การศึกษาการเกิดสารประกอบ 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2- เฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ จากปฏิกิริยาเมลลาร์ดในน้ำผึ้ง

STUDY OF 5-HYDROXYMETHYL-2-FURALDEHYDE FROM MAILLARD REACTION IN HONEY

อาทิตย์ กัณฐ์ศว์กำพล, พรพิมล ม่วงไทย, ปิยะดา จิตรตั้งประเสริฐ

***Arthid kuntatkumpol**, Pompimol muangthai, Piyada Jittangprasert*

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

Department of Chemistry, Faculty of Science, Srinakharinwirot University.

บทคัดย่อ

น้ำผึ้งเป็นอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงและถูกใช้ในการอุปโภคบริโภคเป็นเวลายาวนานกว่า 7,000 ปีก่อนคริสต์ศักราช ในน้ำผึ้งจะประกอบด้วยน้ำประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ และสารอาหารประเภทต่างๆ เช่น น้ำตาลชนิดต่างๆ ประมาณ 79 เปอร์เซ็นต์ กรดชนิดต่างๆ ประมาณ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เอนไซม์ และแร่ธาตุ (แคลเซียม, แมกนีเซียม, โปตัสเซียม, ฟอสฟอรัส) ประมาณ 0.5 เปอร์เซ็นต์ องค์ประกอบหลักของน้ำผึ้ง คือ น้ำตาล แต่อย่างไรก็ตามน้ำผึ้งจะมีสีเข้มมากขึ้นเมื่อเก็บไว้ระยะหนึ่ง ทั้งนี้อาจเนื่องจากเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ดขึ้นได้ ปฏิกิริยาเมลลาร์ดเป็นปฏิกิริยาระหว่างหมู่อะมิโนของกรดอะมิโนกับหมู่คาร์บอนิลของน้ำตาล ปฏิกิริยานี้ให้สารผลิตภัณฑ์มากมายหลายชนิด แต่สารผลิตภัณฑ์หนึ่งที่น่าสนใจ คือ สาร 5–hydroxymethyl–2–furaldehyde (HMF) เนื่องจากสาร HMF เป็นสารพิษชนิดหนึ่ง ซึ่ง HMF จะทำให้น้ำผึ้งมีสีดำคล้ำ ปริมาณของ HMF ถูกใช้ในการกำหนดคุณภาพของน้ำผึ้งในต่างประเทศ งานวิจัยนี้ได้ศึกษาหาปริมาณ HMF ในน้ำผึ้งด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง โดยศึกษาวิธีการวิเคราะห์ 3 สภาวะ ซึ่งแปรผันชนิดและปริมาณสารละลายวัฏภาคเคลื่อนที่ ได้แก่ น้ำ: อะซิโตไนทริลในอัตราส่วนร้อยละ 90:10 โดยปริมาตร สภาวะที่ 2 ใช้สารละลายน้ำ: อะซิโตไนทริลในอัตราส่วนร้อยละ 97:3 โดยปริมาตร และสภาวะที่ 3 ใช้สารละลายน้ำ: เมทานอลในอัตราส่วนร้อยละ 90:10 โดยปริมาตร เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาปัจจัยการให้ความร้อนกับน้ำผึ้งที่อุณหภูมิ 40°C, 60°C, 80°C และ 100°C ระยะเวลาในการให้ความร้อนแก่น้ำผึ้งที่เวลา 20, 40, 60, 80, 100 และ 120 นาที และระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำผึ้ง 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12 และ 24 เดือน ผลการทดลองพบว่า สภาวะที่ 2 ใช้สารละลายน้ำ: อะซีโตไนทริลในอัตราส่วนร้อยละ 97:3 โดยปริมาตรเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการแยก HMF อย่างสมบูรณ์ ผลการศึกษาปัจจัยอุณหภูมิที่ให้ความร้อนพบว่าปริมาณสาร HMF จะเพิ่มตามระดับอุณหภูมิที่ให้ความร้อนแก่น้ำผึ้ง ผลการแปรผันเวลาที่ให้ความร้อน พบว่าปริมาณสาร HMF เพิ่มตามระยะเวลาที่ให้ความร้อนแก่น้ำผึ้งอย่างชัดเจน และผลของปัจจัยระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำผึ้งที่มีต่อปริมาณสารประกอบ HMF พบว่าปริมาณสารประกอบ HMF แปรผันตามระยะเวลาในการเก็บรักษาโดยเมื่อเก็บน้ำผึ้งนาน 24 เดือน จะมีปริมาณ HMF สูงถึงประมาณ 50 ppm

