การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิคในตัวอย่างน้ำผลไม้ด้วยวิธีสเปกโทรโฟโตเมทรี

พงษ์ศักดิ์ ชายกวด

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเคมีศึกษา
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
กรกฎาคม 2560
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของ พงษ์ศักดิ์ ชายกวด ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีศึกษา ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จอมใจ สุกใส)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

....ประธาน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยะดา จิตรตั้งประเสริฐ)

....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จอมใจ สุกใส)

....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จเร จรัสจรูญพงศ์)

....กรรมการ

(ดร. ธนัสถา รัตนะ)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีศึกษาของมหาวิทยาลัยบูรพา

....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกรัฐ ศรีสุข)

วันที่ ...12... เดือน ...กรกฎาคม... พ.ศ. 2560

การวิจัยนี้ได้รับทุนการศึกษา
ระดับปริญญาโท ภาคพิเศษ (ฤดูร้อน) ปีการศึกษา 2554
ทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์/ดุษฎีนิพนธ์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
ประจำปีงบประมาณ 2557

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้คงไม่สามารถสำเร็จลุล่วงไปด้วยดีหากไม่ได้คำแนะนำจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จอมใจ สุกใส ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำแนวทางที่ถูกต้อง ตรวจแก้ไขและวิจารณ์ผลงาน ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ

ขอกราบขอบพระคุณคณะกรรมการสอบปากเปล่าซึ่งประกอบด้วย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยะดา จิตรตั้งประเสริฐ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จเร จรัสจรูญพงศ์ และ ดร.ธนัสถา รัตนะ ที่ได้กรุณาให้ข้อเสนอแนะในการปรับปรุงแก้ไขจนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น อันเป็นประโยชน์ต่อผู้วิจัยเป็นอย่างสูง

ขอขอบคุณเพื่อน ๆ ที่ดีให้คำแนะนำเป็นที่ปรึกษา และที่สำคัญให้กำลังต่อผู้วิจัยด้วยความหวังดีเสมอมา

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่เป็นกำลังใจสำคัญในการวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วง และเป็นผู้มอบความสำเร็จอีกขั้น

ประโยชน์ของงานวิจัยนี้เป็นผลมาจากความกรุณาของท่านดังกล่าวข้างต้น ผู้วิจัยมีความซาบซึ้งใจเป็นอย่างยิ่ง จึงใคร่ขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้ หากงานวิจัยในครั้งนี้มีข้อผิดพลาดประการใด ผู้วิจัยขอน้อมรับไว้แต่เพียงผู้เดียว

พงษ์ศักดิ์ ชายกวด

54990030: สาขาวิชา: เคมีศึกษา; วท.ม. (เคมีศึกษา)

คำสำคัญ: สารประกอบฟีนอลิค/ การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิค/ น้ำผลไม้

พงษ์ศักดิ์ ชายกวด: การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิคในตัวอย่างน้ำผลไม้ด้วยวิธีสเปกโทรโฟโตเมทรี (DETERMINATION OF PHENOLIC COMPOUNDS IN FRUIT JUICE SAMPLES BY SPECTROPHOTOMTRY) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: จอมใจ สุกใส, Ph.D. 93 หน้า. ปี พ.ศ. 2560.

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคในตัวอย่างน้ำผลไม้สำเร็จรูปและน้ำผลไม้คั้นสด ได้ถูกศึกษา 2 วิธีคือ Prussian blue method และ Vanillin assay method จากการศึกษาพบว่าการตรวจวัดด้วย Vanillin assay method นั้นไม่เหมาะสมที่นำมาวิเคราะห์ในน้ำผลไม้เพราะว่ามีน้ำเป็นองค์ประกอบหลัก ส่งผลต่อปฏิกิริยาระหว่างสารมาตรฐานแคทิชินกับสารวานิลลิน จึงได้เลือกวิธี Prussian blue method ซึ่งให้ผลที่น่าเชื่อถือกว่า โดยการทำปฏิกิริยากับสารละลายโพแทสเซียมเฟอริกไซยาไนด์และสารละลายไอร์ออน (III) คลอไรด์ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร จากการวิเคราะห์น้ำผลไม้สำเร็จรูปและน้ำผลไม้คั้นสดพบว่ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคจะอยู่ในช่วง 2.66 – 29.75 มิลลิกรัมต่อลิตร จากการทดสอบความแม่นและความเที่ยงของประสิทธิภาพของการวิเคราะห์ พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนอยู่ในช่วง 90.00-101.33 และมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ไม่เกิน 1.99

54990030: MAJOR: CHEMICAL EDUCATION; M.Sc.
(CHEMICAL EDUCATION)
KEYWORDS: PHENOLIC COMPOUNDS/ DETERMINATION OF PHENOLIC
COMPOUNDS/ FRUIT JUICE SAMPLES

PONGSAK CHAIKUSD: DETERMINATION OF CONDENSED TANNIN IN FRUIT JUICE BY SPECTROPHOTOMETRY. ADVISORY COMMITTEE: CHOMCHAI SUKSAI, Ph.D. 93 P. 2017.

The propose of this research is to study the determination of phenolic compounds in beverages fruit juice and fruit juice using UV-visible spectrophotometry by 2 methods are Prussian blue method and Vanillin Assay method. However, the results show that Vanillin Assay method was not suitable for analysis in fruit juice because it contains water that affects reaction between catechin standard and vanillin. Therefore the Prussian blue method was chosen to give a more reliable result by interaction of phenolic compounds in sample with potassium ferricyanide solution and iron (III) chloride in hydrochloric acid solution. The solutions were mixed well and were measured at 700 nm. It was found that fruit juice contained phenolic compounds in the range of 2.66 - 29.75 mg/L. By testing accuracy and precision, the percentage recovery ranges of condensed tannin were 90.00 - 101.33 and range of the relative standard derivation were less than 1.99.

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.......... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.......... จ
สารบัญ.......... ฉ
สารบัญตาราง.......... ซ
สารบัญภาพ.......... ฎ
บทที่
1 บทนำ.......... 1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.......... 1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.......... 3
สมมติฐานของการวิจัย.......... 3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย.......... 3
ขอบเขตของการวิจัย.......... 3
นิยามศัพท์เฉพาะ.......... 4
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.......... 5
น้ำผลไม้.......... 5
กระบวนการผลิตน้ำผลไม้.......... 6
แทนนิน.......... 8
สเปกโทรโฟโตเมทรี.......... 15
3 วิธีดำเนินการวิจัย.......... 21
กลุ่มตัวอย่าง.......... 21
สถานที่ทำการทดลอง.......... 22
อุปกรณ์ สารเคมี และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.......... 22
ขั้นตอนการดำเนินการทดลอง.......... 23
การคำนวณเชิงสถิติ.......... 30

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4 ผลการวิจัย	32
ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคโดยวิธี Prussian blue method	32
ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคโดยวิธี Vanillin assay method	40
5 อภิปรายและสรุปผล	47
อภิปรายผล	47
สรุปผลการทดลอง	50
ข้อเสนอแนะ	50
บรรณานุกรม	51
ภาคผนวก	54
ประวัติย่อของผู้วิจัย	83

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 แสดงสัญลักษณ์เครื่องหมายการค้าต่าง ๆ ของน้ำผลไม้... 21

2 ปริมาณสารต่าง ๆ ที่เติมลงในสารละลายมาตรฐานแคทิชิน... 27

3 ปริมาณสารต่าง ๆ ที่เติมลงในสารละลายที่ทำหน้าที่แบลงค์.. 28

4 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายแคทิชินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.................................. 32

5 สภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์... 33

6 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างน้ำผลไม้สำเร็จรูป....................................... 34

7 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างในน้ำผลไม้คั้นสด...................................... 35

8 ผลสรุปปริมาณสารประกอบฟีนอลิคในน้ำผลไม้สำเร็จรูปและน้ำผลไม้คั้นสด........... 37

9 ผลการวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนของสารประกอบฟีนอลิคในน้ำผลไม้..... 39

10 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายแคทิชินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.................................. 40

11 สภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์... 41

12 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างน้ำผลไม้สำเร็จรูป....................................... 42

13 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างน้ำผลไม้คั้นสด... 43

14 ผลสรุปปริมาณสารประกอบฟีนอลิคในน้ำผลไม้สำเร็จรูปและน้ำผลไม้คั้นสด........... 44

15 ผลการวิเคราะห์หา % Recovery ของสารประกอบฟีนอลิคในน้ำผลไม้...................... 46

16 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างน้ำผลไม้สำเร็จรูป....................................... 55

17 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างน้ำผลไม้คั้นสด... 55

18 ความเข้มข้นของสารสารประกอบฟีนอลิคในน้ำผลไม้สำเร็จรูป................................ 57

19 ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิคในน้ำผลไม้คั้นสด... 59

20 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคในน้ำผลไม้สำเร็จรูป... 59

21 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคน้ำผลไม้คั้นสด.. 59

22 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างน้ำผลไม้สำเร็จรูปที่มีการเติมสารละลาย
มาตรฐานแคทิชิน... 61

23 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างน้ำผลไม้คั้นสดที่มีการเติมสารละลาย
มาตรฐานแคทิชิน... 62

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

24 ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิคที่พบในสารตัวอย่างน้ำผลไม้สำเร็จรูป ที่มีการเติมสารละลายมาตรฐานแคทิชิน.. 62

25 ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิคที่พบในสารตัวอย่างน้ำผลไม้คั้นสด มีการเติมสารละลายมาตรฐานแคทิชิน... 63

26 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างน้ำผลไม้สำเร็จรูปที่ไม่เติมสารละลาย สารละลายมาตรฐานแคทิชิน.. 64

27 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างน้ำผลไม้คั้นสดที่ไม่เติมสารละลาย มาตรฐานแคทิชิน.. 64

28 ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิคในน้ำผลไม้สำเร็จรูปไม่เติมสารละลาย มาตรฐานแคทิชิน.. 65

29 ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิคในน้ำผลไม้คั้นสดไม่เติมสารละลาย มาตรฐานแคทิชิน.. 65

30 เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน.. 66

31 การคำนวณหาค่า $\hat{y}$, $y_i - \hat{y}$ และ $(y_i - \hat{y})^2$.. 68

32 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างน้ำผลไม้สำเร็จรูป.................................... 70

33 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างน้ำผลไม้คั้นสด....................................... 70

34 ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิคในน้ำผลไม้สำเร็จรูป...................................... 72

35 ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิคในน้ำผลไม้คั้นสด.. 72

36 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างน้ำผลไม้สำเร็จรูปที่มีการเติมสารละลาย มาตรฐานแคทิชิน.. 74

37 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างน้ำผลไม้สำเร็จรูปและน้ำผลไม้คั้นสด มีการเติมสารละลายมาตรฐานแคทิชิน... 74

38 ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิคที่พบในสารตัวอย่างน้ำผลไม้สำเร็จรูปเติม ที่มีการสารละลายมาตรฐานแคทิชิน... 75

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

39 ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิคที่พบในสารตัวอย่างน้ำผลไม้คั้นสด ที่มีการเติมสารละลายมาตรฐานแคทิชิน เข้มข้น 0.15 มิลลิกรัมต่อลิตร...................... 76

40 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างที่ไม่เติมสารละลายมาตรฐานแคทิชิน........ 77

41 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างน้ำผลไม้สำเร็จรูปและน้ำผลไม้คั้นสด ที่ไม่มีการเติมสารละลายมาตรฐานแคทิชิน.. 77

42 ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิคในน้ำผลไม้สำเร็จรูปไม่เติมสารละลาย มาตรฐานแคทิชิน... 78

43 ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิคที่พบในสารตัวอย่างน้ำผลไม้คั้นสด ไม่มีการเติมสารละลายมาตรฐานแคทิชิน... 78

44 เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน.. 79

45 การคำนวณหาค่า $\hat{y}$, $y_i - \hat{y}$ และ $(y_i - \hat{y})^2$ 80

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างทางเคมีของ (+) – Catechin...	2
2	โครงสร้างทางเคมีของ gallic acid และ ellagitannin...	9
3	โครงสร้างทางเคมีของ Hydrolyzable tannin..	9
4	โครงสร้างทางเคมี Flavan-3,4-diol และ Flavan-3-ol หรือ Catechin..........................	10
5	โครงสร้างทางเคมีของ Condensed tannin...	10
6	โครงสร้างทางเคมีของ (+) – Catechin...	11
7	โครงสร้างทางเคมีของ Epicatechin และ Catechin...	12
8	ปฏิกิริยาระหว่าง Catechin กับ Vanillin..	14
9	ปฏิกิริยาระหว่าง Catechin กับ Iron (III)..	15
10	กราฟมาตรฐานทั่วไปที่ใช้ในการหาปริมาณสาร..	17
11	ส่วนประกอบของเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์...	18
12	กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานแคทิชิน ที่มีความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร.....	33
13	กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานแคทิชิน ที่มีความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร.....	41

บทที่1
บทนำ

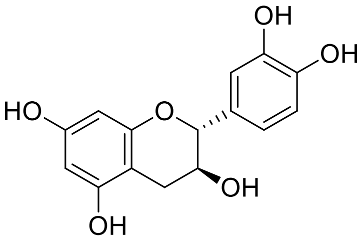
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันเครื่องดื่มนับเป็นสิ่งสำคัญอย่างหนึ่งของการดำรงชีวิตของมนุษย์ น้ำผลไม้เป็นเครื่องดื่มที่คนส่วนมากนิยมดื่มกันเป็นประจำ น้ำผลไม้เป็นเครื่องดื่มที่ย่อยง่าย ถ้าในแต่ละวันเราดื่มน้ำผลไม้ร่างกายก็จะได้รับสารอาหารที่จำเป็นมากมาย ทั้งสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) วิตามิน และแร่ธาตุต่าง ๆ ซึ่งมีประโยชน์ในการช่วยขับสารพิษ เสริมภูมิคุ้มกัน ช่วยป้องกันภาวะการอักเสบ และสร้างสภาพแวดล้อมที่ช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดเนื้องอก น้ำผลไม้ยังช่วยย่อยและขจัดของเสีย ช่วยรักษาความสมดุลของความเป็นกรดและด่างอีกด้วย สำหรับผู้ที่ลดความอ้วนการดื่มน้ำผลไม้สดจะช่วยให้ร่างกายได้รับสารอาหารที่มีประโยชน์ชดเชยส่วนที่ขาดไป และในน้ำผลไม้จะอุดมไปด้วยเอ็นไซม์ซึ่งมีคุณสมบัติที่จะช่วยเสริมการทำงานของระบบย่อยอาหารจึงส่งผลให้ร่างกายสามารถดูดซึมสารอาหารที่จำเป็นได้อย่างมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น เอ็นไซม์จากพืชนี้มีความสำคัญอย่างมากต่อการช่วยให้ของเหลวไหลเวียนไปทั่วร่างกายอย่างต่อเนื่อง สม่ำเสมอและมีประสิทธิภาพในการผลิตน้ำผลไม้เป็นการแยกเอาส่วนที่มีเป็นของเหลวในผลไม้ พร้อมกับสารประกอบที่ให้กลิ่น รส รวมทั้งสารอาหารที่ละลายได้ในในของเหลวนั้นออกจากผลไม้ คุณภาพของน้ำผลไม้ที่ดีจะต้องมีลักษณะที่เหมือนผลไม้สด ทั้งในแง่ของกลิ่นรส สารอาหาร วิตามินและเกลือแร่ต่าง ๆ ที่ต้องยังคงเหมือนเดิมหรือมีความใกล้เคียง ซึ่งการผลิตน้ำผลไม้แต่ละชนิดนั้นมีกระบวนการที่แตกต่างกันออกไป

ในการผลิตน้ำผลไม้นั้น จะพบสาระสำคัญจำพวกสารประกอบฟีนอลิค เช่น แทนนิน ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์เป็นกรดอ่อน มีรสฝาด พบในพืชหลายชนิดได้แก่ องุ่นโดยเฉพาะอย่างยิ่งในเมล็ด และเปลือก ใบชา กาแฟ ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ถั่ว เปลือกเงาะ เปลือกมังคุด เปลือกทับทิม กล้วยเป็นต้น มักพบตามส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น เปลือกของลำต้น แก่นไม้ ใบ ฝัก แทนนินมีคุณสมบัติตกตะกอนโปรตีน จึงนำมาใช้ประโยชน์ในการทำให้หนังสัตว์ไม่เน่าเปื่อย ใช้ในอุตสาหกรรมฟอกหนัง ย้อมผ้า และมีสรรพคุณฝาดสมาน สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียจึงใช้รักษาท้องเสียได้ ช่วยเพิ่มความยืดหยุ่นของกล้ามเนื้อหัวใจและขยายผนังหลอดโลหิต

สารแทนนินเป็นสารประกอบประเภทสารประกอบฟีนอลิคชนิดหนึ่ง มี 2 ประเภทคือ สารไฮโดรไลซ์แทนนิน (Hydrolyzable tannins) ซึ่งเป็นสารประกอบแทนนินที่เป็นพอลิเมอร์ของกรดแกลลิก (Gallic acid) หรือ กรดเอลลาจิก (Ellagic acid) เรียกว่า แกลโลแทนนิน (Gallotannins) และเอลลาจิแทนนิน (Ellagitannins) และสารคอนเดนซ์แทนนิน (Condensed tannins) เป็นกลุ่มของสารประกอบแทนนินที่เป็นพอลิเมอร์ของ แคทิชิน หรือ เอพิแคทิชิน ได้แก่ โพรแอนโทไซยานิดิน (Proanthocyanidins) แอนโทไซยานิดิน (Anthocyanidins) เอพิแกลโลแคทิชิน (Epigallocatechin) แกลโลแคทิชิน (Gallocatechin) เป็นต้น

คอนเดนซ์แทนนิน เกิดจากโมเลกุลของฟลาวานอลรวมตัวกัน โดยมอนอเมอร์ที่รู้จักกันได้แก่ flavan-3-ols, (-) - epicatechin และ (+) - catechin เมื่อมอนอเมอร์เหล่านี้รวมกัน จะได้คอนเดนซ์แทนนินชนิดต่าง ๆ มากมายขึ้นอยู่กับตำแหน่งของคาร์บอนที่เกิดพันธะกัน สามารถพบได้ในอาหารประเภทต่าง ๆ เช่น โกโก้ ไวน์ แอปเปิล ผลไม้ ธัญพืชต่าง ๆ รวมทั้งพืชตระกูลถั่ว แต่พบปริมาณสูงที่สุดในชาเขียว สารแคทิชินเป็นมอนอเมอร์ชนิดหนึ่งในสารคอนเดนซ์แทนนิน เป็นสารจากธรรมชาติที่เข้าไปทำหน้าที่ป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระ และช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดมะเร็งในร่างกาย (นิรัชรา เลาหประสิทธิ์, 2557) นอกจากจะมีคุณสมบัติในการชะลอความเสื่อมของร่างกายและช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งแล้ว พบว่าแคทิชินยังสามารถลดปริมาณ Oxidised Low Density Lipoprotein (Oxidised LDL) ซึ่งมีหน้าที่นำพาคอเลสเทอรอลไปสะสมยังส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย อันเป็นเหตุของโรคต่าง ๆ เช่น โรคหัวใจ ความดัน หลอดเลือดอุดตัน เป็นต้น โดยสูตรโครงสร้างของสารแคทิชิน แสดงได้ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของ (+)- Catechin

ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อจะศึกษาวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิค (phenolic compounds)ในเครื่องดื่มจำพวกน้ำผลไม้สำเร็จรูปและน้ำผลไม้คั้นสด ที่มีจำหน่ายในเขตเทศบาลเมืองแสนสุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี โดยวิธีสเปกโทรโฟโตเมทรี ด้วยวิธีทำปฏิกิริยากับสารละลายโพแทสเซียมเฟอริไซยาไนด์ ($K_3Fe(CN)_6$) และสารละลายเฟอริคคลอไรด์ ($FeCl_3$) หรือ Prussian blue method กับวิธี Vanillin Assay method

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิคในน้ำผลไม้สำเร็จรูปและน้ำผลไม้คั้นสดที่มีจำหน่ายในเขตเทศบาลเมืองแสนสุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี โดยวิธีสเปกโทรโฟเมทรี

สมมติฐานของการวิจัย

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคในน้ำผลไม้สำเร็จรูปและน้ำผลไม้คั้นสด เครื่องหมายการค้าชนิดต่าง ๆ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคไม่เท่ากัน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับปริมาณและเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลิคในน้ำผลไม้สำเร็จรูปและน้ำผลไม้คั้นสด
2. เพื่อเป็นแนวทางสำหรับผู้ที่สนใจในการเลือกบริโภคน้ำผลไม้สำเร็จรูปและน้ำผลไม้คั้นสดที่มีจำหน่ายทั่วไป
3. เพื่อเป็นแนวทางในการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิคในผลิตภัณฑ์ชนิดอื่น ๆ ต่อไป

ขอบเขตของการวิจัย

1. การวิจัยครั้งนี้ทำการสุ่มตัวอย่างน้ำผลไม้สำเร็จรูปเครื่องหมายการค้าต่าง ๆ และน้ำผลไม้คั้นสด 3 ชนิด ที่จำหน่ายในเขตเทศบาลเมืองแสนสุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี
2. การวิจัยครั้งนี้ผู้ทำวิจัยมุ่งทำการศึกษาเฉพาะปริมาณสารประกอบฟีนอลิคในน้ำผลไม้เครื่องหมายการค้าชนิดต่าง ๆ และน้ำผลไม้คั้นสด
3. การวิจัยครั้งนี้ทำการสุ่มตัวอย่างน้ำผลไม้ ในวันที่ 2 เดือน มีนาคม พ.ศ. 2559
4. ทำการวิเคราะห์โดยวิธีสเปกโทรโฟโตเมทรี

5. ตัวแปรที่ใช้ในการวิจัย

5.1 ตัวแปรต้น ชนิดของน้ำผลไม้

5.2 ตัวแปรตาม ปริมาณสารประกอบฟีนอลิค

5.3 ตัวแปรควบคุม สารเคมี เครื่องมือและอุปกรณ์ สภาวะในการทดลองและวิธีการวิเคราะห์

นิยามศัพท์เฉพาะ

1. น้ำผลไม้สำเร็จรูป หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่คั้นได้จากผลไม้ แล้วนำมาปรุงแต่งรสในลักษณะที่พร้อมบริโภคและบรรจุในภาชนะที่ปิดสนิท

2. สารประกอบฟีนอลิค หมายถึง สารประกอบทางเคมีที่เป็นองค์ประกอบในน้ำผลไม้ มีสรรพคุณในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี

3. สารคอนเดนส์แทนนิน หมายถึง พอลิเมอร์ของสารประกอบฟีนอลิค เกิดจากหลายโมเลกุลของ Flavanols รวมตัวกัน

4. วิธีสเปกโทรโฟโตเมทรี หมายถึง การวิเคราะห์หาปริมาณคอนเดนส์แทนนินโดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 สำหรับวิธี Vanillin assay method และ 700 นาโนเมตรสำหรับวิธีทำปฏิกิริยากับสารละลายโพแทสเซียมเฟอริไซยาไนด์และสารละลายเฟอริกคลอไรด์

5. สารต้านอนุมูลอิสระ หมายถึง สารประกอบที่สามารถป้องกันหรือชะลอกระบวนการเกิดออกซิเดชันเนื่องจากในขบวนการปฏิกิริยาชีวเคมีที่เกิดขึ้นภายในร่างกาย

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

น้ำผลไม้

น้ำผลไม้ คือ ของเหลวที่อยู่ในเนื้อเยื่อของผลไม้ตามธรรมชาติ อาจรวมถึงของเหลวจากผลของผักบางชนิดด้วยเช่นมะเขือเทศ น้ำผลไม้ได้มาจากการคั้นหรือการปั่นผักผลไม้เหล่านั้นโดยไม่ต้องใช้ความร้อนหรือตัวทำละลาย ตัวอย่างเช่น น้ำส้มก็คือของเหลวที่สกัดจาก ผลส้ม น้ำมะนาวก็คือของเหลวที่สกัดจากผลมะนาว น้ำผลไม้สำเร็จที่วางขายในท้องตลาดหลายยี่ห้อถูกกรองเอา เส้นใย เนื้อ หรือกากออก แต่น้ำผลไม้ที่มีเนื้อก็ยังคงเป็นเครื่องดื่มที่นิยม น้ำผลไม้อาจขายในรูปแบบเข้มข้น ซึ่งจำเป็นจะต้องเติมน้ำเพื่อลดความเข้มข้นจนกระทั่งอยู่ในสถานะปกติ อย่างไรก็ตาม น้ำผลไม้แบบเข้มข้นมักจะมีรสชาติที่ผิดแปลกไปจากน้ำผลไม้คั้นสดอย่างชัดเจน น้ำผลไม้บางชนิดอาจมีการแปรรูปเพื่อการถนอมอาหารก่อนวางจำหน่าย อาทิ พาสเจอร์ไรซ์ การแช่แข็ง การระเหย หรือการอบให้เป็นผงแห้ง (พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนาปนนท์, ม.ป.ป.)

