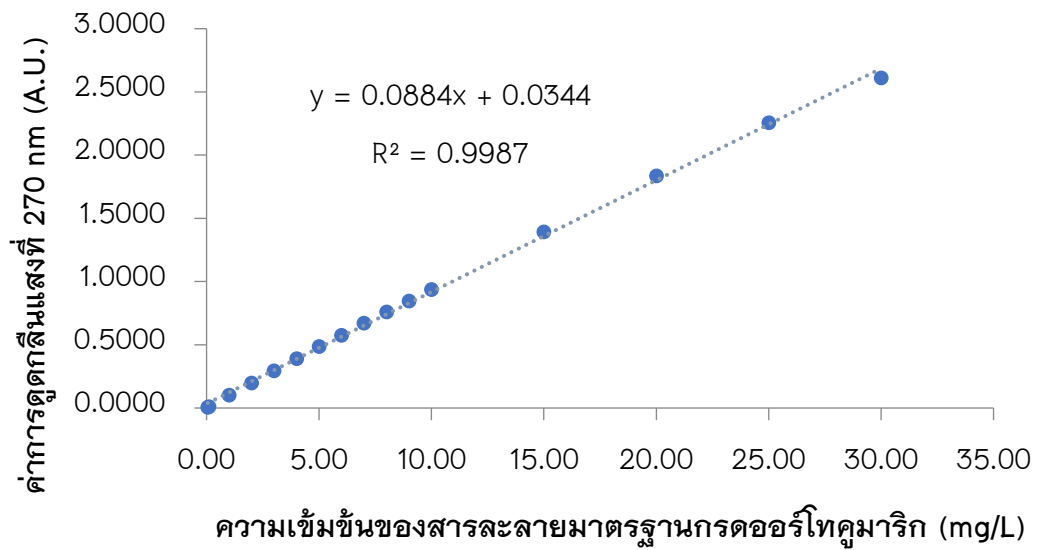
ทำการศึกษาหาความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) โดยทำการศึกษาที่ความเข้มข้น 0.10, 0.50, 1.00, 2.00, 3.00, 4.00, 5.00, 6.00, 7.00, 8.00, 9.00, 10.00, 15.00, 20.00, 25.00, 30.00, 40.00, 50.00 และ 60.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งความสูงของเส้นสเปกตรัมจะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริกเพิ่มขึ้น แสดงดังภาพ 38 (ภาคผนวก ค) ดังนั้นจึงศึกษาความยาวคลื่นที่เหมาะสม โดยการสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริกกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 267, 268, 270, 271, 272, 273, 274 และ 275 นาโนเมตร โดยเกณฑ์ที่ใช้ในการเลือกความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ จะพิจารณาจากสภาพไว (Sensitivity) ที่สูงที่สุด สภาพไวในที่นี้ พิจารณาจากค่าความชัน (Slope) จากสมการเส้นตรงโดยค่าความชันมากแสดงถึงสภาพไวที่สูง แสดงดังภาพ 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และตาราง 2 จะเห็นได้ว่าที่ความยาวคลื่น 272 นาโนเมตร มีสภาพไวที่สูงที่สุด จึงเลือกความยาวคลื่น 272 นาโนเมตร ในการวิเคราะห์กรดออร์โทคูมาริก



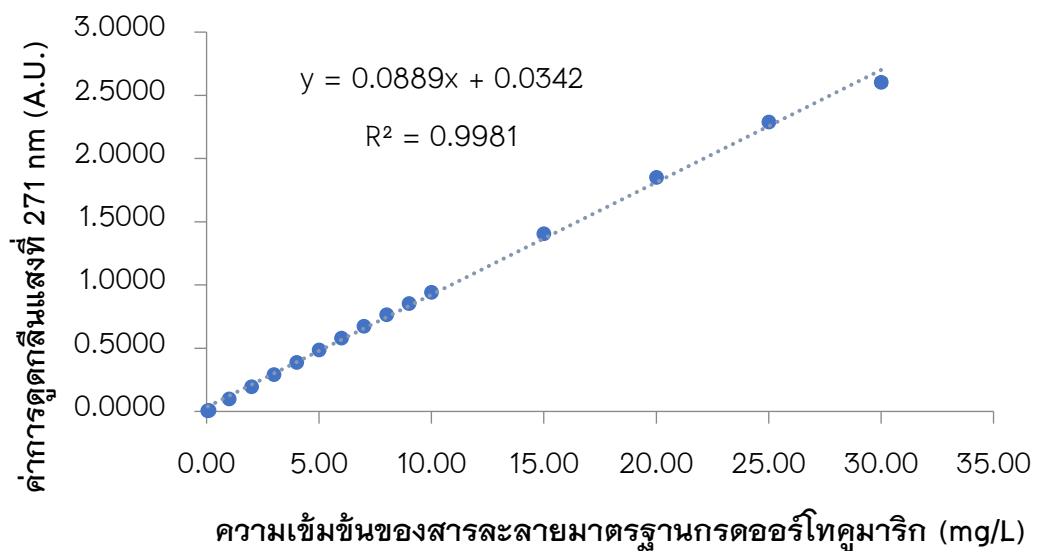
ภาพ 2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดอะซิติกกับความยาวคลื่น 267 นาโนเมตร



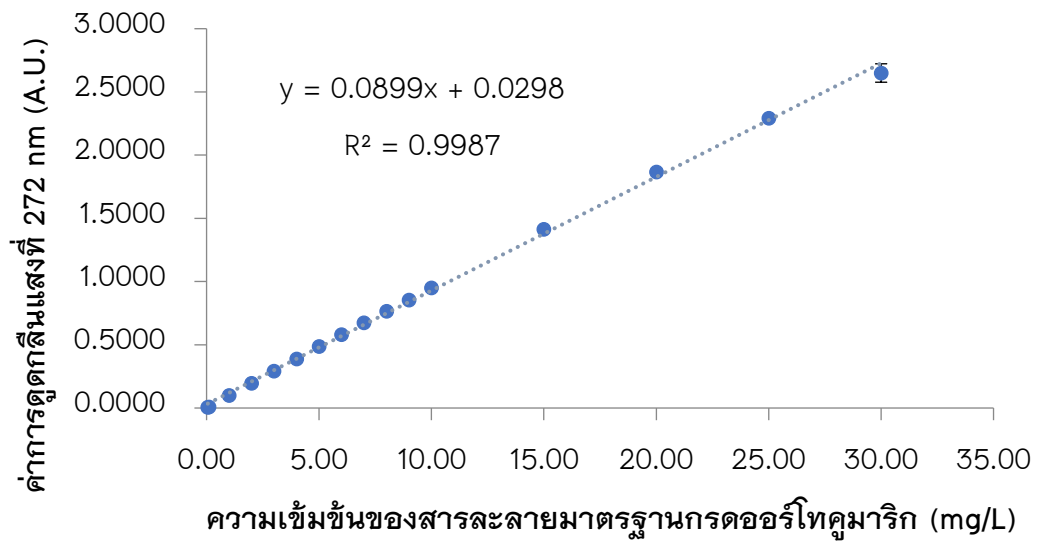
ภาพ 3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดอะซิติกกับความยาวคลื่น 268 นาโนเมตร



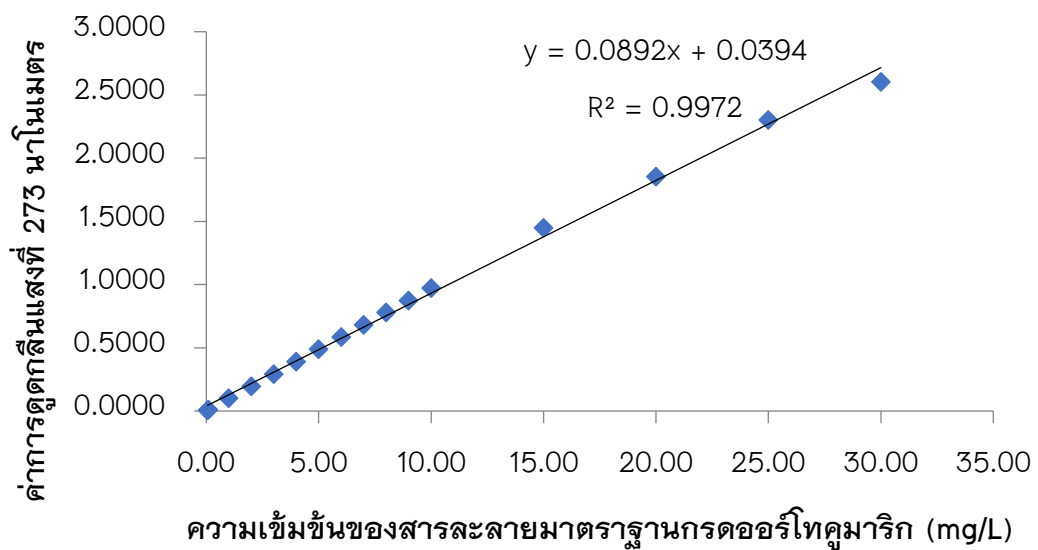
ภาพ 4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริกกับความยาวคลื่น 270 นาโนเมตร



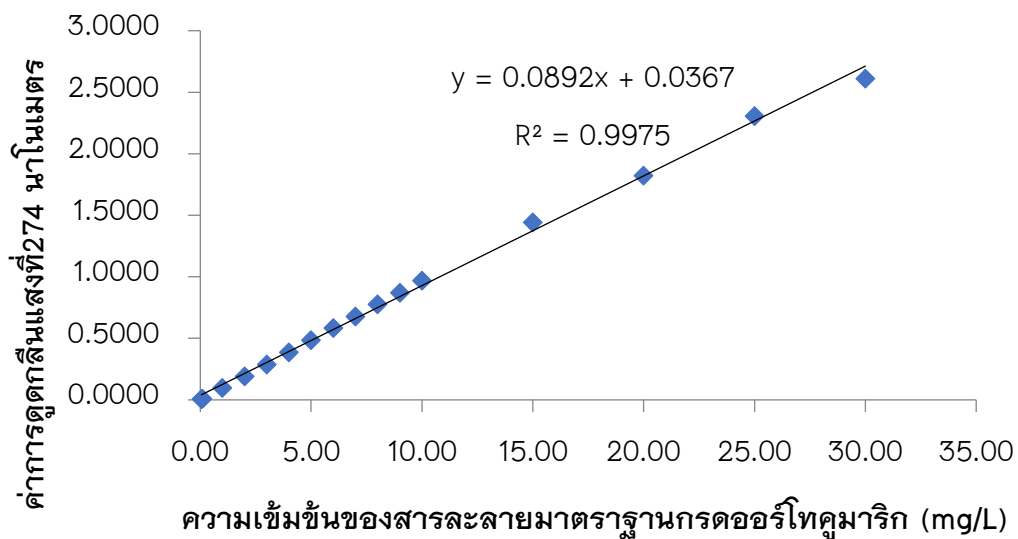
ภาพ 5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริกกับความยาวคลื่น 271 นาโนเมตร



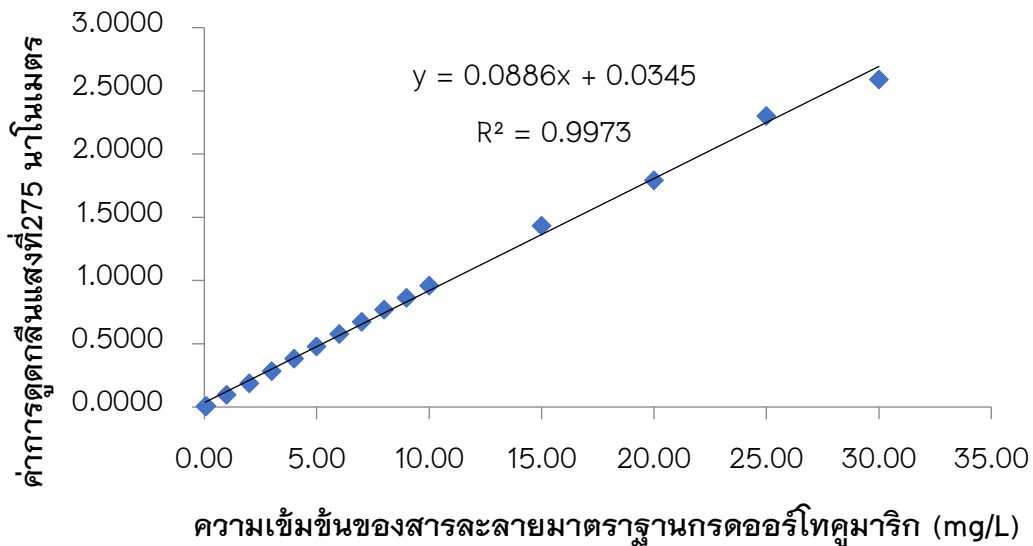
ภาพ 6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริกกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 272 นาโนเมตร



ภาพ 7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริกกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 273 นาโนเมตร



ภาพ 8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริกกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 274 นาโนเมตร



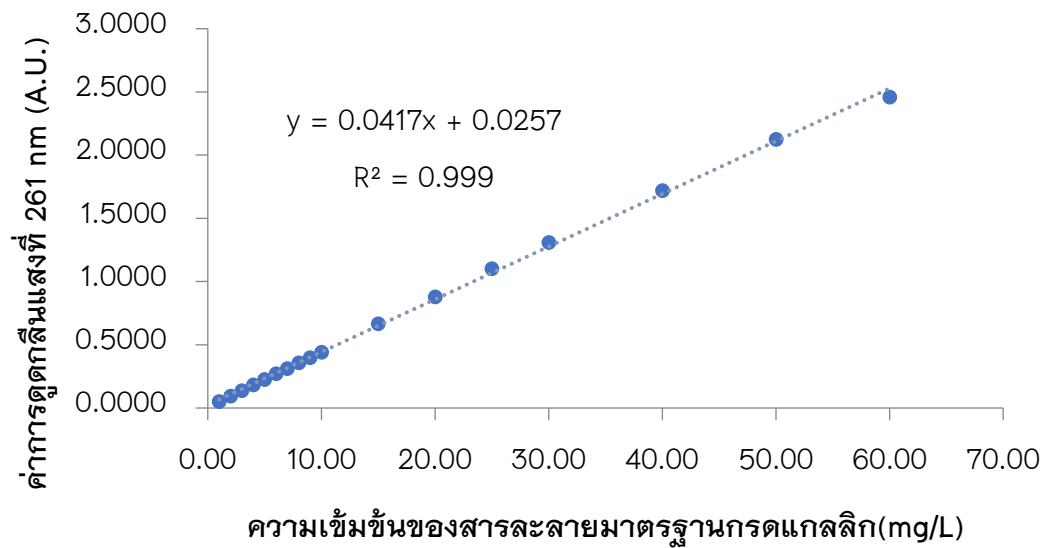
ภาพ 9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริกกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร

ตาราง 2 สมการเส้นตรงและค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริกที่ความยาวคลื่น 267, 268, 270, 271, 272, 273, 274 และ 275 นาโนเมตร

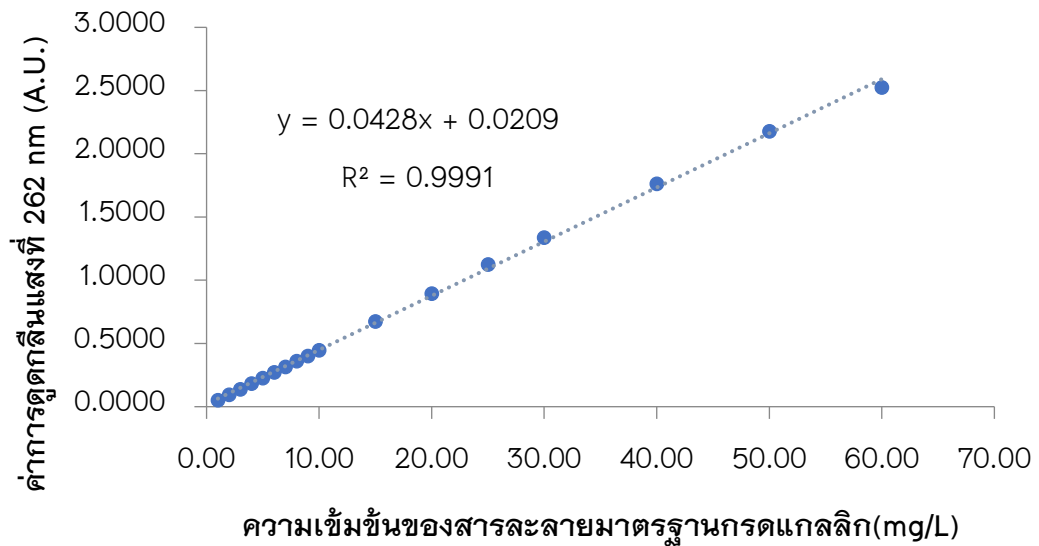
ความยาวคลื่น (นาโนเมตร)	สมการเส้นตรง	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์
267	$y = 0.0831x + 0.0411$	0.9982
268	$y = 0.0858x + 0.0357$	0.9989
270	$y = 0.0884x + 0.0344$	0.9987
271	$y = 0.0889x + 0.0342$	0.9981
272	$y = 0.0899x + 0.0298$	0.9987
273	$y = 0.0892x + 0.0394$	0.9972
274	$y = 0.0892x + 0.0367$	0.9975
275	$y = 0.0886x + 0.0345$	0.9973

4.2 ผลของการหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการวิเคราะห์กรดแกลลิกโดยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตเมตรี

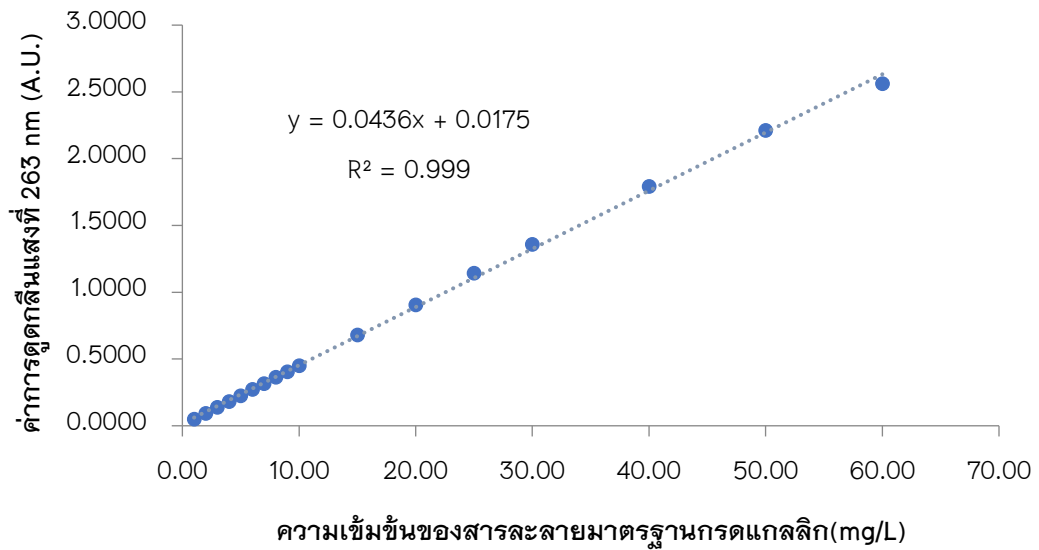
ทำการศึกษาหาความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{\max}) โดยทำการศึกษาที่ความเข้มข้น 0.10, 0.50, 1.00, 2.00, 3.00, 4.00, 5.00, 6.00, 7.00, 8.00, 9.00, 10.00, 15.00, 20.00, 25.00, 30.00, 40.00, 50.00, 60.00, 70.00, 80.00, 90.00 และ 100.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งความสูงของเส้นสเปกตรัมจะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกเพิ่มขึ้น แสดงดังภาพ 39 (ภาคผนวก ค) ดังนั้นจึงศึกษาความยาวคลื่นที่เหมาะสม โดยการสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267 และ 268 นาโนเมตร โดยเกณฑ์ที่ใช้ในการเลือกความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ จะพิจารณาจากสภาพไว (Sensitivity) ที่สูงที่สุด สภาพไวในที่นี้พิจารณาจากค่าความชัน (Slope) จากสมการเส้นตรงโดยค่าความชันมากแสดงถึงสภาพไวที่สูง แสดงดังภาพ 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 และตาราง 3 จะเห็นได้ว่าที่ความยาวคลื่น 266 นาโนเมตร มีสภาพไวที่สูงที่สุด จึงเลือกความยาวคลื่น 266 นาโนเมตร ในการวิเคราะห์กรดแกลลิก