คำสำคัญ: 5–ไฮดรอกซีเมทิล –2– เฟอร์ฟิวราลดีไฮด์, ปฏิกิริยาเมลลาร์ด, น้ำผึ้ง, HMF

Abstract

Honey is the high nutritive food for human more than 7000 years ago BC. It contains 20% water, 79% sugar, 0.5% amino acid and 0.5% enzyme and minerals (such as calcium, magnesium, potassium, phosphorus). Sugar is the main composition in honey. However, the honey has a darken color after storage for a range of time, since the occurrence of Maillard reaction. Maillard reaction is the reaction between amino group of amino acid and carbonyl group of sugar. This reaction produces many products, the one interested product is 5-hydroxy-methyl-2-furaldehyde (HMF). HMF is a toxic substance and make the darken color in honey. The HMF content is used to be the index to control the quality of honey in aboard. In this work, the HMF content was analysed in honey by high performance liquid chromatography by using 3 conditions variation on type and mobile phase content. In condition 1, water : acetonitrile (90:10) was used as mobile phase. In condition 2, water : acetonitrile (97:3) was also used as mobile phase and condition 3, water : methanol (90:10) was a mobile phase for HMF analysis. The factors of heating temperature (40°C, 60°C, 80°C and 100°C), heating time (20, 40, 60, 80, 100 and 120 min.) and storage time (1, 2 , 3 , 4 , 5 , 6 , 12 and 24 months) on HMF content in honey were also studied. The result presented that the condition 2, water : acetonitrile (97:3) was the best condition for complete separation HMF. From the heating temperature study found that HMF content increased as increasing heating temperature and HMF content also increased as increasing heating time. HMF contents in honey also depend on storage time and after 24 months of storage showed 50 ppm of HMF.

Keywords: 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde, Maillard reaction, Honey, HMF

บทนำ

น้ำผึ้ง คือน้ำหวานที่ผึ้งเก็บมาจากต่อมน้ำหวานของดอกไม้ (nectar) โดยผึ้งจะกลืนน้ำหวานลงสู่กระเพาะน้ำหวาน ซึ่งจะมีเอนไซม์ช่วยย่อยน้ำหวานแล้วนำมาเก็บไว้ในหลอดรวงผึ้ง จากนั้นน้ำผึ้งค่อยๆ บ่มตัวเองโดยการระเหยน้ำออกไปจนน้ำผึ้งมีปริมาณน้ำตามที่เข้มข้นขึ้นจนได้ระดับที่เหมาะสมกับการเก็บรักษาผึ้งงานก็จะปิดฝาหลอดรวง เราเรียกน้ำผึ้งนี้ว่า “น้ำผึ้งสุก” เป็นน้ำผึ้งที่ได้มาตรฐาน คือมีน้ำอยู่ไม่เกิน 20-21 เปอร์เซ็นต์

มนุษย์รู้จักนำน้ำผึ้งมาใช้ในการอุปโภคบริโภคเป็นเวลายาวนานมาก มีการพบหลักฐานยืนยันเป็นภาพวาดบนผนังถ้ำในประเทศสเปนเป็นภาพวาดรูปคนกำลังตีผึ้งเพื่อเอาน้ำผึ้ง ภาพวาดนั้นมีอายุยาวนานกว่า 7,000 ปีก่อนคริสต์ศักราช นอกจากเป็นอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงแล้ว น้ำผึ้งยังมีคุณสมบัติพิเศษอีกมากมาย เช่น สามารถเก็บไว้ได้นานโดยไม่เน่าเสีย เพราะมีความเข้มข้นสูง มีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ ทำให้ชุ่มคอ แก้ไอ ใช้รักษาแผลสดและแผลไฟไหม้

น้ำผึ้งประกอบด้วยน้ำประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลชนิดต่างๆ เช่น กลูโครส ฟลุคโตส และเลวูโรส ประมาณ 79 เปอร์เซ็นต์ โดยมีปริมาณน้ำตาล “ฟรักโทส” มากกว่าน้ำตาล “กลูโคส” เล็กน้อย ทำให้

น้ำผึ้งไม่ตกผลึก และมีรสหวานกว่าน้ำตาลชนิดอื่นๆ กรดชนิดต่างๆ ประมาณ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ทำให้น้ำผึ้งมีรสเปรี้ยวเล็กน้อยโดยกรดที่พบมาก คือกรดกลูโคนิก วิตามิน (ไรโบเฟลวิน, ไนอะซิน) เอนไซม์ และแร่ธาตุ (แคลเซียม, แมกนีเซียม, โปตัสเซียม, ฟอสฟอรัส) ประมาณ 0.5 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำผึ้งที่มีสีเข้ม จะมีปริมาณแร่ธาตุสูงกว่าน้ำผึ้งที่มีสีอ่อน ซึ่งจะเห็นได้ว่า องค์ประกอบหลักของน้ำผึ้งคือ น้ำตาล และเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดียวเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งสามารถดูดซึมเข้าสู่ร่างกายและนำไปใช้ประโยชน์ได้ง่าย โดยน้ำผึ้ง 100 กรัม จะให้พลังงาน 303 แคลอรี่ [1]

อาหารทุกชนิดเมื่อผ่านการให้ความร้อนจะเกิดปฏิกิริยาต่างๆ หลายขั้นตอน มีการสูญเสียน้ำ การสลายตัวและการรวมตัวกัน เมื่อหมู่อะมิโนเกิดการรวมตัวกันกับสารรีดิวซิง จะเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนมีสีเหลืองจนถึงสีน้ำตาลและน้ำตาลแดง เรียกการเกิดปฏิกิริยานี้ว่า “ปฏิกิริยาเมลลาร์ด” [2] จากการที่องค์ประกอบหลักของน้ำผึ้งเป็นน้ำตาลและมีกรดอะมิโนอยู่ด้วยจึงทำให้น้ำผึ้งสามารถเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ดได้ง่าย ซึ่งกระบวนการในการเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ดจะมีการเกิดสารประกอบที่เป็นอนุพันธ์ของฟูแรน (Furan) หากเป็นน้ำตาลเฮกโซสจะได้อนุพันธ์ของฟูแรนเป็น 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde (HMF) จากเหตุผลดังกล่าวทำให้ปริมาณของ HMF เป็นปัจจัยสำคัญอันหนึ่งที่ใช้ในการกำหนดคุณภาพของน้ำผึ้ง เนื่องจากสาร HMF เป็นสารก่อมะเร็งตัวหนึ่ง [3]

สารไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์นี้เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลแบบไม่ใช้เอนไซม์ (Nonenzymatic Browning Reaction) โดยสามารถเกิดได้จาก 2 กลไก คือ เกิดผ่านปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Maillard Reaction) หรือเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลที่ได้รับความร้อน [4]

สำหรับตามกำหนดมาตรฐานในต่างประเทศนิยมตรวจสอบหาสารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์ เพื่อเป็นดัชนีบ่งบอกคุณภาพของน้ำผึ้ง [5] โดยในน้ำผึ้งธรรมชาติที่เป็นน้ำผึ้งใหม่ไม่ควรมีสารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์ แต่ถ้ามีก็ไม่ควรเกิน 1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม [6] แต่สารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์จะตรวจพบได้มากในกรณีเก็บน้ำผึ้งเป็นเวลานาน ซึ่งในประเทศแถบทวีปยุโรป เช่น ประเทศเยอรมัน เบลเยียม อิตาลี ออสเตรีย สเปน จะมีกฎหมายควบคุมโดยมีเกณฑ์กำหนดว่าน้ำผึ้งควรมีปริมาณสารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์ได้สูงสุดไม่เกิน 15มิลลิกรัม/กิโลกรัม [7]

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสาร HMF ในน้ำผึ้งด้วยเทคนิคโครมาโทรกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

2. เพื่อศึกษาปัจจัยแปรผันที่มีผลต่อการเกิดสาร HMF ในน้ำผึ้ง โดยศึกษาปัจจัยแปรผัน ต่างๆ ดังนี้

2.1 อุณหภูมิในการให้ความร้อน

2.2 เวลาในการให้ความร้อน

2.3 ระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำผึ้ง

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมี

- เครื่องโครมาโทรกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง จากบริษัท Hewlett-Packard รุ่น HP 1100 โดยใช้คอลัมน์ C18 (Bondclone 10 µm ขนาด 300 x 3.90 mm) และใช้ตัวตรวจวัดแบบไดโอดอะเรย์ (diode array)
- เครื่องผลิตน้ำปราศจากไอออน จากบริษัท Millipore รุ่น Milli-Q
- เครื่องชั่งอย่างละเอียด จากบริษัท PRECISA รุ่น 220A
- อ่างน้ำร้อน
- เยื่อกรองเซลลูโลสอะซิเตตและเยื่อกรองไนลอนขนาด 0.45 ไมครอน

– สารมาตรฐานไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ (จากบริษัท Fuka เกรดโครมาโทกราฟี)

– $K_4Fe(CN)_6 . 3H_2O$

– $Zn(OAc)_2 . 2H_2O$

– อะซิโตไนทริล (Acetonitrile for HPLC grade)

– ตัวอย่างน้ำผึ้ง

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมสารละลาย

1. สารละลายมาตรฐานไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ ชั่งสารมาตรฐานไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ 0.5 กรัม นำมาเติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 500 มิลลิลิตร เขย่าจนได้สารละลายที่เป็นเนื้อเดียวกัน จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 1,000 ppm เก็บไว้ในตู้เย็นเพื่อใช้เป็น Stock Solution

2. สารละลาย Carrez I ชั่งสาร $K_4Fe(CN)_6 . 3H_2O$ 15 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

3. สารละลาย Carrez II ชั่งสาร $Zn(OAc)_2 . 2H_2O$ 15 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

1. การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ (ดัดแปลงจาก [8–10])

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

สภาวะที่ 1 ใช้ น้ำ : อะซีโตไนทริล ในอัตราส่วนร้อยละ 95:5 โดยปริมาตร

สภาวะที่ 2 ใช้ น้ำ : อะซิโตไนทริล ในอัตราส่วนร้อยละ 97:3 โดยปริมาตร

สภาวะที่ 3 ใช้ น้ำ : เมทานอล ในอัตราส่วนร้อยละ 90:10 โดยปริมาตร

ทำการชะสารที่อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ 1 มิลลิลิตร/นาที โดยติดตามการเปลี่ยนแปลงสัญญาณด้วยตัวตรวจวัดชนิดไดโอดอะเรย์ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร บันทึกโครมาโทแกรมของสารมาตรฐานและทำการสร้างกราฟมาตรฐาน