ตลาดน้ำผลไม้เป็นตลาดที่ได้รับความนิยมมากขึ้นเป็นลำดับ ในช่วงปี 2533-2538 แต่ในช่วงปี 2539-2544 เป็นช่วงที่เกิดวิกฤตทางเศรษฐกิจและการเงิน การบริโภคเครื่องดื่มชะลอลง อย่างไรก็ตาม ความต้องการน้ำผลไม้ในระยะยาวยังคงมีแนวโน้มที่สดใส ทั้งตลาดในประเทศและตลาดส่งออก ทั้งนี้เป็นไปตามกระแสของการห่วงใยในการรักษาสุขภาพมากขึ้น ในปี 2545 ปริมาณการจำหน่ายน้ำผลไม้ในประเทศจะเพิ่มขึ้นจากปีก่อนราวร้อยละ 4.2 เป็น 250 ล้านลิตร หรือคิดเป็นมูลค่า 4,615 ล้านบาท ในขณะที่การส่งออกคาดว่าจะเพิ่มขึ้นจากปีก่อนร้อยละ 68.2 เป็น 181 ล้านลิตร หรือคิดเป็นมูลค่า 7,240 ล้านบาท เนื่องจากคู่แข่งสำคัญของไทยในตลาดส่งออก คือ อินโดนีเซีย และฟิลิปปินส์ ประสบปัญหาเศรษฐกิจและการเมือง สำหรับในปี 2543 คาดว่าปริมาณการจำหน่ายน้ำผลไม้ในประเทศจะเพิ่มขึ้นจากปีก่อนราวร้อยละ 10.0 เป็น 275 ล้านลิตร หรือคิดเป็นมูลค่า 5,198 ล้านบาท ตามภาวะเศรษฐกิจที่เริ่มปรับตัวดีขึ้นจากปีก่อน รวมทั้งตลาดในประเทศจะเริ่มกลับมาคึกคัก และมีการแข่งขันกันมากขึ้นอีกครั้ง ส่วนตลาดส่งออก คาดว่าจะเพิ่มขึ้นจากปีก่อนร้อยละ 12.2 เป็น 203 ล้านลิตร หรือคิดเป็นมูลค่า 8,526 ล้านบาท เนื่องจากคาดว่าคู่แข่งในตลาดส่งออกจะยังคงประสบปัญหาเศรษฐกิจและการเมืองอยู่

ผู้ผลิตน้ำผลไม้ในในปัจจุบันมีอยู่ราว 103 โรงงาน ในจำนวนนี้มีผู้ผลิตน้ำผลไม้ขนาดกลางและขนาดย่อม อยู่ราว 91 โรงงาน ส่วนใหญ่จะกระจุกตัวอยู่ในภาคกลางรองลงมาได้แก่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ และภาคใต้ ตามลำดับ จังหวัดที่มีผู้ผลิตมากที่สุดได้แก่ประจวบคีรีขันธ์ นครปฐม กรุงเทพมหานคร สมุทรสงคราม สมุทรสาคร และสมุทรปราการ ตามลำดับ นอกนั้นกระจายอยู่ในภาคต่าง ๆ สำหรับช่องทางการจัดจำหน่ายส่วนใหญ่จำหน่ายเองโดยตรงแก่ผู้บริโภค/ผู้ผลิตน้ำผลไม้รายใหญ่เพื่อนำไปผลิตน้ำผลไม้ หรือจำหน่ายผ่านคนกลางซึ่งเป็นผู้กระจายสินค้าไปยังผู้บริโภค

วัตถุดิบสำคัญได้แก่ ผลไม้ สามารถผลิตได้ในประเทศทั้งหมด ส่วนเครื่องจักรที่ใช้ในการผลิต ได้แก่ เครื่องตัด/เฉาะผลไม้ เครื่องคั้นน้ำผลไม้ เครื่องกรองน้ำผลไม้ เครื่องความดันไอน้ำใช้ในการฆ่าเชื้อโรค เครื่องบรรจุน้ำผลไม้ เป็นต้น นอกจากนี้ในโรงงานจะต้องมีเครื่องมือวัดความหวานและปริมาณของแข็งที่ละลายทั้งหมด (Refrectrometer) และเครื่องวัดค่าความเป็นกรด/ เบส หรือค่า pH เพื่อให้น้ำผลไม้ที่ได้มีมาตรฐานเดียวกัน

กระบวนการผลิตน้ำผักและน้ำผลไม้บรรจุในภาชนะปิดสนิท (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2541)

การผลิตน้ำผักและน้ำผลไม้ เป็นการแยกส่วนของเหลวในผัก และผลไม้ พร้อมกับสารประกอบที่ให้กลิ่นรส รวมทั้งสารอาหารที่ละลายได้ในในของเหลวนั้นออกจากผัก และผลไม้ คุณภาพของน้ำผักและน้ำผลไม้ที่ดีจะต้องมีลักษณะที่เหมือนผักผลไม้สด ทั้งในแง่ของกลิ่นรส สารอาหาร วิตามินและเกลือแร่ต่าง ๆ ที่ต้องยังคงเหมือนเดิมหรือมีความใกล้เคียง ซึ่งกระบวนการผลิตน้ำผักและน้ำผลไม้ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ใหญ่ ๆ ดังนี้

1. ขั้นตอนการสกัดของเหลว

ขั้นตอนนี้มีจุดประสงค์เพื่อแยกของเหลว รวมไปถึงสารละลายได้ที่มีอยู่ในผักและผลไม้ น้ำผัก และผลไม้ที่สกัดใหม่ ๆ ยังคงมีเอนไซม์แขวนลอยหลายชนิด ล้วนแล้วแต่มีประโยชน์ต่อร่างกาย ดังนั้นในขั้นตอนการสกัดนี้จึงต้องเลือกวิธีที่ให้น้ำผลไม้ในปริมาณมากและ มีองค์ประกอบของสารที่มีคุณค่าครบถ้วน ซึ่งวิธีการสกัดมี 2 วิธี คือ วิธีทางกล (mechanical extraction) โดยใช้แรงไปทำให้เซลล์เนื้อผลไม้ฉีกขาดและให้ส่วนของน้ำผลไม้ไหลซึมออกมาพร้อมสารอาหาร กลิ่นและรส และวิธีทางชีวภาพ (biological extraction) ซึ่งจะใช้สารชีวภาพ เช่น เอนไซม์ไปย่อยสลายเซลล์เนื้อผักผลไม้ให้มีขนาดเล็กเพียงพอที่จะปลดปล่อยของเหลวที่มีส่วน ของสารอาหาร กลิ่นและรสของผักและผลไม้นั้น ๆ

2. ขั้นตอนการปรับปรุงคุณภาพ

ขั้นตอนนี้เป็นการทำให้น้ำผักและผลไม้ที่สกัดได้ มีลักษณะคุณภาพตามความต้องการขึ้นกับชนิดของน้ำผักและผลไม้ แบ่งออกเป็น การปรับปรุงคุณภาพด้านลักษณะปรากฏ อาทิเช่น การทำน้ำผลไม้ชนิดใส หรือการทำน้ำผักผลไม้แบบขุ่น และการปรับคุณภาพด้านรสชาติ เช่น รสเปรี้ยว รสหวาน และการเสริมรสหรือเน้นรสชาติน้ำผลไม้

3. ขั้นตอนการให้ความร้อนเพื่อฆ่าเชื้อจุลินทรีย์

การให้ความร้อนเพื่อฆ่าเชื้อจุลินทรีย์มีวัตถุประสงค์เพื่อยืดอายุการเก็บของน้ำผักและผลไม้ที่บรรจุในภาชนะบรรจุปิดสนิท สามารถทำได้ 2 วิธีคือ

1. การให้ความร้อนก่อนบรรจุในภาชนะปิดสนิท สำหรับน้ำผลไม้ที่มีค่า pH ต่ำกว่า 3.5 สามารถฆ่าเชื้อได้ที่อุณหภูมิ 70-72 $^{\circ}$C เป็นเวลา 15 นาที เรียกว่า ระบบพาสเจอร์ไรซ์แบบเร็ว อุณหภูมิสูง (LTLT:- pasteurization) จากนั้นบรรจุในภาชนะสะอาดขณะที่น้ำผักผลไม้ยังร้อนอยู่ที่อุณหภูมิการบรรจุประมาณ 60 $^{\circ}$C แล้วให้ความเย็นทันที โดยน้ำเย็นต้องมีอุณหภูมิไม่เกิน 10 $^{\circ}$C เพื่อหยุดปฏิกิริยาของจุลินทรีย์ที่หลงเหลือจากกระบวนการให้ความร้อน ทั้งนี้ในขั้นตอนการบรรจุต้องทำด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ

2. การให้ความร้อนหลังการบรรจุในภาชนะปิดสนิท วิธีนี้นิยมใช้กับน้ำผลไม้ที่บรรจุในกระป๋องเคลือบแลกเกอร์ ซึ่งจะบรรจุน้ำผักผลไม้ที่เตรียมไว้ในกระป๋อง โดยเว้นช่องว่างเหนือกระป๋องตามสัดส่วนขนาดกระป๋อง จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอนการไล่อากาศ แล้วปิดฝากระป๋อง หลังจากนั้นจึงนำไปฆ่าเชื้อ ซึ่งระยะเวลาในการฆ่าเชื้อขึ้นกับคุณสมบัติของน้ำผักและผลไม้นั้น ๆ เช่น ถ้าน้ำผลไม้ทีมีสภาพเป็นกรดหรือมีค่า pH ต่ำกว่า 4.6 สามารถใช้ความร้อนที่อุณหภูมิน้ำเดือดปกติ 100 $^{\circ}$C ในการฆ่าเชื้อได้ แต่ถ้าน้ำผักหรือผลไม้ที่มีสภาพเป็นกรดต่ำหรือมีค่า pH สูงกว่า 4.6 ต้องใช้ความร้อนที่อุณหภูมิร้อนสูงถึง 116-121 $^{\circ}$C ในการฆ่าเชื้อ

ประโยชน์ของน้ำผลไม้

1. ช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด จึงช่วยปรับความดันโลหิตสูง
2. ช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือด จึงช่วยโรคเบาหวาน
3. สร้างภูมิคุ้มกันโรค จึงช่วยโรคหอบหืด ไซนัส ภูมิแพ้ และชะลอการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งซึ่งเป็นสาเหตุของโรคต่าง ๆ
4. ช่วยในระบบการย่อยอาหาร จึงช่วยผู้ที่มีปัญหาเกี่ยวกับกระเพาะอาหาร ลำไส้เล็ก ใหญ่ ท้องผูก และริดสีดวงทวารได้เป็นอย่างดี
5. บำรุงตับ ไต และตับอ่อน และช่วยโรคดีซ่าน
6. ช่วยฟอกเลือด ขับสารพิษ และขจัดสิ่งปฏิกูลต่าง ๆ ออกจากร่างกาย

7. ช่วยรักษาโรคผิวหนัง เช่น โรคเรื้อนกว้าง แผลถลอก พุพอง ติดเชื้อให้หายเร็วขึ้น
8. ช่วยขจัดของเหลวออกจากข้อต่อของกระดูก จึงใช้รักษาโรคข้อต่ออักเสบ และโรคเก๊าต์
9. ช่วยสร้างกระดูกและเนื้อเยื่อให้แข็งแรง
10. ช่วยบรรเทาความเหนื่อยอ่อนทางร่างกาย อาการทางประสาท คลายเครียด

แทนนิน (tannin)

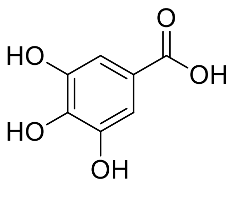
แทนนินเป็นสารประกอบฟีนอลิคที่ได้จากธรรมชาติมีมวลโมเลกุลอยู่ระหว่าง 500 – 3,000 ดาลตัน ทั้งยังมีหมู่ฟีนอลิคไฮดรอกซิลอิสระที่สามารถเกิดการเชื่อมโยงได้กับสารโปรตีน และสารไบโอพอลิเมอร์ เช่น เซลลูโลส และ เพคติน

แทนนินได้จากส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น เปลือก ใบ ผล เปลือกผล ซึ่งมีสมบัติละลายในน้ำ สามารถรวมตัวกับโปรตีนในหนังสัตว์ ทำให้เป็นหนังฟอกหรือหนังสำเร็จได้ ในขณะที่พืชมีชีวิตอยู่สารแทนนินจะถูกสร้างขึ้นมาในรูปของสารละลายรวมอยู่ในโปรโตพลาซึม (Protoplasm) และแวคิวโอของเซลล์ เมื่อเซลล์ตายลงโปรโตพลาซึมจะสลายตัว แทนนินจะถูกดูดอยู่ในผนังเซลล์ โดยทั่วไปแทนนินในเปลือกไม้ชนิดต่าง ๆ จะมีปริมาณแทนนินสูงกว่าในเนื้อไม้มาก (สมศักดิ์ วรมงคลชัย, 2532)

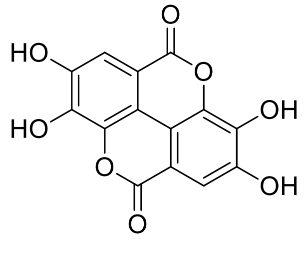
ประเภทของแทนนิน

แทนนินแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ

1. ไฮโดรไลซ์แทนนิน เป็นสารประกอบฟีนอลิค มีน้ำตาลอมเหลือง ละลายได้ในน้ำร้อน โดยปกติเป็นอนุพันธ์ของกรดแกลลิก กับ เอลลาจิแทนนิน และน้ำตาล ดังแสดงได้ดังรูปที่ 2 และ 3 เมื่อรวมตัวกับสารละลายเฟอริก (III) คลอไรด์จะให้สีน้ำเงิน

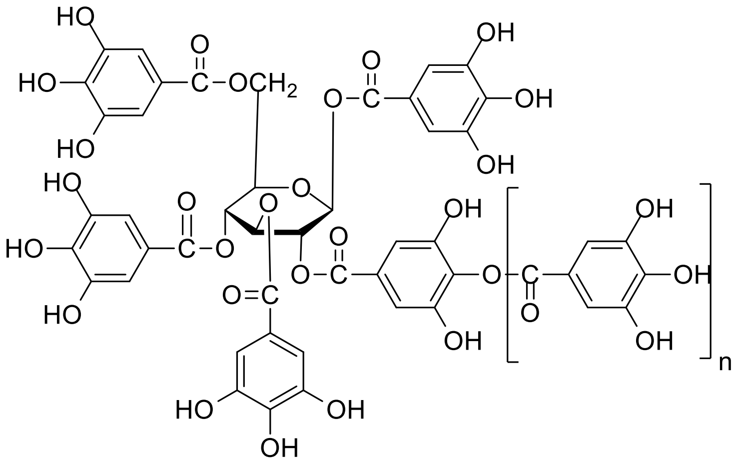


Gallic acid



Ellagitannin

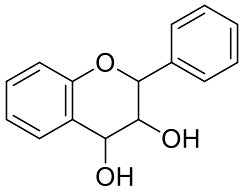
ภาพที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของ gallic acid และ ellagitannin



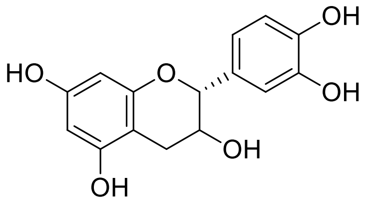
n = 1, 2, 3,...

ภาพที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของ Hydrolyzable tannin (Man, Sommerer, Cheynier, Cole ,& Fulcrand, 2007)

2. คอนเดนส์แทนนิน เป็นพอลิเมอร์ของสารประกอบฟีนอลิค เกิดจากหลายโมเลกุลของฟลาวานอลรวมตัวกัน ซึ่งจะไม่มีน้ำตาลในโมเลกุลของฟลาวานอล ประกอบด้วย 2 ชนิด คือ Flavan-3-ols และ Flavan-3-diols แสดงได้ดังรูปที่ 4 ซึ่งเมื่อรวมตัวกันเป็นโพลิเมอร์จะเรียกว่า แอนโธไซยานิดินและโพรแอนโธไซยานิดิน ซึ่งมีสีแดง แสดงได้ดังรูปที่ 5 ละลายน้ำได้ไม่ดีเท่าไฮโดรไลซ์แทนนิน เมื่อรวมตัวกับสารละลายเฟอริคคลอไรด์จะให้สีเขียว

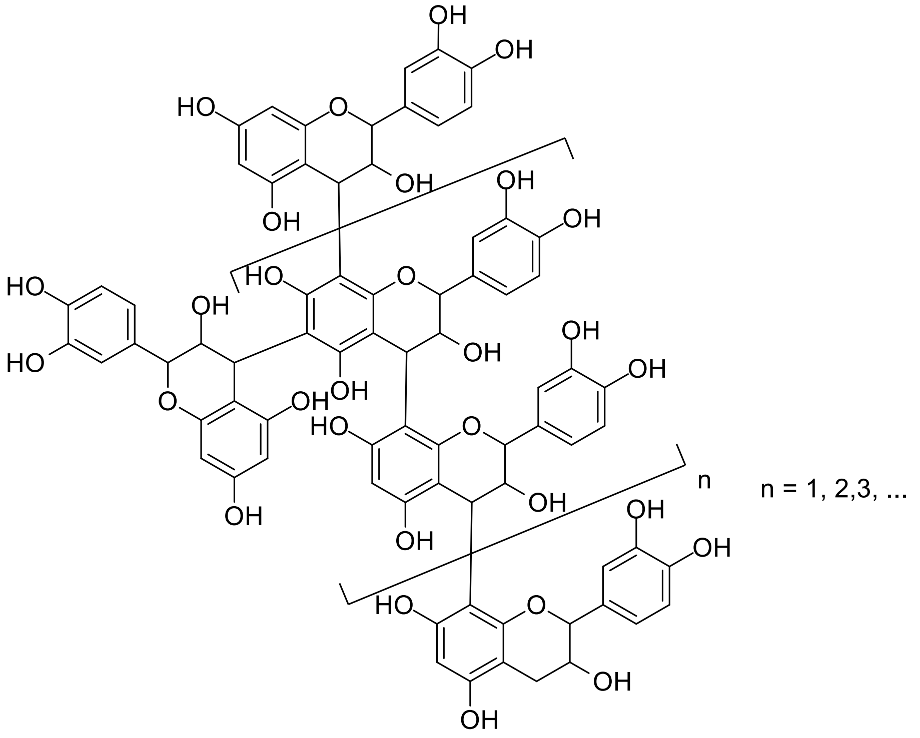


Flavan-3,4-diol



Catechin

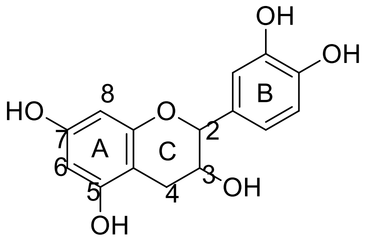
ภาพที่ 4 โครงสร้างทางเคมี Flavan-3,4-diol และ Flavan-3-ol หรือ Catechin



ภาพที่ 5 โครงสร้างทางเคมีของ Condensed tannin (Goncalves, Soares, Mateus, & Freitas, 2007)

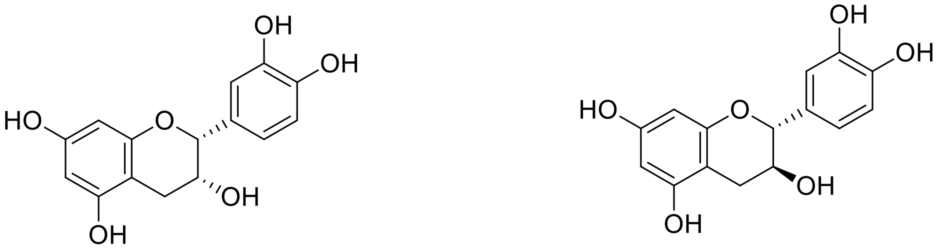
ในขบวนการทำน้ำผลไม้ที่ต้องการบีบคั้นน้ำออกจากผลไม้ สารแทนนินมักจะติดไปกับส่วนที่เป็นน้ำของผลไม้นั้น เช่น แอปเปิล องุ่น และในการต้มใบชาหรือกาแฟก็จะสกัดสารแทนนินปนออกมากับน้ำต้ม เนื่องจากแทนนินทำปฏิกิริยากับไอออนของแคลเซียมและแมกนีเซียมในน้ำ ถ้าในน้ำมีธาตุเหล็กสีของแทนนินจะเข้มขึ้น ถ้าน้ำมีความเป็นกรดโดยการเติมน้ำมะนาวลงไปในน้ำชา แทนนินก็จะมีสีเข้มขึ้นได้เช่นกัน ในขณะเดียวกันกับการต้มสกัดแทนนินจากใบชาหรือกาแฟนั้นจะเกิดการเปลี่ยนแปลงของกลิ่นด้วย ทำให้กลิ่นของน้ำสกัดนั้นหอมชวนดื่มมากกว่าการละลายด้วยน้ำเย็นธรรมดา (เดชภาฑร วงศ์เดชขจร, 2550)

สารแคทิชินมีชื่อตามระบบ IUPAC คือ (2R,3S) -2 - (3,4-dihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-2H-chromene-3,5,7-triol เป็นสารในกลุ่ม Flavan-3-ol หรือ Flavanols ซึ่งสารประกอบด้วยวงเบนซีน 2 วง คือ A ring กับ B ring และมี dihydropyran heterocycle หรือเรียกว่า C ring อยู่ตรงกลางระหว่างวงเบนซีน โดยจะมีหมู่ไฮดรอกซิลอยู่บนคาร์บอนตำแหน่งที่สามของ C ring ดังแสดงได้ในภาพที่ 6