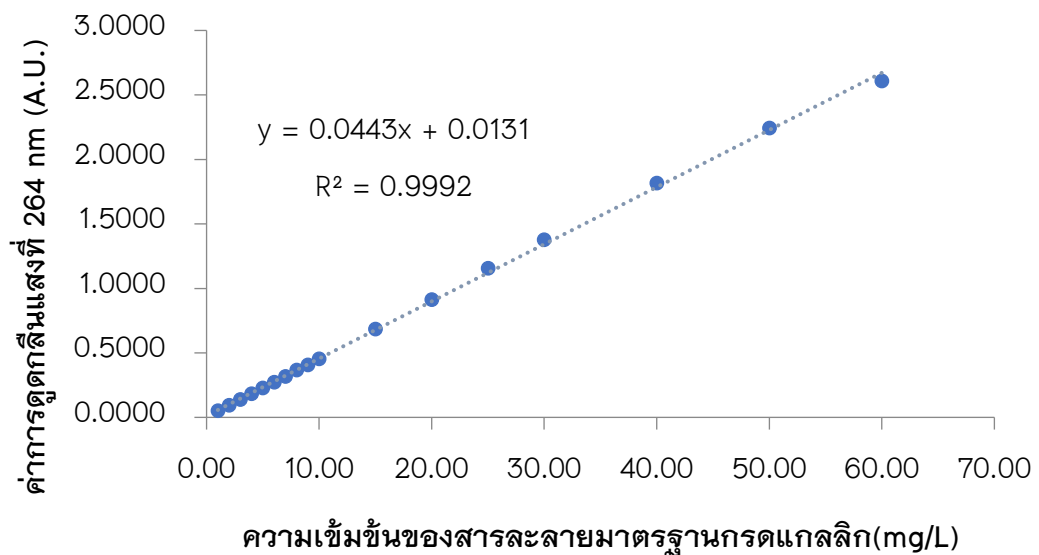
ภาพ 10 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 261 นาโนเมตร



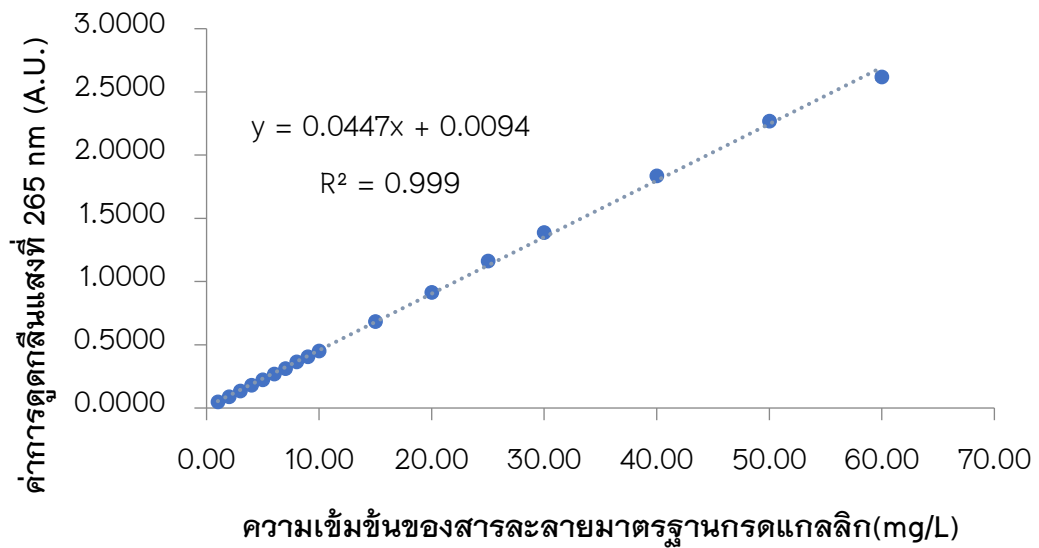
ภาพ 11 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร



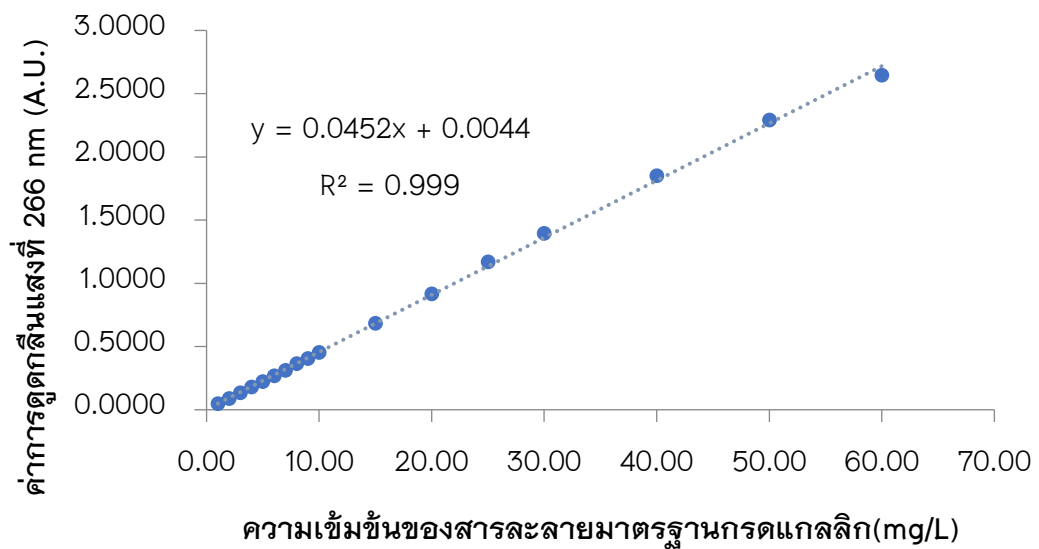
ภาพ 12 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดกลูโคสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 263 นาโนเมตร



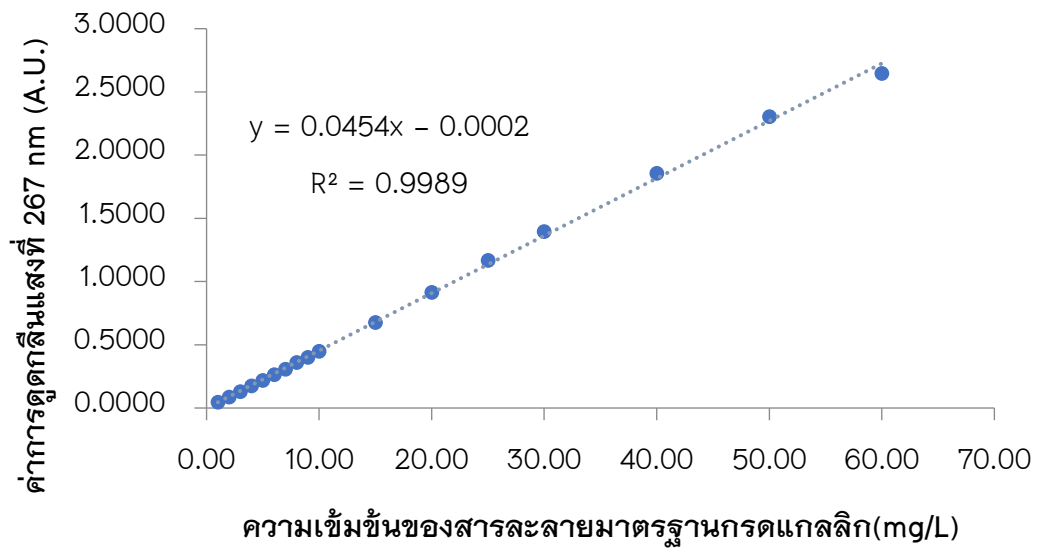
ภาพ 13 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดกลูโคสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 264 นาโนเมตร



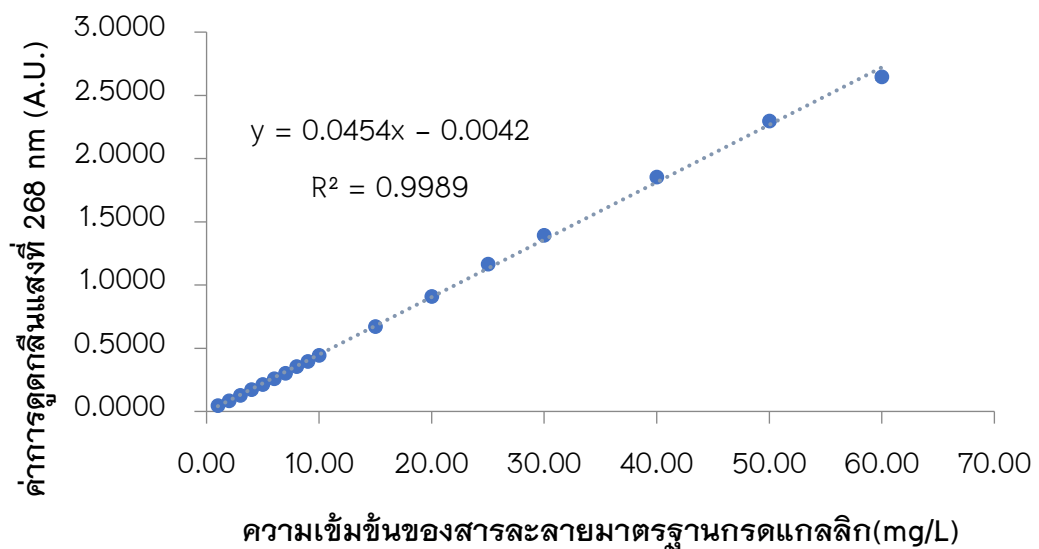
ภาพ 14 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 265 นาโนเมตร



ภาพ 15 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 266 นาโนเมตร



ภาพ 16 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 267 นาโนเมตร



ภาพ 17 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 268 นาโนเมตร

ตาราง 3 สมการเส้นตรงและค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความยาวคลื่น 261–268 นาโนเมตร

ความยาวคลื่น (นาโนเมตร)	สมการเส้นตรง	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์
261	$y = 0.0417x + 0.0257$	0.9990
262	$y = 0.0428x + 0.0209$	0.9991
263	$y = 0.0436x + 0.0175$	0.9990
264	$y = 0.0443x + 0.0131$	0.9992
265	$y = 0.0447x + 0.0094$	0.9990
266	$y = 0.0452x + 0.0044$	0.9990
267	$y = 0.0454x - 0.0002$	0.9989
268	$y = 0.0454x - 0.0042$	0.9989

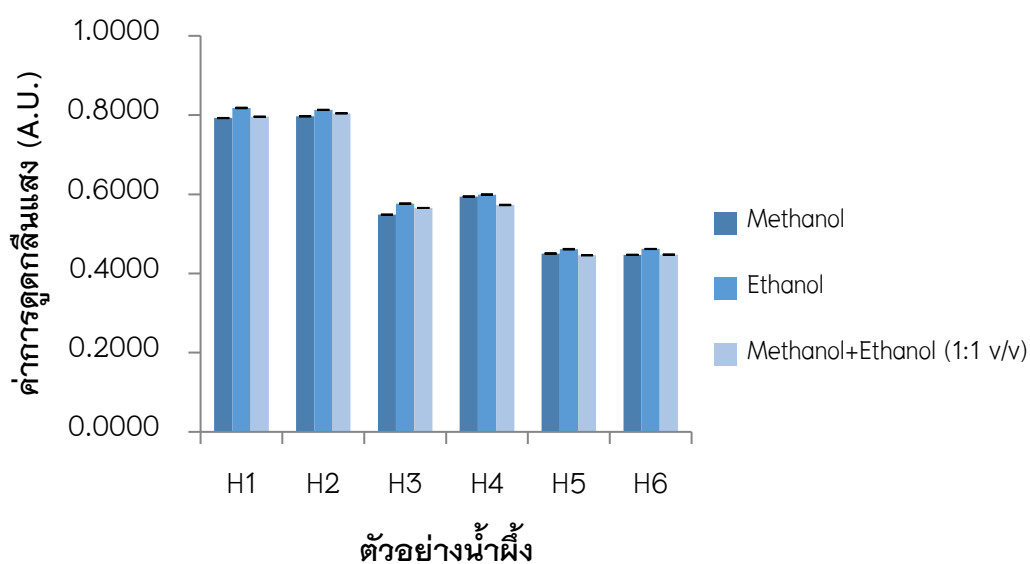
4.3 สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดกรดออร์โทคูมาริก

4.3.1 ผลการศึกษาชนิดของตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด (Types of solvent)

จากการศึกษาชนิดของตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด จากการทดลอง ซึ่งตัวอย่างน้ำผึ้ง 1.66 กรัม ลงในหลอดเซนติพิวก์ ขนาด 15 มิลลิลิตร และละลายตัวอย่างน้ำผึ้งด้วยน้ำปราศจากไอออน 1.00 มิลลิลิตรโดยตัวทำละลายที่ใช้ในการศึกษาการสกัด มี 3 ชนิด คือ เมทานอล เอทานอลและเมทานอลต่อเอทานอล อัตราส่วน 1 ต่อ 1 โดยปริมาตร ทำการสกัดภายใต้สภาวะการทดลองเดียวกันแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสง โดยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 272 นาโนเมตร ซึ่งในการศึกษาค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริกในตัวอย่างน้ำผึ้งที่ใช้ตัวทำละลายในการสกัดทั้ง 3 ชนิดพบว่าเอทานอลเป็นตัวทำละลายที่ใช้สกัดแล้วให้ค่าการดูดกลืนแสงมากที่สุด เนื่องจากกรดออร์โทคูมาริกจัดเป็นสารกลุ่มฟีนอลิกที่มาจาก hydroxycinnamic acid ที่ประกอบด้วยหมู่คาร์บอกซิลและหมู่ไฮดรอกซิลทำให้เป็นสารที่มีขั้ว จึงเหมาะสมกับตัวทำละลายที่มีขั้ว เช่น เอทานอล ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดกรดออร์โทคูมาริกในตัวอย่างน้ำผึ้ง ซึ่งการศึกษาข้อมูลค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริกในตัวอย่างน้ำผึ้งที่ใช้ตัวทำละลายในการสกัดทั้ง 3 ชนิด แสดงผลดังตาราง 4 และภาพ 18

ตาราง 4 ผลการศึกษาชนิดของตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด

ตัวอย่างน้ำผึ้ง	ค่าการดูดกลืนแสง (A.U.) \pm SD		
	เมทานอล	เอทานอล	เมทานอล : เอทานอล (1:1 v/v)
H1	0.7924 \pm 0.0003	0.8180 \pm 0.0008	0.7958 \pm 0.0002
H2	0.7968 \pm 0.0006	0.8131 \pm 0.0004	0.8044 \pm 0.0002
H3	0.5484 \pm 0.0002	0.5764 \pm 0.0003	0.5654 \pm 0.0001
H4	0.5942 \pm 0.0004	0.5992 \pm 0.0004	0.5730 \pm 0.0007
H5	0.4503 \pm 0.0002	0.4612 \pm 0.0008	0.4461 \pm 0.0002
H6	0.4471 \pm 0.0005	0.4619 \pm 0.0003	0.4475 \pm 0.0003



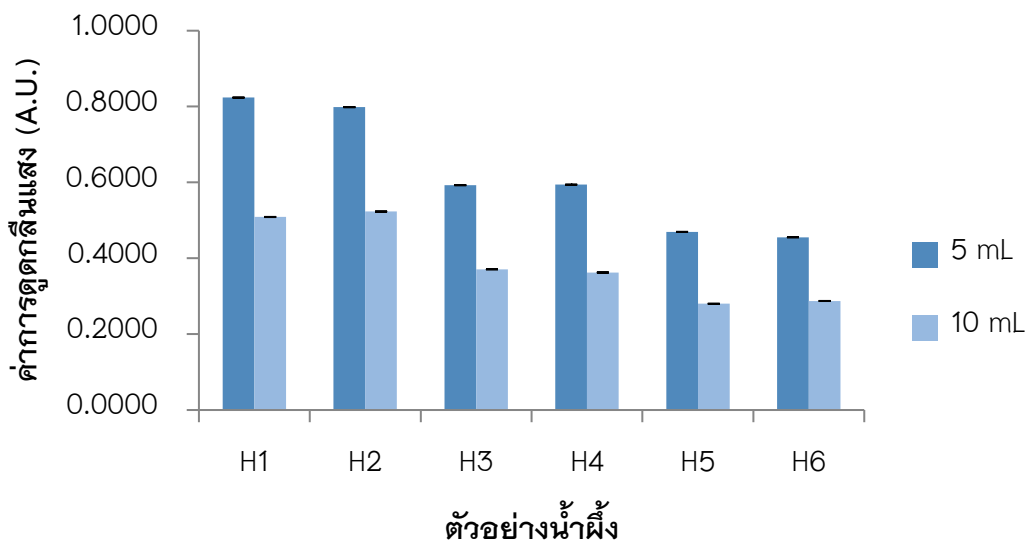
ภาพ 18 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของตัวทำละลายกับค่าการดูดกลืนแสง

4.3.2 ผลการศึกษาปริมาตรตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด (Solvent volumes)

การศึกษาปริมาตรตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด โดยปริมาตรตัวทำละลายที่ใช้คือ 5.00 และ 10.00 มิลลิลิตร ทำการสกัดภายใต้สภาวะการทดลองเดียวกันและวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 272 นาโนเมตร ซึ่งในการศึกษาค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริกโดยใช้ปริมาตรตัวทำละลายต่างกัน พบว่าตัวทำละลายปริมาตร 5.00 มิลลิลิตร ให้ค่าการดูดกลืนแสงมากกว่าตัวทำละลายปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร ดังนั้นจึงเลือกใช้ตัวทำละลายปริมาตรที่น้อยที่สุด คือ 5.00 มิลลิลิตรในการสกัดตัวอย่าง แสดงผลดังตาราง 5 และภาพ 19

ตาราง 5 ผลการศึกษาปริมาตรตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับการสกัด

ตัวอย่างน้ำผึ้ง	ค่าการดูดกลืนแสง (A.U.) \pm SD	
	5.00 มิลลิลิตร	10.00 มิลลิลิตร
H1	0.8236 \pm 0.0006	0.5089 \pm 0.0002
H2	0.7984 \pm 0.0003	0.5232 \pm 0.0008
H3	0.5927 \pm 0.0003	0.3710 \pm 0.0004
H4	0.5940 \pm 0.0004	0.3625 \pm 0.0003
H5	0.4696 \pm 0.0000	0.2801 \pm 0.0005
H6	0.4555 \pm 0.0005	0.2875 \pm 0.0001



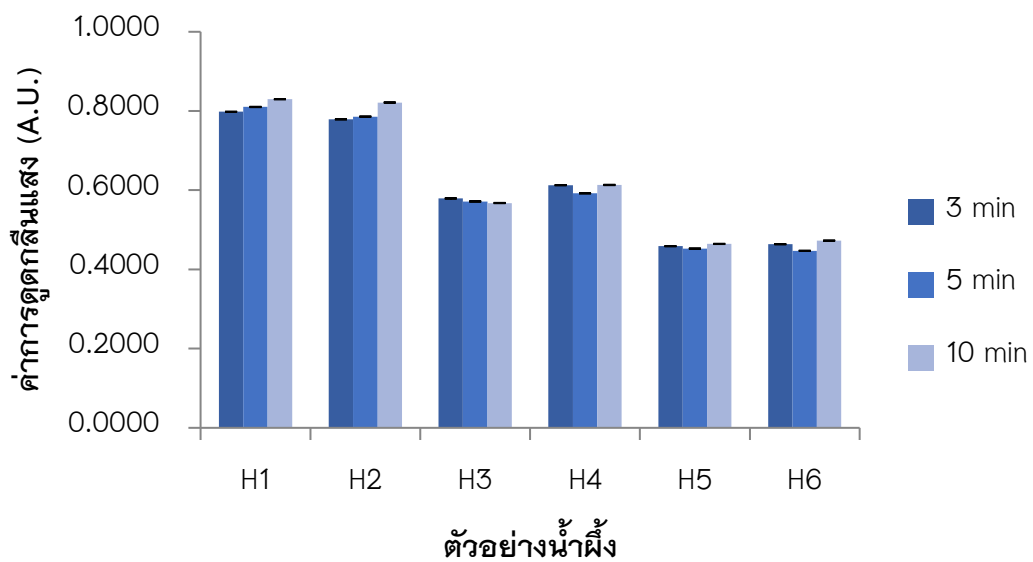
ภาพ 19 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดกับการดูดกลืนแสง

4.3.3 ผลการศึกษาเวลาที่ใช้ในการปั่นเหวี่ยงที่เหมาะสมในการสกัด (Mixing times)

การศึกษาเวลาที่ใช้ในการปั่นเหวี่ยงที่เหมาะสมสำหรับการสกัด โดยใช้เวลาในการปั่นเหวี่ยง คือ 3, 5 และ 10 นาที ทำการสกัดภายใต้สภาวะการทดลองเดียวกันและวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 272 นาโนเมตร ซึ่งในการศึกษาค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริกโดยใช้เวลาในการปั่นเหวี่ยงต่างกัน พบว่าเมื่อเพิ่มเวลาในการปั่นเหวี่ยงสารละลายเป็น 10 นาที จะทำให้ค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้น แต่ในตัวอย่างน้ำผึ้งอำเภอเมืองที่เวลาปั่นเหวี่ยง 10 นาที ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่น้อยกว่า 3 และ 5 นาที เพียงเล็กน้อย ดังนั้นจึงเลือกใช้เวลาในการปั่นเหวี่ยงที่ 10 นาที ซึ่งการศึกษาข้อมูลค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริกที่ใช้เวลาปั่นเหวี่ยงต่างกัน แสดงผลดังตาราง 6 และภาพ 20