การเตรียมกราฟมาตรฐาน

เตรียมสารละลายมาตรฐานไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ เข้มข้น 1000 ppm เก็บไว้เป็นสารตั้งต้นเพื่อเตรียมสารละลายมาตรฐานไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราล ให้มีความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8,1, 2.5, 5, 10, 20, 40, 60, 80 ppm นำสารละลายมาตรฐานนี้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง ซึ่งทำการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 µ ก่อนที่จะฉีดเข้าคอลัมน์ C 18 ครั้งละ 100 ไมโครลิตร แล้วทำการชะสารด้วยตัวทำละลายอะซิโตไนทริล : น้ำ ในอัตราส่วนร้อยละ 5:95 โดยปริมาตร ทำการชะสารด้วยระบบไอโซเครติก ที่ควบคุมอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ 1 มิลลิลิตร/นาที ติดตามการเปลี่ยนแปลงสัญญาณด้วยหัววัดสาร ชนิดไดโอดอะเรย์ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร บันทึกโครมาโทแกรมของสารมาตรฐานทุกความเข้มข้น และนำค่าพื้นที่พีคที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐาน

2. การศึกษาปัจจัยแปรผันที่มีผลต่อปริมาณสารประกอบ HMF ในน้ำผึ้ง

2.1 ผลของอุณหภูมิในการให้ความร้อนน้ำผึ้งต่อปริมาณ 5–ไฮดรอกซีเมทิล–2–เฟอร์ฟิวราลดีไฮด์

วิธีการทดลอง

ชั่งน้ำผึ้ง 5 กรัม ใส่ในหลอดทดลองแต่ละหลอด จำนวน 5 หลอด โดยหลอดที่ 1 เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องส่วนหลอดที่ 2–5 นำไปผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 40, 60, 80 และ 100 องศา

เซลเซียส ตามลำดับเป็นเวลานาน 30 นาที นำไปทำให้เย็นทันทีด้วยการแช่ในอ่างน้ำแข็ง นำน้ำผึ้งที่ผ่านการให้ความร้อนมาเติมน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Carrez I 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติมสารละลาย Carrez II 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ปรับปริมาตรสารละลายให้ครบ 50 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ไปกรองด้วยกระดาษกรอง และนำไปกรองผ่านเยื่อกรองเซลลูโลสอะซิเตตขนาด 0.45 ไมครอน จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปฉีดเข้าระบบโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณ HMF ทำการบันทึกโครมาโทแกรม และนำค่าพื้นที่ใต้พีคที่ได้ไปคำนวณความเข้มข้นของสาร HMF โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

หมายเหตุ: ทำการทดลองตามวิธีการข้างต้นซ้ำอีก 2 ครั้ง เพื่อเก็บข้อมูลทางสถิติ

2.2 ผลของเวลาในการให้ความร้อนน้ำผึ้งต่อปริมาณ 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอร์ฟิวราลดีไฮด์

วิธีการทดลอง

ชั่งน้ำผึ้ง 5 กรัม ใส่ในหลอดทดลองแต่ละหลอด จำนวน 7 หลอด โดยหลอดที่ 1 เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ส่วนหลอดที่ 2-7 นำไปผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 20 40, 60, 80, 100, และ 120 นาที ตามลำดับ นำไปทำให้เย็นทันทีด้วยการแช่ในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นนำน้ำผึ้งที่ผ่านการให้ความร้อนมาเติมน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Carrez I จำนวน 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติมสารละลาย Carrez II จำนวน 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ปรับปริมาตรสารละลายให้ครบปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ไปกรองด้วยกระดาษกรอง และนำไปกรองผ่านเยื่อกรองเซลลูโลสอะซิเตตขนาด 0.45 ไมครอน จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปฉีดเข้าระบบโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณ HMF ทำการบันทึกโครมาโทแกรม และนำค่าพื้นที่ใต้พีคที่ได้ไปคำนวณความเข้มข้นของสาร HMF โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

หมายเหตุ: ทำการทดลองตามวิธีการข้างต้นซ้ำอีก 2 ครั้ง เพื่อเก็บข้อมูลทางสถิติ

2.3 ผลของเวลาเก็บรักษาน้ำผึ้งต่อปริมาณ 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอร์ฟิวราลดีไฮด์

วิธีการทดลอง

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

หมายเหตุ: ทำการทดลองตามวิธีการข้างต้นซ้ำอีก 2 ครั้ง เพื่อเก็บข้อมูลทางสถิติ

ผลการวิจัย

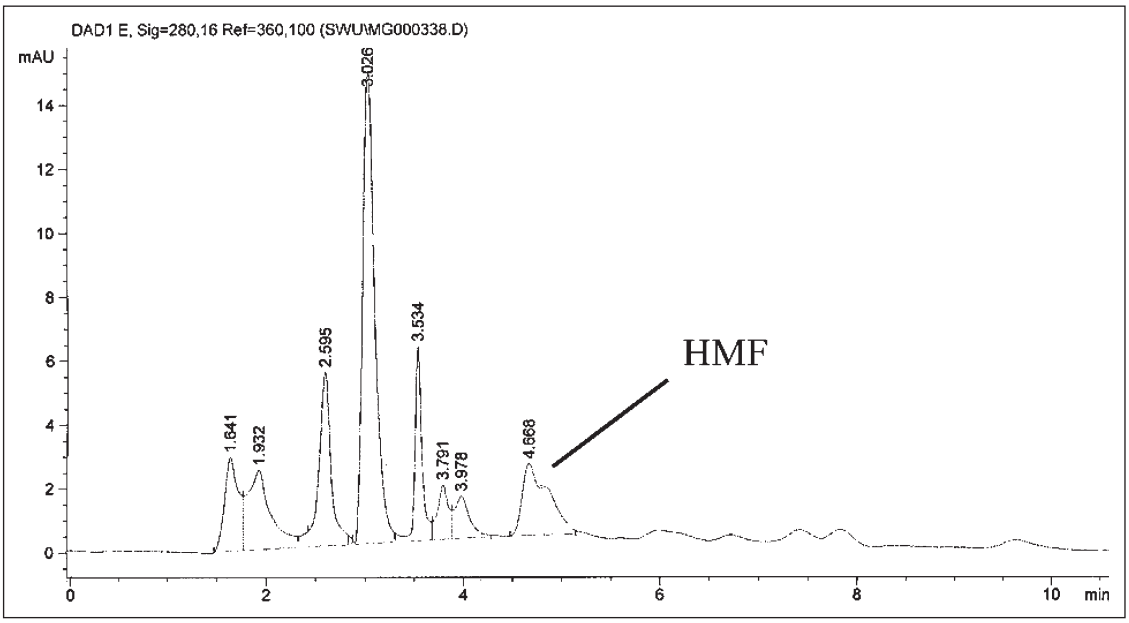
1. การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์