ภาพที่ 6 โครงสร้างทางเคมีของ (+) - Catechin

โมเลกุลของแคทิชินมีตำแหน่งไครัล (Chiral center) อยู่สองตำแหน่งคืออยู่ในคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 และ 3 ดังนั้นจึงมีไดแอสเตอริโอไอโซเมอร์ (Diastereoisomers) อยู่ 4 แบบซึ่งไอโซเมอร์สองในสี่แบบนั้นเป็นแบบซีส (Cis) และแบบทรานส์ (Trans) เรียกสารที่มีโครงสร้างแบบซีสว่า เอพิแคทิชิน และเรียกสารที่มีโครงสร้างแบบทรานส์ว่า แคทิชิน ดังแสดงได้ในภาพที่ 7



(-) - Epicatechin (+) - Catechin

ภาพที่ 7 โครงสร้างทางเคมีของ (-) - Epicatechin และ (+) – Catechin

การกระจายตัวในธรรมชาติของแทนนิน

การกระจายตัวในธรรมชาติของแทนนินนั้น พบว่ามีการกระจายตัวอยู่ในพืชเกือบทุกชนิด และเกิดเป็นองค์ประกอบสำคัญที่เด่นมากในพืชใบเลี้ยงคู่จำนวนมาก แต่สำหรับในพืชชั้นต่ำเช่น รา สาหร่าย มอส ลิเวอร์เวิร์ท ตลอดจนพวกหญ้าทั้งหลายจะพบว่ามีสารแทนนินเป็นองค์ประกอบอยู่น้อยมาก บทบาททางนิเวศวิทยาของแทนนินที่พบอยู่ในพืชยังไม่เป็นที่ทราบกันอย่างชัดแจ้งนักและโดยทั่วไปแล้วพืชทั้งหลายที่มักจะมีแทนนินเป็นองค์ประกอบเสมอ มักจะพบแทนนินสูงในส่วนของแก่นไม้และเปลือกไม้ ในส่วนของพืชที่มีอายุมากกว่า 1 ปีจะมีแทนนินสูงกว่าใบที่อายุเพียงปีเดียว และพืชที่มีใบสีเขียวตลอดปีก็มีแทนนินมากกว่าพืชประเภทผลัดใบ (อัญมณี ปิณฑะบุตร, 2540)

สมบัติของแทนนินที่สำคัญคือ ความฝาด ซึ่งเกิดจากส่วนโพลิเมอริค (Polymeric) ของสารประกอบที่มีกลุ่มฟีนอลและแคเทซอลหรือฟาโวนอล ซึ่งมีมวลโมเลกุลสูง ๆ เนื่องจากสามารถเกิด Cross linking ระหว่างไกลโคโปรตีนกับแทนนินทำให้เกิดการหล่อลื่น (Lubricating action)ในปากลดลง การเกิดรสฝาดจะพบอยู่ในแทนนินที่มีลักษณะโอลิโกเมอร์ (Ologomer) จะไม่พบในแทนนินแบบโมโนเมอร์ และโพลิเมอร์ (สุวรงค์ วงษ์ศิริ, 2536)

ดังนั้นในผลไม้ดิบจะมีคอนเดนซ์แทนนินชนิดลิวโคแอนโธไซยานินที่มีขนาดโมเลกุลพอเหมาะที่มีรสฝาดและจะค่อย ๆ ลดลง จนกระทั่งผลไม้สุก ปริมาณและชนิดของแทนนินในพืชจะขึ้นอยู่กับชนิดของพันธุ์พืช แหล่งที่ปลูก สภาพภูมิอากาศ แร่ธาตุ และอายุกิ่ง ก้านใบของพืช

สมบัติทางกายภาพและทางเคมีแทนนิน (วรรณวิภางค์ ชื้อตระกูล, 2554)

1. แทนนิน คือ สารประกอบเคมีชนิดซับซ้อนมากจะไม่สามารถตกผลึกได้
2. สามารถรวมตัวได้ดีกับโปรตีนและหนังสัตว์ เปลี่ยนหนังดิบให้กลายเป็นหนังฟอกหรือหนังสำเร็จ
3. มีรสฝาดเนื่องจากไกลโคโปรตีนที่อยู่ในน้ำละลายจะเกิดสารเชิงซ้อนกับแทนนินเกิดการตกตะกอน ทำให้การหล่อลื่นลดลง
4. แทนนินสามารถละลายได้ในน้ำ แอลกอฮอล์ อะซิโตน และไพริดีน แต่ไม่สามารถละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น อีเทอร์ คลอโรฟอร์ม แต่เมื่ออยู่ในน้ำจะมีสภาพเป็นคอลลอยด์
5. มีสมบัติเป็นยาฝาดสมาน (Astringent) เพราะสามารถรวมตัวกับโปรตีน เกิดเป็นสารประกอบที่มีความคงตัวมาก
6. เมื่อทำปฏิกิริยากับเกลือของเหล็กจะเป็นสีน้ำเงินหรือสีเขียว
7. สามารถตกตะกอนกับเกลือของโลหะบางชนิด เช่น เลดแอซิเตต
8. สามารถตกตะกอนได้กับสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตหรือกรดโครมิค
9. สามารถทำให้สารอัลคาลอยด์ (Alkaloids) ตกตะกอนได้ และสารอินทรีย์ที่มีสมบัติเป็นเบสก็สามารถตกตะกอนได้เช่นกัน
10. ในสารละลายที่มีความเป็นเบส แทนนินจะดูดซับออกซิเจนและเปลี่ยนสีคล้ำขึ้น
11. เมื่ออยู่ในสารละลายโพแทสเซียมเฟอริคไซยาไนด์และแอมโมเนียจะเกิดเป็นสีแดงเข้ม

ประโยชน์ของแทนนิน (วรรณวิภางค์ ชื้อตระกูล, 2554)

1. ใช้แทนนินในการฟอกหนัง เช่น แทนนินที่ได้จากเปลือกไม้โกงกาง ไม้มิโมซา ไม้แคบวาซอ และเปลือกไม้โอ๊ค

2. ใช้แทนนินในการผลิตกาวไม้อัด และผลิตพลาสติก โดยผสมแทนนินกับฟอร์มัลดีไฮด์ ใช้เป็นกาวในอุตสาหกรรมเกี่ยวกับไม้อัด

3. ใช้แทนนินเคลือบผิวไม้ โดยใช้แทนนินทำปฏิกิริยากับเบนโซอิลเลต (Benzoylated) จะได้สารประกอบ Benzoylated wattle tannins ที่สามารถละลายได้ในโทลูอีน (Toluene) เมื่อทำปฏิกิริยาอีกครั้งกับไดไอโซไซยาเนต (Diisocyanates) จะได้โพลียูรีเทน (Polyurethanes)

4. แทนนินสามารถรวมตัวกับเกลือของเหล็กได้สารประกอบสีน้ำเงิน นำมาใช้ผลิตน้ำหมึก หมึกพิมพ์ สีย้อมผ้า

5. ใช้แทนนินเป็นสารตกตะกอนโปรตีนและจับกับไอออนของโลหะ ในอุตสาหกรรมผลิตไวน์ เบียร์ และสาเก ทำให้สามารถกำจัดกลิ่นและรสที่ไม่ต้องการออกจากผลิตภัณฑ์ได้

6. ใช้แทนนินทำปฏิกิริยากับเจลาตินได้สารประกอบเชิงซ้อน สามารถใช้เคลือบอาหารบางชนิด เช่น เนื้อสัตว์ ให้มีอายุการเก็บเกี่ยวที่นานขึ้น

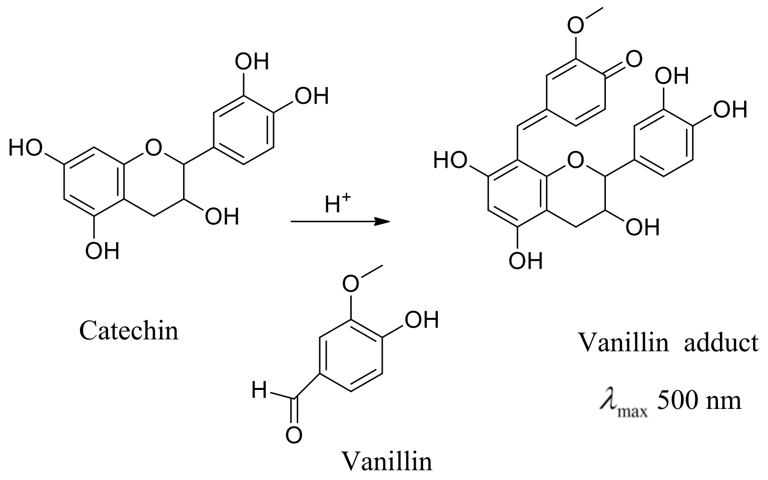
7. ใช้แทนนินป้องกันการเหม็นหืน

8. ใช้แทนนินในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในอาหาร

การหาปริมาณแทนนิน (Schanderl, 1970)

การตรวจสอบสมบัติของแทนนินสามารถทดสอบได้หลายวิธี โดยแต่ละวิธีใช้สารในการทำปฏิกิริยาต่างกัน ดังนี้

1. ตรวจสอบโดยใช้วิธี vanillin hydrochloric ใช้สารประกอบวานิลลินในกรดเกลือเข้มข้น (vallin-conc. HCl) ทดสอบ ใช้ในการอ้างอิงหาปริมาณ condensed tannins โดยหลักการ คือใช้ทดสอบสารประกอบประเภทฟีนอลิคกลุ่ม flavonoid ซึ่งจะเกิดสารสีแดง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นประมาณ 500 นาโนเมตร เป็นดังสมการ ภาพที่ 8



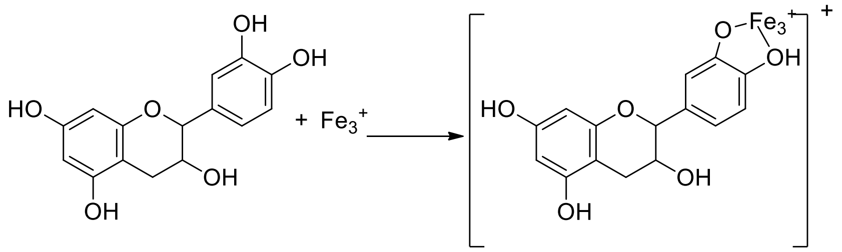
ภาพที่ 8 ปฏิกิริยาระหว่าง Catechin กับ Vanillin (Price, Van Scoyoc, & Butler, 1978)

ปฏิกิริยาระหว่างวานิลลินกับแคทิชินจะให้สารผลิตภัณฑ์ที่มีสีแดง ในการวิเคราะห์นิยมใช้สารแคทิชินเป็นสารมาตรฐานในการทำปฏิกิริยากับวานิลลิน โดยวานิลลินจะเกิดปฏิกิริยากับสารประกอบพวก Aromatic aldehyde โดยจะเกิดที่ตำแหน่งเมตา (meta) ของวงเบนซีนในฟลาวานอล นอกจากจะเกิดกับแคทิชินแล้วยังสามารถเกิดปฏิกิริยากับโพรแอนโธไซยานิดิน (Proanthocyanidin) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ของสารแคทิชินด้วยภายใต้สภาวะที่มี เมทานอลเป็นตัวทำละลาย แต่ว่าอัตราการเกิดปฏิกิริยามีความแตกต่างกันคือแคทิชินจะต่ำกว่าโพรแอนโธไซยานิดิน ปริมาณคอนเดนซ์แทนนินที่วิเคราะห์ได้เป็นค่า Catechin Equivalents (Price et al., 1978)

2. ตรวจสอบโดยใช้วิธี folin-denis ใช้สารละลาย folin-denins reagent เป็นสารทดสอบ โดยหลักการคือการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของหมู่ phenolic hydroxyl โดยหมู่ฟีนอลิคจะไปรีดิวซ์ phosphotunstomolydic acid เกิดเป็นสารเชิงซ้อนสีน้ำเงิน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นประมาณ 700 nm คำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดโดยนำเทียบกับสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิก กรดแกลลิค หรือแคทีชิน

3. ตรวจสอบโดยการทำปฏิกิริยากับสารละลายเจลาติน (gelatin solution) หรือสารละลายเกลือเจลาติน โดยแทนนินจะตกตะกอนกับโปรตีนได้สารประกอบเชิงซ้อนโปรตีนแทนนิน

4. ทดสอบโดยใช้วิธี Prussian blue method โดยการนำไปทำปฏิกิริยากับเฟอริกคลอไรด์และโพแทสเซียมเฟอริกไซยาไนด์ ในสารละลายกรดให้สารละลายสีน้ำเงินหรือสีน้ำเงินม่วงแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นประมาณ 700 นาโนเมตร ดังสมการ ภาพที่ 9



Catechin   Iron catechin complex

ภาพที่ 9 ปฏิกิริยาระหว่าง Catechin กับ Iron (Mario E. Bondini, Del Valle M. A., Ricardo Tapia, Federico Leighton, & Lorcha Godzalez, 2001)

สเปกโทรโฟโตเมทรี (Spectrophotometry) (แม้น อมรสิทธ์ และคณะ, 2552)

วิธีสเปกโทรโฟโตเมทรีเป็นเทคนิคการวิเคราะห์สารที่นิยมใช้มาก สามารถวิเคราะห์สารได้ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ

สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)

สเปกโทรโฟโตมิเตอร์นั้นเป็นเครื่องมือที่ใช้หาปริมาณของสาร โดยจะใช้วิธีการดูดกลืนแสงของสารที่มีสี พบว่าถ้าผ่านแสงที่เคลื่อนที่ต่อเนื่องกันเข้าไปในสารละลาย พบว่าแสงถูกดูดกลืน ณ ที่ช่วงความยาวคลื่นของคลื่นที่มีค่าบางค่า ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่ละลายในสารละลายนั้น การวัดการดูดกลืนของแสงจะกระทำได้โดยใช้เครื่องมือทางวิทยาศาสตร์

หลักในการหาปริมาณของสารกับการวัดปริมาณแสงที่ถูกดูดกลืน

ในการวัดปริมาณของแสงที่ถูกดูดกลืนด้วยสารตัวอย่างนั้น สามารถทำได้โดยให้ลำแสงผ่านเข้าไปในสารตัวอย่าง แล้ววัดปริมาณของแสงที่ผ่านทะลุออกมาโดยเปรียบเทียบกับแสงที่ทะลุออกมาเพื่อไม่มีสารตัวอย่าง ซึ่งกฎการดูดกลืนแสงที่สำคัญ 2 กฎ ได้แก่ กฎของแลมเบิร์ต (Lamber ‘s law) และกฎของเบียร์ (Beer’s law)

กฎของแลมเบิร์ต มีใจความว่า เมื่อลำแสงเดี่ยว ซึ่งเป็นลำแสงที่มีความยาวคลื่นเดียวผ่านตัวกลางเนื้อเดียว สัดส่วนของความเข้มข้นของแสงที่ถูกดูดกลืนไว้ ไม่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของแสงที่กระทบตัวกลางนั้น และความเข้มของแสงจะถูกแต่ละขั้นของตัวกลางดูดกลืนไว้ในสัดส่วนที่เท่ากัน

กฎของเบียร์ มีใจความว่า เมื่อแสงที่มีความยาวคลื่นเดียว ผ่านตัวกลางเนื้อเดียว สัดส่วนของความเข้มแสงที่ถูกตัวกลางนั้นดูดกลืนไว้ จะแปรโดยตรงกับปริมาณของตัวกลางที่ดูดกลืนแสงนั้น

เมื่อวัดการดูดกลืนแสงของสารละลาย ปริมาณความเข้มของแสงที่ถูกดูดกลืนนั้นจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารละลายและความหนาของสารละลายที่ลำแสงต้องผ่าน จึงจำเป็นต้องรวมกฎของเบียร์และกฎของแลมเบิร์ดเข้าด้วยกันเรียกเป็นกฎของเบียร์ – แลมเบิร์ต และเขียนเป็นรูปสมการได้ดังนี้

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon bC$$

$$\%T = \frac{I_0}{I} \times 100$$

$$A = 2 - \log\%T$$

เมื่อ I_0 หมายถึง ความเข้มของแสงก่อนผ่านตัวกลาง

I หมายถึง ความเข้มของแสงซึ่งผ่านตัวกลางแล้ว

C หมายถึง ความเข้มข้นของสาร (mol / dm^3)

b หมายถึง ความหนาของตัวกลาง

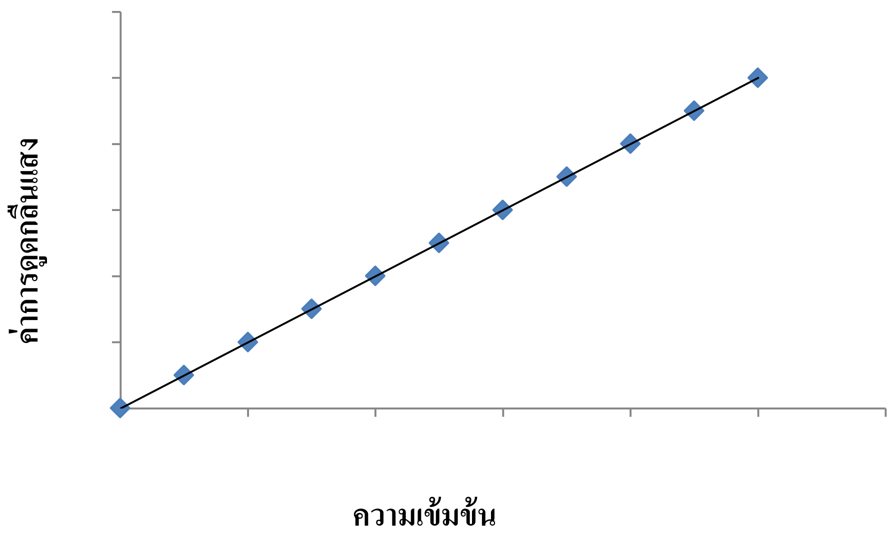
ε หมายถึง โมลาร์แอบซอบติวิตี

T หมายถึง การส่งผ่าน

A หมายถึง การดูดกลืน

การเขียนกราฟมาตรฐาน

กราฟมาตรฐานระหว่างการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสาร จะมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง ดังแสดงได้ในภาพที่ 10



ภาพที่ 10 กราฟมาตรฐานทั่วไปที่ใช้ในการหาปริมาณสาร (แม้น อมรสิทธิ์ และคณะ, 2552)

ชนิดของสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (แม้น อมรสิทธิ์ และคณะ, 2552)

1. สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ชนิดลำแสงเดี่ยว (Single beam spectrophotometer)

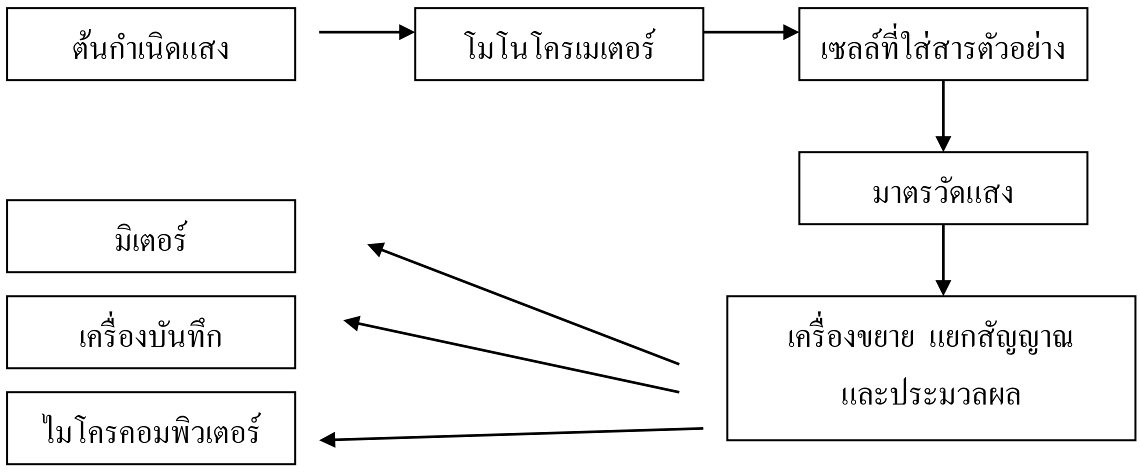
เครื่องมือสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ เป็นหลักการของลำแสงเดี่ยวซึ่งเป็นแบบธรรมดาที่สุด ลำแสงออกจากแหล่งกำเนิดแสงผ่านเข้าหน่วยจำแนกช่วงคลื่นของแสง ควบคุมลำแสงให้พอเหมาะด้วยช่อง (Slit) หลังจากแยกช่วงคลื่นของแสงที่ต้องการออกแล้ว แสงจะตรงผ่านไปที่เซลล์ของสารละลาย ลำแสงที่ผ่านจากเซลล์ก็จะไปกระทบกับผนังของโฟโตเซลล์ทำให้เกิดอิเล็กตรอนหลุดออกมา สเกลที่หน่วยตรวจวัดจะบอกในหน่วยของ Transmittance และ Absorbance ในการใช้เครื่องมือนี้เราจะต้องจัดตั้ง (Set) เครื่องมือให้อ่าน 10 เปอร์เซ็นต์ Transmittance ก่อน โดยใช้สารที่เป็นตัวทำละลาย เช่น ถ้าใช้น้ำเป็นตัวทำละลายก็ใช้น้ำกลั่นใส่ในเซลล์ไปวางกั้นแสง หลังจากนั้นจึงนำเซลล์ที่บรรจุสารละลายของสารที่ต้องการวิเคราะห์ไปวัดการดูดกลืนแสง

2. สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ชนิดลำแสงคู่ (Double beam spectrophotometer)

สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ชนิดลำแสงคู่ถูกดัดแปลงจากสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ชนิดลำแสงเดี่ยวเพื่อให้การวัดค่าการดูดกลืนแสงมีความแม่นยำมากขึ้น ผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้น ซึ่งมักจะเกิดขึ้นในสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ชนิดลำแสงเดี่ยว ได้ถูกจัดกำจัดโดยสิ้นเชิงในสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ชนิดลำแสงคู่ ในเครื่องมือแบบนี้เซลล์ของสารละลายไร้สารตัวอย่างและเซลล์ของสารละลายตัวอย่างจะวัดในเวลาพร้อมกัน

ส่วนประกอบของเครื่องสเปกโทรโตมิเตอร์ (แม้น อมรสิทธิ์ และคณะ, 2552)

เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์โดยทั่วไป จะประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ ดังภาพที่ 11 ต่อไปนี้



ภาพที่ 11 ส่วนประกอบของเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (แม้น อมรสิทธิ์ และคณะ, 2552)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Ferreira and Norgueira (1999) ได้ทำการพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาคอนเดนซ์แทนนินใน ถั่ว guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) โดยการทำให้เกิดสารเชิงซ้อนสีแดงด้วยวิธีวานิลลิน–ไฮโดรคลอริก (vanillin-HCl) แล้วนำไปวิเคราะห์หาแทนนินโดยวิธี FIA โดยใช้คาทิชินเป็นสารละลายมาตรฐาน ผลการวิจัยพบว่าวิธีวิเคราะห์ให้ค่าความเที่ยงของการวิเคราะห์ (%RSD) ต่ำกว่า 1% เมื่อทำการทดลองทุก ๆ 4 ชั่วโมง และสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้อย่างรวดเร็วถึง 60 ตัวอย่างต่อชั่วโมง โดยให้ขีดจำกัดต่ำสุดของวิธีวิเคราะห์ 1.05 มิลลิกรัมต่อลิตร