ตาราง 6 ผลการศึกษาเวลาที่ใช้ในการปั่นเหวี่ยงที่เหมาะสมสำหรับการสกัด

ตัวอย่างน้ำผึ้ง	ค่าการดูดกลืนแสง (A.U.) \pm SD		
	3 นาที	5 นาที	10 นาที
H1	0.7980 \pm 0.0005	0.8102 \pm 0.0005	0.8297 \pm 0.0003
H2	0.7789 \pm 0.0001	0.7858 \pm 0.0002	0.8214 \pm 0.0002
H3	0.5792 \pm 0.0002	0.5716 \pm 0.0004	0.5676 \pm 0.0004
H4	0.6126 \pm 0.0002	0.5921 \pm 0.0005	0.6133 \pm 0.0006
H5	0.4586 \pm 0.0005	0.4526 \pm 0.0002	0.4644 \pm 0.0004
H6	0.4636 \pm 0.0003	0.4470 \pm 0.0001	0.4727 \pm 0.0003



ภาพ 20 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ใช้ในการสกัดกับค่าการดูดกลืนแสง

4.4 สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดกรดแกลลิก

4.4.1 ผลการศึกษาชนิดของตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด (Types of solvent)

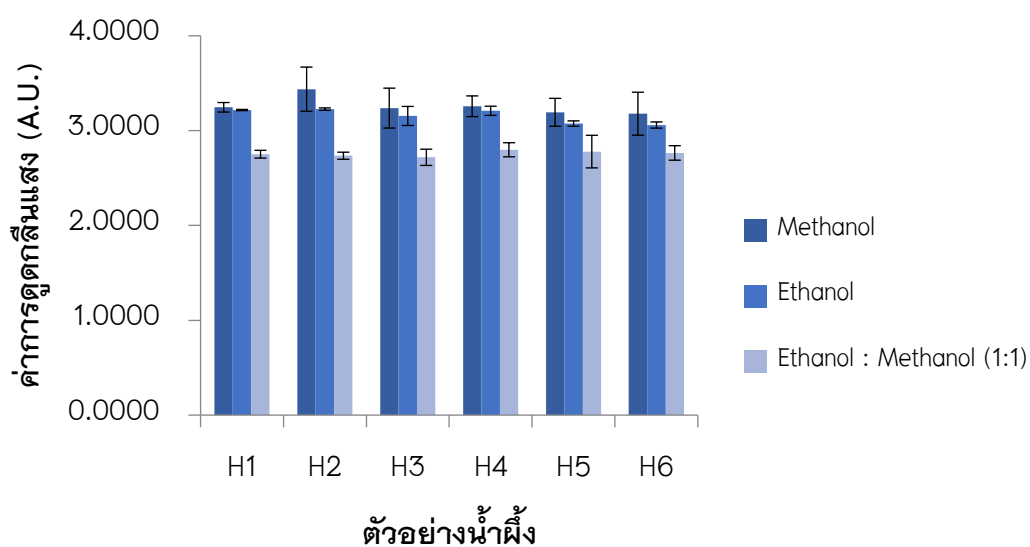
จากการศึกษาชนิดของตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด จากการทดลอง ซึ่งตัวอย่างน้ำผึ้ง 1.66 กรัม ลงในหลอดเซนติพิวัก ขนาด 15 มิลลิลิตร และละลายตัวอย่างน้ำผึ้งด้วยน้ำปราศจากไอออน 1.00 มิลลิลิตรโดยตัวทำละลายที่ใช้ในการศึกษาการสกัด มี 3 ชนิด คือ เมทานอล เอทานอลและเมทานอลต่อเอทานอล อัตราส่วน 1 ต่อ 1 โดยปริมาตร ทำการสกัดภายใต้สภาวะการทดลองเดียวกันแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสง โดยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 266 นาโนเมตร ซึ่งในการศึกษาค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกในตัวอย่างน้ำผึ้งที่ใช้ตัวทำละลายในการสกัดทั้ง 3 ชนิด พบว่าเอทานอลเป็นตัวทำละลายที่ใช้สกัดแล้วให้ค่าการดูดกลืนแสงมากที่สุด เนื่องจากกรดแกลลิกจัดเป็นสารกลุ่มกรดฟีนอลิกที่มาจาก hydroxybenzoic acids ที่ประกอบด้วยหมู่คาร์บอกซิลและหมู่ไฮดรอกซิลทำให้เป็นสารที่มีขั้ว จึงเหมาะสมกับตัวทำละลายที่มีขั้ว เช่น เอทานอล ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดกรดแกลลิกในตัวอย่างน้ำผึ้ง ซึ่งการศึกษาข้อมูลค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกในตัวอย่างน้ำผึ้งที่ใช้ตัวทำละลายในการสกัดทั้ง 3 ชนิด แสดงผลดังตาราง 7 และภาพ 21

ตาราง 7 ผลการศึกษาชนิดของตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด

ตัวอย่างน้ำผึ้ง	ค่าการดูดกลืนแสง (A.U.) ± SD		
	เมทานอล	เอทานอล	เมทานอล : เอทานอล (1:1 v/v)
H1	0.7596 ± 0.0004	0.7857 ± 0.0012	0.7639 ± 0.0005
H2	0.7559 ± 0.0010	0.7734 ± 0.0004	0.7614 ± 0.0005
H3	0.5227 ± 0.0007	0.5518 ± 0.0004	0.5394 ± 0.0010
H4	0.5689 ± 0.0002	0.5855 ± 0.0008	0.5499 ± 0.0006

ตาราง 7 (ต่อ)

ตัวอย่างน้ำผึ้ง	ค่าการดูดกลืนแสง (A.U.) \pm SD		
	เมทานอล	เอทานอล	เมทานอล : เอทานอล (1:1 v/v)
H5	0.4387 \pm 0.0005	0.4651 \pm 0.0010	0.4404 \pm 0.0003
H6	0.4294 \pm 0.0013	0.4480 \pm 0.0006	0.4300 \pm 0.0004
H5	0.4387 \pm 0.0005	0.4651 \pm 0.0010	0.4404 \pm 0.0003
H6	0.4294 \pm 0.0013	0.4480 \pm 0.0006	0.4300 \pm 0.0004



ภาพ 21 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของตัวทำละลายกับค่าการดูดกลืนแสง

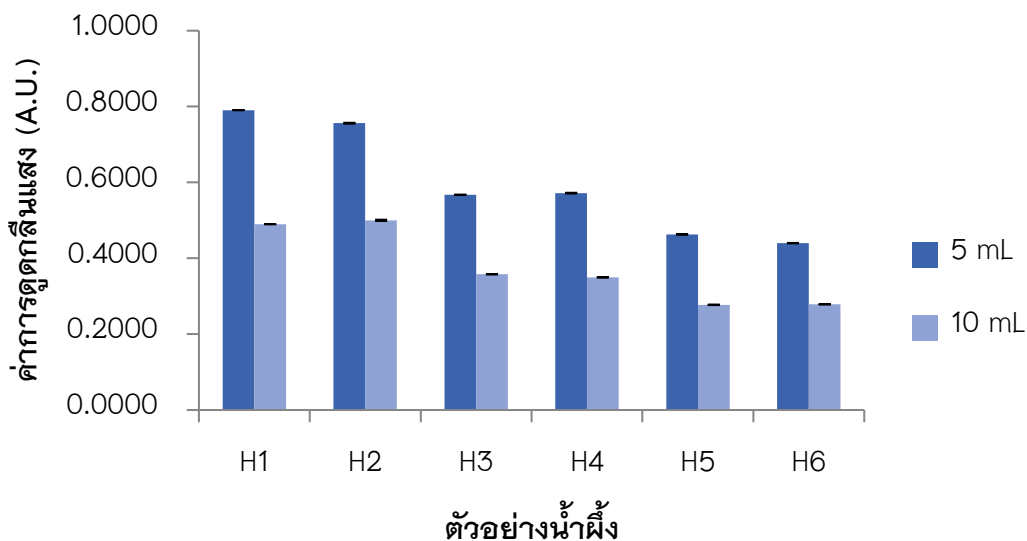
4.4.2 ผลการศึกษาปริมาตรตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด (Solvent volumes)

การศึกษาปริมาตรตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด โดยปริมาตรตัวทำละลายที่ใช้คือ 5.00 และ 10.00 มิลลิลิตร ทำการสกัดภายใต้สภาวะการทดลองเดียวกันและวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 266 นาโนเมตร ซึ่งใน

การศึกษาค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกโดยใช้ปริมาตรตัวทำละลายต่างกัน พบว่าตัวทำละลายปริมาตร 5.00 มิลลิลิตร ให้ค่าการดูดกลืนแสงมากกว่าตัวทำละลายปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร ดังนั้นจึงเลือกใช้ตัวทำละลายปริมาตรที่น้อยที่สุด คือ 5.00 มิลลิลิตร ในการสกัดตัวอย่าง แสดงผลดังตาราง 8 และภาพ 22

ตาราง 8 ผลการศึกษาปริมาตรตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับการสกัด

ตัวอย่างน้ำผึ้ง	ค่าการดูดกลืนแสง (A.U.) \pm SD	
	5.00 มิลลิลิตร	10.00 มิลลิลิตร
H1	0.7905 \pm 0.0001	0.4900 \pm 0.0002
H2	0.7560 \pm 0.0012	0.5000 \pm 0.0017
H3	0.5674 \pm 0.0004	0.3579 \pm 0.0004
H4	0.5717 \pm 0.0010	0.3497 \pm 0.0005
H5	0.4630 \pm 0.0005	0.2774 \pm 0.0007
H6	0.4399 \pm 0.0006	0.2787 \pm 0.0003



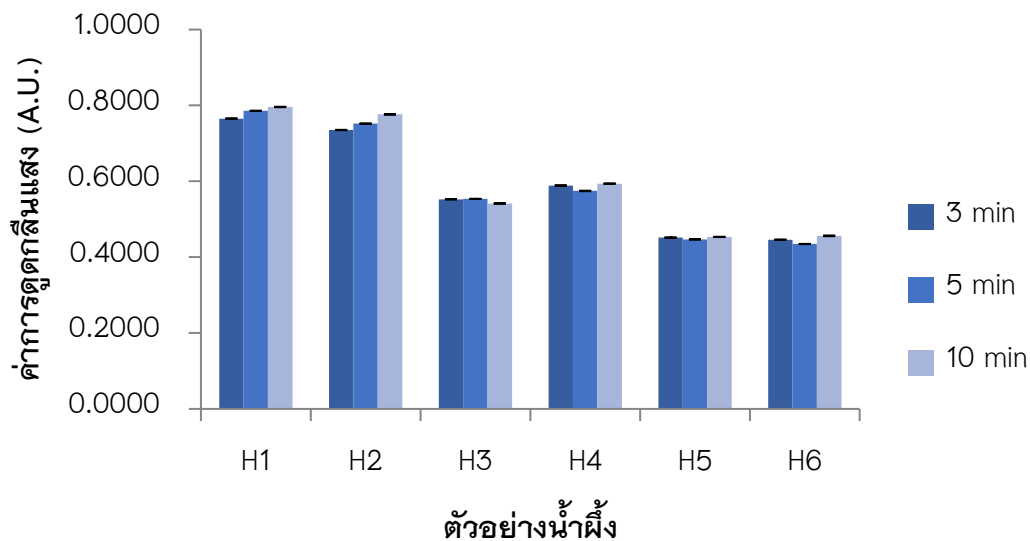
ภาพ 22 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดกับค่าการดูดกลืนแสง

4.4.3 ผลการศึกษาเวลาที่ใช้ในการปั่นเหวี่ยงที่เหมาะสมในการสกัด (Mixing times)

การศึกษาเวลาที่ใช้ในการปั่นเหวี่ยงที่เหมาะสมสำหรับการสกัด โดยใช้เวลาในการปั่นเหวี่ยง คือ 3, 5 และ 10 นาที ทำการสกัดภายใต้สภาวะการทดลองเดียวกันและวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 266 นาโนเมตร ซึ่งในการศึกษาค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกโดยใช้เวลาในการปั่นเหวี่ยงต่างกัน พบว่าเมื่อเพิ่มเวลาในการปั่นเหวี่ยงสารละลายจาก 3 เป็น 5 และ 10 นาที จะทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลง แต่ในตัวอย่างน้ำผึ้งจากอำเภอเมืองที่ทำการปั่นเหวี่ยงที่ 5 นาที มีค่าการดูดกลืนแสงที่มากกว่า 3 นาที เพียงเล็กน้อย ดังนั้นจึงเลือกใช้เวลาในการปั่นเหวี่ยงที่น้อยที่สุดคือที่เวลา 3 นาที ซึ่งการศึกษาข้อมูลค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ใช้เวลาปั่นเหวี่ยงต่างกัน แสดงผลดังตาราง 9 และภาพ 23

ตาราง 9 ผลการศึกษาเวลาที่ใช้ในการปั่นเหวี่ยงที่เหมาะสมสำหรับการสกัด

ตัวอย่างน้ำผึ้ง	ค่าการดูดกลืนแสง (A.U.) \pm SD		
	3 นาที	5 นาที	10 นาที
H1	0.7653 \pm 0.0004	0.7858 \pm 0.0005	0.7959 \pm 0.0006
H2	0.7352 \pm 0.0005	0.7520 \pm 0.0006	0.7763 \pm 0.0005
H3	0.5526 \pm 0.0005	0.5537 \pm 0.0002	0.5416 \pm 0.0004
H4	0.5888 \pm 0.0004	0.5746 \pm 0.0007	0.5938 \pm 0.0007
H5	0.4515 \pm 0.0003	0.4469 \pm 0.0003	0.4534 \pm 0.0004
H6	0.4460 \pm 0.0005	0.4347 \pm 0.0003	0.4562 \pm 0.0009



ภาพ 23 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ใช้ในการสกัดกับค่าการดูดกลืนแสง

4.5 สมรรถนะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์กรดออร์โทคูมาริก (Analytical performance)

4.5.1 ผลการหาช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity)

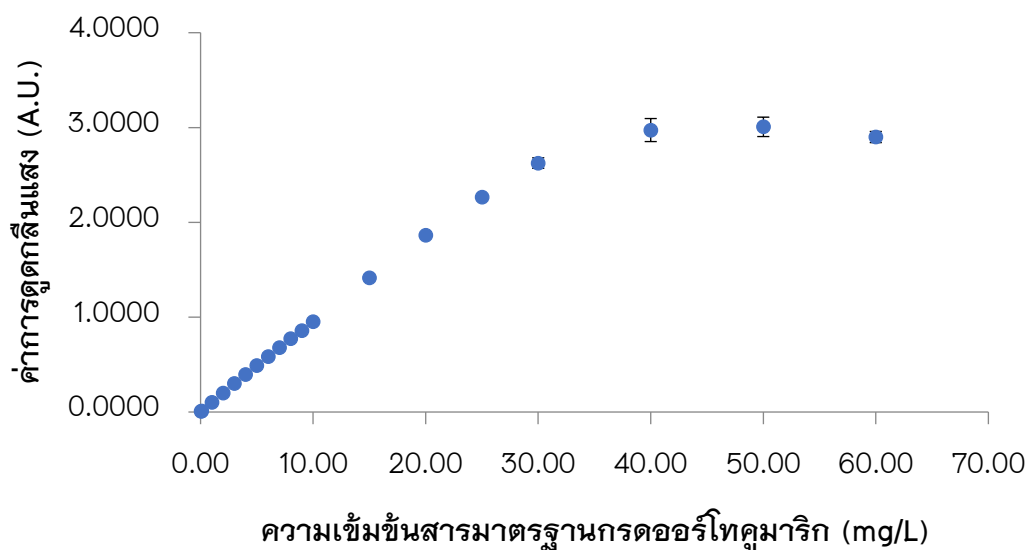
จากการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง โดยใช้สารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริกที่ความเข้มข้น 0.05, 0.10, 1.00, 2.00, 3.00, 4.00, 5.00, 6.00, 7.00, 8.00, 9.00, 10.00, 15.00, 20.00, 25.00, 30.00, 40.00, 50.00 และ 60.00 มิลลิกรัมต่อลิตร วัดค่าความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ พบว่าที่ 0.05–30.00 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความเป็นเส้นตรงมากที่สุด แสดงผลดังตารางที่ 10 และภาพที่ 24 แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นจาก 40.00–60.00 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ากราฟที่ได้มีลักษณะโค้ง ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้สร้างกราฟมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริกที่ความเข้มข้น 0.50, 1.00, 3.00, 5.00, 7.00 และ 9.00 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อหาความสัมพันธ์เชิงเส้นที่ทำให้กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรง ($y = 0.0985x + 0.0069$) และมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9996 แสดงผลดังตาราง 11 และภาพ 25

ตาราง 10 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริกในการหาช่วงความเป็นเส้นตรง

ความเข้มข้นของ สารละลายมาตรฐานกรด ออร์โทคูมาริก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง (A.U.) ± SD	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R ²)
0.05	0.0068 ± 0.0008	1.0000
0.10	0.0126 ± 0.0005	1.0000
1.00	0.1032 ± 0.0003	1.0000
2.00	0.1999 ± 0.0016	0.9990
3.00	0.3000 ± 0.0006	0.9990
4.00	0.3945 ± 0.0006	0.9990
5.00	0.4911 ± 0.0003	0.9990

ตาราง 10 (ต่อ)

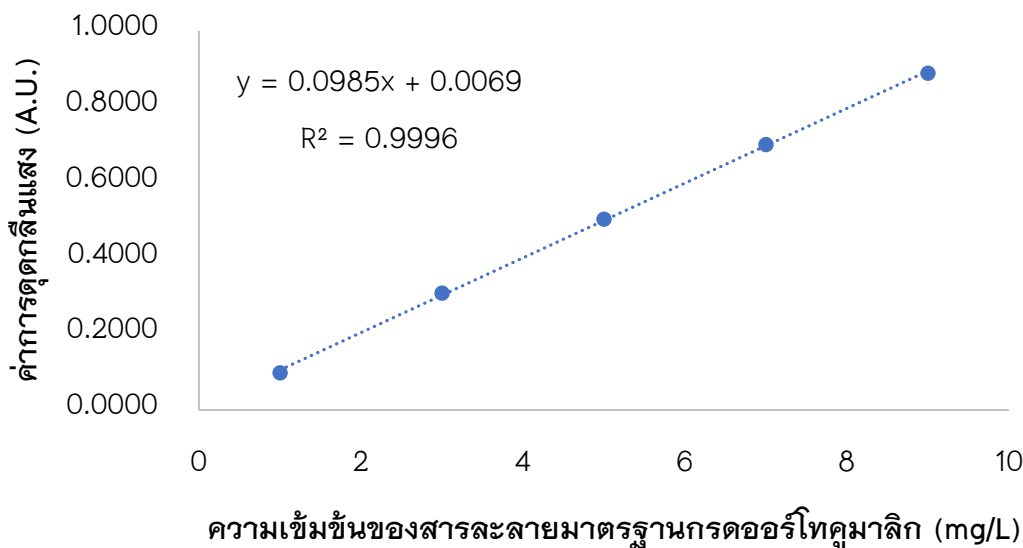
ความเข้มข้นของ		
สารละลายมาตรฐานกรด ออร์โทคูมาริก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง (A.U.) ± SD	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R ²)
6.00	0.5842 ± 0.0006	0.9990
7.00	0.6813 ± 0.0011	0.9990
8.00	0.7741 ± 0.0012	0.9990
9.00	0.8586 ± 0.0007	0.9990
10.00	0.9524 ± 0.0015	0.9990
15.00	1.4147 ± 0.0006	0.9990
20.00	1.8632 ± 0.0071	0.9990
25.00	2.2655 ± 0.0031	0.9990
30.00	2.6250 ± 0.0552	0.9980
40.00	2.9732 ± 0.1215	0.9830
50.00	3.0072 ± 0.1024	0.9480
60.00	2.8997 ± 0.0588	0.8990



ภาพ 24 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริกกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริกกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 272 นาโนเมตร

ตาราง 11 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริก (กราฟมาตรฐาน)

ความเข้มข้นของสารละลาย มาตรฐานกรดออร์โทคูมาริก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง (A.U.) \pm SD	ค่าสัมประสิทธิ์ สหสัมพันธ์ (R^2)
1.00	0.0985 \pm 0.0004	1.0000
3.00	0.3082 \pm 0.0004	1.0000
5.00	0.5029 \pm 0.0013	0.9995
7.00	0.6998 \pm 0.0006	0.9997
9.00	0.8878 \pm 0.0002	0.9996



ภาพ 25 กราฟมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริกแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริกกับค่าการดูดกลืนแสง

4.5.2 ผลการหาขีดจำกัดการตรวจวัด (Limit of Detection, LOD) และขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantization, LOQ)

จากการศึกษาขีดจำกัดการตรวจวัดและขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณ โดยการใช้สารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริกที่มีความเข้มข้น 0.50, 1.00, 3.00, 5.00, 7.00, 9.00, 11.00, 13.00, 15.00, 17.00 และ 19.00 มิลลิกรัมต่อลิตร สร้างกราฟมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริก เพื่อให้ได้สมการเส้นตรง ($y = 0.0943x + 0.0281$) แสดงผลดังภาพ 28 (ภาคผนวก ก) โดยใช้สารละลายเอทานอลต่อน้ำปราศจากไอออน (5:1 v/v) ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง 7 ซ้ำ จากนั้นคำนวณหาขีดจำกัดของการตรวจวัดและขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณ จากสูตร 3 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($S_{y/x}$) / ความชัน (b) และ 10 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($S_{y/x}$) / ความชัน (b) ตามลำดับ พบว่ามีค่าขีดจำกัดการตรวจวัดเท่ากับ 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร และขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณเท่ากับ 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร

4.5.3 ผลการตรวจสอบความแม่นยำ (Precision)

4.5.3.1 ความแม่นยำของเครื่องมือ (Repeatability)

จากการตรวจสอบความแม่นยำของเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ โดยนำสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริก ความเข้มข้น 1.00, 5.00 และ 10.00 มิลลิกรัมต่อลิตร

(ความเข้มข้นละ 1 ขวด) ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 272 นาโนเมตร วัดซ้ำจำนวน 7 ครั้ง แสดงผลดังตาราง 12 พบว่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์อยู่ในช่วง 0.08–0.65 % จึงถือว่าการวิเคราะห์มีความแม่นยำสูง เนื่องจากอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ของ AOAC 2016^[9] (น้อยกว่าหรือเท่ากับ 7.3 %)

ตาราง 12 ความแม่นยำ (Repeatability) โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริกที่ความเข้มข้น 1.00, 5.00 และ 10.00 มิลลิกรัมต่อลิตร (n = 7)

ครั้งที่	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริก		
	1.00 mg/L	5.00 mg/L	10.00 mg/L
1	0.1052	0.4909	0.9615
2	0.1051	0.4908	0.9675
3	0.1046	0.4903	0.9651
4	0.1047	0.4923	0.9668
5	0.1051	0.4898	0.9664
6	0.1065	0.4915	0.9663
7	0.1054	0.4916	0.9668
เฉลี่ย	0.1052	0.4910	0.9658
SD	0.0007	0.0009	0.0008
%RSD	0.66	0.18	0.08

4.5.3.2 ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (Reproducibility)

จากการตรวจสอบความแม่นยำของวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์ โดยการนำสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริก ความเข้มข้น 1.00, 5.00 และ 10.00 มิลลิกรัมต่อลิตร (ความเข้มข้นละ 7 ขวด) ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 272 นาโนเมตร วัดซ้ำจำนวน

3 ครั้ง แสดงผลดังตาราง 13 พบว่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์อยู่ในช่วง 0.36–1.60 % จึงถือว่าการวิเคราะห์มีความแม่นยำสูง เนื่องจากอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ของ AOAC 2016^[9] (น้อยกว่าหรือเท่ากับ 7.3 %)

ตาราง 13 ความแม่นยำ (Reproducibility) โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริกที่ความเข้มข้น 1.00, 5.00 และ 10.00 มิลลิกรัมต่อลิตร (n = 3)

ขวดที่	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริก (A.U.) ± SD		
	1.00 mg/L	5.00 mg/L	10.00 mg/L
1	0.1052 ± 0.0005	0.4898 ± 0.0005	0.9625 ± 0.0008
2	0.1072 ± 0.0014	0.4953 ± 0.0011	0.9621 ± 0.0016
3	0.1041 ± 0.0003	0.4900 ± 0.0002	0.9557 ± 0.0009
4	0.1064 ± 0.0006	0.4934 ± 0.0001	0.9627 ± 0.0009
5	0.1049 ± 0.0004	0.4892 ± 0.0009	0.9610 ± 0.0011
6	0.1033 ± 0.0001	0.4866 ± 0.0001	0.9603 ± 0.0013
7	0.1080 ± 0.0006	0.4879 ± 0.0006	0.9673 ± 0.0010
เฉลี่ย	0.1056	0.4903	0.9617
SD	0.0017	0.0030	0.0035
%RSD	1.61	0.61	0.36

4.5.4 ผลการหาค่าร้อยละการได้กลับคืนของเครื่องมือ (%Recovery)

ทำการตรวจสอบความถูกต้องจากการศึกษาหาค่าร้อยละการได้กลับคืนของเครื่องมือ โดยทำการสกัดตัวอย่างแล้วเติมสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริกที่ความเข้มข้น 5.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในตัวอย่างน้ำผึ้ง 6 ตัวอย่าง และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาว

คลื่น 272 นาโนเมตร วัดค่าความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ มีค่าร้อยละการได้กลับคืนอยู่ในช่วง 93-96 % พบว่าการวิเคราะห์มีความถูกต้อง ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ของ AOAC 2016^[9] (80-110 %) แสดงผลดังตาราง 14

ตาราง 14 ร้อยละการได้กลับคืนของเครื่องมือ (%Recovery) ของกรดออร์โทคูมาริกในตัวอย่างน้ำผึ้ง

ความเข้มข้นที่เติม (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง (A.U.) ± SD	ความเข้มข้นที่พบ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ร้อยละการได้ กลับคืน (%)
H1	0.1743 ± 0.0002	1.5564	-
H1 + 5.00	0.6143 ± 0.0005	6.2372	94
H2	0.1771 ± 0.0008	1.5862	-
H2 + 5.00	0.6123 ± 0.0004	6.2160	93
H3	0.1225 ± 0.0007	1.0053	-
H3 + 5.00	0.5657 ± 0.0001	5.7202	94
H4	0.1301 ± 0.0002	1.0862	-
H4 + 5.00	0.5736 ± 0.0002	5.8043	94
H5	0.0974 ± 0.0004	0.7383	-
H5 + 5.00	0.5451 ± 0.0005	5.5011	95
H6	0.0971 ± 0.0007	0.7351	-
H6 + 5.00	0.5468 ± 0.0001	5.5191	96

4.5.5 ผลการหาร้อยละการได้กลับคืนของวิธีการวิเคราะห์ (%Recovery)

ทำการตรวจสอบความถูกต้องจากการศึกษาการร้อยละการได้กลับคืนของวิธีการวิเคราะห์ โดยเติมสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริกที่ความเข้มข้น 5.00 มิลลิกรัมต่อลิตรลงในน้ำผึ้งทั้ง 6 ตัวอย่าง แล้วทำการสกัด จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 272 นาโนเมตร วัดซ้ำความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ มีค่าร้อยละการได้กลับคืนอยู่ในช่วง 16–40% ซึ่งไม่อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ตามมาตรฐาน AOAC2016 โดยเกณฑ์ที่ยอมรับได้อยู่ในช่วง 80–110% ทั้งนี้อาจเกิดจากสารรบกวน เช่น โลหะ (แมกนีเซียม สังกะสีหรือเหล็ก) โดยโลหะจะไปทำปฏิกิริยากับสารกลุ่มฟีนอลิก เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ใหม่ ซึ่งไม่สามารถตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 272 นาโนเมตรได้ จึงส่งผลให้ค่าร้อยละการได้กลับคืนที่ต่ำกว่าเกณฑ์ตามมาตรฐาน AOAC2016 โดยสามารถแก้ปัญหาได้ด้วยการศึกษาผลกระทบของสารรบกวนที่มีผลต่อการวิเคราะห์เพื่อลดหรือหลีกเลี่ยงการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารที่สนใจที่จะวิเคราะห์กับโลหะ แสดงผลดังตาราง 15

ตาราง 15 ร้อยละการได้กลับคืนของวิธีการวิเคราะห์ (%Recovery) ของกรดออร์โทคูมาริกในตัวอย่างน้ำผึ้ง

ความเข้มข้นที่เติม (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง (A.U.) ± SD	ความเข้มข้นที่พบ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ร้อยละการได้ กลับคืน (%)
H1	1.4829 ± 0.0008	15.48	–
H1 + 5.00	1.6062 ± 0.0036	16.79	26
H2	1.4945 ± 0.0017	15.60	–
H2 + 5.00	1.5715 ± 0.0022	16.42	16
H3	0.9456 ± 0.0012	9.76	–
H3 + 5.00	1.1008 ± 0.0001	11.41	33
H4	1.0870 ± 0.0004	11.27	–
H4 + 5.00	1.2752 ± 0.0006	13.27	40

ตาราง 15 (ต่อ)

ความเข้มข้นที่เติม (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง (A.U.) ± SD	ความเข้มข้นที่พบ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ร้อยละการได้ กลับคืน (%)
H5	0.8502 ± 0.0018	8.75	-
H5 + 5.00	0.9691 ± 0.0006	10.01	25
H6	0.8304 ± 0.0018	8.75	-
H6 + 5.00	0.9709 ± 0.0004	10.03	30

4.6 สมรรถนะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์กรดแกลลิก (Analytical performance)

4.6.1 ผลการหาช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity)

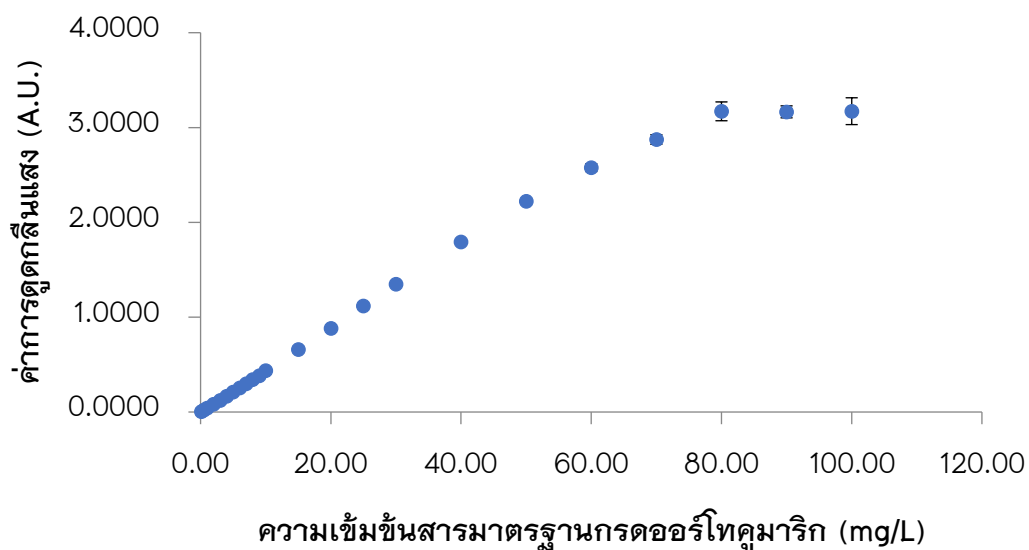
จากการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง โดยใช้สารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่มีความเข้มข้น 0.10, 0.50, 1.00, 2.00, 3.00, 4.00, 5.00, 6.00, 7.00, 8.00, 9.00, 10.00, 15.00, 20.00, 25.00, 30.00, 40.00, 50.00, 60.00, 70.00, 80.00, 90.00 และ 100.00 มิลลิกรัมต่อลิตร วัดค่าความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ พบว่าที่ 0.10–80.00 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความเป็นเส้นตรงมากที่สุด แสดงผลดังตาราง 16 และภาพ 26 เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 90.00–100.00 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ากราฟจะโค้ง ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้สร้างกราฟมาตรฐานกรดแกลลิกที่มีความเข้มข้น 0.50, 1.00, 3.00, 5.00, 10.00, 15.00, 20.00 และ 25.00 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อหาความสัมพันธ์เชิงเส้นที่ทำให้กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรง ($y = 0.0456x - 0.0071$) และมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9999 แสดงผลดังตาราง 17 และภาพ 27

ตาราง 16 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกในการหาช่วงความเป็นเส้นตรง

ความเข้มข้นของ สารละลายมาตรฐาน กรดแกลลิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง (A.U.) ± SD	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R ²)
0.10	0.0055 ± 0.0002	1.0000

ตาราง 16 (ต่อ)

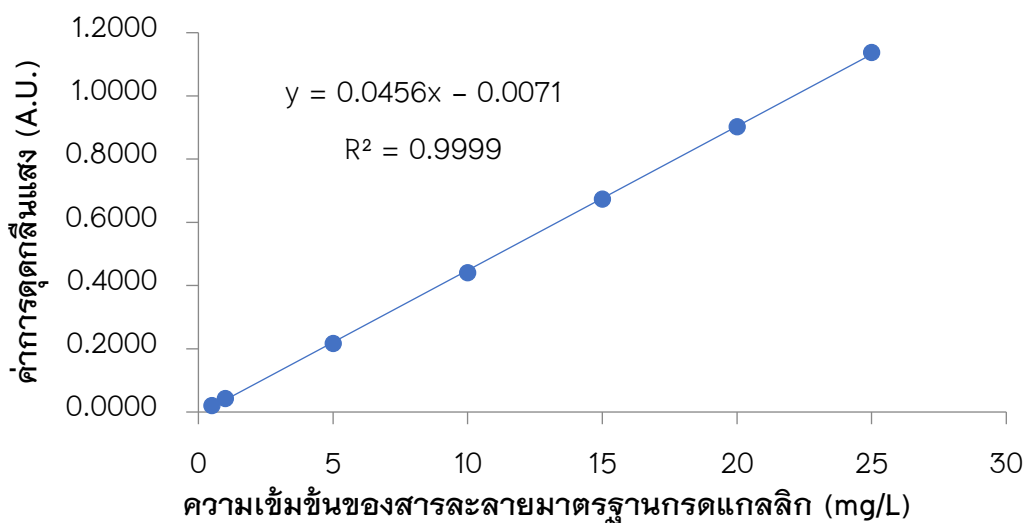
ความเข้มข้นของ สารละลายมาตรฐานกรด แกลลิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง (A.U.) ± SD	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R ²)
5.00	0.2116 ± 0.0003	0.9997
6.00	0.2554 ± 0.0006	0.9997
7.00	0.2987 ± 0.0001	0.9998
8.00	0.3418 ± 0.0007	0.9998
9.00	0.3838 ± 0.0006	0.9999
10.00	0.4374 ± 0.0003	0.9995
15.00	0.6595 ± 0.0002	0.9995
20.00	0.8805 ± 0.0000	0.9997
25.00	1.1190 ± 0.0011	0.9996
30.00	1.3481 ± 0.0012	0.9997
40.00	1.7942 ± 0.0027	0.9998
50.00	2.2207 ± 0.0117	0.9999
60.00	2.5766 ± 0.0407	0.9993
70.00	2.8736 ± 0.0507	0.9978
80.00	3.1705 ± 0.0991	0.9962
90.00	3.1650 ± 0.0631	0.9874
100.00	3.1722 ± 0.1414	0.9742



ภาพ 26 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 266 นาโนเมตร

ตาราง 17 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (กราฟมาตรฐาน)

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน กรดแกลลิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง (A.U.) \pm SD	ค่าสัมประสิทธิ์ สหสัมพันธ์ (R^2)
0.50	0.0204 \pm 0.0006	1.0000
1.00	0.0428 \pm 0.0006	1.0000
5.00	0.2168 \pm 0.0009	1.0000
10.00	0.4404 \pm 0.0004	1.0000
15.00	0.6740 \pm 0.0003	0.9999
20.00	0.9027 \pm 0.0006	0.9999
25.00	1.1375 \pm 0.0009	0.9999



ภาพ 27 กราฟมาตรฐานกรดแกลลิกแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานแกลลิกกับค่าการดูดกลืนแสง

4.6.2 ผลการค้นหาขีดจำกัดการตรวจวัด (Limit of Detection, LOD) และขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantization, LOQ)

จากการศึกษาขีดจำกัดการตรวจวัดและขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณ โดยการใช้สารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่มีความเข้มข้น 0.10, 0.50, 1.00, 5.00, 10.00, 15.00, 20.00, 25.00, 30.00, 40.00, 50.00 และ 60.00 มิลลิกรัมต่อลิตร สร้างกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก เพื่อให้ได้สมการเส้นตรง ($y = 0.0453x - 0.0044$) แสดงผลดังภาพ 29 (ภาคผนวก ก.) โดยใช้สารละลายเอทานอลต่อน้ำปราศจากไอออน (5:1 v/v) ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง 11 ชั่วโมง จากนั้นคำนวณหาขีดจำกัดของการตรวจวัดและขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณ จากสูตร 3 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($S_{y/x}$) / ความชัน (b) และ 10 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($S_{y/x}$) / ความชัน (b) ตามลำดับ พบว่ามีค่าขีดจำกัดการตรวจวัดเท่ากับ 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร และขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณเท่ากับ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

4.6.3 ผลการตรวจสอบความแม่นยำ (Precision)

4.6.3.1 ความแม่นยำของเครื่องมือ (Repeatability)

จากการตรวจสอบความแม่นยำของเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ โดยนำสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก ความเข้มข้น 1.00, 20.00 และ 40.00 มิลลิกรัมต่อลิตร

(ความเข้มข้นละ 1 ขวด) ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 266 นาโนเมตร วัดซ้ำจำนวน 7 ครั้ง แสดงผลดังตาราง 18 พบว่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์อยู่ในช่วง 0.11 – 0.69 % จึงถือว่าการวิเคราะห์มีความแม่นยำสูง เนื่องจากอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ของ AOAC 2016^[9] (น้อยกว่าหรือเท่ากับ 7.3 %)

ตาราง 18 ความแม่นยำ (Repeatability) โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 1.00, 20.00 และ 40.00 มิลลิกรัมต่อลิตร (n = 11)

ครั้งที่	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก		
	1.00 mg/L	20.00 mg/L	40.00 mg/L
1	0.0459	0.8823	1.7825
2	0.0451	0.8821	1.7803
3	0.0452	0.8817	1.7838
4	0.0459	0.8815	1.7811
5	0.0454	0.8819	1.7800
6	0.0455	0.8806	1.7777
7	0.0456	0.8797	1.7771
เฉลี่ย	0.0455	0.8814	1.7804
SD	0.0003	0.0009	0.0024
%RSD	0.69	0.11	0.14

4.6.3.2 ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (Reproducibility)

จากการตรวจสอบความแม่นยำของวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์ โดยการนำสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก ความเข้มข้น 1.00, 20.00 และ 40.00 มิลลิกรัมต่อลิตร (ความเข้มข้นละ 11 ขวด) ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 266 นาโนเมตร วัดซ้ำ

จำนวน 3 ครั้ง แสดงผลดังตาราง 19 พบว่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์อยู่ในช่วง 0.12 – 2.25% จึงถือว่าการวิเคราะห์มีความแม่นยำสูง เนื่องจากอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ของ AOAC 2016^[9] (น้อยกว่าหรือเท่ากับ 7.3 %)

ตาราง 19 ความแม่นยำ (Reproducibility) โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 1.00, 20.00 และ 40.00 มิลลิกรัมต่อลิตร (n = 3)

ขวดที่	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริก (A.U.) ± SD		
	1.00 mg/L	20.00 mg/L	40.00 mg/L
1	0.0422 ± 0.0005	0.8857 ± 0.0011	1.7913 ± 0.0024
2	0.0409 ± 0.0006	0.8874 ± 0.0010	1.7874 ± 0.0025
3	0.0416 ± 0.0007	0.8889 ± 0.0008	1.7870 ± 0.0133
4	0.0433 ± 0.0013	0.8879 ± 0.0006	1.7876 ± 0.0059
5	0.0425 ± 0.0002	0.8886 ± 0.0010	1.7752 ± 0.0058
6	0.0432 ± 0.0002	0.8870 ± 0.0006	1.8021 ± 0.0053
7	0.0435 ± 0.0012	0.8879 ± 0.0005	1.7980 ± 0.0017
เฉลี่ย	0.0425	0.8876	1.7898
SD	0.0010	0.0011	0.0087
%RSD	2.27	0.12	0.49

4.6.4 ผลการหาค่าร้อยละการได้กลับคืนของเครื่องมือ (%Recovery)

ทำการตรวจสอบความถูกต้องจากการศึกษาหาค่าร้อยละการได้กลับคืนของเครื่องมือ โดยทำการสกัด แล้วเติมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 5.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในตัวอย่างน้ำผึ้ง 6 ตัวอย่าง และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 266 นาโนเมตร วัดซ้ำความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ มีค่าร้อยละการได้กลับคืนอยู่ในช่วง 85–87% พบว่าการ

วิเคราะห์ที่มีความถูกต้อง ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ของ AOAC 2016^[9] (80–110 %) แสดงผลดังตาราง 20

ตาราง 20 ร้อยละการได้กลับคืน (%Recovery) ของกรดแกลลิกในตัวอย่งน้ำผึ้ง

ความเข้มข้นที่เติม (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง (A.U.) ± SD	ความเข้มข้นที่พบ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ร้อยละการได้ กลับคืน (%)
H1	0.1616 ± 0.0002	3.5022	–
H1 + 5.00	0.3503 ± 0.0002	7.8711	87
H2	0.1664 ± 0.0003	3.6089	–
H2 + 5.00	0.3513 ± 0.0004	7.8889	86
H3	0.1148 ± 0.0015	2.4622	–
H3 + 5.00	0.3033 ± 0.0004	6.8289	87
H4	0.1289 ± 0.0007	2.7756	–
H4 + 5.00	0.3120 ± 0.0008	7.0422	85
H5	0.0916 ± 0.0019	1.9467	–
H5 + 5.00	0.2798 ± 0.0002	6.3089	87
H6	0.0901 ± 0.0003	1.9133	–
H6 + 5.00	0.2764 ± 0.0004	6.2400	87