ผลการทดลองเกี่ยวกับเวลาในการคงอยู่บนคอลัมน์ (Retention Time) ของสารละลายมาตรฐาน HMF ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ค่าระยะเวลารีเทนชันของ HMF ณ สภาวะต่างๆ ของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้ในการศึกษา

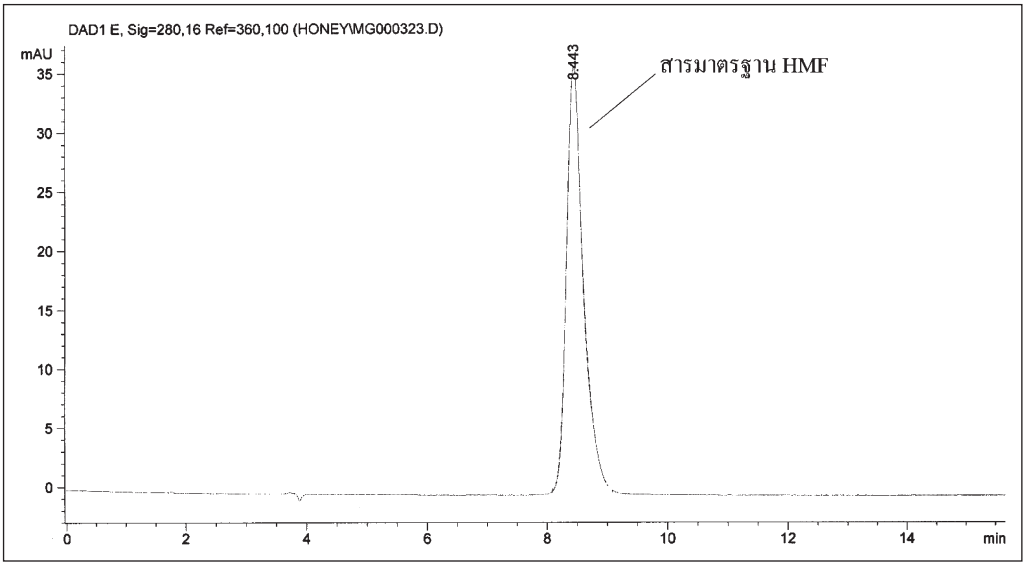
สภาวะที่ทดสอบ	เวลาในการคงอยู่บนคอลัมน์ (นาที)
1	5.16 ± 0.01
2	8.53 ± 0.07
3	7.21 ± 0.01

จากผลการทดลองในตารางที่ 1 พบว่าระยะเวลาในการคงอยู่บนคอลัมน์ ที่เกิดพีคของสาร HMF แตกต่างกัน โดยในสภาวะที่ 1 จะเกิดพีคของสาร HMF เร็วที่สุด แต่เมื่อนำไปประยุกต์ใช้กับตัวอย่างน้ำผึ้งพบว่า การใช้สภาวะที่ 1 โครมาโทแกรมที่ได้จะมีการซ้อนทับระหว่างพีคของสาร HMF กับพีคอื่นๆ ที่อยู่ในตัวอย่าง ดังภาพที่ 1 แสดงว่าไม่ใช่สภาวะที่เหมาะสมในการทดลอง