Luthar (1992) ได้วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลและแทนนินในเมล็ดบัควีด (buckwheat seed) สายพันธุ์ต่าง ๆ ทำให้เกิดสารเชิงซ้อนสีแดงด้วยวิธีวานิลลิน–ไฮโดรคลอริก แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโดยวิธีสเปกโตรโฟโตเมทรี พบว่าในเมล็ดบัควีดมีปริมาณแทนนิน 0.5–4.5 % ซึ่งปริมาณแทนนินจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และสภาพแวดล้อมในการเพาะปลูก

Paaver, Matto, and Raal (2010) ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณแทนนินในส่วนของลำต้นที่บวมของต้นโอ๊ค ที่เรียกว่า แกล (Gall) ชนิดต่าง ๆ ในเอสโตเนีย (Estonia) ด้วยวิธีของ Price and Butler พบว่า แกลโอ๊คแอปเปิลมีแทนนิน 47.2 % ในขณะที่แกลโอ๊คแอปเปิลที่แห้งจนเป็นสีน้ำตาลจะมีแทนนินเพียง 4.2 % แกลโอ๊คองุ่นมีแทนนิน 3.4 % แกลของโอ๊คจีนมีแทนนิน 89.1 % แกลของโอ๊คตุรกีก็มีแทนนิน 81.1 % และแกลของโอ๊คพีสทาเซียมีแทนนิน 52.4 % เมื่อวิเคราะห์ปริมาณแทนนินในเปลือกโอ๊ค พบว่ามีแทนนิน 9.1 % และในส่วนรากมีแทนนิน 21.1 % จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า แกลแอปเปิลหรือแกลโอ๊คองุ่นมีความเหมาะสมที่จะนำมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตแทนนินเพื่อนำมาผลิตยาต่อไป

Price and Butler (1977) ได้พัฒนาวิธีทางสเปกโทรโฟโตเมริกเพื่อตรวจหาปริมาณของแทนนินและสารโพลีฟีนอลที่มีความเข้มข้นต่ำ ๆ ได้ โดยการทำให้เกิดสารเชิงซ้อนสีน้ำเงินและให้ผลการทดสอบที่เป็นบวกอย่างรวดเร็วกับสารโพลีฟีนอลในเมล็ดข้าวฟ่าง สามารถเปรียบเทียบปริมาณของแทนนินได้ภายใน 20 นาที

Price, Hagerman, and Butler (1980) ได้ทำการศึกษาปริมาณของคอนเดนส์แทนนินในถั่วพุ่มจำนวน 10 สายพันธุ์ ถั่วลูกไก่ ถั่วแระและถั่วเขียว โดยวิธีสเปกโทรโฟโตเมตรี พบว่ามีความเข้มข้นของคอนเดนส์แทนนิน อยู่ในช่วง 0 -0.7 % ในถั่วพุ่มและ 0 – 0.2 % ในถั่วแระแต่ไม่พบคอนเดนส์แทนนินในถั่วลูกไก่และถั่วเขียว แสดงให้เห็นว่าในถั่วพุ่มมีปริมาณคอนเดนส์แทนนินอยู่มากที่สุด ซึ่งอาจมีผลต่อคุณค่าทางอาหารหรือทำให้เกิดอันตรายได้

Tabasum, Ahmad, Akhlaq, and Rahman (2001) ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณแทนนินในการผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปบางชนิด ด้วยวิธีการไทเทรตกับสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต พบว่า ชาสุพรีม บรู๊ค บอนด์ มีแทนนิน 0.18 % ชาเขียวมีแทนนิน 0.18 % กาแฟแม็กเวล มีแทนนิน 0.35 % โกลเด้นท์แอปเปิลมีแทนนิน 0.19 % แอมรี่แอปเปิลมีแทนนิน 0.19 % นาคซ์แพร์มีแทนนิน 0.02 % ซูมายพีชมีแทนนิน 0.09 % ซาลารีทับทิมมีแทนนิน 0.39 % ชาลิปตันฉลากสีเหลืองและใบชา มีแทนนิน 0.48 % และบาคาน่าทับทิมมีแทนนิน 1.17 %

รวินิภา ศรีมูล, ศิริจันทร์ ตาใจ และศิริกมล นิยมวรรณ์ (2557) ได้วิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu reagent และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH assay ในน้ำผลไม้แปรรูปที่วางจำหน่ายในจังหวัดจันทบุรี 3 ชนิดได้แก่ น้ำมังคุด น้ำสำรอง และน้ำลูกหว้า รวม 10 ตัวอย่าง พบว่า น้ำลูกหว้า มีปริมาณฟีนอลรวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยวัดเป็นค่าร้อยละของการยับยั้งที่สูงที่สุด เท่ากับ 69 ± 0.00 มิลลิกรัมต่อกรัมกรดแกลลิค 92.17 ± 0.32 ตามลำดับ ส่วนน้ำมังคุดและและน้ำสำรองมีปริมาณฟีนอลรวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ในปริมาณ ที่น้อยกว่า ปริมาณฟีนอลรวมไม่มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 (p-value >0.05)

วรรณวิภางค์ ชื้อตระกูล (2554) ได้ทำการศึกษาปริมาณแทนนินในเครื่องดื่มชาสำเร็จพร้อมดื่มจำนวน 5 เครื่องหมายการค้า ด้วยวิธีสเปกโทรโฟโตเมทรี โดยการทำปฏิกิริยากับสารละลายโพแทสเซียมเฟอริไซยาไนด์ และสารละลายไอออน (III) คลอไรด์ ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร พบว่ามีปริมาณแทนนินอยู่ในช่วง 575.00 – 812.50 มิลลิกรัมต่อลิตร

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

กลุ่มตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่างในการวิจัยครั้งนี้ โดยทำการสุ่มตัวอย่างน้ำผลไม้สำเร็จรูปพร้อมดื่มที่มีเครื่องหมายการค้าต่าง ๆ ที่จำหน่ายในเขตเทศบาลเมืองแสนสุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงสัญลักษณ์เครื่องหมายการค้าต่าง ๆ ของน้ำผลไม้

สัญลักษณ์	ประเภทของน้ำผลไม้	เครื่องหมายการค้า
A1	น้ำองุ่นแดงสำเร็จรูป	ทิปโก้
A2	น้ำองุ่นแดงสำเร็จรูป	UFC
A3	น้ำองุ่นแดงสำเร็จรูป	มาลี
A4	น้ำแอปเปิลสำเร็จรูป	มาลี
A5	น้ำแอปเปิลสำเร็จรูป	UFC
A6	น้ำแอปเปิลสำเร็จรูป	Stith
A7	น้ำสตรอเบอรีสำเร็จรูป	ดอยคำ
A8	น้ำสตรอเบอรีสำเร็จรูป	ทิปโก้
A9	น้ำสตรอเบอรีสำเร็จรูป	Suntra
A10	น้ำส้มเขียวหวานสำเร็จรูป	ทิปโก้
A11	น้ำส้มเขียวหวานสำเร็จรูป	มาลี
A12	น้ำส้มเขียวหวานสำเร็จรูป	UFC
A13	น้ำทับทิมสำเร็จรูป	ทิปโก้
B1	น้ำส้มเขียวหวานคั้นสด	ร้านที่ 1
B2	น้ำส้มเขียวหวานคั้นสด	ร้านที่ 2
B3	น้ำส้มเขียวหวานคั้นสด	ร้านที่ 3
B4	น้ำทับทิมคั้นสด	ร้านที่ 1

สถานที่ทำการทดลอง

อาคารสิรินธร ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

อุปกรณ์ สารเคมี และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. ขวดวัดปริมาตร (Volumetric flask)
2. บีกเกอร์ (Beaker)
3. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)
4. ปิเปต (Piepette)
5. ช้อนตักสารเคมี
6. แท่งแก้ว
7. ขวดฉีดน้ำกลั่น
8. คิวเวทท์ (Cuvette)
9. เครื่องชั่งน้ำหนักไฟฟ้า (Analytical balance) ความละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง
10. ตู้ควัน (Hood)
11. เครื่อง Spectronic Genesys 20
12. ขวดสีชา

สารเคมี

1. กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid , HCl)
2. โพแทสเซียมเฟอริกไซยาไนด์ (Potassium ferricyanide, $K_3Fe(CN)_6$
3. ไอร์ออน(III) คลอไรด์ (Iron (III)chloride, $FeCl_3$)
4. คาทิชิน ((+)- Catechin hydrate , $C_{15}H_{12}O_7$
5. น้ำกลั่น
6. Methanol
7. Vanillin

ขั้นตอนการดำเนินงาน

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคโดยวิธีการ Prussian blue method

การเตรียมสารละลาย

1. สารละลายกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 0.10 โมลาร์

ตวงกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 โมลาร์ ปริมาตร 1.7 มิลลิลิตร ใส่ในบิกเกอร์ที่มีน้ำกลั่น ปริมาตร 98.3 มิลลิลิตร

2. สารละลายโพแทสเซียมเฟอริไซยาไนด์ เข้มข้น 0.003 โมลาร์

ชั่งโพแทสเซียมเฟอริไซยาไนด์ 0.0500 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกปริมาตร

3. สารละลายไอร์ออน (III) คลอไรด์ เข้มข้น 0.06 โมลาร์ ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.10 โมลาร์

ชั่งไอร์ออน (III) คลอไรด์ 0.005 กรัม ละลายด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จนถึงขีดบอกปริมาตร

4. สารละลายมาตรฐานแคทิชิน เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

4.1 ชั่งแคทิชิน 0.0100 กรัม ละลายกับน้ำกลั่นในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกปริมาตร จะได้สารละลายแคทิชินเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

4.2 ปิเปตสารละลายแคทิชิน เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 5.00 มิลลิลิตรใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกปริมาตรใช้เป็นสารละลายมาตรฐาน

5. สารละลายมาตรฐานแคทิชิน เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ปิเปตสารละลายแคทิชิน เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 2.50 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกปริมาตร ใช้เป็นสารละลายมาตรฐานในการหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน

การเตรียมสารละลายมาตรฐานและการสร้างกราฟมาตรฐานแคทิชิน

1. ปิเปตสารละลายมาตรฐานแคทิชินเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร

2. เติมสารละลายโพแทสเซียมเฟอริไซยาไนด์เข้มข้น 0.003 โมลาร์ ปริมาตร 1.00 มิลลิกรัม แกว่งสารละลายผสมให้เข้ากัน

3. เติมสารละลายไอร์ออน (III) คลอไรด์เข้มข้น 0.06 โมลาร์ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร แกว่งในสารละลายผสมให้เข้ากัน

4. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดวัดปริมาตร

5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectronic Genesys 20 ที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร บันทึกผล วัดการดูดกลืนแสงซ้ำอีก 2 ครั้งบันทึกผล

6. ทำการทดลองซ้ำตามข้อ 1-5 เพื่อใช้สารละลายมาตรฐานแคทิชินเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 2.00, 3.00, 4.00 และ 5.00 มิลลิลิตร

7. ทำการทดลองตามข้อ 1-5 เพื่อเตรียมสารละลายแบลงค์ โดยใช้น้ำกลั่น ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร แทนสารละลายมาตรฐานแคทิชิน

8. สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานแคทิชิน

การเตรียมสารตัวอย่าง

1. ปิเปตตัวอย่างน้ำผลไม้สำเร็จรูป เครื่องหมายการค้า A1 ปริมาตร 2.00 มิลลิลิตรใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกปริมาตร ใช้เป็นสารละลายมาตรฐาน

2. เตรียมสารละลายตัวอย่างซ้ำตามข้อ 1 โดยใช้ตัวอย่างน้ำผลไม้เครื่องหมายการค้า A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9, A10, A11, A12, A13, B1, B2, B3 และ B4 ตามลำดับ

วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณแคทิชินในสารละลายตัวอย่างน้ำผลไม้

1. ปิเปตสารละลายตัวอย่างเครื่องหมายการค้า A1 ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร

2. เติมสารละลายโพแทสเซียมเฟอริไซยาไนด์ 0.003 โมลาร์ ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร แกว่งสารละลายผสมให้เข้ากัน

3. เติมสารละลายไอร์ออน (III) คลอไรด์ เข้มข้น 0.06 โมลาร์ ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร แกว่งสารละลายผสมให้เข้ากัน

4. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกปริมาตร

5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยเครื่อง Spectronic Genesys 20 ที่มีความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร บันทึกผล วัดการดูดกลืนแสงซ้ำอีก 2 ครั้งบันทึกผล

6. ทำการทดลองซ้ำตามข้อ 1-5 โดยใช้สารละลายตัวอย่าง เครื่องหมายการค้า A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9, A10, A11 และ A12 ตามลำดับ ส่วนสารละลายตัวอย่าง A2 และ A13 ปิเปตมา 0.50 มิลลิลิตร สารละลายตัวอย่าง A6, B1, B2, B3 และ B4 ปิเปตมาชนิดละ 2.00 มิลลิลิตร

7. ทำการทดลองตามข้อ 1-5 เพื่อเตรียมสารละลายแบลงค์โดยใช้น้ำกลั่น ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร แทนสารละลายตัวอย่าง

8. คำนวณค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงและคำนวณหาความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิคในตัวอย่างน้ำผลไม้ เครื่องหมายการค้าต่าง ๆ โดยใช้ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงและสมการเส้นตรงในกราฟมาตรฐาน

การหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน (% Recovery)

1. สารตัวอย่างที่ไม่เติมสารละลายมาตรฐานแคทิชิน (Unspiked sample)

1.1 ปิเปตสารละลายตัวอย่างเครื่องหมายการค้า A1 ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร

1.2 เติมสารละลายโพแทสเซียมเฟอริไซยาไนด์ เข้มข้น 0.003 โมลาร์ ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร แกว่งสารละลายผสมให้เข้ากัน

1.3 เติมสารละลายไอร์ออน (III) คลอไรด์ เข้มข้น 0.03 โมลาร์ ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร แกว่งสารละลายผสมเข้ากัน

1.4 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกปริมาตร

1.5 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยเครื่อง Spectronic Genesys 20 ที่มีความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร บันทึกผล วัดการดูดกลืนแสงซ้ำอีก 2 ครั้ง บันทึกผล

1.6 ทำการทดลองซ้ำตามข้อ 1.1-1.5 โดยใช้สารละลายตัวอย่างเครื่องหมายการค้า A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9, A10, A11, A12, A13, B1, B2, B3 และ B4 ตามลำดับ

1.7 ทำการทดลองตามข้อ 1.1-1.5 เพื่อเตรียมสารละลายแบลงค์ โดยใช้น้ำกลั่น ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร แทนสารละลายตัวอย่าง

1.8 คำนวณค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงและคำนวณหาความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิคในตัวอย่างน้ำผลไม้ชนิดต่าง ๆ แต่ละเครื่องหมายการค้า โดยใช้ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงและสมการเส้นตรงในกราฟมาตรฐาน

2. สารละลายตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานแคทิชิน (Spiked sample)

2.1 ปิเปตสารละลายตัวอย่างเครื่องหมายการค้า A1 ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร

2.2 เติมสารละลายโพแทสเซียมเฟอริไซยาไนด์ เข้มข้น 0.003 โมลาร์ ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร แกว่งสารละลายผสมให้เข้ากัน

2.3 เติมสารละลายไอร์ออน (III) คลอไรด์ เข้มข้น 0.06 โมลาร์ ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร แกว่งสารละลายผสมเข้ากัน

2.4 ปิเปตสารละลายมาตรฐานแคทิชิน เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 1.50 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรในข้อ 2.3

2.5 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกปริมาตร

2.6 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยเครื่อง Spectronic Genesys 20 ที่มีความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร บันทึกผล วัดการดูดกลืนแสงซ้ำอีก 2 ครั้ง บันทึกผล

2.7 ทำการทดลองซ้ำตามข้อ 2.1- 2.6 โดยใช้สารละลายตัวอย่างเครื่องหมายการค้า A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9, A10, A11, A12, A13, B1, B2, B3 และ B4 ตามลำดับ

2.8 ทำการทดลองตามข้อ 2.1- 2.6 เพื่อเตรียมสารละลายแบลงค์ โดยใช้น้ำกลั่นปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร แทนสารละลายตัวอย่าง

2.9 คำนวณค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงและคำนวณหาความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิคในตัวอย่างน้ำผลไม้ชนิดต่าง ๆ แต่ละเครื่องหมายการค้า โดยใช้ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงและสมการเส้นตรงในกราฟมาตรฐาน

3. นำความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ไม่เติมสารละลายมาตรฐานแคทิชิน และความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานแคทิชิน ที่คำนวณได้จากกราฟมาตรฐานมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคโดยวิธี Vanillin Assay method (Vanillin Assay by Price et al., 1978 **)**

การเตรียมสารละลาย

1. สารละลายวานิลลิน เข้มข้น 1% ในเมทานอล

ชั่งวานิลลิน ปริมาณ 1.0 กรัมละลายในเมทานอลปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 °C

2. สารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 8 % ในเมทานอล

ตวงสารละลายกรดไอโดรคลอริกปริมาตร 8.0 มิลลิลิตร ละลายในเมทานอลปริมาตร100 มิลลิลิตร

3. สาระลาย Working vanillin

ผสมสารละลายในข้อ 1 และข้อ 2 เข้าด้วยกันทั้งหมด

4. สารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 4 % ในเมทานอล

ตวงสารละลายกรดไฮโดรคลอริกปริมาตร 4.0 มิลลิลิตร ละลายในเมทานอลปริมาตร 100 มิลลิลิตร

5. สารมาตรฐานแคทิชินเข้มข้น 0.3 mg/ml

ชั่งสารมาตรฐานแคทิชิน 3.0 มิลลิกรัมละลายในเมทานอล 10 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 °C ใช้ให้หมดในเวลา 3 วัน

การเตรียมสารละลายมาตรฐานและการสร้างกราฟมาตรฐาน

1. ปิเปตสารละลายมาตรฐานแคทิชินมา ใส่ลงในหลอดทดลองจำนวน 2 หลอดหลอดละ 0.40 มิลลิลิตร

2. หลอดที่ 1 เติมสารละลายวานิลลินเข้มข้น 1% ในเมทานอลปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 0.20 มิลลิลิตร แล้วเติมเมทานอล 1.40 มิลลิลิตร ส่วนหลอดที่ 2 ให้เติมสารละลาย กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 4 % ในเมทานอลปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 0.20 มิลลิลิตร แล้วเติมเมทานอล 1.40 มิลลิลิตรโดยระยะเวลาระหว่างการเติมสารหลอดที่ 1 และ 2 ห่างกันประมาณ 1 นาที

3. นำหลอดทดลองทั้งสองไปแช่ในอ่างน้ำร้อนอุณหภูมิ 30 °C ประมาณ 20 นาที

4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectronic Genesys 20 ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร บันทึกผล วัดการดูดกลืนแสงประมาณ 3 ครั้งแล้วบันทึกผล โดยหลอดที่ 2 ทำหน้าที่เป็นแบลงค์

5. ทำการทดลองซ้ำข้อ 1-4 เพื่อใช้สารละลายมาตรฐานแคทิชินเข้มข้น 0.3 mg/ml ปริมาตร 0.80, 1.20, 1.60 และ 2.00 มิลลิลิตรตามลำดับ โดยหลอดทดลองหลอดที่ 1 มีการเติมสารต่าง ๆ ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ปริมาณสารต่างที่เติมลงในสารละลายมาตรฐานแคทิชิน

ปริมาตรสารละลายมาตรฐานแคทิชิน (มิลลิลิตร)	ปริมาตรของสารที่เติม		
	Working vanillin 1% ในเมทานอล (มิลลิลิตร)	น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	เมทานอล (มิลลิลิตร)
0.80	10.00	0.20	1.00
1.20	10.00	0.20	0.60
1.60	10.00	0.20	0.20
2.00	10.00	0.20	0.00

สำหรับหลอดที่ 2 จะทำหน้าที่เป็นแบลงค์ มีการเติมสารดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ปริมาณสารต่าง ๆ ที่เติมลงในสารละลายที่ทำหน้าที่เป็นแบลงค์

ปริมาตรสารละลายมาตรฐานแคทิชิน (มิลลิลิตร)	ปริมาตรของสารที่เติม		
	กรดไฮโดรคลอริก 4% ในเมทานอล (มิลลิลิตร)	น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	เมทานอล (มิลลิลิตร)
0.80	10.00	0.20	1.00
1.20	10.00	0.20	0.60
1.60	10.00	0.20	0.20
2.00	10.00	0.20	0.00

6. สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณมิลลิกรัมของแคทิชิน

การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

น้ำผลไม้ตัวอย่างที่เตรียมมาไม่ต้องนำมาเจือจางใด ๆ สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ได้

การวิเคราะห์หาปริมาณแคทิชินในสารละลายตัวอย่างน้ำผลไม้

1. ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่มีเครื่องหมายการค้า A1 ลงในหลอดทดลองจำนวน 2 หลอด ๆ ละ 0.20 มิลลิลิตร

2. หลอดที่ 1 เติมสารละลายวานิลลินเข้มข้น 1% ในเมทานอลปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร แล้วเติมเมทานอลลงไป 1.60 มิลลิลิตร ส่วนหลอดที่ 2 ให้เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 4 % ในเมทานอลปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร และเมทานอล 1.60 มิลลิลิตร (ทำหน้าที่เป็นแบลงค์) โดยระยะเวลาระหว่างการเติมสารหลอดที่ 1 และ 2 ห่างกันประมาณ 1 นาที

3. แช่ในอ่างน้ำร้อน 20 นาทีพอดี

4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectronic Genesys 20 ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร บันทึกผล วัดการดูดกลืนแสงประมาณ 3 ครั้งแล้วบันทึกผล

5. ทำการทดลองซ้ำข้อ 1-5 โดยใช้สารละลายตัวอย่าง A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9, A10, A11, A12, A13, B1, B2, B3 และ B4 ตามลำดับ

6. คำนวณหาค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงและคำนวณหาความเข้มข้นของสารแคทิชินในน้ำผลไม้ตัวอย่างโดยใช้ค่าค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงและสมการเส้นตรงในกราฟมาตรฐาน

การหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน (% Recovery)

1. สารตัวอย่างที่ไม่เติมสารละลายมาตรฐานแคทิชิน (Unspiked sample)

1.1 ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่มีเครื่องหมายการค้า A1 ลงในหลอดทดลองจำนวน 2 หลอดๆละ 0.20 มิลลิลิตร

1.2 แช่หลอดทดลองไว้ในอ่างน้ำร้อน

1.3 หลอดที่ 1 เติมสารละลาย Vanillin เข้มข้น 1% ในเมทานอลปริมาตร 10.00 มิลลิลิตรแล้วเติมเมทานอลลงไป 1.60 มิลลิลิตร ส่วนหลอดที่ 2 ให้เติมสารละลาย กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 4 % ในเมทานอลปริมาตร 10.00 มิลลิลิตรแล้วเติมเมทานอลลงไป 1.60 มิลลิลิตร (ทำหน้าที่เป็นแบงค์) โดยระยะเวลาระหว่างการเติมสารหลอดที่ 1 และ 2 ห่างกันประมาณ 1 นาที