4.6.5 ผลการหาร้อยละการได้กลับคืนของวิธีการวิเคราะห์ (%Recovery)

ทำการตรวจสอบความถูกต้องจากการศึกษาการได้กลับคืนของวิธีการวิเคราะห์ โดยเติมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 5.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในตัวอย่งน้ำผึ้ง 6 ตัวอย่าง แล้วทำการสกัด นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 266 นาโนเมตร วัดซ้ำความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ มีค่าร้อยละการได้กลับคืนอยู่ในช่วง 28–90% ซึ่งไม่อยู่ใน

เกณฑ์ที่ยอมรับได้ตามมาตรฐาน AOAC2016 โดยเกณฑ์ที่ยอมรับได้อยู่ในช่วง 80-110% ทั้งนี้ อาจเกิดจากสารรบกวน เช่น โลหะ (แมกนีเซียม สังกะสีหรือเหล็ก) โดยโลหะจะไปทำปฏิกิริยากับสารกลุ่มฟีนอลิก เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ใหม่ ซึ่งไม่สามารถตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 266 นาโนเมตรได้ จึงส่งผลให้ได้ค่าร้อยละการได้กลับคืนที่ต่ำกว่าเกณฑ์ตามมาตรฐาน AOAC2016 โดยสามารถแก้ปัญหาได้ด้วยการศึกษาผลกระทบของสารรบกวนที่มีผลต่อการวิเคราะห์เพื่อลดหรือหลีกเลี่ยงการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารที่สนใจที่จะวิเคราะห์กับโลหะ แสดงผลดังตาราง 21

ตาราง 21 ร้อยละการได้กลับคืน (%Recovery) ของของวิธีในการวิเคราะห์กรดแกลลิกในตัวอย่างน้ำผึ้ง

ความเข้มข้นที่เติม (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง (A.U.) \pm SD	ความเข้มข้นที่พบ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ร้อยละการได้ กลับคืน (%)
H1	1.4381 \pm 0.0006	32.05	-
H1 + 5.00	1.5006 \pm 0.0005	33.44	28
H2	1.4087 \pm 0.0034	31.39	-
H2 + 5.00	1.5544 \pm 0.0005	34.63	65
H3	0.8878 \pm 0.0015	19.82	-
H3 + 5.00	0.9899 \pm 0.0001	22.09	45
H4	1.0315 \pm 0.0009	23.01	-
H4 + 5.00	1.1538 \pm 0.0008	25.73	54
H5	0.8856 \pm 0.0016	19.77	-
H5 + 5.00	1.0024 \pm 0.0000	22.36	52
H6	0.7927 \pm 0.0017	17.70	-
H6 + 5.00	0.9943 \pm 0.0003	22.18	90

4.7 การวิเคราะห์หาปริมาณกรดออร์โทคูมาริกในตัวอย่างน้ำผึ้งโดยเทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตเมตรี

การวิเคราะห์หาปริมาณกรดออร์โทคูมาริกในตัวอย่างน้ำผึ้งในจังหวัดพะเยา จำนวน 6 ตัวอย่าง จากนั้นทำการสกัดตัวอย่างน้ำผึ้ง พบว่าปริมาณกรดออร์โทคูมาริกในตัวอย่างน้ำผึ้ง ทั้ง 6 ตัวอย่าง อยู่ในช่วง 282.91– 497.93 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แสดงดังตาราง 22

ตาราง 22 ปริมาณกรดออร์โทคูมาริกที่พบในตัวอย่างน้ำผึ้ง

ตัวอย่างน้ำผึ้งแต่ ละอำเภอ	น้ำหนักตัวอย่าง น้ำผึ้ง (กรัม)	ปริมาณกรดออร์โทคูมาริกที่พบใน ตัวอย่างน้ำผึ้ง	
		มิลลิกรัมต่อลิตร	มิลลิกรัมต่อ กิโลกรัม
เชียงใหม่	1.6613	82.7208	497.93
(H1)			
ปง	1.6627	82.1726	494.21
(H2)			
เมือง	1.6620	58.7310	353.38
(H3)			
แม่ใจ	1.6626	62.3858	375.23
(H4)			
ภูพานยาว	1.6647	47.0964	282.91
(H5)			
เชียงคำ	1.6609	47.6142	286.68
(H6)			

4.8 การวิเคราะห์หาปริมาณกรดแกลลิกในตัวอย่างน้ำผึ้งโดยเทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตเมตรี

การวิเคราะห์หาปริมาณกรดแกลลิกในตัวอย่างน้ำผึ้งในจังหวัดพะเยา จำนวน 6 ตัวอย่าง จากนั้นทำการสกัดตัวอย่างน้ำผึ้ง พบว่าปริมาณกรดแกลลิกในตัวอย่างน้ำผึ้งทั้ง 6 ตัวอย่าง อยู่ในช่วง 615.15 – 1051.28 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แสดงดังตาราง 23

ตาราง 23 ปริมาณกรดแกลลิกที่พบในตัวอย่างน้ำผึ้ง

ตัวอย่างน้ำผึ้งแต่ละอำเภอ	น้ำหนักตัวอย่างน้ำผึ้ง (กรัม)	ปริมาณกรดแกลลิกที่พบในตัวอย่างน้ำผึ้ง	
		มิลลิกรัมต่อลิตร	มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม
เชียงใหม่ (H1)	1.6613	174.6491	1051.28
ปง (H2)	1.6627	172.1053	1035.10
เมือง (H3)	1.6620	124.5395	749.33
แม่ใจ (H4)	1.6626	132.6974	798.13
ภูกามยาว (H5)	1.6647	102.6316	616.52
เชียงคำ (H6)	1.6609	102.1711	615.15

บทที่ 5

บทสรุป

5.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดตัวอย่างน้ำผึ้งในการวิเคราะห์หาปริมาณกรดออร์โทคูมาริกและกรดแกลลิก

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดตัวอย่างน้ำผึ้ง ซึ่งทำการศึกษาสภาวะดังนี้ ชนิดตัวทำละลายที่ใช้สกัด ปริมาตรที่ใช้ในการสกัดและเวลาที่ใช้ในการปั่นเหวี่ยง พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดตัวอย่างน้ำผึ้งแสดงดังตาราง 24

ตาราง 24 สภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการสกัดตัวอย่างน้ำผึ้งในการวิเคราะห์หาปริมาณกรดออร์โทคูมาริกและกรดแกลลิก

สภาวะที่ศึกษา	สภาวะที่เหมาะสม
ชนิดตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด	เอทานอล
ปริมาตรที่ใช้ในการสกัด (มิลลิลิตร)	5
เวลาที่ใช้ในการปั่นเหวี่ยง (นาที)	10

5.2 สรุปผลการตรวจสอบสมรรถนะในการวิเคราะห์กรดออร์โทคูมาริก (Analytical performance)

จากการตรวจสอบสมรรถนะในการวิเคราะห์ (Analytical performance) ได้ทำการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง โดยใช้สารละลายกรดออร์โทคูมาริกที่ช่วงความเข้มข้น 0.00–60.00 ppm พบว่าช่วงความเป็นเส้นตรงอยู่ที่ 0.05–30.00 ppm (ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.998) และจากการศึกษาขีดจำกัดการตรวจวัด (LOD) เท่ากับ 0.01 ppm และมีค่าขีดจำกัดการตรวจเชิงปริมาณ (LOQ) เท่ากับ 0.05 ppm และค่าความแม่นยำของเครื่องมือในการวิเคราะห์ (Repeatability) และค่าความแม่นยำของการวิเคราะห์ (Reproducibility) โดยใช้

สารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริกที่ความเข้มข้น 1.00, 5.00 และ 10.00 ppm พบว่ามีค่า ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ อยู่ในช่วง 0.08–0.66% และ 0.36–1.61% ตามลำดับ ซึ่งถือว่า เครื่องมือและกระบวนการที่ใช้ในการวิเคราะห์มีความแม่นยำสูง เนื่องจากอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ของ AOAC 2016⁹¹ (Repeatability น้อยกว่าหรือเท่ากับ 7.3%, Reproducibility น้อยกว่าหรือ เท่ากับ 7.3%) และสำหรับการศึกษาความความถูกต้อง (Accuracy) ของเครื่องมือการวิเคราะห์ ทำได้โดยทำการสกัดตัวอย่างแล้วเติมสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริก 5.00 ppm พบว่า มีค่าร้อยละการได้กลับคืนอยู่ในช่วง 93–96% สำหรับการศึกษาคความถูกต้อง (Accuracy) ของวิธีการวิเคราะห์ทำได้โดยการสกัดสารตัวอย่างแล้วเติมสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริก 5.00 ppm พบว่ามีค่าร้อยละการได้กลับคืนอยู่ในช่วง 16–40% ซึ่งการตรวจสอบ สมรรถนะในการวิเคราะห์กรดออร์โทคูมาริก แสดงผลดังตาราง 25

ตาราง 25 การตรวจสอบสมรรถนะในการวิเคราะห์กรดออร์โทคูมาริก (Analytical performance)

การตรวจสอบสมรรถนะในการวิเคราะห์	ผลการวิเคราะห์
ช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity) (ppm)	0.05–30.00
ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์	0.998
ขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด (LOD) (ppm)	0.01
ขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดเชิงปริมาณ (LOQ) (ppm)	0.04
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ; Repeatability (%)	0.08–0.66
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ; Reproducibility (%)	0.36–1.61
ร้อยละการได้กลับคืนของเครื่อง (%recovery)	93–96%
ร้อยละการได้กลับคืนของวิธีการวิเคราะห์ (%recovery)	16–40%

5.3 สรุปผลการตรวจสอบสมรรถนะในการวิเคราะห์กรดแกลลิก (Analytical performance)

จากการตรวจสอบสมรรถนะในการวิเคราะห์ (Analytical performance) ทำการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง โดยใช้สารละลายกรดออกอร์โทคูมาริกในช่วงความเข้มข้น 0.00–60.00 ppm พบว่าช่วงความเป็นเส้นตรงอยู่ที่ 0.10–80.00 ppm (ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.996) และจากการศึกษาขีดจำกัดการตรวจวัด (LOD) เท่ากับ 0.03 ppm และมีค่าขีดจำกัดการตรวจเชิงปริมาณ (LOQ) เท่ากับ 0.1 ppm และค่าความแม่นยำของเครื่องมือในการวิเคราะห์ (Repeatability) และค่าความแม่นยำของการวิเคราะห์ (Reproducibility) โดยใช้สารละลายมาตรฐานกรดออกอร์โทคูมาริกที่ความเข้มข้น 1.00, 20.00 และ 40.00 ppm พบว่ามีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ อยู่ในช่วง 0.11–0.69 % และ 0.12–2.25% ตามลำดับ ซึ่งถือว่าเครื่องมือและกระบวนการที่ใช้ในการวิเคราะห์มีความแม่นยำสูง เนื่องจากอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ของ AOAC 2016^[9] (Repeatability น้อยกว่าหรือเท่ากับ 7.3%, Reproducibility น้อยกว่าหรือเท่ากับ 7.3%) และสำหรับการศึกษาคความถูกต้อง (Accuracy) ของเครื่องมือการวิเคราะห์ทำได้โดยการสกัดตัวอย่างแล้วเติมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก 5.00 ppm พบว่ามีค่าร้อยละการได้กลับคืนอยู่ในช่วง 85–87% และสำหรับการศึกษาคความถูกต้อง (Accuracy) ของวิธีการวิเคราะห์ทำได้โดยการสกัดสารตัวอย่างแล้วเติมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก 5.00 ppm พบว่ามีค่าร้อยละการได้กลับคืนอยู่ในช่วง 28–90% ซึ่งการตรวจสอบสมรรถนะในการวิเคราะห์กรดแกลลิก แสดงผลดังตาราง 26

ตาราง 26 การตรวจสอบสมรรถนะในการวิเคราะห์กรดแกลลิก (Analytical performance)

การตรวจสอบสมรรถนะในการวิเคราะห์	ผลการวิเคราะห์
ช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity) (ppm)	0.10–80.00
ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์	0.996
ขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด (LOD) (ppm)	0.02
ขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดเชิงปริมาณ (LOQ) (ppm)	0.08
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ; Repeatability (%)	0.11–0.69

ตาราง 26 (ต่อ)

การตรวจสอบสมรรถนะในการวิเคราะห์	ผลการวิเคราะห์
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ; Reproducibility (%)	0.12–2.25
ร้อยละการได้กลับคืน (%recovery)	85–87%
ร้อยละการได้กลับคืนของวิธีการวิเคราะห์ (%recovery)	28–90%

5.4 สรุปผลการหาปริมาณกรดออร์โทคูมาริกและกรดแกลลิกในตัวอย่างน้ำผึ้ง

เมื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณกรดออร์โทคูมาริกและกรดแกลลิกในตัวอย่างน้ำผึ้งในพื้นที่จังหวัดพะเยา ที่สกัดภายใต้สภาวะที่เหมาะสม พบว่าปริมาณกรดออร์โทคูมาริกในตัวอย่างน้ำผึ้ง อยู่ในช่วง 282.91– 497.93 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยตัวอย่างน้ำผึ้งที่มีปริมาณกรดออร์โทคูมาริกมากที่สุดคือ ตัวอย่างน้ำผึ้งจากอำเภอยางมาว รองลงมาคืออำเภอบง และตัวอย่างน้ำผึ้งที่มีปริมาณกรดออร์โทคูมาริกน้อยที่สุดคือตัวอย่างน้ำผึ้งจากอำเภอกฎาคมยาว และพบว่าปริมาณกรดแกลลิกในตัวอย่างน้ำผึ้ง อยู่ในช่วง 615.15 – 1051.28 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยตัวอย่างน้ำผึ้งที่มีปริมาณกรดแกลลิกมากที่สุดคือตัวอย่างน้ำผึ้งจากอำเภอยางมาว รองลงมาคืออำเภอบงและตัวอย่างน้ำผึ้งที่มีปริมาณกรดแกลลิกน้อยที่สุดคือตัวอย่างน้ำผึ้งจากอำเภอยางมาว

5.5 ข้อเสนอแนะ

- 5.5.1 ควรมีการทดสอบน้ำผึ้งแท้และน้ำผึ้งเทียม
- 5.5.2 ควรศึกษาจำนวนครั้งในการสกัดและจำนวนรอบที่ใช้ในการปั่นเหวี่ยง
- 5.5.3 ควรศึกษาการสกัดด้วยเอทานอลที่ปริมาตร 3 มิลลิลิตร
- 5.5.4 ควรศึกษา interference ที่มีผลต่อขั้นตอนการสกัดตัวอย่าง
- 5.5.5 ควรศึกษาวิธีการสกัดแบบอื่น ๆ
- 5.5.6 ควรแจ้งจางสารละลายตัวอย่างให้มีค่าการดูดกลืนแสงไม่เกิน 1 ตามกฎของเบียร์ (Beer's law)

5.5.7 ควรมีการเปรียบเทียบการหาปริมาณกรดออร์โทคูมาริกและกรดแกลลิกกับ
เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

บรรณานุกรม

- [1] คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. WHAT'S BEE?, 16 พฤศจิกายน 2562.
<http://smart-beekeeper.com/Bee/Bee/whatis>
- [2] ไทยลันนาฟาร์มผึ้ง. คุณสมบัติของน้ำผึ้ง, 16 พฤศจิกายน 2562.
<http://www.thailanna.co.th/index.php?lay=show&ac=article&id=197826>
- [3] ณัฐฐา ไชยมุติ. บทความเรื่องอนุมูลอิสระ, 16 พฤศจิกายน 2562.
http://kb.psu.ac.th/psukb/bitstream/2553/2906/7/241434_ch1.pdf
- [4] ปรียา. (2559). 3 วิธีตรวจสอบน้ำผึ้ง, 16 พฤศจิกายน 2562.
<https://www.akerufeed.com/health/3-tests-honey-pure-or-fake>
- [5] ผศ.ดร.พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์, ศาสตราจารย์เกียรติคุณ ดร.นิธิยา รัตนานนท์.
Honey / น้ำผึ้ง, 15 พฤศจิกายน 2562.
<http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1155/honey-น้ำผึ้ง>
- [6] ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. UV –
Vis spectrophotometer, 18 พฤศจิกายน 2562.
<http://www.env.eng.chula.ac.th/?q=content/uv-%E2%80%93-vis-spectrophotometer>
- [7] ลือชัย บุตุคุป. (2011). สารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ทางชีวภาพ. *The Journal of Science Technol MSU*. 443–455.
- [8] สถาบันนวัตกรรมและพัฒนาระบบการเรียนรู้ออนไลน์ มหาวิทยาลัยมหิดล. ส่วนประกอบของ
เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์, 18 พฤศจิกายน 2562. https://il.mahidol.ac.th/e-media/color-light/page4_2.html
- [9] สุภาพาร์มผึ้ง. ผึ้งมีกี่ชนิด, 18 พฤศจิกายน 2562.
<http://sophabeefarm.lnwshop.com/article/2/ผึ้งมีกี่ชนิด?>
- [10] อัญชลี สวาสดิ์ธรรม, สุกันทรส ชาติกิตติสาร, สุทธิ ชัยพฤกษ์, อรพินธ์ ไรจนะ. (2549).
การพัฒนาเทคโนโลยีการทำน้ำผึ้งครีมจากน้ำผึ้ง จากดอกไม้บางชนิด, 15 พฤศจิกายน
2562. <http://www.rtir.rmutt.ac.th/bitstream/123456789/216/1/110260.pdf>
- [11] AOAC. (2016). Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance
Requirements, 18 พฤศจิกายน 2562. http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf

- [12] Augustin M, Radu D, Costel S. (2009). Rapid and effective evaluation of the antioxidant capacity of propolis extracts using DPPH bleaching kinetic profiles, FT-IR and UV-vis spectroscopic data. *The Journal of Food Composition and Analysis*. 516–522.
- [13] Fabíola B, Jefferson S, Mayara S, Francieli B, Lucaino G, Heloisa M, Eliseu R, Luciano V, Gustavo M, Daniel B, Ana C, Roseane F. (2017). Polyphenolic compounds, antioxidant capacity and bioaccessibility of minerals of stingless bee honey (*Meliponinae*). *The Journal of Food Composition and Analysis*, 89–97.
- [14] Gulzar N, Vikas N. (2016). A chemometric approach to evaluate the phenolic compounds, antioxidant activity and mineral content of different unifloral honey types from Kashmir, India. *The Journal of LWT – Food Science and Technology*. 504–513.
- [15] Isnandia S, Tanai S, Celso C, Neide Q, Marciane M, Jaílson N, Luiz S, Edeltrudes L, Antonia S, Antonio S. (2013). Phenolic profile, antioxidant and palynological analysis of stingless bee honey from Amazonas, Northern Brazil. *The Journal of Food Chemistry*, 3552–3558.
- [16] Izabela M, Jasica M, Anna P, Malgorza D, Pawel K. (2012). Phenolic compound and abscisic acid as potential markers for the floral origin of two Polish unifloral honeys. *The Journal of Food Chemistry*, 1149–1156.
- [17] Janaína S, Evadro S, Gilmardes M, Bruno M, Ângela C, Beatriz G, Maria P, Marcaine M. (2016). Phenolic profile and antioxidant and antibacterial activities of monofloral honeys produced by *Meliponini* in the Brazilian semiarid region. *The Journal of Food Research International*, 61–68.
- [18] Jianling D, Rui L, Qun L, Peiyan H, Anqi X, Jiuliang Z, Jan T. (2018). Biochemical properties, antibacterial and cellular antioxidant activities of buckwheat honey in comparison to monofloral honey. *The Journal of Food Chemistry*, 243–249.
- [19] Jose T, Helene N, Alejandro O, Jose A, Wessel T. (2017). Phenolic profiling of grapes, fermenting samples and wines using UV-Visible spectroscopy with chemometrics. *The Journal of Food Control*, 11–22.

- [20] Kristina R, Aad S, Vitalis B, Liudas I, Valdas J. (2010). The quantitative analysis of biologically active compounds in Lithuanian honey. *The Journal of Food Chemistry*. 1544–1548.
- [21] Lihu Y, Yueming J, Riantong S, Nivedita D, Katherine R. (2004). Phenolic acids and abscisic acid in Australian *Eucalyptus* honeys and their potential for floral authentication. *The Journal of Food Chemistry*, 169–177.
- [22] Luca C, Anna L. Piccinelli, Imma P, Sonai C, Rosa D. Sanzo, Mariaeresa R, Luca R. (2014). Determination of phenolic compounds in honey using dispersive liquid–liquid microextraction. *The Journal of chromatography A*, 9–15.
- [23] Mitra Z, Vahid Z, Hossein Jalali J. (2019). Application of ultrasonic–assisted inclusion complex formation with α -cyclodextrin for simultaneous spectrophotometric determination of gallic acid and vanillic acids in fruit samples. *The Journal of Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 1–10.
- [24] N P Pawar, V R Salunkhe. (2013). Development and Validation of UV–VIS Spectrophotometric Method For Simultaneous Estimation Of Rutin And Gallic Acid In Hydroalcoholic Extract Of *Triphala churna*. *The Journal of PharmTech Research*, 724–729.
- [25] Showing Compound Gallic acid (FDB000662). 25 มีนาคม 2563.
<https://foodb.ca/compounds/FDB000662>.
- [26] Showing Compound m–Coumaric acid (FDB002590). 25 มีนาคม 2563.
<https://foodb.ca/compounds/FDB002590>.
- [27] Showing Compound o–Coumaric acid (FDB011258). 25 มีนาคม 2563.
<https://foodb.ca/compounds/FDB011258>.
- [28] Showing Compound p–Coumaric acid (FDB002593). 25 มีนาคม 2563.
<https://foodb.ca/compounds/FDB002593>.