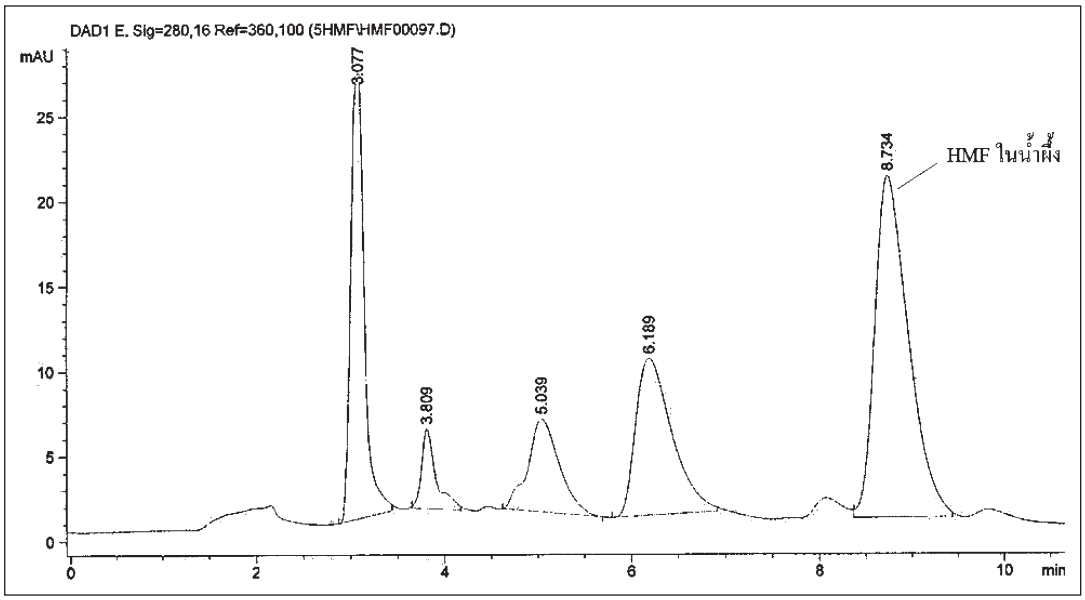
ภาพที่ 1 โครมาโทแกรมการวิเคราะห์สาร HMF ในน้ำผึ้งโดยทดลองด้วยสภาวะที่ 1

แต่เมื่อทำการทดลองด้วยสภาวะที่ 2 จะได้ผล HMF ในภาพที่ 2 ดังแสดงในตัวอย่างโครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน



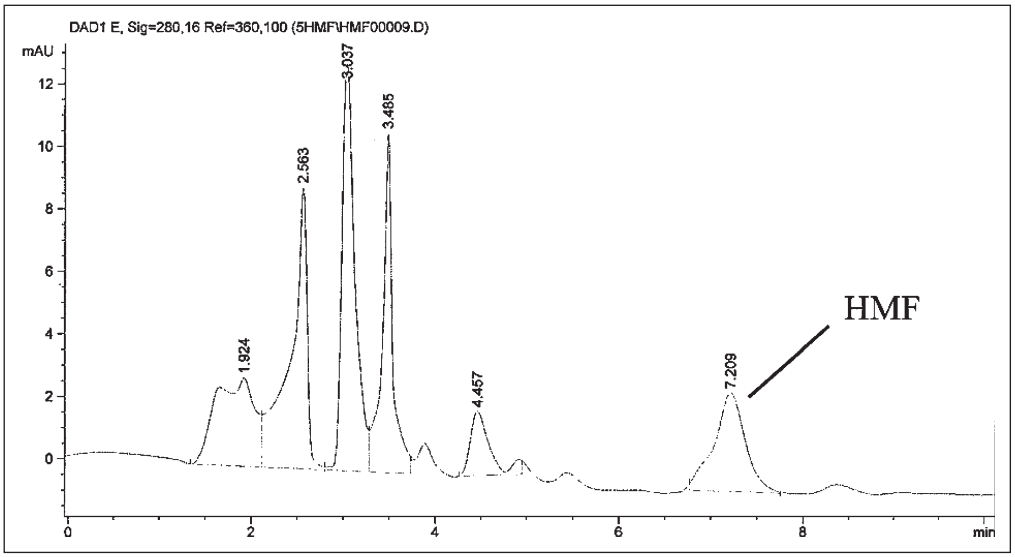
ภาพที่ 2 โครมาโทแกรมแสดงผลการวิเคราะห์สารมาตรฐาน HMF โดยใช้สภาวะที่ 2

แม้จะใช้เวลาในการวิเคราะห์นานกว่า แต่เกิดการแยกได้อย่างสมบูรณ์จากพีคอื่น เมื่อทดลองกับการวิเคราะห์ในน้ำผึ้งจริง ดังแสดงในภาพที่ 3 จึงเลือกใช้สภาวะนี้ในการวิเคราะห์ต่อไป



ภาพที่ 3 โครมาโทแกรมแสดงผลการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำผึ้งโดยใช้สภาวะที่ 2

สำหรับผลการทดลองด้วยสภาวะที่ 3 คือ ใช้น้ำและเมทานอล ในอัตราส่วนร้อยละ 90:10 โดยปริมาตร เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ พบว่าได้พีคที่มีฐานพีคกว้างมาก เนื่องจากอาจเกิดจากการแยกที่ไม่สมบูรณ์ ดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 4 โครมาโทแกรมการวิเคราะห์สาร HMF ในน้ำผึ้งโดยทดลองด้วยสภาวะที่ 3

2. การศึกษาปัจจัยแปรผันที่มีผลต่อการเกิดสาร HMF ในน้ำผึ้ง

2.1 ผลของอุณหภูมิในการให้ความร้อนที่มีต่อปริมาณ HMF ในน้ำผึ้ง

เมื่อทำการศึกษาในระบบของตัวอย่างน้ำผึ้ง โดยศึกษาผลของอุณหภูมิในการให้ความร้อนแก่น้ำผึ้ง ที่อุณหภูมิต่างๆ ตั้งแต่ 40–00 องศาเซลเซียส แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสาร HMF ผลการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ปริมาณสารประกอบ HMF ในน้ำผึ้งที่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ

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

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

2.2 การศึกษาผลของเวลาในการให้ความร้อนที่มีต่อปริมาณ HMF ในน้ำผึ้ง

ผลของเวลาในการให้ความร้อนแก่น้ำผึ้งต่อปริมาณสารประกอบ HMF ให้ผลดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ปริมาณสารประกอบ HMF ในน้ำผึ้งที่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ณ เวลาต่างๆ

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

จากการให้ความร้อนแก่น้ำผึ้งที่เวลาต่างๆ พบว่า มีการเปลี่ยนแปลงกับน้ำผึ้งคล้ายกับการทดลองในข้อ 2.1 โดยสามารถตรวจพบสาร HMF แต่เมื่อให้ความร้อนเป็นเวลานานมากขึ้น โดยจะเกิดในปริมาณมากกว่าเดิมเป็นสองเท่าเมื่อให้ความร้อนนาน 120 นาที แสดงว่าเมื่อนำน้ำผึ้งมาเคี่ยวให้ความร้อนเป็นเวลานานๆ จะมีโอกาสตรวจพบสาร HMF มากขึ้น

2.3 ผลของเวลาเก็บรักษาน้ำผึ้งต่อปริมาณสารประกอบ HMF

ในการศึกษาผลของเวลาในการเก็บรักษาน้ำผึ้งนั้น จากการนำน้ำผึ้งตัวอย่างมาจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง และสุ่มตัวอย่างวิเคราะห์หาปริมาณสาร HMF ตามระยะเวลาต่างๆ พบว่าได้ผลตามตารางที่ 4

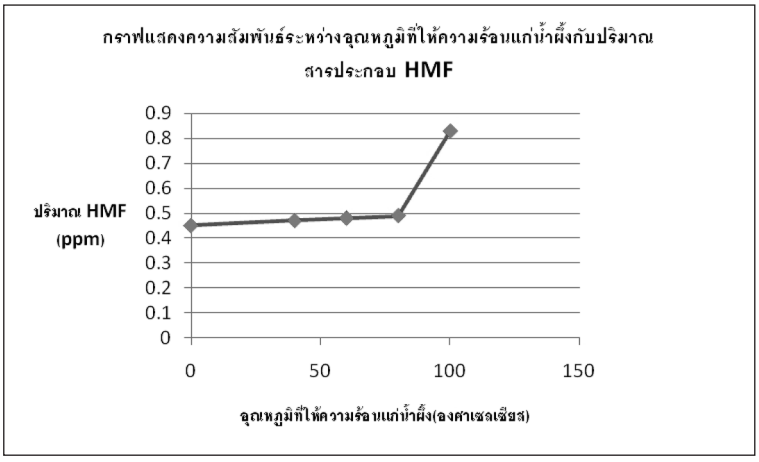
ตารางที่ 4 ปริมาณของสารประกอบ HMF ในน้ำผึ้งที่การเก็บรักษาที่ระยะเวลาต่างๆ

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

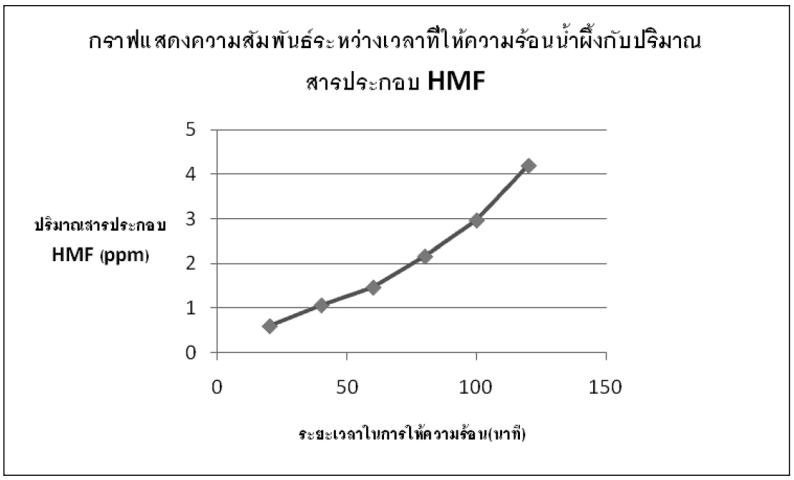
จากการเก็บรักษาน้ำผึ้งนาน 24 เดือน โดยทำการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสาร HMF เป็นระยะ พบว่ามีการเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ดมากขึ้น จึงสามารถตรวจหาสาร HMF ในปริมาณที่มากขึ้นซึ่งการเก็บนานเป็นปียิ่งมีสาร HMF มาก โดยสอดคล้องกับลักษณะทางกายภาพของน้ำผึ้งที่เก็บไว้เป็นเวลานานจะมีสีดำคล้ำมากๆ จนไม่น่าบริโภค