1.4 แช่ในอ่างน้ำร้อนอุณหภูมิ 30 $^{\circ}$C เป็นเวลาประมาณ 20 นาที

1.5 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectronic Genesys 20 ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร บันทึกผล วัดการดูดกลืนแสงซ้ำ 2 ครั้งแล้วบันทึกผล

1.6 ทำการทดลองซ้ำข้อ 1-5 โดยใช้สารละลายตัวอย่าง A2, A3, A4, A5, A6, A7,

A8, A9, A10, A11, A12, A13, B1, B2, B3 และ B4 ตามลำดับ

1.7 คำนวณหาค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงและคำนวณหาความเข้มข้นของสารแคทิชินในน้ำผลไม้ตัวอย่างโดยใช้ค่าค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงและสมการเส้นตรงในกราฟมาตรฐาน

2. สารละลายตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานแคทิชิน (Spiked sample)

2.1 ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่มีเครื่องหมายการค้า A1 ลงในหลอดทดลองจำนวน 2 หลอดๆละ 0.20 มิลลิลิตร

2.2 หลอดที่ 1 เติมสารละลายวานิลลินเข้มข้น 1% ในเมทานอลปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร แล้วเติมเมทานอล 1.20 มิลลิลิตร ส่วนหลอดที่ 2 ให้เติมสารละลาย กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 4 % ในเมทานอลปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร แล้วเติมเมทานอล 1.20 มิลลิลิตร (ทำหน้าที่เป็นแบงค์) โดยระยะเวลาระหว่างการเติมสารหลอดที่ 1 และ 2 ห่างกันประมาณ 1 นาที

2.3 แช่ในอ่างน้ำร้อน 20 นาทีพอดี

2.4 ปิเปตสารละลายมาตรฐานแคทิชิน เข้มข้น 0.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.60 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองที่ 1

2.5 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectronic Genesys 20 ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร บันทึกผล วัดการดูดกลืนแสงซ้ำ 2 ครั้งแล้วบันทึกผล

2.6 ทำการทดลองซ้ำข้อ 1-5 โดยใช้สารละลายตัวอย่าง A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9, A10, A11, A12, A13, B1, B2, B3 และ B4 ตามลำดับ

2.7 คำนวณหาค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงและคำนวณหาความเข้มข้นของสารแคทิชินในน้ำผลไม้ตัวอย่างโดยใช้ค่าค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงและสมการเส้นตรงในกราฟมาตรฐาน

การคำนวณเชิงสถิติ (ศุภชัย ใช้เทียมวงศ์, 2553)

ค่าเฉลี่ย (Mean , $\bar{x}$)

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^{n} xi}{n}$$

เมื่อ $\bar{x}$ = ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่วัดได้จำนวน n ครั้ง

x_i = ค่าการดูดกลืนแสงจากการวัดครั้งที่ i

n = จำนวนครั้งของการวัด

ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Derivation , SD)

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \overline{x})^2}{n-1}}$$

เมื่อ SD = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Derivation)

$\overline{x}$ = ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่วัดได้จำนวน n ครั้ง

x_i = ค่าการดูดกลืนแสงจากการวัดครั้งที่ i

n = จำนวนครั้งของการวัด

ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative Standard Derivation, RSD)

$$RSD = \frac{SD}{\overline{x}} x\,100$$

เมื่อ RSD = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative Standard Derivation)

SD = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Derivation)

$\overline{x}$ = ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่วัดได้จำนวน n ครั้ง

เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน

$$\%\text{Recovery} = \frac{C_s - C_u}{c} \times 100$$

เมื่อ C_s = ความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างหลังเติมสารละลายมาตรฐาน (Spiked sample)

C_u = ความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างก่อนเติมสารละลายมาตรฐาน (Unspiked sample)

C = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เติมลงไป

บทที่ 4
ผลการวิจัย

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคโดยวิธีการ Prussian blue method

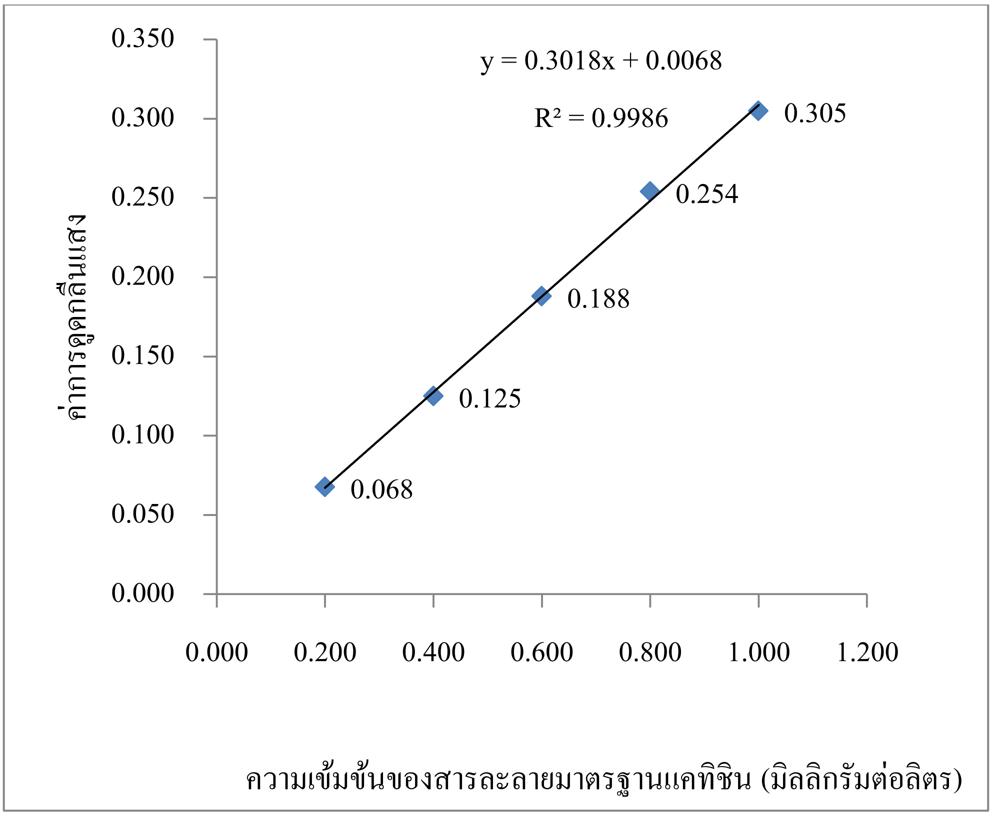
การสร้างกราฟมาตรฐานแคทิชิน

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิคด้วยวิธีสเปกโทรโฟโตเมตรี โดยการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารเคมีที่ต้องการวิเคราะห์และรีเอเจนต์ที่เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ ได้ผลิตภัณฑ์ที่สามารถดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่นเฉพาะค่าหนึ่ง ความเข้มแสงที่ถูกดูดกลืนจะแปรผันตรงกับปริมาณสารวิเคราะห์นั้น การคำนวณปริมาณสารวิเคราะห์จากการดูดกลืนแสง (Absorbance, A) ที่วัดได้ต้องใช้กราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้นจากการนำสารละลายมาตรฐานแคทิชิน เข้มข้น 0.20, 0.40, 0.60, 0.80 และ1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร มาทำปฏิกิริยากับสารละลายโพแทสเซียมเฟอริไซยาไนด์ เข้มข้น 0.003 โมลาร์ และสารละลายไอร์ออน (III) คลอไรด์ เข้มข้น 0.06 โมลาร์ ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.10 โมลาร์ จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร จำนวน 3 ครั้ง ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายแคทิชินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานแคทิชิน มิลลิกรัมต่อลิตร	ค่าการดูดกลืนแสง (A)			ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD	%RSD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
0.20	0.066	0.068	0.069	0.068 $\pm$ 0.002	2.94
0.40	0.124	0.125	0.126	0.125 $\pm$ 0.001	0.80
0.60	0.188	0.188	0.188	0.188 $\pm$ 0.000	0.00
0.80	0.252	0.254	0.256	0.254 $\pm$ 0.002	0.79
1.00	0.303	0.305	0.307	0.305 $\pm$ 0.002	0.65

นำข้อมูลจากตารางที่ 1 มาสร้างกราฟมาตรฐานโดยให้แกน X เป็นความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานแคทิชิน และ แกน Y เป็นค่าการดูดกลืนแสง ดังแสดงในภาพที่ 12



ภาพที่ 12 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานแคทิชิน ที่มีความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร

ตารางที่ 5 สภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์

การวิเคราะห์	ค่าที่วิเคราะห์ได้
ช่วงความเป็นเส้นตรง (มิลลิกรัมต่อลิตร)	0.20-1.00
สมการเส้นตรง	$y = 0.3018x + 0.0068$
R^2	0.9982
SD ที่ความเข้มข้น 0.20 มิลลิกรัมต่อลิตร	0.002
SD ที่ความเข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร	0.002
LOD (มิลลิกรัมต่อลิตร)	0.045
LOQ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	0.151

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคในน้ำผลไม้

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคในน้ำผลไม้สำเร็จรูป ได้แก่น้ำองุ่นแดง น้ำแอปเปิล และน้ำสตรอเบอรี โดยซื้อน้ำผลไม้ที่เป็นแบบสำเร็จรูปบรรจุกล่องจำนวน 3 ชนิด แต่ละชนิดประกอบด้วย 3 เครื่องหมายการค้า ตัวอย่างในเทศบาลเมืองแสนสุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี นำน้ำผลไม้ตัวอย่างมา 2.00 มิลลิลิตรเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้เป็นสารละลายตัวอย่างปริมาตร 50.00 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายน้ำผลไม้ตัวอย่างปริมาตร 1.00 มิลลิลิตรมาทำปฏิกิริยากับสารละลายโพแทสเซียมเฟอริไซยาไนด์ เข้มข้น 0.003 โมลาร์และสารละลายไอร์ออน(III) คลอไรด์ เข้มข้น0.06 โมลาร์ ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.10 โมลาร์ จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร และนำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณมาความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิคในตัวอย่างน้ำผลไม้สำเร็จรูป ผลการทดลองเป็นดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิคของสารละลายตัวอย่างน้ำผลไม้สำเร็จรูป

ชนิดของน้ำผลไม้	ตัวอย่างน้ำผลไม้	ค่าการดูดกลืนแสง (A)		ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิค (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
		ค่าเฉลี่ย ± SD	%RSD	ค่าเฉลี่ย ± SD	%RSD
น้ำองุ่น	A1	0.262 ± 0.003	1.14	0.846 ± 0.010	1.18
	A2	0.153 ± 0.002	1.31	0.483 ± 0.005	1.04
	A3	0.107 ± 0.002	1.87	0.333 ± 0.005	1.50
น้ำแอปเปิล	A4	0.075 ± 0.000	0.00	0.226 ± 0.000	0.00
	A5	0.086 ± 0.002	2.33	0.261 ± 0.005	1.92
	A6	0.127 ± 0.002	1.57	0.397 ± 0.005	1.26
น้ำสตรอเบอรี	A7	0.117 ± 0.001	0.86	0.364 ± 0.002	0.55
	A8	0.186 ± 0.001	0.99	0.312 ± 0.003	0.96
	A9	0.083 ± 0.001	1.21	0.254 ± 0.002	0.79
น้ำส้มสำเร็จรูป	A10	0.116 ± 0.001	0.86	0.363 ± 0.004	0.95
	A11	0.085 ± 0.001	1.18	0.259 ± 0.003	1.16
	A12	0.156 ± 0.001	0.64	0.493 ± 0.002	0.41
น้ำทับทิมสำเร็จรูป	A13	0.186 ± 0.001	0.54	0.595 ± 0.004	0.67

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคในน้ำผลไม้คั้นสด ที่มีจำหน่ายในเขตเทศบาลเมืองแสนสุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี ได้แก่น้ำส้มคั้น 3 ตัวอย่าง และน้ำทับทิมคั้นสด 1 ตัวอย่างเครื่องหมายการค้า นำน้ำผลไม้ตัวอย่างมา 2.00 มิลลิลิตรเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้เป็นสารละลายตัวอย่างปริมาตร 50.00 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายน้ำผลไม้ตัวอย่างปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร มาทำปฏิกิริยากับสารละลายโพแทสเซียมเฟอริไซยาไนด์ เข้มข้น 0.003 โมลาร์ และสารละลายไอร์ออน (III) คลอไรด์ เข้มข้น0.06 โมลาร์ ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.10 โมลาร์ จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร จำนวน 3 ครั้งแล้วหาค่าเฉลี่ย แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณมาความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิคในน้ำผลไม้คั้นสด ผลการคำนวณแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิคของสารละลายตัวอย่างน้ำผลไม้คั้นสด

ชนิดของน้ำผลไม้	ตัวอย่างน้ำผลไม้	ค่าการดูดกลืนแสง (A)		ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิค (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
		ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD	%RSD	ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD	%RSD
น้ำส้มคั้นสด	B1	0.130 ± 0.001	0.77	0.407 ± 0.002	0.49
	B2	0.071 ± 0.001	1.41	0.213 ± 0.003	1.41
	B3	0.084 ± 0.001	1.19	0.271 ± 0.002	0.74
น้ำทิบทิมคั้นสด	B4	0.087 ± 0.001	1.15	0.266 ± 0.003	1.33

จากตารางที่ 6 และตารางที่ 7 คำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในน้ำผลไม้สำเร็จรูปโดยใช้สมการที่ 1 ดังนี้

$$T = C \times D \qquad (1)$$

เมื่อ T = ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคน้ำผลไม้ (มิลลิกรัมต่อลิตร)

C = ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคที่ได้จากกราฟมาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อลิตร)

D = อัตราส่วนในการเจือจางน้ำผลไม่ในสารละลายตัวอย่างมีค่าเท่ากับ 25

ในตัวอย่างน้ำผลไม้ A2 และ A13 อัตราส่วนในการเจือจางสารละลายตัวอย่างมีค่าเท่ากับ 50 ในตัวอย่างน้ำผลไม้ A6, B1, B2 และ B3 อัตราส่วนในการเจือจางสารละลายตัวอย่างมีค่าเท่ากับ 12.5

การคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิคจากน้ำผลไม้ตัวอย่าง A1 ทำได้โดยนำค่าความเข้มข้นจากตารางที่ 6 มาแทนในสมการที่ 1 จะได้ว่า

$$T = 0.846 \times 25$$

$$= 21.15 \text{ มิลลิกรัมต่อลิตร}$$

สำหรับการคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิคในน้ำผลไม้ชนิดอื่น ๆ สามารถทำได้ในทำนองเดียวกันนี้ ผลการคำนวณแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ผลสรุปปริมาณสารประกอบฟีนอลิคในน้ำผลไม้สำเร็จรูปและน้ำผลไม้คั้นสด

ชนิดของน้ำผลไม้	ตัวอย่างน้ำผลไม้	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิค (มิลลิกรัมต่อลิตร)	SD	%RSD
น้ำองุ่นแดง	A1	21.15	0.25	1.18
	A2	24.15	0.25	1.04
	A3	8.33	0.13	1.54
น้ำแอปเปิล	A4	5.65	0.00	0.00
	A5	6.53	0.13	1.93
	A6	4.96	0.06	1.27
น้ำสตรอเบอรี	A7	9.10	0.04	0.48
	A8	7.80	0.08	0.96
	A9	6.33	0.06	0.91
น้ำส้มสำเร็จรูป	A10	9.08	0.09	0.95
	A11	6.48	0.08	1.16
	A12	12.33	0.04	0.35
น้ำทับทิมสำเร็จรูป	A13	29.75	0.20	0.68
น้ำส้มคั้นสด	B1	5.09	0.02	0.43
	B2	2.66	0.04	1.65
	B3	3.21	0.02	0.67
น้ำทับทิมคั้นสด	B4	6.64	0.09	1.32

จากตารางที่ 8 พบว่า ช่วงความเข้มข้นสารประกอบฟีนอลิคที่พบในน้ำผลไม้สำเร็จรูปตั้งแต่ตัวอย่าง A1-A13 มีค่าเท่ากับ 4.96 -29.75 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำผลไม้สำเร็จรูปเครื่องหมายการค้า A13 และA6 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคมากที่สุดและน้อยที่สุดตามลำดับ สำหรับช่วงความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิคที่พบในน้ำผลไม้คั้นสด B1-B4 มีค่าระหว่าง 2.66 -6.64 มิลลิกรัมต่อลิตร ถ้าเปรียบเทียบกับน้ำผลไม้สำเร็จรูปเครื่องหมายการค้า A9-A12 ซึ่งเป็นน้ำผลไม้ชนิดเดียวกัน กับน้ำผลไม้คั้นสด B1-B3 ปรากฏว่าน้ำผลไม้สำเร็จรูปจะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคมากกว่าน้ำผลไม้คั้นสดแบบเดียวกัน ส่วนน้ำผลไม้สำเร็จรูป A13 กับน้ำผลไม้คั้นสด B4 เป็นน้ำผลไม้ชนิดเดียวกัน โดยมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิค 29.75 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 6.64

มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยน้ำผลไม้สำเร็จรูป A4 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคมากกว่าน้ำผลไม้คั้นสด B4

การหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน (% Recovery)

การหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนของสารประกอบฟีนอลิกในน้ำผลไม้ ทำได้ได้การเตรียมสารละลายตัวอย่างจำนวน 2 ชุด ได้แก่สารตัวอย่างที่ไม่เติมสารละลายมาตรฐานแคทิชิน (Unspiked sample) และสารตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานแคทิชิน (Spiked sample) ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 13

ตารางที่ 9 ผลการวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนของประกอบฟีนอลิคในน้ำผลไม้

ชนิดของน้ำผลไม้	ตัวอย่างน้ำผลไม้	ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิค (มิลลิกรัมต่อลิตร)		เปอร์เซนต์การได้กลับคืน (%Recovery)
		Spiked sample	Unspiked sample	
น้ำองุ่นแดง	A1	0.987	0.846	94.00
	A2	0.630	0.483	98.00
	A3	0.474	0.333	94.00
น้ำแอปเปิล	A4	0.366	0.226	93.33
	A5	0.406	0.261	96.67
	A6	0.546	0.397	99.33
น้ำสตรอเบอรี	A7	0.508	0.364	96.00
	A8	0.451	0.312	92.67
	A9	0.392	0.254	92.00
น้ำส้มสำเร็จรูป	A10	0.512	0.363	99.33
	A11	0.394	0.259	90.00
	A12	0.636	0.493	95.33
น้ำทับทิมสำเร็จรูป	A13	0.732	0.595	91.33
น้ำส้มคั้นสด	B1	0.550	0.407	95.33
	B2	0.365	0.213	101.33
	B3	0.394	0.257	91.33
น้ำทับทิมคั้นสด	B4	0.402	0.266	90.67

จากตารางที่ 9 พบว่าเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนของสารประกอบฟีนอลิคมีค่าอยู่ในช่วง 90.00-101.33 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับได้

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคโดยวิธี Vanillin Assay method

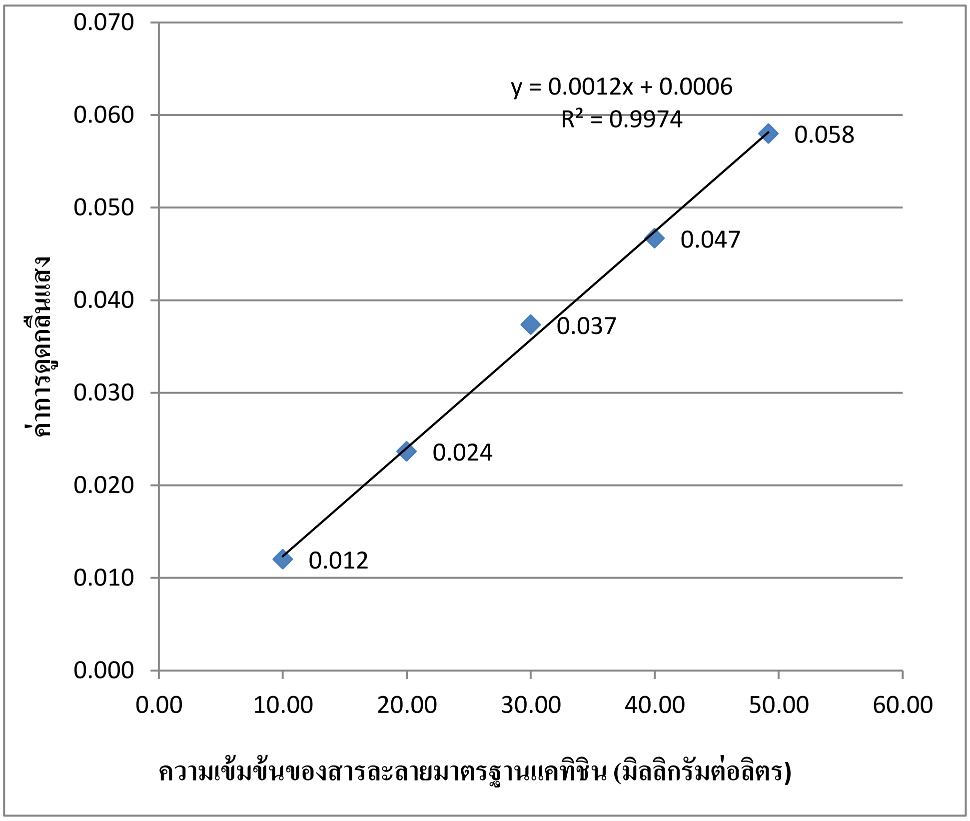
การสร้างกราฟมาตรฐานแคทิชิน

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิคด้วยวิธีสเปกโทรโฟโตเมตรี โดยการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารเคมีที่ต้องการวิเคราะห์และรีเอเจนต์ที่เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ ได้ผลิตภัณฑ์ที่สามารถดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่นเฉพาะค่าหนึ่ง ความเข้มแสงที่ถูกดูดกลืนจะแปรผันตรงกับปริมาณสารวิเคราะห์นั้น การคำนวณปริมาณสารวิเคราะห์จากการดูดกลืนแสง (Absorbance, A) ที่วัดได้ต้องใช้กราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้นจากการนำสารละลายมาตรฐานแคทิชิน เข้มข้น 10.00, 20.00, 30.00, 40.00 และ 49.18 มิลลิกรัมต่อลิตร มาทำปฏิกิริยากับสารละลายวานิลลีนเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตรในเมทานอลผสมกับกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรในเมทานอล จะได้สารละลายที่มีสีแดง จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร จำนวน 3 ครั้ง ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายแคทิชินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานแคทิชิน มิลลิกรัมต่อลิตร	ค่าการดูดกลืนแสง (A)			ค่าเฉลี่ย ± SD	%RSD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
10.00	0.012	0.012	0.012	0.012 ± 0.000	0.00
20.00	0.024	0.024	0.023	0.024 ± 0.001	4.17
30.00	0.038	0.038	0.036	0.037 ± 0.001	2.70
40.00	0.046	0.047	0.047	0.047 ± 0.001	2.13
49.18	0.061	0.057	0.056	0.058 ± 0.003	5.17