- [29] Walter S, Maria S, Ana S, Débora S, Ravena A, Jamile C. (2015). Simultaneous determination of 13 phenolic bioactive compounds in guava (*Psidium guajava* L.) by HPLC–PAD with evaluation using PCA and Neural Network Analysis (NNA). *The Journal of Microchemical Journal*. 583–592.
- [30] Zuoyi Z, Yu Z, Junhong W, Xue L, Wei W, Zhongping H. (2019). Sugaring–out assisted liquid–liquid extraction coupled with highperformance liquid chromatography–electrochemical detection for the determination of 17 phenolic compounds in honey. *The Journal of Chromatography A*, 104–114.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

1. ผลของการหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการวิเคราะห์กรดออร์โทคูมาริกโดยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตเมตรี

สเปกตรัมของสารมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริก ปรากฏจุดยอดคลื่นของสเปกตรัมที่มีความยาวคลื่น 267, 268, 270, 271, 272, 273, 274 และ 275 นาโนเมตร ดังนั้นจึงศึกษาความยาวคลื่นที่เหมาะสม โดยการสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริกกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 267, 268, 270, 271, 272, 273, 274 และ 275 นาโนเมตร แสดงดังตาราง 27 ถึง 34

ตาราง 27 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริกที่ความยาวคลื่น 267 นาโนเมตร (n = 3)

ความเข้มข้นของสารละลาย มาตรฐานกรดออร์โทคูมาริก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย (A.U.)	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)
0.05	0.0059	0.0004
0.10	0.0096	0.0003
1.00	0.1001	0.0005
2.00	0.1943	0.0005
3.00	0.2871	0.0003
4.00	0.3771	0.0005
5.00	0.4722	0.0005
6.00	0.5519	0.0004
7.00	0.6436	0.0004

ตาราง 27 (ต่อ)

ความเข้มข้นของสารละลาย มาตรฐานกรดออร์โทคูมาริก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย (A.U.)	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
		(SD)
8.00	0.7318	0.0010
9.00	0.8067	0.0012
10.00	0.8913	0.0007
15.00	1.3180	0.0001
20.00	1.7339	0.0071
25.00	2.1408	0.0193
30.00	2.4499	0.1190

ตาราง 28 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริกที่ความยาวคลื่น 268 นาโนเมตร (n = 3)

ความเข้มข้นของสารละลาย มาตรฐานกรดออร์โทคูมาริก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย (A.U.)	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
		(SD)
0.05	0.0057	0.0003
0.10	0.0100	0.0005
1.00	0.1013	0.0004
2.00	0.1966	0.0006
3.00	0.2911	0.0003

ตาราง 28 (ต่อ)

ความเข้มข้นของสารละลาย มาตรฐานกรดออร์โทคูมาริก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย (A.U.)	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)
4.00	0.3827	0.0003
5.00	0.4788	0.0007
6.00	0.5620	0.0003
7.00	0.6556	0.0005
8.00	0.7445	0.0010
9.00	0.8231	0.0011
10.00	0.9102	0.0018
15.00	1.3473	0.0029
20.00	1.7767	0.0031
25.00	2.1872	0.0096
30.00	2.5500	0.0347

ตาราง 29 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริกที่ความยาวคลื่น 270 นาโนเมตร (n = 3)

ความเข้มข้นของสารละลาย มาตรฐานกรดออร์โทคูมาริก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย (A.U.)	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)
0.05	0.0055	0.0003
0.10	0.0101	0.0007
1.00	0.1012	0.0006
2.00	0.1979	0.0003
3.00	0.2939	0.0007
4.00	0.3896	0.0004
5.00	0.4872	0.0003
6.00	0.5763	0.0007
7.00	0.6707	0.0003
8.00	0.7616	0.0006
9.00	0.8465	0.0004
10.00	0.9379	0.0013
15.00	1.3931	0.0004
20.00	1.8356	0.0077
25.00	2.2556	0.0135
30.00	2.6118	0.0176

ตาราง 30 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริกที่ความยาวคลื่น 271 นาโนเมตร (n = 3)

ความเข้มข้นของสารละลาย มาตรฐานกรดออร์โทคูมาริก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย (A.U.)	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)
0.05	0.0053	0.0002
0.10	0.0095	0.0004
1.00	0.1003	0.0004
2.00	0.1966	0.0006
3.00	0.2931	0.0008
4.00	0.3893	0.0003
5.00	0.4877	0.0002
6.00	0.5801	0.0009
7.00	0.6747	0.0006
8.00	0.7658	0.0011
9.00	0.8527	0.0003
10.00	0.9427	0.0026
15.00	1.4062	0.0013
20.00	1.8519	0.0124
25.00	2.2896	0.0116
30.00	2.6043	0.0306

ตาราง 31 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริกที่ความยาวคลื่น 272 นาโนเมตร ($n = 3$)

ความเข้มข้นของสารละลาย มาตรฐานกรดออร์โทคูมาริก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย (A.U.)	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)
0.05	0.0056	0.0006
0.10	0.0095	0.0003
1.00	0.0996	0.0005
2.00	0.1955	0.0007
3.00	0.2919	0.0007
4.00	0.3883	0.0006
5.00	0.4863	0.0004
6.00	0.5812	0.0004
7.00	0.6742	0.0008
8.00	0.7660	0.0010
9.00	0.8553	0.0002
10.00	0.9507	0.0009
15.00	1.4124	0.0020
20.00	1.8679	0.0021
25.00	2.2918	0.0005
30.00	2.6495	0.0729

ตาราง 32 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริกที่ความยาวคลื่น 273 นาโนเมตร (n = 3)

ความเข้มข้นของสารละลาย มาตรฐานกรดออร์โทคูมาริก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย (A.U.)	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)
0.05	0.0059	0.0004
0.10	0.0098	0.0001
1.00	0.1006	0.0005
2.00	0.1955	0.0006
3.00	0.2920	0.0004
4.00	0.3903	0.0007
5.00	0.4878	0.0001
6.00	0.5863	0.0005
7.00	0.6818	0.0006
8.00	0.7788	0.0004
9.00	0.8739	0.0002
10.00	0.9721	0.0007
15.00	1.4472	0.0016
20.00	1.8545	0.0028
25.00	2.3004	0.0126
30.00	2.6030	0.0357

ตาราง 33 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริกที่ความยาวคลื่น 274 นาโนเมตร (n = 3)

ความเข้มข้นของสารละลาย มาตรฐานกรดออร์โทคูมาริก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย (A.U.)	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)
0.05	0.0060	0.0006
0.10	0.0097	0.0001
1.00	0.0991	0.0004
2.00	0.1929	0.0005
3.00	0.2886	0.0005
4.00	0.3878	0.0007
5.00	0.4850	0.0004
6.00	0.5837	0.0003
7.00	0.6793	0.0004
8.00	0.7761	0.0008
9.00	0.8717	0.0008
10.00	0.9683	0.0010
15.00	1.4435	0.0039
20.00	1.8238	0.0043
25.00	2.3059	0.0110
30.00	2.6099	0.0276

ตาราง 34 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริกที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร (n = 3)

ความเข้มข้นของสารละลาย มาตรฐานกรดออร์โทคูมาริก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย (A.U.)	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)
0.05	0.0062	0.0005
0.10	0.0092	0.0004
1.00	0.0964	0.0003
2.00	0.1887	0.0005
3.00	0.2842	0.0006
4.00	0.3835	0.0002
5.00	0.4796	0.0003
6.00	0.5782	0.0003
7.00	0.6733	0.0005
8.00	0.7699	0.0004
9.00	0.8651	0.0011
10.00	0.9593	0.0018
15.00	1.4344	0.0032
20.00	1.7946	0.0056
25.00	2.3033	0.0207
30.00	2.5897	0.0249

2. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดกรดออร์โทคูมาริก

2.1 ผลการศึกษาชนิดของตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด (Types of solvent)

จากการศึกษาชนิดของตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด ซึ่งข้อมูลค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริกในตัวอย่างน้ำผึ้งที่ใช้ตัวทำละลายในการสกัดทั้ง 3 ชนิด แสดงผลดังตาราง 35 ถึง 37

ตาราง 35 ค่าการดูดกลืนแสงของเมทานอล

ตัวอย่างน้ำผึ้ง	ค่าการดูดกลืนแสง (A.U.)			ค่าเฉลี่ย \pm SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
H1	0.7921	0.7924	0.7927	0.7924 \pm 0.0003
H2	0.7974	0.7963	0.7968	0.7968 \pm 0.0006
H3	0.5486	0.5482	0.5484	0.5484 \pm 0.0002
H4	0.5938	0.5946	0.5941	0.5942 \pm 0.0004
H5	0.4504	0.4501	0.4504	0.4503 \pm 0.0002
H6	0.4475	0.4471	0.4466	0.4471 \pm 0.0005

ตาราง 36 ค่าการดูดกลืนแสงของเอทานอล

ตัวอย่างน้ำผึ้ง	ค่าการดูดกลืนแสง (A.U.)			ค่าเฉลี่ย \pm SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
H1	0.8188	0.8178	0.8173	0.8180 \pm 0.0008
H2	0.8135	0.8127	0.8130	0.8131 \pm 0.0004
H3	0.5763	0.5761	0.5767	0.5764 \pm 0.0003
H4	0.5997	0.5990	0.5989	0.5992 \pm 0.0004
H5	0.4621	0.4610	0.4606	0.4612 \pm 0.0008
H6	0.4619	0.4616	0.4621	0.4619 \pm 0.0003

ตาราง 37 ค่าการดูดกลืนแสงของเมทานอลต่อเอทานอล อัตราส่วน 1 ต่อ 1 โดยปริมาตร

ตัวอย่างน้ำผึ้ง	ค่าการดูดกลืนแสง (A.U.)			ค่าเฉลี่ย \pm SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
H1	0.7959	0.7958	0.7956	0.7958 \pm 0.0002

ตาราง 37 (ต่อ)

ตัวอย่างน้ำผึ้ง	ค่าการดูดกลืนแสง (A.U.)			ค่าเฉลี่ย \pm SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
H2	0.8044	0.8043	0.8046	0.8044 \pm 0.0002
H3	0.5655	0.5654	0.5654	0.5654 \pm 0.0001
H4	0.5736	0.5723	0.5730	0.5730 \pm 0.0007
H5	0.4462	0.4461	0.4459	0.4461 \pm 0.0002
H6	0.4477	0.4475	0.4472	0.4475 \pm 0.0003

2.2 ผลการศึกษาปริมาตรตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด (Solvent volumes)

จากการศึกษาปริมาตรตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด ซึ่งข้อมูลค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริกในตัวอย่างน้ำผึ้งที่ใช้ปริมาตร 5 และ 10 มิลลิลิตรในการสกัด แสดงผลดังตาราง 38 และ 40

ตาราง 38 ค่าการดูดกลืนแสงของเอทานอล ปริมาตร 5.00 มิลลิลิตร

ตัวอย่างน้ำผึ้ง	ค่าการดูดกลืนแสง (A.U.)			ค่าเฉลี่ย \pm SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
H1	0.8229	0.8239	0.8239	0.8236 \pm 0.0006
H2	0.7982	0.7982	0.7988	0.7984 \pm 0.0003
H3	0.5928	0.5930	0.5924	0.5927 \pm 0.0003
H4	0.5944	0.5940	0.5936	0.5940 \pm 0.0004
H5	0.4696	0.4696	0.4696	0.4696 \pm 0.0000
H6	0.4560	0.4553	0.4551	0.4555 \pm 0.0005

ตาราง 39 ค่าการดูดกลืนแสงของเอทานอล ปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร

ตัวอย่างน้ำผึ้ง	ค่าการดูดกลืนแสง (A.U.)			ค่าเฉลี่ย \pm SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
H1	0.5090	0.5086	0.5090	0.5089 \pm 0.0002
H2	0.5241	0.5226	0.5228	0.5232 \pm 0.0008

ตาราง 39 (ต่อ)

ตัวอย่างน้ำผึ้ง	ค่าการดูดกลืนแสง (A.U.)			ค่าเฉลี่ย \pm SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
H3	0.3715	0.3708	0.3708	0.3710 \pm 0.0004
H4	0.3627	0.3622	0.3625	0.3625 \pm 0.0003
H5	0.2806	0.2798	0.2798	0.2801 \pm 0.0005
H6	0.2876	0.2874	0.2874	0.2875 \pm 0.0001

2.3 ผลการศึกษาเวลาที่ใช้ในการปั่นเหวี่ยงที่เหมาะสมในการสกัด (Mixing times)

จากการศึกษาเวลาในการปั่นเหวี่ยงที่เหมาะสมในการสกัด ซึ่งข้อมูลค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริกในตัวอย่างน้ำผึ้งที่เวลาในการปั่นเหวี่ยง 3, 5 และ 10 นาที แสดงผลดังตาราง 40 ถึง 42

ตาราง 40 ค่าการดูดกลืนแสงของเอทานอลที่เวลาปั่นเหวี่ยง 3 นาที

ตัวอย่างน้ำผึ้ง	ค่าการดูดกลืนแสง (A.U.)			ค่าเฉลี่ย \pm SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
H1	0.7985	0.7976	0.798	0.7980 \pm 0.0005

ตาราง 40 (ต่อ)

ตัวอย่างน้ำผึ้ง	ค่าการดูดกลืนแสง (A.U.)			ค่าเฉลี่ย \pm SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
H2	0.7790	0.7788	0.7790	0.7789 \pm 0.0001
H3	0.5793	0.5793	0.5790	0.5792 \pm 0.0002
H4	0.6124	0.6128	0.6126	0.6126 \pm 0.0002
H5	0.4587	0.4581	0.4591	0.4586 \pm 0.0005
H6	0.4639	0.4635	0.4633	0.4636 \pm 0.0003

ตาราง 41 ค่าการดูดกลืนแสงของเอทานอลที่เวลาปั่นเหวี่ยง 5 นาที

ตัวอย่างน้ำผึ้ง	ค่าการดูดกลืนแสง (A.U.)			ค่าเฉลี่ย \pm SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
H1	0.8098	0.8100	0.8108	0.8102 \pm 0.0005
H2	0.7860	0.7857	0.7858	0.7858 \pm 0.0002
H3	0.5712	0.5719	0.5716	0.5716 \pm 0.0004

ตาราง 41 (ต่อ)

ตัวอย่างน้ำผึ้ง	ค่าการดูดกลืนแสง (A.U.)			ค่าเฉลี่ย \pm SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
H4	0.5927	0.5917	0.5919	0.5921 \pm 0.0005
H5	0.4528	0.4524	0.4525	0.4526 \pm 0.0002
H6	0.4470	0.4469	0.4471	0.4470 \pm 0.0001

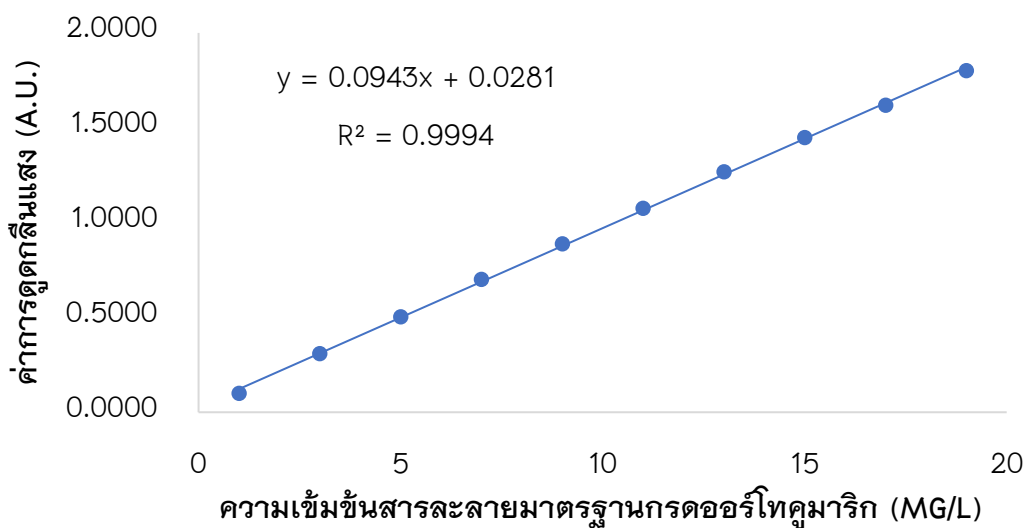
ตาราง 42 ค่าการดูดกลืนแสงของเอทานอลที่เวลาบ่มเหวียง 10 นาที

ตัวอย่างน้ำผึ้ง	ค่าการดูดกลืนแสง (A.U.)			ค่าเฉลี่ย \pm SD
	สกัดครั้งที่ 1	สกัดครั้งที่ 2	สกัดครั้งที่ 3	
H1	0.8301	0.8296	0.8295	0.8297 \pm 0.0003
H2	0.8216	0.8213	0.8212	0.8214 \pm 0.0002
H3	0.5679	0.5678	0.5671	0.5676 \pm 0.0004
H4	0.6139	0.6129	0.6130	0.6133 \pm 0.0006
H5	0.4646	0.4647	0.4640	0.4644 \pm 0.0004

ตาราง 42 (ต่อ)

ตัวอย่างน้ำผึ้ง	ค่าการดูดกลืนแสง (A.U.)			ค่าเฉลี่ย \pm SD
	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3	
H6	0.4729	0.4724	0.4727	0.4727 \pm 0.0003

3. กราฟมาตรฐานของสารละลายกรดออร์โทคูมาริก



ภาพ 28 กราฟมาตรฐานของสารละลายกรดออร์โทคูมาริก เพื่อกำหนดหาขีดจำกัดการตรวจวัด (Limit of Detection, LOD) และขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantization, LOQ)

4. ค่าการดูดกลืนแสงของเอทานอลต่อน้ำปราศจากไอออน (5:1 v/v) ที่ความยาวคลื่น 272 นาโนเมตร เพื่อคำนวณขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด

ตาราง 43 ค่าการดูดกลืนแสงของเอทานอลต่อน้ำปราศจากไอออน (5:1 v/v)

ครั้งที่	ค่าการดูดกลืนแสงของเอทานอลต่อ น้ำปราศจากไอออน
	Ethanol : DI (5:1 v/v)
1	0.0004
2	-0.0001
3	0.0004
4	-0.0003
5	0.0006
6	0.0002
7	0.0003
8	0.0014
9	0.0002
10	0.0003
11	0.0005
เฉลี่ย	0.0004
SD	0.0004

5. ผลของการหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการวิเคราะห์กรดแกลลิกโดยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรเมตรี

สเปกตรัมของสารมาตรฐานกรดแกลลิก ปรากฏจุดยอดคลื่นของสเปกตรัมที่ความยาวคลื่น 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267 และ 268 นาโนเมตร ดังนั้นจึงศึกษาความยาวคลื่นที่เหมาะสม โดยการสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267 และ 268 นาโน แสดงดังตาราง 44 ถึง 51

ตาราง 44 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความยาวคลื่น 261 นาโนเมตร ($n = 3$)

ความเข้มข้นของสารละลาย มาตรฐานกรดแกลลิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย (A.U.)	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)
1.00	0.0514	0.0002
2.00	0.0946	0.0003
3.00	0.1384	0.0005
4.00	0.1822	0.0008
5.00	0.2251	0.0003
6.00	0.2711	0.0002
7.00	0.3127	0.0002
8.00	0.3578	0.0006
9.00	0.3973	0.0008
10.00	0.4408	0.0004

ตาราง 44 (ต่อ)

ความเข้มข้นของสารละลาย มาตรฐานกรดแกลลิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย (A.U.)	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
		(SD)
15.00	0.6665	0.0006
20.00	0.8799	0.0003
25.00	1.1031	0.0007
30.00	1.3095	0.0020
40.00	1.7203	0.0071
50.00	2.1255	0.0065
60.00	2.4600	0.0024
70.00	2.7590	0.0130
80.00	2.9245	0.0333
90.00	3.0640	0.0339
100.00	3.2110	0.0571

ตาราง 45 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร ($n = 3$)

ความเข้มข้นของสารละลาย มาตรฐานกรดแกลลิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย (A.U.)	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)
1.00	0.0514	0.0002
2.00	0.0948	0.0003
3.00	0.1387	0.0002
4.00	0.1829	0.0002
5.00	0.2262	0.0001
6.00	0.2730	0.0003
7.00	0.3145	0.0003
8.00	0.3616	0.0003
9.00	0.4019	0.0004
10.00	0.4462	0.0002
15.00	0.6748	0.0009
20.00	0.8944	0.0005
25.00	1.1249	0.0007
30.00	1.3371	0.0008
40.00	1.7624	0.0026
50.00	2.1775	0.0139

ตาราง 45 (ต่อ)