สรุปและอภิปรายผล

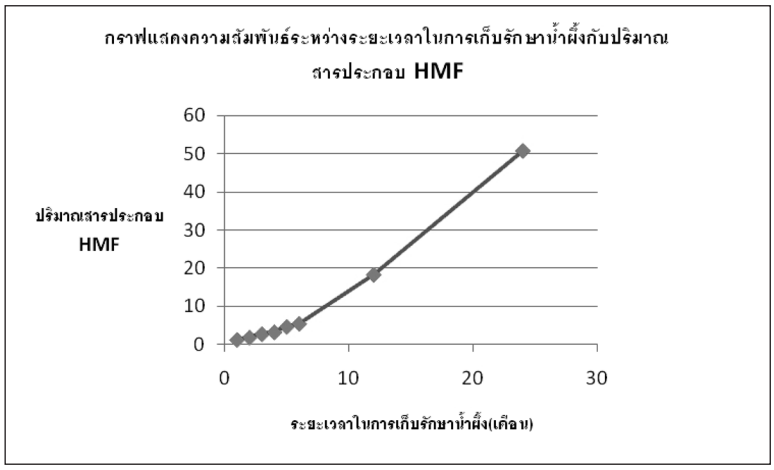
จากผลการทดลองหาวิธีการที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณ HMF ในน้ำผึ้งและยาลูกกลอน พบว่าควรใช้สภาวะดังนี้ Column C 18 (Bondclone 10 μ ขนาด 300x3.90 mm), mobile phase: water: acetronitrile = 97:3, flow rate: 1.00 ml/min, Detector: DAD 280 nm และจากการศึกษาปัจจัยด้านอุณหภูมิและเวลา สามารถสรุปได้ว่าอุณหภูมิและเวลาในการให้ความร้อนแก่น้ำผึ้งแปรผันตรงกับปริมาณ HMF โดยมีแนวโน้มว่าปริมาณ HMF จะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นและ/หรือเวลาในการให้ความร้อนมากขึ้นดังแสดงในภาพที่ 5 และ 6 ส่วนระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำผึ้งจะมีผลต่อปริมาณสารประกอบ HMF คือเมื่อระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำผึ้งมากขึ้น ปริมาณสารประกอบ HMF ก็มากขึ้นด้วยดังแสดงในภาพที่ 7



ภาพที่ 5 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสาร HMF กับอุณหภูมิในการให้ความร้อนแก่น้ำผึ้ง



ภาพที่ 6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ HMF กับระยะเวลาในการให้ความร้อนแก่น้ำผึ้ง



ภาพที่ 7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ HMF กับระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำผึ้ง

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาปริมาณและอัตราส่วนของกรดอะมิโนและน้ำตาล ในน้ำผึ้งเพื่อศึกษาตัวแปรอื่น ๆ ที่เป็นปัจจัยในการแปรผันของปริมาณสารประกอบ HMF

2. ควรมีการทดสอบสภาวะการเก็บรักษาตัวอย่างน้ำผึ้ง เช่น เก็บในที่มืด ในที่โดนแสงแดด และ/หรือ อุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษา เพื่อสังเกตตัวแปรอื่นๆ ที่เป็นปัจจัยในการแปรผันของปริมาณสารประกอบ HMF

3. ควรมีการแยกลักษณะบรรจุภัณฑ์ของน้ำผึ้ง เช่น ขวดทึบ-ใส หรือวัสดุที่เป็นบรรจุภัณฑ์ในการวิเคราะห์เพื่อดูผลของปัจจัยจากบรรจุภัณฑ์ที่ใช้เก็บรักษาน้ำผึ้ง

4. ควรมีการศึกษาตัวอย่างในวงกว้างมากขึ้นเพื่อประโยชน์ทางด้านสุขภาพของผู้บริโภค โดยศึกษาจากตัวอย่างน้ำผึ้งจากหลายๆ แหล่งผลิต

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ งบประมาณเงินรายได้ประจำปี 2553

เอกสารอ้างอิง

[1] สมพร ภูติยานันต์. (2542). *ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับแพทย์แผนไทยว่าด้วยสมุนไพรกับการแพทย์แผนไทย.* พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์สงเคราะห์ทหารผ่านศึก.

[2] Lubuza, T. P.; et al. (1993). *Maillard Reactions in Chemistry, food and health*. Bodmin: Hortnolls.

[3] Aldrich Chemical Co. (1994). *Material Safety Data Sheet: 5-Hydroxymethylfurfural 99%*. Milwaukee, WI: n.p.

[4] Lee, C. Y.; & Whitaker, J. R. (1995). *Enzymatic Browning and Its Prevention*. Washington D.C.: n.p.

[5] Coco, F. L.; et al. (1996). High-performance Liquid Chromatographic Determination of 2-furaldehyde and 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde in Honey. *Journal of Chromatography A*. (749): 95-102.

[6] Codex Alimentarius. (1993). *Standard for Honey*. Ref.Nr.Cl . 1993/14-SH FAO and WHO. Rome.

[7] Khalil, M. I.; Sulaiman S. A.; & Gan S. H. (2010). High 5-hydroxymethylfurfural Concentrations are Found in Malaysian Honey Samples Stored for More Than One Year. *Food and Chemical Toxicology*. (48): 2388-2392.

[8] Ferrer, E.; et al. (2002). High-performance Liquid Chromatographic Determination of Furfural Compounds in Infant Formulas Changes During Heat Treatment and Storage. *Journal of Chromatography A*. (947): 85-95.

[9] Gokmen Vural.; & Acar Jale. (1999). Simultaneous Determination of 5-hydroxymethylfurfural and Patulin in Apple Juice by Reversed-phase Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography A*. (847): 69-74.

[10] Nozal, M. J.; et al. (2001). High-performance Liquid Chromatographic Determination of Methyl Anthranilate, Hydroxymethylfurfural and Related Compounds in Honey. *Journal of Chromatography A*. (917): 95-103.