นำข้อมูลจากตารางที่ 10 มาสร้างกราฟมาตรฐานโดยให้แกน X เป็นความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานแคทิชิน และ แกน Y เป็นค่าการดูดกลืนแสง ดังแสดงในภาพที่ 13



ภาพที่ 13 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานแคทิชิน ที่มีความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร

ตารางที่ 11 สภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์

การวิเคราะห์	ค่าที่วิเคราะห์ได้
ช่วงความเป็นเส้นตรง (มิลลิกรัมต่อลิตร)	10.00-50.00
สมการเส้นตรง	$y = 0.0012x + 0.0006$
R^2	0.9974
SD ที่ความเข้มข้น 10.00 มิลลิกรัมต่อลิตร	0.0000
SD ที่ความเข้มข้น 50.00 มิลลิกรัมต่อลิตร	0.0026
LOD (มิลลิกรัมต่อลิตร)	0.025
LOQ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	20.3

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคในน้ำผลไม้

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิคในน้ำผลไม้สำเร็จรูป ได้แก่น้ำองุ่นแดง น้ำแอปเปิล น้ำสตรอเบอรี น้ำส้มและน้ำทับทิม โดยการซื้อน้ำผลไม้ที่เป็นแบบสำเร็จรูปบรรจุกล่องในเขตเทศบาลตำบลแสนสุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี โดยการนำน้ำผลไม้ปริมาตร 0.20 มิลลิลิตรมาปรับปริมาตรด้วยเมทานอลให้เป็น 1.60 มิลลิลิตร มาทำปฏิกิริยากับ Working vanillin ซึ่งเป็นการผสมระหว่างสารละลายวานิลลีนเข้มข้น 1 % w/v ในเมทานอลผสมกับกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 8 % v/v ในเมทานอลจะได้สารละลายที่มีสีแดง จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร จำนวน 3 ครั้ง หาค่าเฉลี่ย แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิค ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 ค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิคของสารละลายตัวอย่างน้ำผลไม้สำเร็จรูป

ชนิดของน้ำผลไม้	ตัวอย่างน้ำผลไม้	ค่าการดูดกลืนแสง (A)		ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิค (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
		ค่าเฉลี่ย ± SD	%RSD	ค่าเฉลี่ย S± D	%RSD
น้ำองุ่นแดง	A1	*	-	-	-
	A2	*	-	-	-
	A3	0.008 ± 0.001	7.25	5.56 ± 0.48	8.63
น้ำแอปเปิล	A4	0.004 ± 0.001	25.0	2.78 ± 0.48	17.27
	A5	0.002 ± 0.000	0.00	1.39 ± 0.48	34.53
	A6	0.003 ± 0.001	19.33	0.83 ± 0.00	0.000
น้ำสตรอเบอรี	A7	0.008 ± 0.001	7.25	5.56 ± 0.48	8.63
	A8	0.011 ± 0.001	9.09	8.67 ± 0.48	5.54
	A9	0.011 ± 0.000	1.91	8.61 ± 1.73	20.09
น้ำส้มสำเร็จรูป	A10	0.004 ± 0.001	14.50	2.78 ± 0.48	17.27
	A11	0.002 ± 0.000	0.00	0.83 ± 0.00	0.00
	A12	0.004 ± 0.001	14.50	2.22 ± 0.96	43.24
น้ำทับทิมสำเร็จรูป	A13	0.029 ± 0.002	11.60	23.06 ± 1.2729	5.51

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคในน้ำผลไม้คั้นสด โดยหาซื้อมาในเขตเทศบาลเมืองแสนสุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี ได้แก่น้ำส้มคั้น 3 ตัวอย่างและน้ำทับทิมคั้นสด 1 ตัวอย่าง นำน้ำผลไม้ตัวอย่างมาใส่หลอดทดลอง 2 หลอด ๆละ 0.20 มิลลิลิตรหลอดที่ 1 เติมสารละลายวานิลลิน เข้มข้น 1% ในเมทานอล ปริมาตร 10.00 มิลลิลิตรแล้วเติมเมทานอล 1.60 มิลลิลิตร ส่วนหลอดที่ 2 ให้เติมสารละลาย กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 4 % ในเมทานอลปริมาตร 10.0 มิลลิลิตร เมทานอล 1.60 มิลลิลิตร(ทำหน้าที่เป็นแบลงค์) โดยระยะเวลาระหว่างการเติมสารหลอดที่ 1 และ 2 ห่างกันประมาณ 1 นาทีแช่ในอ่างน้ำร้อนอุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 20 นาทีพอดี นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectronic Genesys 20 ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร จำนวน 3 ครั้งแล้วหาค่าเฉลี่ย จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณมาความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิคในน้ำผลไม้คั้นสด ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 13

ตารางที่ 13 ค่าการดูดกลืนแสงและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิคของสารละลายตัวอย่างน้ำผลไม้คั้นสด

ชนิดของน้ำผลไม้	ตัวอย่างน้ำผลไม้	ค่าการดูดกลืนแสง (A)		ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิค (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
		ค่าเฉลี่ย ± SD	%RSD	ค่าเฉลี่ย ± SD	%RSD
น้ำส้มคั้นสด	B1	0.005 ± 0.001	20.00	3.67 ± 0.83	22.62
	B2	*	-	-	-
	B3	*	-	-	-
น้ำทับทิมคั้นสด	B4	0.005 ± 0.001	20.00	3.67 ± 0.83	22.62

* ไม่สามารถวัดได้

จากตารางที่ 12 และ 13 จะสรุปปริมาณสารประกอบฟีนอลิคในน้ำผลไม้ จำนวน 17 ตัวอย่าง แสดงผลดังตารางที่ 14

ตารางที่ 14 ผลสรุปปริมาณสารประกอบฟีนอลิคในน้ำผลไม้สำเร็จรูปและน้ำผลไม้คั้นสด

ชนิดของน้ำผลไม้	ตัวอย่างน้ำผลไม้	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิค (มิลลิกรัมต่อลิตร)	SD	%RSD
น้ำองุ่น	A1	*	-	-
	A2	*	-	-
	A3	5.56	0.48	8.63
น้ำแอปเปิล	A4	2.78	0.48	17.27
	A5	1.39	0.48	34.53
	A6	0.83	0.00	0.00
น้ำสตรอเบอรี	A7	5.56	0.48	8.63
	A8	8.67	0.48	5.54
	A9	8.61	1.73	20.12
น้ำส้มสำเร็จรูป	A10	2.78	0.48	14.27
	A11	0.83	0.00	0.00
	A12	2.22	0.96	43.24
น้ำทับทิมสำเร็จรูป	A13	23.06	1.27	5.31
น้ำส้มคั้นสด	B1	3.67	0.83	22.62
	B2	-	-	
	B3	-	-	
น้ำทับทิมคั้นสด	B4	3.67	0.83	22.62

จากตารางที่ 14 พบว่า ช่วงความเข้มข้นสารประกอบฟีนอลิคที่พบในน้ำผลไม้สำเร็จรูปตั้งแต่ตัวอย่าง A3-A13 มีค่าเท่ากับ 0.83 -23.06 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำผลไม้สำเร็จรูปเครื่องหมายการค้า A13 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคมากที่สุด ส่วนน้ำผลไม้ A1 และ A2 ไม่สามารถตรวจวัดได้ สำหรับช่วงความเข้มข้นของสารประกอบ ฟีนอลิคที่พบในน้ำผลไม้คั้นสด B1 และ B2 มีค่า 3.67 มิลลิกรัมต่อลิตร ถ้าเปรียบเทียบกับน้ำผลไม้สำเร็จรูปเครื่องหมายการค้า A9 -A12 ซึ่งเป็นน้ำผลไม้

ชนิดเดียวกันกับน้ำผลไม้คั้นสด B1-B3 ปรากฏว่าน้ำผลไม้สำเร็จรูปจะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคมากกว่าน้ำผลไม้คั้นสดแบบเดียวกัน ส่วนน้ำผลไม้สำเร็จรูป A13 กับ น้ำผลไม้คั้นสด B4 เป็นน้ำผลไม้ชนิดเดียวกัน โดยมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิค 23.06 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 3.67 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยน้ำผลไม้สำเร็จรูป A13 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคมากกว่าน้ำผลไม้คั้นสด B4

การหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน (% Recovery)

การหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนของสารประกอบฟีนอลิคในน้ำผลไม้ ทำได้ได้การเตรียมสารละลายตัวอย่างจำนวน 2 ชุด ได้แก่สารตัวอย่างที่ไม่เติมสารละลายมาตรฐานแคทิชิน (Unspiked sample) และสารตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานแคทิชิน (Spiked sample) ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 15

ตารางที่ 15 ผลการวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนของคอนสารประกอบฟีนอลิคในน้ำผลไม้

ชนิดของน้ำผลไม้	ตัวอย่างน้ำผลไม้	ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิค (mg/L)		เปอร์เซนต์การได้กลับคืน (%Recovery)
		Spiked sample	Unspiked sample	
น้ำองุ่นแดง	A1	-	-	-
	A4	-	-	-
	A3	13.33	5.56	103.70
น้ำแอปเปิล	A4	8.33	2.78	74.07
	A5	8.33	0.83	100.00
	A6	8.33	1.39	92.60
น้ำสตรอเบอรี	A7	13.61	5.56	107.41
	A8	16.72	8.87	107.41
	A9	16.39	8.61	103.70
น้ำส้มสำเร็จรูป	A10	9.17	2.22	92.60
	A11	10.00	2.78	96.30
	A12	8.611	0.56	107.40
น้ำทับทิมสำเร็จรูป	A13	25.78	18.06	96.30
น้ำส้มคั้นสด	B1	10.62	3.67	107.33
	B2	-	-	-
	B3	-	-	-
น้ำทับทิมคั้นสด	B4	10.28	3.06	92.50

จากตารางที่ 15 พบว่าเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนของสารประกอบฟีนอลิคมีค่าอยู่ในช่วง 74.07 -107.41

บทที่ 5
อภิปรายและสรุปผล

อภิปรายผล

การหาปริมาณหาสารประกอบฟีนอลิคด้วยวีธีที่ได้รับการพัฒนาโดย Price and Butler (1977) ในน้ำผลไม้สำเร็จรูปและน้ำผลไม้คั้นสด โดยการนำสารละลายตัวอย่างมาทำปฏิกิริยากับสารละลายโพแทสเซียมเฟอริกไซยาไนด์ เข้มข้น 0.003 โมลาร์ และสารละลายไอร์ออน (III) คลอไรด์ เข้มข้น 0.06 โมลาร์ ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 โมลาร์ แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น700 นาโนเมตรซึ่งอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์เป็นอุปกรณ์พื้นฐานในห้องปฏิบัติการเคมีทั่วไป ส่วนสารเคมีที่ใช้สามารถเกิดปฏิกิริยาในสารละลายตัวอย่างที่มีความเจือจางมากได้อย่างรวดเร็ว เกิดสีน้ำเงินของสารเชิงซ้อนได้อย่างชัดเจนและคงทน ทำให้ง่ายและสะดวก รวดเร็วในการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิคจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับเฟอริกไซยาไนด์ $[Fe(CN)_6]^{3-}$ โดยที่เฟอริกไซยาไนด์ไอออนจะถูกรีดิวซ์เป็นเฟอโรไซยาไนด์ไอออน ($Fe(CN)_6]^{4-}$) หลังจากนั้นเฟอโรไซยาไนด์ไอออนจะเกิดปฏิกิริยากับเฟอริกไอออน (Fe^{3+}) เกิดเป็นสารประกอบเฟอริกเฟอโรไซยาไนด์ (Ferric ferrocyanide, $Fe_4[Fe(CN)_6]_3$ ได้สารเชิงซ้อนสีน้ำเงิน (Prussian blue) (Curtman, 1931,Brown, 1987) ดังนั้นจึงสามารถวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคได้จากความเข้มของสีของสารละลายที่เกิดขึ้น ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นแสดงได้ดังนี้

$$\underset{}{\text{Polyphenol}} + \underset{\text{Ferricyanide ion}}{2Fe(CN)_6^{3-}} \longrightarrow \underset{\text{Oxidized}}{\text{Polyphenol}} + \underset{\text{Ferrocyanide ion}}{2Fe(CN)_6^{4-}}$$

$$3Fe(CN)_6^{4-} + \underset{\text{Ferric ion}}{4Fe^{3+}} \longrightarrow \underset{\text{Ferric ferrocyanide (Prussian blue)}}{Fe_4[Fe(CN)_6]_3}$$

จากผลการวิจัยทำให้ทราบถึงปริมาณสารประกอบฟีนอลิคในน้ำผลไม้สำเร็จรูปได้แก่ น้ำองุ่นแดง น้ำแอปเปิล น้ำสตรอเบอรี ที่มีขายในห้างสรรพสินค้าทั่วไป

- น้ำองุ่นแดง มี 3 เครื่องหมายการค้า คือ A1, A2 ,A3 พบปริมาณสารประกอบฟีนอลิคเท่ากับ 21.15, 24.15 และ 8.33 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ น้ำองุ่นแดงที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคมากที่สุดคือเครื่องหมายการค้า A2 ซึ่งมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคเท่ากับ 24.15 มิลลิกรัมต่อลิตร

- น้ำแอปเปิล มี 3 เครื่องหมายการค้า คือ A4, A5, A6 พบปริมาณสารประกอบฟีนอลิคเท่ากับ 5.65, 6.53 และ 4.96 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ น้ำแอปเปิลที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคมากที่สุดคือเครื่องหมายการค้า A5 ซึ่งมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคเท่ากับ 6.53 มิลลิกรัมต่อลิตร
- น้ำสตรอเบอรี มี 3 เครื่องหมายการค้า คือ A7, A8, A9 พบปริมาณสารประกอบฟีนอลิคเท่ากับ 9.10, 7.80 และ6.33 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ น้ำสตรอเบอรีที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคมากที่สุดคือเครื่องหมายการค้า A8 ซึ่งมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคเท่ากับ 7.80 มิลลิกรัมต่อลิตร
- สารตัวอย่างน้ำผลไม้สำเร็จรูป 3 ชนิดจะพบว่าน้ำองุ่นมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคมากที่สุดอยู่ในช่วง 8.33 – 24.15 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับน้ำแอปเปิลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคน้อยที่สุดอยู่ในช่วง 4.96 - 6.53 มิลลิกรัมต่อลิตร
- สำหรับตัวอย่างน้ำผลไม้ชุดตัวอย่าง A10, A11 และ A12 เป็นน้ำส้มสำเร็จรูป 3 เครื่องหมายการค้า พบว่ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคเท่ากับ 9.08, 6.48 และ 12.33 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ตัวอย่างน้ำส้มสำเร็จรูปที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคมากที่สุดคือเครื่องหมายการค้า A12 ซึ่งมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคเท่ากับ 12.33 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ส่วนน้ำผลไม้ตัวอย่างเครื่องหมายการค้า A4 เป็นน้ำทิมสำเร็จรูป มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคเท่ากับ 29.75 มิลลิกรัมต่อลิตร
- น้ำผลไม้คั้นสด B1, B2 และ B3 ที่นำมาทำวิจัยครั้งนี้เป็นน้ำส้มคั้นสดมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคเท่ากับ 5.90, 2.66 และ 3.21 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ น้ำส้มคั้นสด B1 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคมากสุดคือ 5.09 มิลลิกรัมต่อลิตร

สำหรับน้ำทับทิมคั้นสด B4 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคเท่ากับ 6.64 มิลลิกรัมต่อลิตร จะพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิคที่พบในน้ำส้มสำเร็จรูปมีค่าอยู่ในช่วง 6.48 - 12.33 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนน้ำส้มคั้นสดจะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคในช่วง 2.66 – 5.09 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งจะเห็นว่าน้ำส้มสำเร็จรูปมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคมากกว่าน้ำส้มคั้นสดและน้ำทับทิมสำเร็จรูปจะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคมากกว่าน้ำทับทิมคั้นสด

เนื่องจากผู้วิจัยไม่สามารถหาน้ำองุ่นแดง น้ำแอปเปิลและน้ำสตอเบอรีคั้นสดได้ ดังนั้นจึงไม่สามารถเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลิคในน้ำผลไม้ทั้งสามชนิดระหว่างน้ำผลไม้สำเร็จรูปและน้ำผลไม้คั้นสด

สำหรับวิธีการวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิคด้วยวิธีการ Vanillin Assay method โดยการนำน้ำผลไม้ตัวอย่าง มาทำปฏิกิริยากับ Working vanillin ซึ่งเป็นสารละลายผสมระหว่างสารละลายวานิลลินเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตรในเมทานอลผสมกับกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรในเมทานอล นำไปแช่อ่างน้ำอุ่นที่มีอุณหภูมิคงที่ 30 ^{o}C ประมาณ 20 นาที จะได้สารละลายที่มีสีแดงจากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร

ผลการวิจัยพบว่า น้ำองุ่นที่มีเครื่องหมายการค้า A1, A2 ไม่สามารถตรวจวัดได้ A3 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคอยู่ใน 5.56 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำแอปเปิลที่มีเครื่องหมายการค้า A4, A5 และ A6 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลคอยู่ระหว่าง 0.83 - 2.78 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำสตรอเบอรีที่มีเครื่องหมายการค้า A7, A8 และ A9 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคอยู่ระหว่าง 5.56 -8.67 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำส้มคั้นสำเร็จรูปที่มีเครื่องหมายการค้า A10, A11 และ A12 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคระหว่าง 0.83 – 2.78 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำทับทิมสำเร็จรูปที่มีเครื่องหมายการค้า A13 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิค 23.06 มิลลิกรัมต่อลิตร

สำหรับน้ำส้มคั้นสดนั้นที่วัดค่าการดูดกลืนแสงได้มีเพียงตัวอย่างเดียวคือ B1 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิค 3.67 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำทับทิมคั้นสด B4 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิค 3.67 มิลลิกรัมต่อลิตร

ในการวิเคราะห์ด้วยวิธี Vanillin Assay method เราใช้สารแคทิชินซึ่งเป็นมอเนอร์ของคอนเดนซ์แทนนินหรือสารประกอบฟีนอลิคเป็นสารละลายมาตรฐาน ทำปฏิกิริยากับสารลายวานิลลินในเมทานอล ปริมาณน้ำยังมีผลต่อสีของสารด้วยถ้ามีปริมาณน้ำในสารตัวอย่างมากไปก็จำทำให้สีแดงจางลง (Price et al., 1978) ในการเตรียมสารละลายมาตรฐานจึงต้องมีการเติมน้ำกลั่นลงไปด้วย เนื่องจากตัวอย่างน้ำผลไม้ที่ใช้นี้มีน้ำเป็นองค์ประกอบด้วย ซึ่งโดยทั่วไปแล้ววิธีนี้นิยมนำไปหาปริมาณคอนเดนซ์แทนนินในเมล็ดข้าวฟ่าง หรือธัญพืชอื่น ๆ โดยใช้ตัวทำละลายสกัดที่เป็นพวกแอลกอฮอล์ แล้วนำเข้าเครื่องเหวี่ยงแยกแล้วนำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์ต่อไป ทำให้ ไม่มีน้ำในสารตัวอย่าง ในการวิจัยครั้งนี้นำเอาวิธีนี้มาใช้วิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิกในน้ำผลไม้ทั้งแบบสำเร็จรูปและน้ำผลไม้คั้นสดที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ ผลที่ได้มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคต่ำกว่าวิธี Prussian blue method สารตัวอย่างบางชนิดไม่เกิดปฏิกิริยากับวานิลลินแล้วให้สีแดง จึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิคโดยเฉพาะน้ำผลไม้คั้นสด

สิ่งที่น่าสนใจที่พบได้ในงานวิจัยนี้คือ น้ำผลไม้สำเร็จรูปมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคสูงกว่าน้ำผลไม้แบบคั้นสด ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าในกระบวนการผลิตน้ำผลไม้คั้นสดนั้นอาจมีการเจือจางน้ำลงไปเพื่อลดต้นทุนการผลิตและมีการเติมสารเพิ่มความหวาน แต่งกลิ่นให้ดูน่าดื่มมากขึ้น

สรุปผลการทดทอง

การหาปริมาณหาสารประกอบฟีนอลิคด้วยวิธี Prussian blue method ในน้ำผลไม้สำเร็จรูปและน้ำผลไม้คั้นสด โดยการนำสารละลายตัวอย่างมาทำปฏิกิริยากับสารละลายโพแทสเซียมเฟอริกไซยาไนด์ เข้มข้น 0.003 โมลาร์ และสารละลายไอร์ออน (III) คลอไรด์เข้มข้น 0.06 โมลาร์ ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 โมลาร์ แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตรจากการวิเคราะห์น้ำผลไม้สำเร็จรูปและน้ำผลไม้คั้นสดพบว่ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคจะอยู่ในช่วง 2.66 – 29.75 มิลลิกรัมต่อลิตร จากการทดสอบความแม่นและความเที่ยงของประสิทธิภาพของการวิเคราะห์ พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนอยู่ในช่วง 90.00-101.33 มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์อยู่ในช่วง 0.00 -1.99 มีค่าขีดกำจัดในการตรวจพบและค่าขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณเท่ากับ 0.045 และ 0.151 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ

ในการวิเคราะห์ด้วยวิธี Vanillin Assay method เราใช้สารแคทิชินซึ่งเป็นสารละลายมาตรฐาน ทำปฏิกิริยากับสารลายวานิลลินในเมทานอล นำไปแช่อ่างน้ำอุ่นที่มีอุณหภูมิคงที่ 30 ^{o}C ประมาณ 20 นาที จะได้สารละลายที่มีสีแดงจากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร จากการวิเคราะห์น้ำผลไม้สำเร็จรูปและน้ำผลไม้คั้นสดพบว่ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคจะอยู่ในช่วง 0.83 – 23.67 มิลลิกรัมต่อลิตร จากการทดสอบความแม่นและความเที่ยงของประสิทธิภาพของการวิเคราะห์ พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนอยู่ในช่วง 74.07 -107.41 มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์อยู่ในช่วง 0.00 – 43.24 มีค่าขีดกำจัดในการตรวจพบและค่าขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณเท่ากับ 0.025 และ 20.30 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ

น้ำผลไม้สำเร็จรูปมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคสูงกว่าน้ำผลไม้แบบคั้นสด

ข้อเสนอแนะ

จากการวิจัยในครั้งนี้สามารถนำหลักการแนวทางการศึกษาและวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิคไปใช้ประโยชน์ต่อไปโดยผู้วิจัยมีข้อเสนอแนะคือควรใช้วิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคที่ในการวิเคราะห์ตัวอย่างเพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลิคจากวิธีการวิเคราะห์ที่แตกต่างกันหลาย ๆ วิธี นอกจากนั้นแล้วควรหาวิธีที่สามารถวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิคที่จำเพาะเจาะจง เช่น สารคอนเดนส์แทนนิน สารไฮโดรไลซ์แทนนินด้วยวิธีที่มีความเชื่อถือเปรียบเทียบกันหลาย ๆ วิธี

บรรณานุกรม

เดชภาฑร วงศ์เดชขจร. (2550). *ประสิทธิภาพของสารแทนนินจากกระถินต่อพยาธิตัวกลมในระบบทางเดินอาหารและอัตราการเจริญเติบโตของแพะ.* วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาสัตวบาล, บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นิรัชรา เลาหะประสิทธิ์. (2557, 10 กุมภาพันธ์). คุณประโยชน์ของคาทิชินต้านมะเร็ง ชะลอความเสื่อม. *ไทยรัฐออนไลน์.* เข้าถึงได้จาก https://www.thairath.co.th/content/402394

ปราณี อ่านเปรื่อง. (2541). ทฤษฎีการผลิตน้ำผลไม้บรรจุขวดพร้อมดื่ม และความรู้เกี่ยวกับการขึ้นทะเบียนฯ. *อาหาร. 28(3)*, 157-167.