ความเข้มข้นของสารละลาย มาตรฐานกรดแกลลิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย (A.U.)	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)
60.00	2.5248	0.0224
70.00	2.7897	0.0464
80.00	2.9712	0.0627
90.00	3.0595	0.0509
100.00	3.2193	0.0872

ตาราง 46 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความยาวคลื่น 263 นาโนเมตร (n = 3)

ความเข้มข้นของสารละลาย มาตรฐานกรดแกลลิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย (A.U.)	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)
1.00	0.0503	0.0002
2.00	0.0930	0.0003
3.00	0.1379	0.0002
4.00	0.1829	0.0002
5.00	0.2261	0.0002
6.00	0.2735	0.0003
7.00	0.3153	0.0002

ตาราง 46 (ต่อ)

ความเข้มข้นของสารละลาย มาตรฐานกรดแกลลิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย (A.U.)	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)
8.00	0.3637	0.0001
9.00	0.4046	0.0001
10.00	0.4503	0.0005
15.00	0.6805	0.0003
20.00	0.9051	0.0007
25.00	1.1421	0.0007
30.00	1.3583	0.0011
40.00	1.7936	0.0023
50.00	2.2116	0.0016
60.00	2.5630	0.0222
70.00	2.8448	0.0404
80.00	2.9518	0.0329
90.00	3.1014	0.0431
100.00	3.2602	0.1124

ตาราง 47 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความยาวคลื่น 264 นาโนเมตร ($n = 3$)

ความเข้มข้นของสารละลาย มาตรฐานกรดแกลลิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย (A.U.)	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
		(SD)
1.00	0.0497	0.0003
2.00	0.0924	0.0003
3.00	0.1370	0.0003
4.00	0.1825	0.0005
5.00	0.2258	0.0002
6.00	0.2724	0.0010
7.00	0.3154	0.0001
8.00	0.3654	0.0004
9.00	0.4067	0.0004
10.00	0.4520	0.0002
15.00	0.6836	0.0006
20.00	0.9126	0.0004
25.00	1.1547	0.0004
30.00	1.3754	0.0011
40.00	1.8157	0.0014
50.00	2.2426	0.0055

ตาราง 47 (ต่อ)

ความเข้มข้นของสารละลาย มาตรฐานกรดแกลลิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย (A.U.)	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)
60.00	2.6074	0.0072
70.00	2.8584	0.0138
80.00	2.9817	0.0469
90.00	3.0817	0.0597
100.00	3.1735	0.0447

ตาราง 48 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความยาวคลื่น 265 นาโนเมตร (n = 3)

ความเข้มข้นของสารละลาย มาตรฐานกรดแกลลิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย (A.U.)	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)
1.00	0.0482	0.0007
2.00	0.0905	0.0002
3.00	0.1349	0.0007
4.00	0.1810	0.0001
5.00	0.2237	0.0004
6.00	0.2702	0.0008
7.00	0.3134	0.0003

ตาราง 48 (ต่อ)

ความเข้มข้นของสารละลาย มาตรฐานกรดแกลลิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย (A.U.)	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)
8.00	0.3642	0.0007
9.00	0.4056	0.0008
10.00	0.4523	0.0004
15.00	0.6844	0.0002
20.00	0.9153	0.0003
25.00	1.1633	0.0009
30.00	1.3874	0.0003
40.00	1.8367	0.0025
50.00	2.2683	0.0137
60.00	2.6194	0.0264
70.00	2.8443	0.0263
80.00	3.0051	0.0582
90.00	3.1106	0.0634
100.00	3.0855	0.0501

ตาราง 49 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความยาวคลื่น 266 นาโนเมตร ($n = 3$)

ความเข้มข้นของสารละลาย มาตรฐานกรดแกลลิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย (A.U.)	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
		(SD)
1.00	0.0474	0.0003
2.00	0.0890	0.0003
3.00	0.1333	0.0003
4.00	0.1789	0.0001
5.00	0.2216	0.0003
6.00	0.2675	0.0006
7.00	0.3107	0.0004
8.00	0.3630	0.0006
9.00	0.4037	0.0008
10.00	0.4515	0.0004
15.00	0.6829	0.0003
20.00	0.9165	0.0003
25.00	1.1685	0.0011
30.00	1.3952	0.0021
40.00	1.8501	0.0004
50.00	2.2912	0.0076

ตาราง 49 (ต่อ)

ความเข้มข้นของสารละลาย มาตรฐานกรดแก๊สลิค (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย (A.U.)	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)
60.00	2.6447	0.0061
70.00	2.8757	0.0488
80.00	2.9964	0.0376
90.00	3.1178	0.0678
100.00	3.1941	0.0688

ตาราง 50 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดแก๊สลิคที่ความยาวคลื่น 267 นาโนเมตร (n = 3)

ความเข้มข้นของสารละลาย มาตรฐานกรดแก๊สลิค (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย (A.U.)	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)
1.00	0.0459	0.0004
2.00	0.0868	0.0003
3.00	0.1305	0.0033
4.00	0.1760	0.0004
5.00	0.2176	0.0004
6.00	0.2633	0.0006
7.00	0.3064	0.0002

ตาราง 50 (ต่อ)

ความเข้มข้นของสารละลาย มาตรฐานกรดแกลลิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย (A.U.)	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)
8.00	0.3596	0.0009
9.00	0.3997	0.0003
10.00	0.4478	0.0003
15.00	0.6778	0.0006
20.00	0.9139	0.0007
25.00	1.1688	0.0008
30.00	1.3968	0.0013
40.00	1.8570	0.0039
50.00	2.3042	0.0038
60.00	2.6461	0.0132
70.00	2.8794	0.0649
80.00	2.9560	0.0333
90.00	3.1046	0.0734
100.00	3.1862	0.0158

ตาราง 51 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความยาวคลื่น 268 นาโนเมตร ($n = 3$)

ความเข้มข้นของสารละลาย มาตรฐานกรดแกลลิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย (A.U.)	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
		(SD)
1.00	0.0445	0.0001
2.00	0.0842	0.0002
3.00	0.1273	0.0003
4.00	0.1727	0.0007
5.00	0.2135	0.0003
6.00	0.2587	0.0002
7.00	0.3017	0.0002
8.00	0.3548	0.0002
9.00	0.3952	0.0006
10.00	0.4435	0.0006
15.00	0.6711	0.0003
20.00	0.9079	0.0003
25.00	1.1658	0.0010
30.00	1.3921	0.0014
40.00	1.8526	0.0045
50.00	2.2965	0.0097

ตาราง 51 (ต่อ)

ความเข้มข้นของสารละลาย มาตรฐานกรดแกลลิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย (A.U.)	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)
60.00	2.6452	0.0257
70.00	2.8352	0.0562
80.00	2.9850	0.0315
90.00	3.1126	0.0903
100.00	3.2134	0.1141

6. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดกรดแกลลิก

6.1 ผลการศึกษาชนิดของตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด (Types of solvent)

จากการศึกษาชนิดของตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด ซึ่งข้อมูลค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกในตัวอย่างน้ำผึ้งที่ใช้ตัวทำละลายในการสกัดทั้ง 3 ชนิด แสดงผลดังตาราง 52 ถึง 54

ตาราง 52 ค่าการดูดกลืนแสงของเมทานอล

ตัวอย่างน้ำผึ้ง	ค่าการดูดกลืนแสง (A.U.)			ค่าเฉลี่ย \pm SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
H1	0.7593	0.7595	0.7600	0.7596 \pm 0.0004
H2	0.7570	0.7554	0.7553	0.7559 \pm 0.0010
H3	0.5235	0.5224	0.5223	0.5227 \pm 0.0007
H4	0.5687	0.5688	0.5691	0.5689 \pm 0.0002
H5	0.4393	0.4384	0.4385	0.4387 \pm 0.0002
H6	0.4309	0.4287	0.4287	0.4294 \pm 0.0013

ตาราง 53 ค่าการดูดกลืนแสงของเอทานอล

ตัวอย่างน้ำผึ้ง	ค่าการดูดกลืนแสง (A.U.)			ค่าเฉลี่ย \pm SD
	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3	
H1	0.7870	0.7854	0.7847	0.7857 \pm 0.0012
H2	0.7738	0.7733	0.7730	0.7734 \pm 0.0004
H3	0.5522	0.5515	0.5518	0.5518 \pm 0.0004
H4	0.5864	0.5852	0.5850	0.5855 \pm 0.0008
H5	0.4662	0.4645	0.4645	0.4651 \pm 0.0010
H6	0.4486	0.4474	0.4480	0.4480 \pm 0.0006

ตาราง 54 ค่าการดูดกลืนแสงของเมทานอลต่อเอทานอล อัตราส่วน 1 ต่อ 1 โดยปริมาตร

ตัวอย่างน้ำผึ้ง	ค่าการดูดกลืนแสง (A.U.)			ค่าเฉลี่ย \pm SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
H1	0.7645	0.7636	0.7637	0.7639 \pm 0.0005
H2	0.7618	0.7615	0.7609	0.7614 \pm 0.0005

ตาราง 54 (ต่อ)

ตัวอย่างน้ำผึ้ง	ค่าการดูดกลืนแสง (A.U.)			ค่าเฉลี่ย \pm SD
	สกัดครั้งที่ 1	สกัดครั้งที่ 2	สกัดครั้งที่ 3	
H3	0.5405	0.5389	0.5388	0.5394 \pm 0.0010
H4	0.5506	0.5496	0.5496	0.5499 \pm 0.0006
H5	0.4407	0.4402	0.4403	0.4404 \pm 0.0003
H6	0.4303	0.4296	0.4300	0.4300 \pm 0.0004

6.2 ผลการศึกษาปริมาตรตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด (Solvent volumes)

จากการศึกษาปริมาตรตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด ซึ่งข้อมูลค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกในตัวอย่งน้ำผึ้งที่ใช้ปริมาตรในการสกัด 5 และ 10 มิลลิลิตร แสดงผลดังตาราง 55 และ 56

ตาราง 55 ค่าการดูดกลืนแสงของเอทานอล ปริมาตร 5.00 มิลลิลิตร

ตัวอย่างน้ำผึ้ง	ค่าการดูดกลืนแสง (A.U.)			ค่าเฉลี่ย \pm SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
H1	0.7905	0.7904	0.7906	0.7905 \pm 0.0001
H2	0.7574	0.7551	0.7556	0.7560 \pm 0.0012
H3	0.5679	0.5672	0.5671	0.5674 \pm 0.0004
H4	0.5729	0.5713	0.5710	0.5717 \pm 0.0010
H5	0.4635	0.4625	0.4629	0.4630 \pm 0.0005
H6	0.4406	0.4396	0.4394	0.4399 \pm 0.0006

ตาราง 56 ค่าการดูดกลืนแสงของเอทานอล ปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร

ตัวอย่างน้ำผึ้ง	ค่าการดูดกลืนแสง (A.U.)			ค่าเฉลี่ย \pm SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
H1	0.4902	0.4899	0.4898	0.4900 \pm 0.0002
H2	0.5020	0.4992	0.4988	0.5000 \pm 0.0017

ตาราง 56 (ต่อ)

ตัวอย่างน้ำผึ้ง	ค่าการดูดกลืนแสง (A.U.)			ค่าเฉลี่ย \pm SD
	สกัดครั้งที่ 1	สกัดครั้งที่ 2	สกัดครั้งที่ 3	
H3	0.3583	0.3577	0.3576	0.3579 \pm 0.0004
H4	0.3503	0.3495	0.3493	0.3497 \pm 0.0005
H5	0.2781	0.2767	0.2773	0.2774 \pm 0.0007
H6	0.2789	0.2784	0.2788	0.2787 \pm 0.0003

6.3 ผลการศึกษาเวลาที่ใช้ในการปั่นหรือยึ่งที่เหมาะสมในการสกัด (Mixing times)

จากการศึกษาเวลาในการปั่นหรือยึ่งที่เหมาะสมในการสกัด ซึ่งข้อมูลค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกในตัวอย่างน้ำผึ้งที่ใช้เวลาในการปั่นหรือยึ่ง 3, 5 และ 10 นาที แสดงผลดังตาราง 57 ถึง 59

ตาราง 57 ค่าการดูดกลืนแสงของเอทานอลที่เวลาปั่นหรือยึ่ง 3 นาที

ตัวอย่างน้ำผึ้ง	ค่าการดูดกลืนแสง (A.U.)			ค่าเฉลี่ย \pm SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
H1	0.7656	0.7648	0.7654	0.7653 \pm 0.0004

ตาราง 57 (ต่อ)

ตัวอย่างน้ำผึ้ง	ค่าการดูดกลืนแสง (A.U.)			ค่าเฉลี่ย \pm SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
H2	0.7347	0.7352	0.7357	0.7352 \pm 0.0005
H3	0.5531	0.5523	0.5523	0.5526 \pm 0.0005
H4	0.5884	0.5888	0.5891	0.5888 \pm 0.0004
H5	0.4515	0.4513	0.4518	0.4515 \pm 0.0003
H6	0.4465	0.4456	0.4459	0.4460 \pm 0.0005

ตาราง 58 ค่าการดูดกลืนแสงของเอทานอลที่เวลาบ่มเหวียง 5 นาที

ตัวอย่างน้ำผึ้ง	ค่าการดูดกลืนแสง (A.U.)			ค่าเฉลี่ย \pm SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
H1	0.7856	0.7854	0.7863	0.7858 \pm 0.0005
H2	0.7526	0.7515	0.7518	0.7520 \pm 0.0006
H3	0.5535	0.5539	0.5536	0.5537 \pm 0.0002

ตาราง 58 (ต่อ)

ตัวอย่างน้ำผึ้ง	ค่าการดูดกลืนแสง (A.U.)			ค่าเฉลี่ย \pm SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
H4	0.5754	0.5743	0.5741	0.5746 \pm 0.0007
H5	0.4466	0.4470	0.4471	0.4469 \pm 0.0003
H6	0.4350	0.4345	0.4345	0.4347 \pm 0.0003

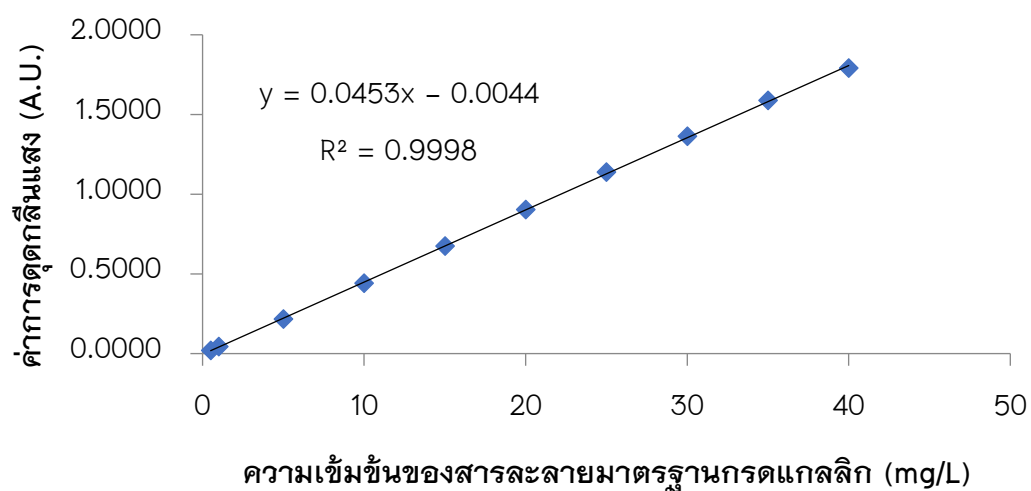
ตาราง 59 ค่าการดูดกลืนแสงของเอทานอลที่เวลาบ่มเหวียง 10 นาที

ตัวอย่างน้ำผึ้ง	ค่าการดูดกลืนแสง (A.U.)			ค่าเฉลี่ย \pm SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
H1	0.7966	0.7956	0.7956	0.7959 \pm 0.0006
H2	0.7768	0.7759	0.7763	0.7763 \pm 0.0005
H3	0.5421	0.5414	0.5413	0.5416 \pm 0.0004
H4	0.5946	0.5934	0.5935	0.5938 \pm 0.0007
H5	0.4537	0.4535	0.4530	0.4534 \pm 0.0004

ตาราง 59 (ต่อ)

ตัวอย่างน้ำผึ้ง	ค่าการดูดกลืนแสง (A.U.)			ค่าเฉลี่ย \pm SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
H6	0.4573	0.4555	0.4559	0.4562 \pm 0.0009

7. กราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก



ภาพ 29 กราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก เพื่อคำนวณหาขีดจำกัดการตรวจวัด (Limit of Detection, LOD) และขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantization, LOQ)

8. ค่าการดูดกลืนแสงของเอทานอลต่อน้ำปราศจากไอออน (5:1 v/v) ที่ความยาวคลื่น 266 นาโนเมตร เพื่อคำนวณขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด

ตาราง 60 ค่าการดูดกลืนแสงของเอทานอลต่อน้ำปราศจากไอออน (5:1 v/v)

ครั้งที่	ค่าการดูดกลืนแสงของเอทานอลต่อ น้ำปราศจากไอออน
	Ethanol : DI (5:1 v/v)
1	0.0002
2	0.0007
3	0.0007
4	0.0005
5	0.0006
6	0.0003
7	0.0006
8	0.0001
9	-0.0006
10	0.0000
11	0.0010
เฉลี่ย	0.0004
SD	0.0004

ภาคผนวก ข

การคำนวณ

1. การเตรียมสารละลายมาตรฐานจากสารที่เป็นของแข็ง

จากการเทียบบัญญัติไตรยางศ์

ตัวอย่าง เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริก ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 250 มิลลิลิตร จากสารมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริก 94.0 % สารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริก ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร หมายถึง สารละลาย 1000.00 mL มีสารมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริก 100 mg

ต้องการเตรียมสารละลาย 250.00 mL จะมีสารมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริก

$$\frac{250.00 \text{ mL} \times 100 \text{ mg}}{1000 \text{ mL}} = 25.00 \text{ mg}$$

จากความเข้มข้นสารละลายมาตรฐาน 94.0 % หมายความว่า ถ้าต้องการเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริก 94.0 mg ต้องชั่งสารมาตรฐาน 100 mg ต้องการเตรียมสารมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริก 25.00 mg ต้องชั่งสารมาตรฐาน

$$\frac{25.00 \text{ mg} \times 100 \text{ mg}}{94.0 \text{ mg}} = 25.80 \text{ mg}$$

ดังนั้น เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริก ความเข้มข้น 100.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 250.00 มิลลิลิตร โดยชั่งสารมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริก 25.80 มิลลิกรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน ในขวดวัดปริมาตร ขนาด 250 มิลลิลิตร

2. การเตรียมสารละลายจากสารที่เป็นของเหลว

สูตรที่ใช้ $C_1V_1 = C_2V_2$

เมื่อ $C_1 =$ ความเข้มข้นของสารละลายก่อนเจือจาง (มิลลิกรัมต่อลิตร)

$V_1 =$ ปริมาตรของสารละลายก่อนเจือจาง (มิลลิลิตร)

$C_2 =$ ความเข้มข้นของสารละลายหลังเจือจาง (มิลลิกรัมต่อลิตร)

$V_2 =$ ปริมาตรของสารละลายหลังเจือจาง (มิลลิลิตร)

ตัวอย่าง เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริก ความเข้มข้น 5.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 50.00 มิลลิลิตร จากสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริกความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$(100 \text{ mg/L})(V_1) = (5.00 \text{ mg/L})(50.00 \text{ mL})$$

$$V_1 = \frac{5.00 \text{ mg/L} \times 50.00 \text{ mL}}{100 \text{ mg/L}}$$

$$V_1 = 2.50 \text{ mL}$$

ดังนั้น เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริกความเข้มข้น 5.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 50.00 มิลลิลิตร โดยปิเปตสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริก ความเข้มข้น 100.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 2.50 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน ในขวดวัดปริมาตร ขนาด 50.00 มิลลิลิตร

3. การคำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard derivative, SD)

$$\text{ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)} = \sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{n-1}}$$

เมื่อ \bar{x} = ค่าเฉลี่ยของแต่ละชุดข้อมูล

n = จำนวนชุดข้อมูลทั้งหมด

\sum = ผลรวม

x = ข้อมูล

ตาราง 61 ค่าการดูดกลืนแสงของเอทานอลต่อน้ำปราศจากไอออน (5:1 v/v) ที่ความยาวคลื่น 272 นาโนเมตร

ครั้งที่	ค่าการดูดกลืนแสงของเอทานอลต่อ น้ำปราศจากไอออน
	Etanol: DI (5:1 v/v)
1	0.0004

ตาราง 61 (ต่อ)

ครั้งที่	ค่าการดูดกลืนแสงของเอทานอลต่อ น้ำปราศจากไอออน
	Etanol: DI (5:1 v/v)
3	0.0004
4	-0.0003
5	0.0006
6	0.0002
7	0.0003
8	0.0014
9	0.0002
10	0.0003
11	0.0005
เฉลี่ย	0.0004