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนาปนนท์. (ม.ป.ป.). *น้ำผลไม้.* เข้าถึงได้จาก http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/0884/fruit-juice

แม้น อมรสิทธิ์, อมร เพชรสม, ยุวดี เชี่ยววัฒนา, อาทิตยา ศิริภิญญานนท์, ศรีวิไล โอมอภิญญาณ และอุทุมพร สุขม่วง. (2552). *หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เครื่องมือ.* กรุงเทพฯ: ชวนพิมพ์ 50.

รวินิภา ศรีมูล, จันทร์ ตาใจ และศิริกมล นิยมวรรณ์. (2557). *ปริมาณฟีนอลรวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในน้ำผลไม้แปรรูปในจังหวัดจันทบุรี.* รายงานการวิจัยวิจัย : คณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรมการเกษตร, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก วิทยาเขตจันทบุรี.

วรรณวิภางค์ ชื้อตระกูล. (2554). *การวิเคราะห์หาปริมาณแทนนินในเครื่องดื่มชาปรุงสำเร็จพร้อมดื่มด้วยวิธีสเปกโทรโฟโตเมทรี.* งานนิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเคมีศึกษา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.

ศุภชัย ใช้เทียมวงศ์. (2553). *เคมีวิเคราะห์.* (พิมพ์ครั้งที่ 12). กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สมพร มีเดช, เจริญ เจริญชัย, จุฑารัตน์ ศรีดารา, วัฒนา วิริวุฒิกร และกนกวรรณ ฤดีสิริศักดิ์. (2554). *การศึกษาปริมาณแทนนินในผลิตภัณฑ์ไวน์ที่ผลิตในประเทศไทย โดยวิธีไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี.* รายงานการวิจัย : สถาบันวิทยบริการ, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี.

สมศักดิ์ วรมงคลชัย. (2532). *การสกัดแทนนินจากเปลือกไม้โกงกางในคอลัมแบบพัลส์ประเภทวงแหวนกับจาน.* วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเคมี, บัณฑิตวิทยาลัย, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุรวงค์ วงษ์ศิริ. (2536). *การสกัดแทนนินจากเปลือกเงาะ*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเคมีเทคนิค, คณะวิทยาศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อัญมณี ปิณฑะบุตร. (2540). *การสกัดแทนนินจากเปลือกลูกตาล*. การวิจัยวิทยาศาสตรบัณฑิต, สาขาวิชาเคมีศึกษา, คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, สถาบันราชภัฏเพชรบุรี.

Ferreira, E. C., & Nogueira, A. R. (1999). Vanillin-condensed Tannin Study Using Flow Injection Spectrophotametry. *Journal of Elsevier, 51*, 1-6.

Goncalves, R., Soares, S., Mateus, N., & Feritas, V. (2007). Inhibition of trypsin by condensed tannins and wine. *Journal of Agricurtural and Food Chemistry, 55*(18)*,* 7596-7610. Retrieved from http://pubs.acs.org.

Helrich, K. (1990). *Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemists* (18^{th} Ed.).United States of America : Association of Official Analytical Chemists.

Horace D. Graham. (1992). Stabilization of the Prussian blue color in the determination of polyphenols. *Journal of Agricurtural and Food Chemistry, 40,* 801-805.

James N. Miller, & Jane C. Miller. (2010). Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry. (6^{th}Ed). England Pearson Education: Limited.

Luthar, Z. (1992). Polyphenol classification and tannin content of buckwheat seed. *(Fagopyrum escuentum Moench) Fagopyrum*, *12*, 36-42.

Mane, C., Sommerer, N., Cheynier, Y. V., Cole, R. B., & Fulcrand, H. (2007). Assessment of the molecular weight distribution of tannin fractions through MALDI-TOF MS analysis of protein-tannin complexes. *Analytical Chemistry*, *79*(6)*,* 2239-2248.

Mario E. Bondini, Del Valle M. A., Ricardo Tapia, Federico Leighton, & Lorcha Godzalez. (2001). Study of the iron catechin complexes in dimethyl sulphoxide. Redox chemistry and interaction with superoxide radical anion in this medium. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*, 46, 309-317. Retrieved from http://dx.doi.org/10.4067/S0366-16442001000300011

Maxson, E. D., & Rooney, L. W. (1972). Evaluation of Method for Tannin in Sorghum Grain. *American Association of Cereal Chemists*, *Inc*, 49 ,720-729.

Paaver, U., Motto, V., & Raal, A. (2010). Total tannin content in distinct Qurecus robur L. galls. *Journal of Medicinal Plants Research*, *4*(8), 702-705.

Price, M. L., & Butler, L. G. (1977). Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. *Agricultural and Food Chemistry*, *25*(6), 1268-1273.

Price, M. L., Hagerman, A. E., & Butler, L. G. (1980). Tannin content of cowpeas, chickpeas, pigeon peas, and mung beans. *Agricultural and Food Chemistry*, *28*(2), 459-461.

Price, van Scoyoc, & Butler. (1978). Vanillin Assay. *Agricultural and Food Chemistry*, *26*, 1214-1218.

Schofield P., Mbugua D. M., & Pell A. N. (2001). Analysis of condensed tannins : a review. *Animal Feed Science and Technology*. *91*, 21-40.

Schanderl, S. H. (1970). *Method in Food Analysis*. New York : Academic Press.

Tabasum, S., Ahmad, S., Akhlaq, N., & Rahman, K. (2001). Estimation of tannins in difference food product. *Agriculture & Biology*, *3*(4), 529-530.

Yumiko Nakamura, Sumiko Tsuji, & Yasuhide Tonogai. (2003). Anaysis of Proanthocyanidins in Grape Seed Exracts, Health Foods and Grape Seed oils. *Journal of Health Science, 49*, 45-54.

ภาคผนวก

สัญลักษณ์แทนเครื่องหมายการค้า

สัญลักษณ์แทนเครื่องหมายการค้าต่าง ๆ ของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ มีดังนี้

A1 แทน น้ำองุ่นแดง ยี่ห้อ ทิปโก้

A2 แทน น้ำองุ่นแดง ยี่ห้อ UFC

A3 แทน น้ำองุ่นแดง ยี่ห้อ มาลี

A4 แทน น้ำแอปเปิล ยี่ห้อ มาลี

A5 แทน น้ำแอปเปิล ยี่ห้อ UFC

A6 แทน น้ำแอปเปิล ยี่ห้อ Stith

A7 แทน น้ำสตรอเบอรี ยี่ห้อ ดอยคำ

A8 แทน น้ำสตรอเบอรี ยี่ห้อ ทิปโก้

A9 แทน น้ำสตรอเบอรี ยี่ห้อ Suntra

A10 แทน น้ำส้มเขียวหวาน ยี่ห้อ ทิปโก้

A11 แทน น้ำส้มเขียวหวาน ยี่ห้อ มาลี

A12 แทน น้ำส้มเขียวหวาน ยี่ห้อ UFC

A13 แทน น้ำทับทิม ยี่ห้อ ทิปโก้

B1 แทน น้ำส้มเขียวหวานคั้นสด ร้านที่1

B2 แทน น้ำส้มเขียวหวานคั้นสด ร้านที่ 2

B3 แทน น้ำส้มเขียวหวานคั้นสด ร้านที่ 3

B4 แทน น้ำทับทิมคั้นสด

การวัดค่าค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างน้ำผลไม้

ตารางที่ 16 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างน้ำผลไม้สำเร็จรูป

ตัวอย่างน้ำผลไม้	ค่าการดูดกลืนแสง (A)			ค่าเฉลี่ย ± SD	%RSD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
A1	0.259	0.262	0.265	0.262 ± 0.003	1.14
A2	0.151	0.153	0.154	0.153 ± 0.002	1.31
A3	0.106	0.107	0.109	0.107 ± 0.002	1.87
A4	0.075	0.075	0.075	0.075 ± 0.000	0.00
A5	0.084	0.086	0.087	0.086 ± 0.002	2.33
A6	0.125	0.127	0.128	0.127 ± 0.002	1.57
A7	0.116	0.117	0.117	0.117 ± 0.001	0.86
A8	0.100	0.101	0.102	0.101 ± 0.001	0.99
A9	0.083	0.083	0.084	0.083 ± 0.001	1.21
A10	0.115	0.117	0.117	0.116 ± 0.001	0.86
A11	0.084	0.085	0.086	0.085 ± 0.001	1.18
A12	0.155	0.156	0.156	0.156 ± 0.001	0.64
A13	0.185	0.187	0.187	0.186 ± 0.001	0.54

ตารางที่ 17 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างน้ำผลไม้คั้นสด

ตัวอย่างน้ำผลไม้	ค่าการดูดกลืนแสง (A)			ค่าเฉลี่ย ± SD	%RSD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
B1	0.129	0.130	0.130	0.130 ± 0.001	0.77
B2	0.070	0.071	0.072	0.071 ± 0.001	1.41
B3	0.084	0.084	0.085	0.084 ± 0.001	1.91
B4	0.086	0.087	0.088	0.087 ± 0.001	1.15

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคโดยวิธีการ Prussian blue method

คำนวณความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานแคทิชิน ที่ใช้สร้างกราฟมาตรฐาน

สารละลายมาตรฐานแคทิชินเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

ปิเปตสารละลายมาตรฐานแคทิชิน 1.00 มิลลิลิตร แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนสารละลายมีปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$(10\ \text{mg/L})(1.00\ \text{mL}) = C_2\ (50\ \text{mL})$$

$$C_2 = 0.20\ \text{mg/L}$$

สารละลายมาตรฐานแคทิชิน มีความเข้มข้น 0.20 มิลลิกรัมต่อลิตร

คำนวณความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิคในสารละลายตัวอย่างน้ำผลไม้

นำค่า Absorbance ที่ได้มาแทนค่าในสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐานสารละลายแคทิชิน

$$y = 0.3018x + 0.0068$$

y = ค่า Absorbance

x = ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิค

ยกตัวอย่างสารละลายมาตรฐานตัวอย่าง A1 วัดค่าการดูดกลืนแสงได้ 0.262

แทนค่า $y = 0.3018x + 0.0068$

$$0.262 = 0.3018x + 0.0068$$

$$x = \frac{0.262 - 0.0068}{0.3018}$$

$$x = 0.846$$

สารตัวอย่างน้ำผลไม้ A1 มีความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิค 0.846 มิลลิกรัม

ตารางที่ 18 ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิคในน้ำผลไม้สำเร็จรูป

ตัวอย่างน้ำผลไม้	ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิค (มิลลิกรัมต่อลิตร)			ค่าเฉลี่ย ± SD	%RSD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
A1	0.836	0.846	0.856	0.846 ± 0.010	1.18
A2	0.478	0.484	0.488	0.483 ± 0.005	1.04
A3	0.329	0.332	0.339	0.333 ± 0.005	1.50
A4	0.226	0.226	0.226	0.226 ± 0.000	0.00
A5	0.256	0.262	0.266	0.261 ± 0.005	1.92
A6	0.392	0.398	0.402	0.397 ± 0.005	1.26
A7	0.362	0.365	0.365	0.364 ± 0.002	0.55
A8	0.309	0.312	0.315	0.312 ± 0.003	0.96
A9	0.252	0.252	0.256	0.253 ± 0.002	0.79
A10	0.359	0.365	0.365	0.363 ± 0.004	1.10
A11	0.256	0.259	0.262	0.259 ± 0.003	1.16
A12	0.491	0.494	0.494	0.493 ± 0.002	0.41
A13	0.590	0.597	0.597	0.595 ± 0.004	0.67

ตารางที่ 19 ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิคในน้ำผลไม้คั้นสด

ตัวอย่างน้ำผลไม้	ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิค (มิลลิกรัมต่อลิตร)			ค่าเฉลี่ย ± SD	%RSD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
B1	0.405	0.408	0.408	0.407 ± 0.002	0.49
B2	0.209	0.213	0.216	0.213 ± 0.004	1.88
B3	0.256	0.256	0.259	0.257 ± 0.002	0.78
B4	0.262	0.266	0.269	0.266 ± 0.004	1.50

การคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิคในน้ำผลไม้

จากค่าการดูดกลืนแสงของสารประกอบฟีนอลิคที่ได้จากสารตัวอย่างต่าง ๆ และนำความเข้มข้นที่ได้จากกราฟมาตรฐานของสารละลายแคททิชิน นำไปคำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิคในน้ำผลไม้ได้ดังนี้

ปิเปตน้ำผลไม้ตัวอย่าง 2.00 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 50.00 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ปิเปตสารละลายน้ำผลไม้ตัวอย่าง 1.00 มิลลิลิตร เติมสารละลายโพแทสเซียมเฟอริไซยาไนด์เข้มข้น 0.003 โมลาร์ ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร และสารละลายไอร์ออน (III) คลอไรด์ เข้มข้น 0.06 โมลาร์ ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.10 โมลาร์ ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 50.00 มิลลิลิตร

$$T = C \times D$$

เมื่อ T = ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิคในน้ำผลไม้ (มิลลิกรัมต่อลิตร)

C = ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิคที่ได้จากกราฟมาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อลิตร)

D = อัตราส่วนในการเจือจางน้ำผลไม้ให้เป็นสารละลายตัวอย่างมีค่าเท่ากับ 25

สำหรับการคำนวณหาความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิคในน้ำผลไม้เครื่องหมายการค้า A1 ทำโดยการนำค่าความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิคมาแทนในสมการที่ 1 จะได้ว่า

$$T = 0.846 \text{ mg/L} \times 25$$

$$T = 21.50 \text{ mg/L}$$

ดังนั้นความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิคที่วิเคราะห์ได้คือ 21.15 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตารางที่ 20 ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิคในน้ำผลไม้สำเร็จรูป

ตัวอย่างน้ำผลไม้	ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิค (มิลลิกรัมต่อลิตร)			ค่าเฉลี่ย ± SD	%RSD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
A1	20.90	21.15	21.40	21.15 ± 0.25	1.18
A2	23.90	24.80	24.10	24.15 ± 0.25	1.04
A3	8.23	8.30	8.48	8.33 ± 0.13	1.54
A4	5.56	5.65	5.56	5.65 ± 0.00	0.00
A5	6.40	6.55	6.65	6.53 ± 0.13	1.99
A6	4.90	4.98	5.03	4.96 ± 0.13	1.21
A7	9.05	9.13	9.13	9.10 ± 0.04	0.44
A8	7.73	7.80	7.88	7.80 ± 0.08	1.03
A9	6.30	6.30	6.40	6.33 ± 0.06	0.95
A10	8.98	9.13	9.13	9.08 ± 0.09	0.99
A11	6.40	6.48	6.50	6.48 ± 0.08	1.24
A12	12.28	12.35	12.35	12.33 ± 0.04	0.32
A13	29.50	29.85	29.85	29.75 ± 0.20	0.67

ตารางที่ 21 ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิคในน้ำผลไม้คั้นสด

ตัวอย่างน้ำผลไม้	ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิค (มิลลิกรัมต่อลิตร)			ค่าเฉลี่ย ± SD	%RSD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
B1	5.06	5.10	5.10	5.09 ± 0.20	0.39
B2	2.61	2.66	2.70	3.66 ± 0.04	1.50
B3	3.20	3.20	3.24	3.21 ± 0.02	0.62
B4	6.55	6.65	6.73	6.64 ± 0.09	1.36

การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนของสารประกอบฟีนอลิค

จากการใช้สารละลายตัวอย่างน้ำผลไม้ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตรมาเติมสารละลายมาตรฐานแคทิชินเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 1.5 มิลลิลิตร

สารละลายมาตรฐานแคทิชิน เข้มข้น 5 mg/L ปริมาตร 1.5 mL

สารละลายมาตรฐาน 1,000 mL มีปริมาณแคทิชิน 5 mg

สารละลายมาตรฐาน 1.50 mL มีปริมาณแคทิชิน $\frac{5\text{ mg} \times 1.50\text{ mL}}{1000\text{ mL}}$

$= 0.0075$ mg

ดังนั้นความเข้มข้นในสารละลายมาตรฐานแคทิชินในสารละลาย spiked sample

สารละลาย spiked sample ปริมาตร 50.00 mL มีปริมาณแคทิชิน 0.0075 mg

สารละลาย spiked sample ปริมาตร 1,000 mL ,มีปริมาณแคทิชิน

$$\frac{0.0075\text{ mg} \times 1000\text{ mL}}{50.00\text{ mL}}$$

$= 0.15$ mg

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานแคทิชินในสารละลาย spiked sample 0.15 mg/L

จากการหาค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิคในสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร ที่เติมสารละลายมาตรฐานแคทิชินเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังตารางที่ 22 และตารางที่ 23

ตารางที่ 22 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างน้ำผลไม้สำเร็จรูปที่มีการเติมสารละลายมาตรฐานแคทิชิน

ตัวอย่างน้ำผลไม้	ค่าการดูดกลืนแสง (A)			ค่าเฉลี่ย ± SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
A1	0.303	0.304	0.307	0.305 ± 0.002
A2	0.195	0.197	0.199	0.197 ± 0.002
A3	0.145	0.150	0.155	0.150 ± 0.005
A4	0.116	0.117	0.119	0.117 ± 0.002
A5	0.128	0.130	0.130	0.129 ± 0.001
A6	0.171	0.172	0.172	0.172 ± 0.001
A7	0.158	0.159	0.163	0.160 ± 0.003
A8	0.142	0.143	0.144	0.143 ± 0.001
A9	0.124	0.125	0.126	0.125 ± 0.001
A10	0.160	0.162	0.162	0.161 ± 0.001
A11	0.125	0.126	0.126	0.126 ± 0.001
A12	0.197	0.199	0.200	0.199 ± 0.002
A13	0.227	0.228	0.228	0.228 ± 0.001

ตารางที่ 23 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างน้ำผลไม้คั้นสดที่มีการเติมสารละลายมาตรฐานแคทิชิน

ตัวอย่างน้ำผลไม้	ค่าการดูดกลืนแสง (A)			ค่าเฉลี่ย ± SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
B1	0.171	0.173	0.174	0.173 ± 0.002
B2	0.116	0.117	0.118	0.117 ± 0.001
B3	0.125	0.126	0.126	0.126 ± 0.001
B4	0.127	0.128	0.129	0.128 ± 0.001

ตารางที่ 24 ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิคที่พบในสารตัวอย่างน้ำผลไม้สำเร็จรูปที่มีการเติมสารละลายมาตรฐานแคทิชิน เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตัวอย่างน้ำผลไม้	ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิค (มิลลิกรัมต่อลิตร)			ค่าเฉลี่ย ± SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
A1	0.981	0.985	0.995	0.987 ± 0.007
A2	0.624	0.630	0.637	0.630 ± 0.007
A3	0.458	0.474	0.491	0.474 ± 0.017
A4	0.362	0.365	0.372	0.366 ± 0.005
A5	0.402	0.408	0.408	0.406 ± 0.004
A6	0.544	0.547	0.547	0.546 ± 0.002
A7	0.501	0.504	0.518	0.508 ± 0.009
A8	0.448	0.451	0.455	0.451 ± 0.003
A9	0.388	0.392	0.395	0.395 ± 0.002
A10	0.508	0.514	0.514	0.512 ± 0.004
A11	0.392	0.395	0.395	0.394 ± 0.002
A12	0.630	0.637	0.640	0.636 ± 0.005
A13	0.730	0.733	0.733	0.732 ± 0.002

ตารางที่ 25 ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิคที่พบในสารตัวอย่างน้ำผลไม้คั้นสด ที่มีการเติมสารละลายมาตรฐานแคทิชิน เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตัวอย่างน้ำผลไม้	ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิค (มิลลิกรัมต่อลิตร)			ค่าเฉลี่ย ± SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
B1	0.544	0.551	0.554	0.550 ± 0.005
B2	0.362	0.365	0.368	0.365 ± 0.003
B3	0.392	0.395	0.395	0.271 ± 0.002
B4	0.730	0.733	0.733	0.732 ± 0.002

การหาค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิคในสารละลายตัวอย่างที่ไม่เติมสารละลายมาตรฐานแคทิชิน ดังตารางที่ 26 และตารางที่ 27

ตารางที่ 26 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างน้ำผลไม้สำเร็จรูปที่ไม่เติมสารละลายมาตรฐานแคทิชิน

ตัวอย่างน้ำผลไม้	ค่าการดูดกลืนแสง (A)			ค่าเฉลี่ย ± SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
A1	0.259	0.262	0.265	0.262 ± 0.003
A2	0.151	0.153	0.154	0.153 ± 0.002
A3	0.106	0.107	0.109	0.107 ± 0.002
A4	0.075	0.075	0.075	0.075 ± 0.000
A5	0.084	0.086	0.087	0.086 ± 0.002
A6	0.125	0.127	0.128	0.127 ± 0.002
A7	0.116	0.117	0.117	0.117 ± 0.001
A8	0.100	0.101	0.102	0.186 ± 0.001
A9	0.083	0.083	0.084	0.083 ± 0.001
A10	0.115	0.117	0.117	0.116 ± 0.001
A11	0.084	0.085	0.086	0.085 ± 0.001
A12	0.155	0.156	0.156	0.156 ± 0.001
A13	0.185	0.187	0.187	0.186 ± 0.001

ตารางที่ 27 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างน้ำผลไม้คั้นสดที่ไม่เติมสารละลายมาตรฐานแคทิชิน

ตัวอย่างน้ำผลไม้	ค่าการดูดกลืนแสง (A)			ค่าเฉลี่ย ± SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
A10	0.129	0.130	0.130	0.130 ± 0.001
A11	0.070	0.071	0.072	0.071 ± 0.001
A12	0.084	0.084	0.085	0.084 ± 0.001
A13	0.086	0.087	0.088	0.087 ± 0.001

ตารางที่ 28 ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิคในน้ำผลไม้สำเร็จรูปไม่เติมสารละลายมาตรฐานแคทิชิน

ตัวอย่างน้ำผลไม้	ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิค (มิลลิกรัมต่อลิตร)			ค่าเฉลี่ย ± SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
A1	0.836	0.846	0.856	0.846 ± 0.010
A2	0.478	0.484	0.488	0.483 ± 0.005
A3	0.329	0.332	0.339	0.333 ± 0.005
A4	0.226	0.226	0.226	0.226 ± 0.000
A5	0.256	0.262	0.266	0.261 ± 0.005
A6	0.392	0.398	0.402	0.397 ± 0.005
A7	0.362	0.365	0.365	0.364 ± 0.002
A8	0.309	0.312	0.315	0.312 ± 0.003
A9	0.252	0.252	0.256	0.254 ± 0.002
A10	0.359	0.356	0.365	0.363 ± 0.004
A11	0.256	0.259	0.262	0.259 ± 0.003
A12	0.491	0.494	0.494	0.493 ± 0.002
A13	0.590	0.597	0.597	0.595 ± 0.004

ตารางที่ 29 ความเข้มข้นของสารสารประกอบฟีนอลิคในน้ำผลไม้คั้นสดไม่เติมสารละลายมาตรฐานแคทิชิน

ตัวอย่างน้ำผลไม้	ความเข้มข้นของแทนนิน (มิลลิกรัมต่อลิตร)			ค่าเฉลี่ย ± SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
B1	0.405	0.408	0.408	0.407 ± 0.002
B2	0.209	0.213	0.216	0.213 ± 0.003
B3	0.256	0.256	0.259	0.257 ± 0.002
B4	0.262	0.266	0.269	0.266 ± 0.003

สามารถคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนของสารประกอบฟีนอลิค ดังตารางที่ 30

ตารางที่ 30 เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน

ตัวอย่าง	เติมสารละลายมาตรฐานแคทิชิน		ไม่เติมสารละลายมาตรฐานแคทิชิน		เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน (%Recovery)
	ค่าการดูดกลืนแสง	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
A1	0.305	0.987	0.262	0.846	94.00
A2	0.197	0.630	0.153	0.483	98.00
A3	0.150	0.474	0.107	0.333	94.00
A4	0.117	0.366	0.127	0.226	93.33
A5	0.129	0.406	0.086	0.261	96.67
A6	0.172	0.546	0.127	0.397	99.33
A7	0.160	0.508	0.117	0.364	96.00
A8	0.143	0.451	0.101	0.312	92.67
A9	0.125	0.392	0.083	0.254	92.00
A10	0.161	0.512	0.116	0.363	99.33
A11	0.126	0.394	0.085	0.259	90.00
A12	0.199	0.363	0.156	0.493	95.33
A13	0.228	0.732	0.186	0.595	91.33
B1	0.173	0.550	0.130	0.407	95.33
B2	0.117	0.365	0.071	0.213	101.33
B3	0.126	0.394	0.084	0.257	91.33
B4	0.128	0.402	0.087	0.266	90.67

จากตารางที่ 30 สามารถหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน โดยคำนวณได้จากสูตร *ดังนี้*

$$\% \text{ Recovery} = \frac{C_s - C_u}{C} \times 100$$

เมื่อ C_s = ความเข้มข้นของสารตัวอย่างหลังเติมสารละลายมาตรฐาน *(*Spiked sample)

C_u = ความเข้มข้นของสารตัวอย่างก่อนเติมสารละลายมาตรฐาน *(*Unspiked sample)

C = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เติมลงไป

เช่นความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างก่อนเติมสารละลายมาตรฐานที่วัดได้ 0.846 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างหลังเติมสารละลายมาตรฐานที่วัด*ได้* 0.987 มิลลิกรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เติมลงไป 0.15 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังนั้น

$$\text{เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน} = \frac{0.987 - 0.846}{0.15} \times 100$$

$$= 94.00$$

การศึกษาความถูกต้องของวิธีที่ทำการวิเคราะห์ (Jame N. Miller & Jame C. Miller, 2010)

การหาขีดจำกัดของการตรวจวัด (Limit of Detection, LOD) ใช้ข้อมูลจากกราฟมาตรฐาน เพื่อนำไปวิเคราะห์หาขีดจำกัดของวิธีที่สามารถตรวจพบปริมาณต่ำสุดของสารที่ต้องการวิเคราะห์ได้ หาได้จากข้อมูลที่ใช้สร้างกราฟมาตรฐาน แล้วนำมาคำนวณโดยใช้สูตร

$$LOD = y = y_B + 3S_B$$

y_B คือ ค่าจุดตัดแกน y ที่ได้จากสมการเส้นตรงในกราฟมาตรฐาน

S_B คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของแบลงค์

นำข้อมูลจากตารางที่ และภาพที่ มาหาค่า S_B จากสูตร

$$S_B = S_{y/x} = \left\{\frac{\sum(y_i-\hat{y})^2}{n-2}\right\}^{1/2}$$

$S_B = S_{y/x}$ คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของแบลงค์

y_i คือ ค่า y ที่ได้จากการทดลอง (ค่าการดูดกลืนแสง)

$\hat{y}$ คือ ค่า y ที่ได้จากการแทนค่าลงในสมการเส้นตรง $y = 0.3018x + 0.0068$

n คือจำนวนข้อมูลที่ใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐาน

ตารางที่ 31 การคำนวณหาค่า $\hat{y}$, $y_i - \hat{y}$ และ $(y_i - \hat{y})^2$

ความเข้มข้นของแคทิชิน (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง (y_i)	$\hat{y}$	$y_i - \hat{y}$	$(y_i - \hat{y})^2$
0.20	0.068	0.067	0.001	0.000001
0.40	0.125	0.128	-0.003	0.000009
0.60	0.188	0.188	0.000	0.000000
0.80	0.254	0.248	0.006	0.000036
1.00	0.305	0.309	-0.004	0.000016
		n = 5		$\sum = 0.000062$

แทนค่าลงในสูตร $S_B = S_{y/x} = \left\{\frac{\sum(y_i-\hat{y})^2}{n-2}\right\}^{1/2}$

$= \left(\frac{0.000062}{3}\right)^{1/2}$

$= 4.546 \times 10^{-3}$

y_B (ค่าตัดแกน y ที่ได้จากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน) = 0.0068

หาขีดจำกัดของการตรวจวัด

แทนค่าลงในสูตร $y = y_B + 3S_B$

$= 0.0068 + 3(4.546 \times 10^{-3})$

$= 0.020438$

$= 0.0204$

จากสมการเส้นตรง $y = 0.3018x + 0.0068$

Limit of detection (LOD) $x = \frac{0.0204-0.0068}{0.3018}$

$= 0.045$ มิลลิกรัมต่อลิตร

การหาค่า Limit of Quantitation (LOQ)

แทนค่าลงในสูตร $y = y_B + 10S_B$

$= 0.0068 + 10(4.546 \times 10^{-3})$

$= 0.0524$

จากสมการเส้นตรง $y = 0.3018x + 0.0068$

Limit of Quantitation $x = \frac{(0.0524-0.0068)}{0.3018}$

$= 0.151$ มิลลิกรัมต่อลิตร

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคโดยวิธี Vanillin Assay method

ตารางที่ 32 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างน้ำผลไม้สำเร็จรูป

ตัวอย่างน้ำผลไม้	ค่าการดูดกลืนแสง (A)			ค่าเฉลี่ย ±SD	%RSD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
A1	*	*	*	*	-
A2	*	*	*	*	-
A3	0.007	0.008	0.008	0.008 ± 0.001	12.50
A4	0.005	0.004	0.004	0.004 ± 0.001	25.00
A5	0.002	0.002	0.002	0.002 ± 0.000	0.00
A6	0.003	0.002	0.003	0.003 ± 0.001	33.33
A7	0.008	0.007	0.008	0.008 ± 0.001	12.50
A8	0.011	0.012	0.011	0.011 ± 0.001	9.09
A9	0.009	0.013	0.012	0.011 ± 0.000	0.00
A10	0.005	0.004	0.004	0.004 ± 0.001	25.00
A11	0.002	0.002	0.002	0.002 ± 0.000	0.00
A12	0.003	0.003	0.005	0.004 ± 0.001	25.00
A13	0.027	0.029	0.030	0.029 ± 0.002	6.90

ตารางที่ 33 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างน้ำผลไม้คั้นสด

ตัวอย่างน้ำผลไม้	ค่าการดูดกลืนแสง (A)			ค่าเฉลี่ย ±SD	%RSD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
B1	0.005	0.004	0.006	0.005 ± 0.001	20.00
B2	*	*	*	*	-
B3	*	*	*	*	-
B4	0.005	0.004	0.005	0.005 ± 0.001	20.00

* ไม่สามารถวัดได้

คำนวณความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานแคทิชิน ที่ใช้สร้างกราฟมาตรฐาน

สารละลายมาตรฐานแคทิชินเข้มข้น 0.30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ปิเปตสารละลายมาตรฐานแคทิชิน 0.40 มิลลิลิตร แล้วเจือจางด้วยเมทานอลจนสารละลายมีปริมาตรขนาด 12 มิลลิลิตร

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$(0.30 \text{ mg/mL})(0.40 \text{ mL}) = C_2 (12 \text{ mL})$$

$$C_2 = 0.01 \text{ mg/mL}$$

สารละลายมาตรฐานแคทิชิน มีความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารละลาย 1.00 mL มีแคทิชิน 0.01 mg

สารละลาย 1,000 mL มีแคทิชิน $\dfrac{0.01\ mg \times 1{,}000\ mg}{1.00\ mL}$

= 10.00 มิลลิกรัมต่อลิตร

คำนวณความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิคในสารละลายตัวอย่างน้ำผลไม้

นำค่า Absorbance ที่ได้มาแทนค่าในสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐานสารละลายแคทิชิน

$$y = 0.0012x + 0.0006$$

y = ค่า Absorbance

x = ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิค

ยกตัวอย่างสารละลายมาตรฐานตัวอย่าง A3 วัดค่าการดูดกลืนแสงได้ 0.007

แทนค่า $y = 0.0012x + 0.0006$

$$0.007 = 0.0012x + 0.0006$$

$$x = \frac{0.007 - 0.0006}{0.0012}$$

$$x = 5.53$$

สารตัวอย่างน้ำผลไม้ A1 มีความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิค 5.53 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตารางที่ 34 ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิคในน้ำผลไม้สำเร็จรูป

ตัวอย่างน้ำผลไม้	ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิค (มิลลิกรัมต่อลิตร)			ค่าเฉลี่ย ±SD	%RSD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
A1	-	-	-	-	-
A2	-	-	-	-	-
A3	5.33	6.17	6.17	5.89 ± 0.83	14.09
A4	3.33	2.50	2.50	2.78 ± 0.48	17.27
A5	1.67	0.83	1.67	1.39 ± 0.48	34.53
A6	0.83	0.83	0.83	0.83 ± 0.00	0.00
A7	5.83	5.00	5.83	556 ± 0.48	8.63
A8	8.67	9.50	8.67	8.95 ± 0.48	5.36
A9	6.67	10.00	9.17	8.61 ± 1.73	20.12
A10	3.33	2.50	2.50	2.78 ± 0.48	14.27
A11	0.83	0.83	0.83	0.83 ± 0.00	0.00
A12	1.67	1.67	3.33	2.22 ± 0.96	43.24
A13	21.67	23.33	24.17	23.06 ± 1.27	5.51

ตารางที่ 35 ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิคในน้ำผลไม้คั้นสด

ตัวอย่างน้ำผลไม้	ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิค (มิลลิกรัมต่อลิตร)			ค่าเฉลี่ย ±SD	%RSD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
B1	3.67	2.83	4.50	3.67 ± 0.83	22.62
B2	*	*	*	-	-
B3	*	*	*	-	-
B4	3.67	2.83	3.67	3.39 ± 0.49	14.45

* ไม่สามารถวัดได้

การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนของสารประกอบฟีนอลิค

จากการใช้สารละลายตัวอย่างน้ำผลไม้ปริมาตร 0.20 มิลลิลิตรมาเติมสารละลายมาตรฐานแคทิชินเข้มข้น 0.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 0.60 มิลลิลิตร

สารละลายมาตรฐานแคทิชิน เข้มข้น 0.15 mg/mL ปริมาตร 0.60 mL

สารละลายมาตรฐาน 1.00 mL มีปริมาณแคทิชิน 0.15 mg

สารละลายมาตรฐาน 0.60 mL มีปริมาณแคทิชิน $\frac{0.15\ \text{mg} \times 0.60\ \text{mL}}{1.00\ \text{mL}}$

= 0.09 mg

ดังนั้นความเข้มข้นในสารละลายมาตรฐานแคทิชินในสารละลาย spiked sample

สารละลาย spiked sample ปริมาตร 12.00 mL มีปริมาณแคทิชิน 0.09 mg

สารละลาย spiked sample ปริมาตร 1,000 mL ,มีปริมาณแคทิชิน

$$\frac{0.09\ mg \times 1000\ mL}{12.00\ mL}$$

= 7.50 mg

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานแคทิชินในสารละลาย spiked sample 7.50 mg/L

ตารางที่ 36 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างน้ำผลไม้สำเร็จรูปที่มีการเติมสารละลายมาตรฐานแคทิชิน

ตัวอย่างน้ำผลไม้	ค่าการดูดกลืนแสง (A)			ค่าเฉลี่ย ±SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
A1	-	-	-	-
A2	-	-	-	-
A3	0.017	0.017	0.017	0.017 ± 0.000
A4	0.010	0.012	0.010	0.011 ± 0.001
A5	0.011	0.011	0.011	0.011 ± 0.000
A6	0.012	0.011	0.010	0.011 ± 0.001
A7	0.017	0.017	0.018	0.017 ± 0.001
A8	0.021	0.021	0.021	0.021 ± 0.000
A9	0.019	0.022	0.021	0.021 ± 0.002
A10	0.012	0.012	0.012	0.012 ± 0.000
A11	0.013	0.013	0.013	0.013 ± 0.000
A12	0.012	0.011	0.011	0.011 ± 0.001
A13	0.032	0.032	0.030	0.031 ± 0.001

ตารางที่ 37 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างน้ำผลไม้สำเร็จรูปและน้ำผลไม้คั้นสดที่มีการเติมสารละลาย มาตรฐานแคทิชิน

ตัวอย่างน้ำผลไม้	ค่าการดูดกลืนแสง (A)			ค่าเฉลี่ย ±SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
B1	0.014	0.014	0.015	0.014 ± 0.001
B2	-	-	-	-
B3	-	-	-	-
B4	0.012	0.014	0.014	0.013 ± 0.001

ตารางที่ 38 ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิคที่พบในสารตัวอย่างน้ำผลไม้สำเร็จรูป ที่มีการเติมสารละลายมาตรฐานแคทิชิน เข้มข้น 0.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตัวอย่างน้ำผลไม้	ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิค (มิลลิกรัมต่อลิตร)			ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
A1	-	-	-	-
A2	-	-	-	-
A3	13.33	13.33	13.33	13.33 $\pm$ 0.00
A4	7.50	9.17	7.50	8.06 $\pm$ 0.96
A5	8.33	8.33	8.3	8.33 $\pm$ 0.00
A6	9.17	8.33	7.50	8.33 $\pm$ 0.83
A7	13.33	13.33	14.7	13.61 $\pm$ 0.48
A8	16.72	16.72	16.72	16.72 $\pm$ 0.00
A9	15.00	17.50	16.67	16.39 $\pm$ 1.27
A10	9.17	9.17	9.17	9.17 $\pm$ 0.00
A11	10.00	10.00	10.00	10.00 $\pm$ 0.00
A12	9.17	8.33	8.33	8.61 $\pm$ 0.48
A13	25.83	25.83	24.17	25.28 $\pm$ 0.96

ตารางที่ 39 ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิคที่พบในสารตัวอย่างน้ำผลไม้คั้นสด ที่มีการเติมสารละลายมาตรฐานแคทิชิน

ตัวอย่างน้ำผลไม้	ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิค (มิลลิกรัมต่อลิตร)			ค่าเฉลี่ย ± SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
B1	11.16	11.16	12.00	11.44 ± 0.48
B2	-	-	-	-
B3	-	-	-	-
B4	9.50	13.40	13.40	12.10 ± 2.25

การหาค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิคในสารละลายตัวอย่างที่ไม่เติมสารละลายมาตรฐานแคทิชิน ดังตารางที่ 40 และตารางที่ 41

ตารางที่ 40 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างที่ไม่เติมสารละลายมาตรฐานแคทิชิน

ตัวอย่างน้ำผลไม้	ค่าการดูดกลืนแสง (A)			ค่าเฉลี่ย ± SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
A1	*	*	*	*
A2	*	*	*	*
A3	0.007	0.008	0.008	0.008 ± 0.001
A4	0.005	0.004	0.004	0.004 ± 0.001
A5	0.002	0.002	0.002	0.002 ± 0.000
A6	0.003	0.002	0.003	0.003 ± 0.001
A7	0.008	0.007	0.008	0.008 ± 0.001
A8	0.011	0.012	0.011	0.011 ± 0.001
A9	0.009	0.013	0.012	0.011 ± 0.002
A10	0.003	0.003	0.005	0.004 ± 0.001
A11	0.005	0.004	0.004	0.004 ± 0.001
A12	0.002	0.001	0.002	0.011 ± 0.001
A13	0.023	0.023	0.022	0.023 ± 0.001

ตารางที่ 41 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างน้ำผลไม้สำเร็จรูปและน้ำผลไม้คั้นสดที่ไม่มีการเติมสารละลายมาตรฐานแคทิชิน

ตัวอย่างน้ำผลไม้	ค่าการดูดกลืนแสง (A)			ค่าเฉลี่ย ± SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
B1	0.012	0.014	0.016	0.014 ± 0.002
B2	-	-	-	-
B3	-	-	-	-
B4	0.005	0.004	0.005	0.005 ± 0.001

ตารางที่ 42 ความเข้มข้นของสารในน้ำผลไม้สำเร็จรูปไม่เติมสารละลายมาตรฐานแคทิชิน

ตัวอย่างน้ำผลไม้	ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิค (มิลลิกรัมต่อลิตร)			ค่าเฉลี่ย ± SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
A1	-	-	-	-
A2	-	-	-	-
A3	5.00	5.89	5.83	5.56 ± 0.48
A4	3.33	2.50	2.50	2.78 ± 0.00
A5	0.83	0.83	0.83	0.83 ± 0.00
A6	1.67	0.83	1.67	1.39 ± 0.48
A7	5.83	5.00	5.83	5.56 ± 0.48
A8	8.67	9.50	8.67	8.95 ± 0.48
A9	6.67	10.00	9.17	8.61 ± 1.74
A10	1.67	1.67	3.33	2.22 ± 0.96
A11	3.33	2.50	2.50	2.78 ± 0.48
A12	0.83	0.00	0.83	0.56 ± 0.48
A13	18.3	18.33	17.50	18.06 ± 0.48

ตารางที่ 43 ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิคที่พบในสารตัวอย่างน้ำผลไม้คั้นสด
ที่ไม่มีการเติมสารละลายมาตรฐานแคทิชิน

ตัวอย่างน้ำผลไม้	ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิค (มิลลิกรัมต่อลิตร)			ค่าเฉลี่ย ± SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
B1	2.83	3.67	3.67	3.39 ± 0.48
B2	-	-	-	-
B3	-	-	-	-
B4	3.67	2.83	3.67	3.39 ± 0.48

สามารถคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนของสารประกอบฟีนอลิค ดังตารางที่ 44

ตารางที่ 44 เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐาน (mg/L)	Spiked sample		Unspiked sample		เปอร์เซนต์การได้กลับคืน (%Recovery)
		ค่าการดูดกลืนแสง	ความเข้มข้น (mg/L)	ค่าการดูดกลืนแสง	ความเข้มข้น (mg/L)	
A1	-	-	-	-	-	-
A2	-	-	-	-	-	-
A3	7.50	0.017	13.33	0.008	5.56	103.70
A4	7.50	0.011	8.33	0.004	2.78	74.07
A5	7.50	0.011	8.33	0.002	0.83	100.00
A6	7.50	0.011	8.33	0.003	1.39	92.60
A7	7.50	0.017	13.61	0.008	5.6	107.41
A8	7.50	0.026	20.83	0.016	12.78	107.41
A9	7.50	0.021	17.00	0.011	8.95	107.30
A10	7.50	0.012	9.17	0.004	2.22	92.60
A11	7.50	0.013	10.00	0.004	2.78	96.30
A12	7.50	0.011	8.61	0.002	0.56	107.40
A13	7.50	0.037	25.28	0.023	18.06	96.30
B1	7.50	0.014	11.44	0.014	3.39	107.33
B2	-	-	-	-	-	-
B3	-	-	-	-	-	-
B4	7.50	0.013	10.33	0.005	3.39	92.50

การศึกษาความถูกต้องของวิธีที่ทำการวิเคราะห์ (Jame N. Miller & Jame C. Miller, 2010)

การหาขีดจำกัดของการตรวจวัด (Limit of Detection, LOD) ใช้ข้อมูลจากกราฟมาตรฐาน เพื่อนำไปวิเคราะห์หาขีดจำกัดของวิธีที่สามารถตรวจพบปริมาณต่ำสุดของสารที่ต้องการวิเคราะห์ได้ หาได้จากข้อมูลที่ใช้สร้างกราฟมาตรฐาน แล้วนำมาคำนวณโดยใช้สูตร

$$LOD = y = y_B + 3S_B$$

y_B คือ ค่าจุดตัดแกน y ที่ได้จากสมการเส้นตรงในกราฟมาตรฐาน

S_B คือ ส่วนเบี่ยงเยนมาตรฐานของแบลงค์

นำข้อมูลจากตารางที่ และภาพที่ มาหาค่า S_B จากสูตร

$$S_B = S_{y/x} = \left\{\frac{\sum(y_i - \hat{y})^2}{n-2}\right\}^{1/2}$$

$S_B = S_{y/x}$ คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของแบลงค์

y_i คือ ค่า y ที่ได้จากการทดลอง (ค่าการดูดกลืนแสง)

$\hat{y}$ คือ ค่า y ที่ได้จากการแทนค่าลงในสมการเส้นตรง $y = 0.0012x + 0.001$

n คือ จำนวนข้อมูลที่ใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐาน

ตารางที่ 45 การคำนวณหาค่า $\hat{y}$, $y_i - \hat{y}$ และ $(y_i - \hat{y})^2$

ความเข้มข้นของแคทิชิน (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง (y_i)	$\hat{y}$	$y_i - \hat{y}$	$(y_i - \hat{y})^2$
10.00	0.012	0.013	-0.001	0.000001
20.00	0.023	0.025	-0.002	0.000004
30.00	0.037	0.037	0.000	0.000000
40.00	0.047	0.049	-0.002	0.000004
50.00	0.058	0.061	-0.003	0.000009
	n = 5			$\sum = 0.000018$

แทนค่าลงในสูตร $S_B = S_{y/x} = \left\{\frac{\sum(y_i-\hat{y})^2}{n-2}\right\}^{1/2}$

$= \left(\frac{0.000018}{3}\right)^{1/2}$

$= 2.449 \times 10^{-3}$

y_B (ค่าตัดแกน y ที่ได้จากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน) = 0.001

หาขีดจำกัดของการตรวจวัด

แทนค่าลงในสูตร $y = y_B + 3S_B$

$= 0.001 + 3(2.449 \times 10^{-3})$

$= 0.00837$

$= 0.008$

จากสมการเส้นตรง $y = 0.0012x + 0.001$

Limit of detection (LOD) $x = \frac{0.008-0.001}{0.0012}$

= 5.83 มิลลิกรัมต่อลิตร

การหาค่า Limit of Quantitation (LOQ)

แทนค่าลงในสูตร $y = y_B + 10S_B$

$= 0.001 + 10(2.449 \times 10^{-3})$

$= 0.025$

จากสมการเส้นตรง $y = 0.0012x + 0.001$

Limit of Quantitation $x = \frac{(0.025-0.001)}{0.0012}$

= 20.3 มิลลิกรัมต่อลิตร