จากสูตร $SD = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n-1}}$

SD =

$$\sqrt{\frac{(0.0004-0.0004)^2 + (-0.0003-0.0004)^2 + (0.0006-0.0004)^2 + (0.0002-0.0004)^2 + (0.0003-0.0004)^2 + (0.0014-0.0004)^2 + (0.0002-0.0004)^2 + (0.0003-0.0004)^2 + (0.0005-0.0004)^2}{11-1}}$$

SD = 0.0004

4. การคำนวณขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด

Limit of detection (LOD)

$$\text{สูตรที่ใช้} \quad \text{LOD} = \frac{3\text{SD}}{\text{Slope}}$$

Limit of quantitation (LOQ)

$$\text{สูตรที่ใช้} \quad \text{LOQ} = \frac{10\text{SD}}{\text{Slope}}$$

เมื่อ LOD = ขีดจำกัดการตรวจพบ (มิลลิกรัมต่อลิตร)

LOQ = ขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณ (มิลลิกรัมต่อลิตร)

SD = ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

Slope = ความชัน

จากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน $y = 0.102x + 0.0116$ ($R^2 = 1$)

$$\text{จากสมการ} \quad \text{LOD} = \frac{3\text{SD}}{\text{Slope}}$$

$$\text{LOD} = \frac{(3 \times 0.0004)}{0.0943}$$

$$\text{LOD} = 0.01 \text{ มิลลิกรัมต่อลิตร}$$

$$\text{จากสมการ} \quad \text{LOQ} = \frac{10\text{SD}}{\text{Slope}}$$

$$\text{LOQ} = \frac{(10 \times 0.0004)}{0.0943}$$

$$\text{LOQ} = 0.05 \text{ มิลลิกรัมต่อลิตร}$$

4. ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

ตาราง 62 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทโทคูมาริก ความเข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร

ครั้งที่	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทโทคูมาริก	
	1.00 mg/L	
1	0.1052	
2	0.1051	
3	0.1046	
4	0.1047	
5	0.1051	
6	0.1065	
7	0.1054	
เฉลี่ย	0.1052	
SD	0.0007	

จากสูตร

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

$$\%RSD = \frac{0.0007}{0.1052} \times 100$$

$$\%RSD = 0.66 \%$$

4. การคำนวณหาปริมาณกรดออร์โทคูมาริกในน้ำผึ้ง

ตัวอย่าง สารละลายตัวอย่างน้ำผึ้ง (อำเภอเชียงใหม่) ได้ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย เท่ากับ

2.9080

$$\text{สมการเส้นตรง} \quad y = 0.0943x + 0.0281$$

$$0.8217 = 0.0943x + 0.0281$$

$$x = \frac{0.8217 - 0.0281}{0.0943}$$

$$x = 8.416 \text{ ppm}$$

เนื่องจากตัวอย่างถูกเจือจางลง 10 เท่า ดังนั้น น้ำผึ้งอำเภอเชียงใหม่ มีปริมาณกรดออร์โทคูมาริก $8.416 \times 10 = 84.16$ มิลลิกรัมต่อลิตร

5. การหาร้อยละการได้กลับคืน (%Recovery)

ร้อยละการได้กลับคืนคำนวณได้จาก

$$\% \text{Recovery} = \frac{(C_1 - C_0)}{C} \times 100$$

เมื่อ C_1 = ความเข้มข้นของตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน (ppm)

C_0 = ความเข้มข้นของสารที่สนใจในตัวอย่าง (ppm)

C = ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติม (ppm)

ตัวอย่าง

ความเข้มข้นของตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน (C_1) = 6.2372 ppm

ความเข้มข้นของตัวอย่าง (C_0) = 1.5564 ppm

ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติม = 5.00 ppm

$$\text{จะได้} \quad \% \text{Recovery} = \frac{(6.2372 - 1.5564)}{5.00} \times 100$$

$$\% \text{Recovery} = 94$$

ดังนั้น ค่าร้อยละการได้กลับคืนที่ 5.00 มิลลิกรัมต่อลิตร คือ 94 %

6. การแปลงหน่วยจากมิลลิกรัมต่อลิตรเป็นมิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ตัวอย่าง ซึ่งตัวอย่างน้ำผึ้ง(อำเภอเชียงม่วน)มา 1.6613 กรัม นำไปสกัดด้วยน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร และเมทานอล ปริมาตร 5.00 มิลลิลิตร พบว่ามีความเข้มข้น กรดคอร์โทคูมาริก 81.46 มิลลิกรัมต่อลิตร ต้องการเปลี่ยนหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตร เป็นมิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

84.16 มิลลิกรัมต่อลิตร หมายความว่า

สารละลาย 1000.00 mL มีปริมาณกรดคอร์โทคูมาริก 84.16 mg

$$\begin{aligned} \text{ถ้าสารละลาย 10.00 mL} \quad \text{จะมีปริมาณกรดคอร์โทคูมาริก} &= \frac{84.16 \text{ mg} \times 10.00 \text{ mL}}{1000.00 \text{ mL}} \\ &= 0.8416 \text{ mg} \end{aligned}$$

1 กิโลกรัม = 1000 กรัม

ตัวอย่างน้ำผึ้ง(อำเภอเชียงม่วน) 1.6678 g มีปริมาณกรดคอร์โทคูมาริก 0.8416 mg

$$\begin{aligned} \text{ถ้าตัวอย่างน้ำผึ้ง 1000 กรัม} \quad \text{จะมีปริมาณกรดคอร์โทคูมาริก} &= \frac{0.8416 \text{ mg} \times 1000 \text{ g}}{1.6613 \text{ g}} \\ &= 506.59 \text{ mg} \end{aligned}$$

ดังนั้น ปริมาณกรดคอร์โทคูมาริกในตัวอย่างน้ำผึ้ง ความเข้มข้น 81.46 มิลลิกรัมต่อลิตร เท่ากับ 506.59 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ภาคผนวก ค

ภาพประกอบการศึกษาวิจัย

1. ตัวอย่างน้ำผึ้งทั้ง 6 อำเภอ



ภาพ 30 น้ำผึ้ง (Honey) อำเภอเมือง



ภาพ 31 น้ำผึ้ง (Honey) อำเภอปง



ภาพ 32 น้ำผึ้ง (Honey) อำเภอเชียงคำ



ภาพ 33 น้ำผึ้ง (Honey) อำเภอเชียงม่วน



ภาพ 34 น้ำผึ้ง (Honey) อำเภอภูพาน



ภาพ 35 น้ำผึ้ง (Honey) อ้าเภอแม่ใจ

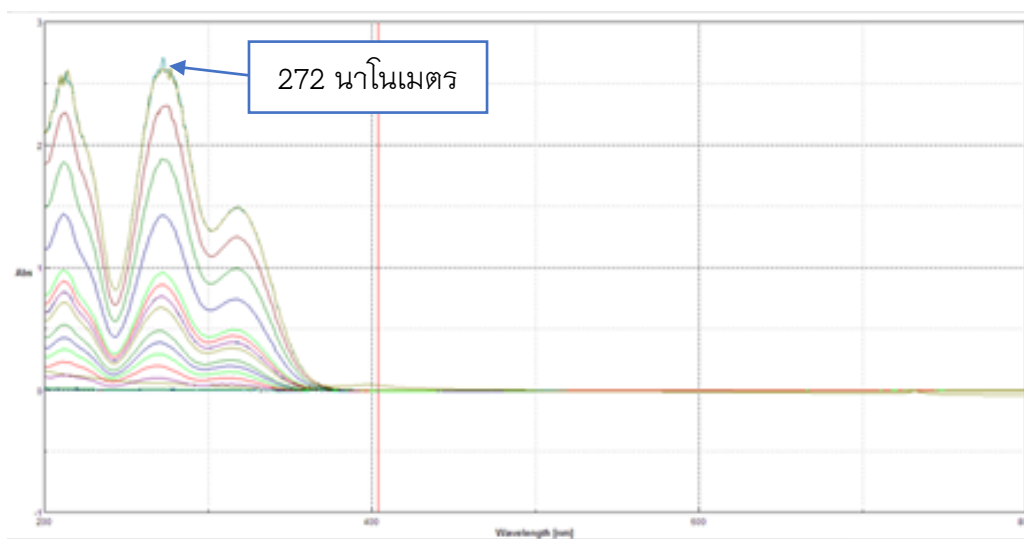


ภาพ 36 ลักษณะสีของตัวอย่างน้ำผึ้ง

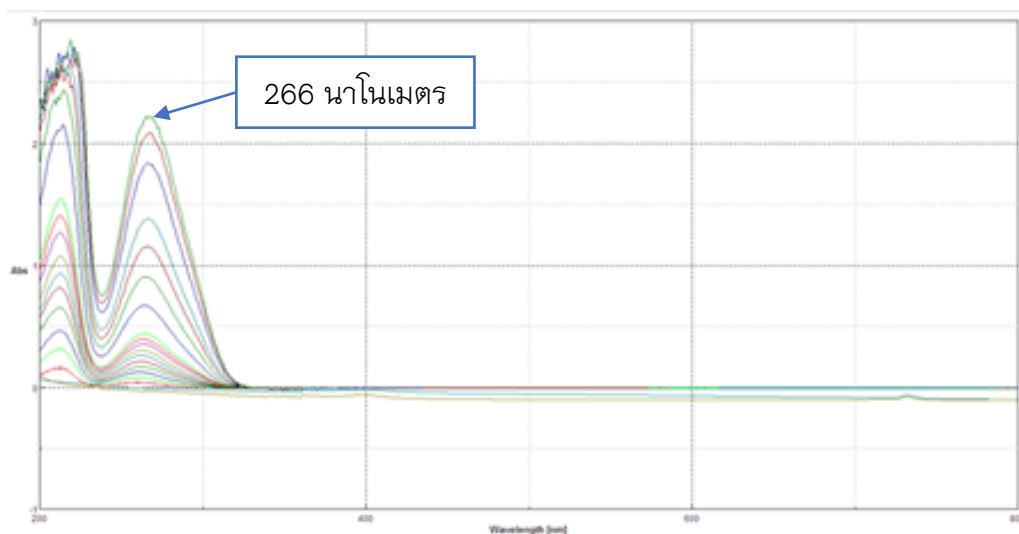
2. เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์



ภาพ 37 เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (UV-visible Spectrophotometer)

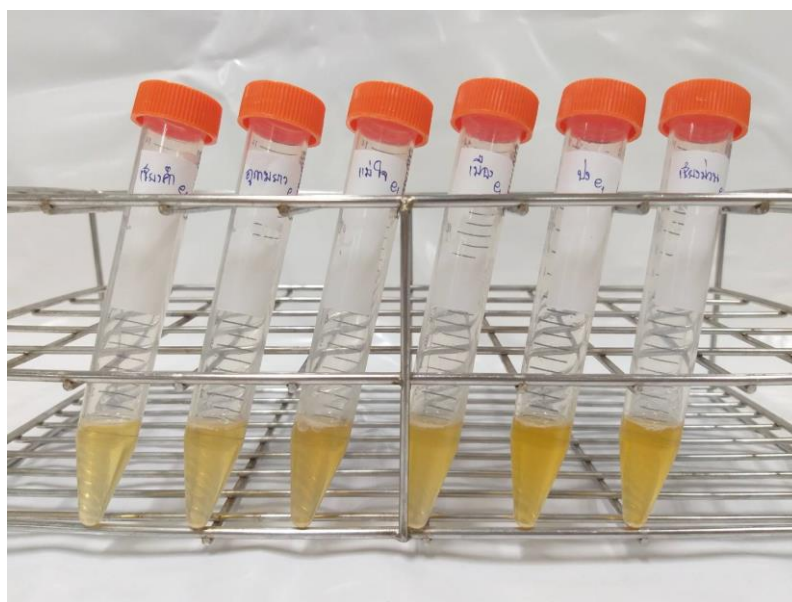


ภาพ 38 การสแกนหาความยาวคลื่นสูงสุดของสารละลายมาตรฐานกรดออร์โทคูมาริกที่
ความเข้มข้น 0.10-60.00 ppm

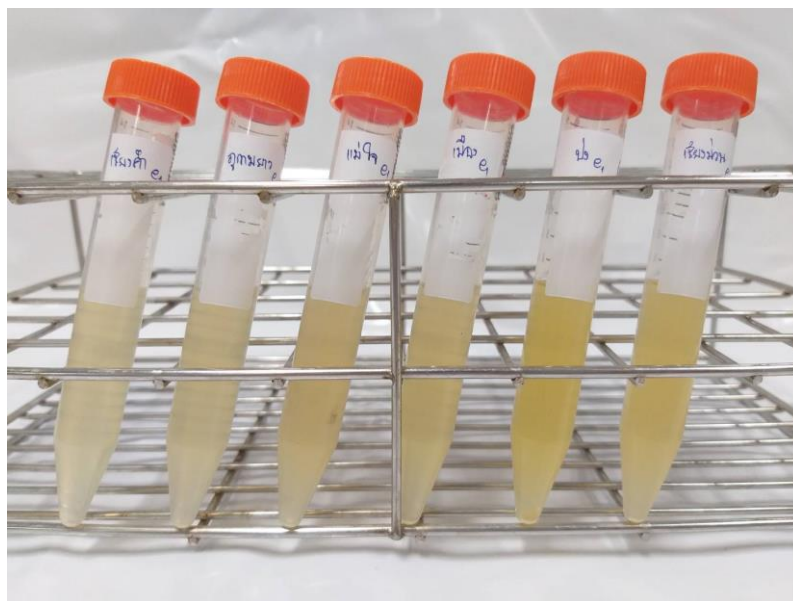


ภาพ 39 การสแกนหาความยาวคลื่นสูงสุดของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 0.10–100.00 ppm

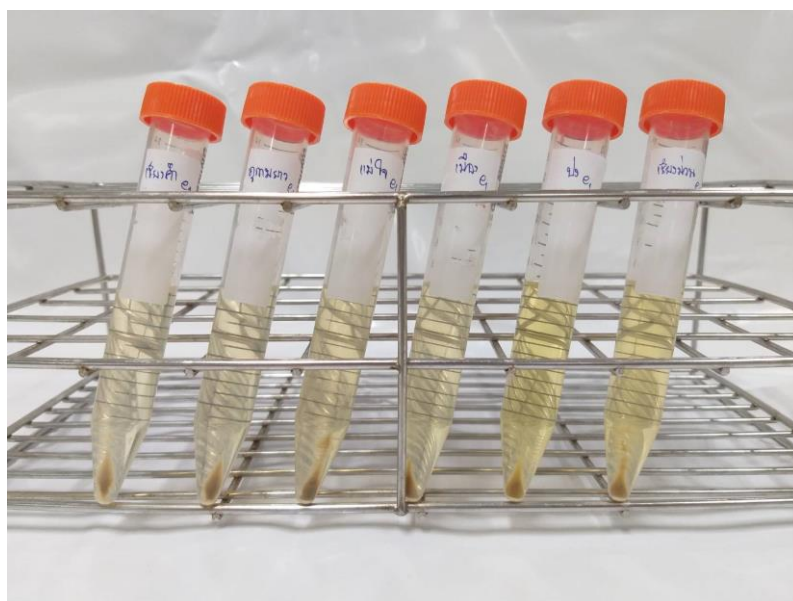
3. วิธีการดำเนินการทำวิจัย



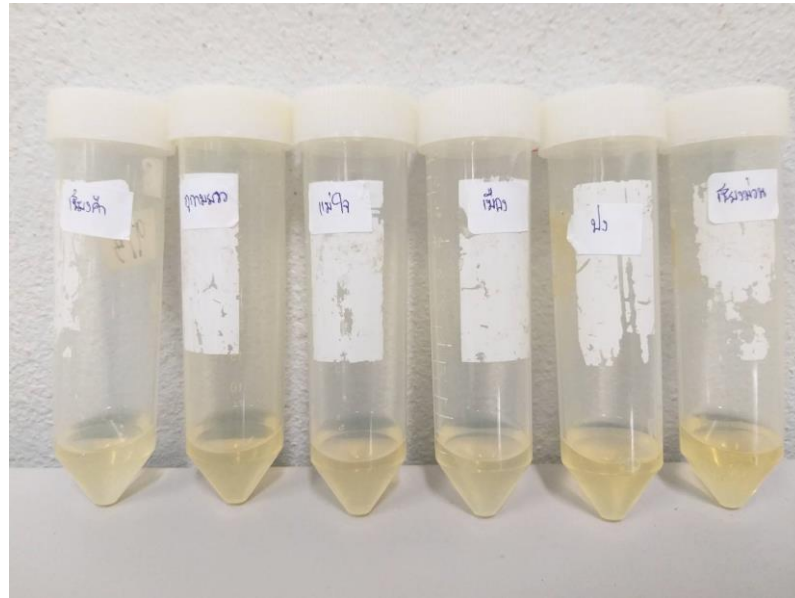
ภาพ 40 ตัวอย่างน้ำผึ้ง 1.66 กรัม (หลังละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน 1 มิลลิลิตร)



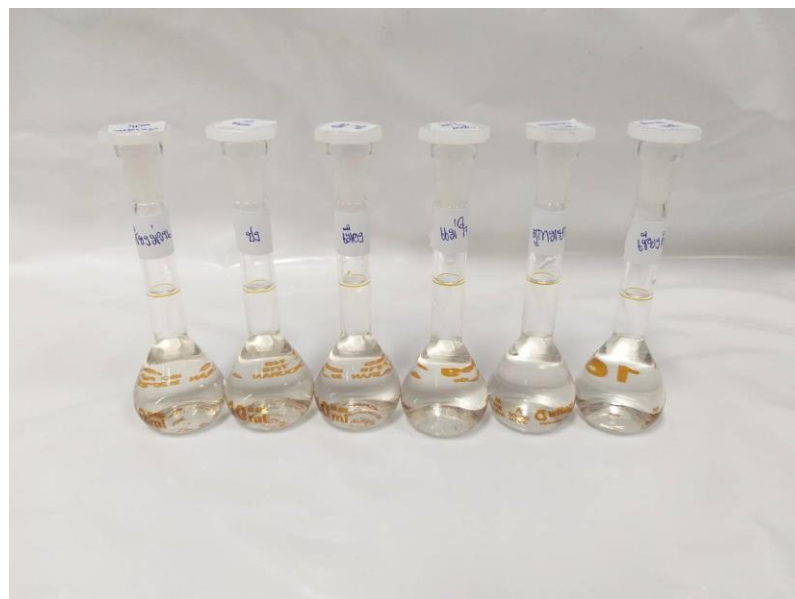
ภาพ 41 ตัวอย่างน้ำผึ้งที่สกัดด้วยเอทานอล 5 มิลลิลิตร (หลังการเขย่า)



ภาพ 42 ตัวอย่างน้ำผึ้งที่ทำการสกัดด้วยเอทานอล (หลังการปั่นเหวี่ยง)



ภาพ 43 ตัวอย่างน้ำผึ้งหลังการสกัดด้วยเอทานอล



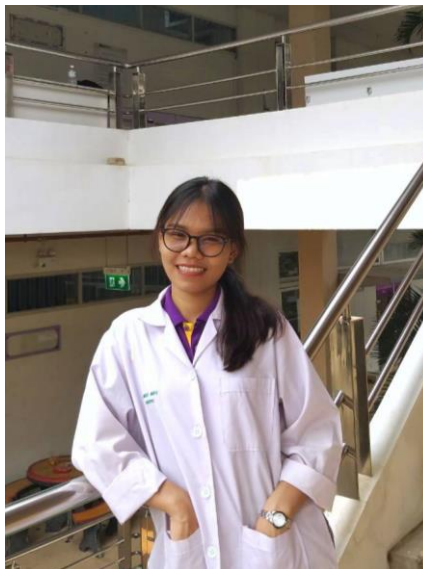
ภาพ 44 ตัวอย่างน้ำผึ้งที่เจือจางลง 10 เท่า

ประวัติผู้ศึกษาวิจัย



ชื่อ-สกุล	นางสาวอัญญรัตน์ ศีละพงษ์
วันเดือนปีเกิด	15 พฤศจิกายน 2541
ประวัติการศึกษา	<ul style="list-style-type: none"> - ระดับชั้นมัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนท้าวพันอนุสรณ์ จังหวัดอุทัยธานี ปีที่จบ 2555 - ระดับชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนท้าวพันอนุสรณ์ จังหวัดอุทัยธานี ปีที่จบ 2558
ที่อยู่ปัจจุบัน	62 หมู่ 4 ต.หนองหลวง อ.สว่างอารมณ์ จ.อุทัยธานี 61150
เบอร์โทรศัพท์ติดต่อ	091-1122469
อีเมลล์	anyarat2469@gmail.com

ประวัติผู้ศึกษาวิจัย



ชื่อ-สกุล

นางสาวอารีรัตน์ บุญโย

วันเดือนปีเกิด

6 กันยายน 2541

ประวัติการศึกษา

- ระดับชั้นมัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนแหลมรั้งวิทยาคม
จังหวัดพิจิตร ปีที่จบ 2555

- ระดับชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนแหลมรั้งวิทยาคม
จังหวัดพิจิตร ปีที่จบ 2558

ที่อยู่ปัจจุบัน

468 หมู่ 8 ต.แหลมรั้ง อ.บึงนาราง จ.พิจิตร 66130

เบอร์โทรศัพท์

061-3074202

อีเมล

arerat0609@gmail.com