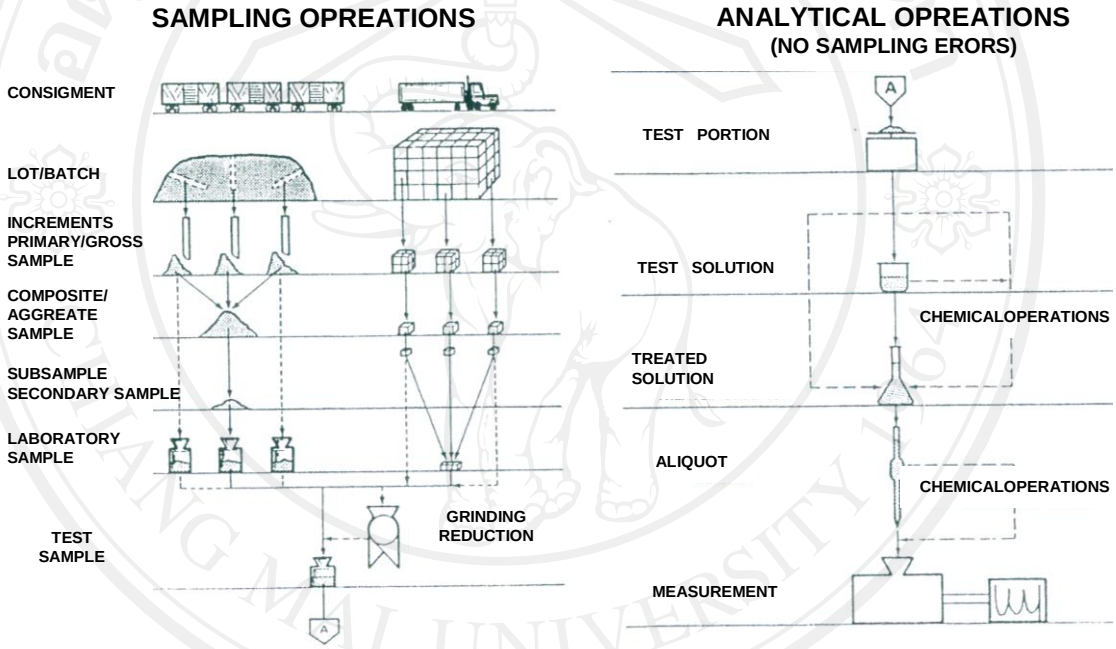
บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 ตัวอย่างน้ำผึ้ง

3.1.1 การสุ่มเก็บตัวอย่างน้ำผึ้ง

หลักในการสุ่มเก็บตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์ให้ได้มาตรฐานและทั่วถึง จากตัวอย่างที่มีจำนวนมาก (Bulk) เพื่อวิเคราะห์คุณภาพ โดยทั่วไปยึดตามหลักของ AOAC (2000) ดังภาพที่ 4



ภาพ 4 ขั้นตอนของการเลือกสุ่มเก็บตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์คุณภาพของตัวอย่างชนิดต่าง ๆ (AOAC, 2000)

สำหรับในการศึกษานี้ได้สุ่มเก็บตัวอย่างน้ำผึ้งจากแหล่งต่าง ๆ ได้แก่

1. แหล่งการซื้อ-ขายของเกษตรกรกับบริษัทส่งออกและบริษัทรับซื้อน้ำผึ้งเพื่อนำไปแปรรูปสินค้า ซึ่งตัวอย่างน้ำผึ้งที่ ได้แก่ ตัวอย่างน้ำผึ้งสาบเสือ ลำไย ลิ้นจี่ ทานตะวัน

การสุ่มตัวอย่างจากถังขนาด 300 กิโลกรัม จะสุ่มโดยการใช้ท่อพลาสติกใสขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1/2-3/4 นิ้ว มีความ 1- 1.2 เมตร จากกดลงไปในถังจนถึงก้นถังจากนั้นใช้มือปิดด้านบนแล้วดึงขึ้นมาจะได้ตัวอย่างน้ำผึ้งจากทุกระดับในถังประมาณ 250 ml มาเป็นตัวแทน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ของน้ำผึ้งถังนั้น หากมีมากกว่า 1 ถัง จะนำเอาน้ำผึ้งที่สุ่มมากจากทุกถังมารวมแล้วจึงสุ่มเก็บตัวอย่างมา 1 กิโลกรัม เพื่อการวิเคราะห์ ได้แก่ น้ำผึ้งลำไย น้ำสาบเสือ

2. การสุ่มจากน้ำผึ้งบรรจุขวด เป็นสินค้าที่ผลิตเพื่อขาย ซึ่งทำการสุ่มซื้อจากแหล่งผลิตระบุชัดเจนแหล่งที่ผลิตและชื่อผู้ผลิต ทำการสุ่มซื้อ ณ แหล่งผลิตหรือบริษัผู้ผลิต ปริมาณ 0.5-1 กิโลกรัม ต่อตัวอย่างน้ำผึ้ง ได้แก่ น้ำผึ้งลำไย น้ำสาบเสือ ลิ้นจี่

3.1.2 ตัวอย่างน้ำผึ้งที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่างน้ำผึ้งที่สุ่มเก็บจากแหล่งต่าง ๆ จะนำมาวิเคราะห์คุณสมบัติด้านต่าง ๆ ของน้ำผึ้ง โดยตัวอย่างน้ำผึ้งทั้งหมดถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องและไม่เกิน 6 เดือน สำหรับการตรวจวิเคราะห์ สำหรับจำนวนตัวอย่างของน้ำผึ้งที่ได้วิเคราะห์สรุปไว้ดังตารางที่ 5

ตาราง 5 จำนวนและชนิดของตัวอย่างน้ำผึ้งที่ทำการวิเคราะห์

ลำดับที่	ชนิดน้ำผึ้ง	แหล่งที่มา	จำนวน
1	ลำไย	เชียงใหม่ ลำพูน	40
2	สาบเสือ	เชียงใหม่ ลำพูน	8
3	ลิ้นจี่	เชียงใหม่ ลำพูน	3
4	ทานตะวัน	ลพบุรี สระบุรี	3

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของตัวอย่างน้ำผึ้ง

สำหรับการวิเคราะห์คุณสมบัติของตัวอย่างน้ำผึ้งนี้ เป็นไปตามวิธีมาตรฐานสากล (ตามหลักของ AOAC method) ซึ่งมีวิธีการที่ใช้ในการวิเคราะห์ได้ดังนี้ (AOAC, 2000)

3.2.1.1 การเตรียมตัวอย่างน้ำผึ้งเพื่อการวิเคราะห์

นำน้ำผึ้งมา 250 ml มาวิเคราะห์ หากน้ำผึ้งมีส่วนที่ตกผลึกหรือมีส่วนของแข็งปนอยู่ด้วย ให้นำไปอุ่นที่ 60 ºC 30 นาที ให้ส่วนของของแข็งหรือผลึกกลายเป็นของเหลวพร้อมสำหรับการวิเคราะห์หัวข้อต่อไป แต่ยกเว้นสำหรับการวิเคราะห์ค่า Diastase Activity และการหาปริมาณสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรอลไม่ต้องอุ่นตัวอย่างน้ำผึ้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.1.2 การวิเคราะห์ความชื้น (Moisture content)

การวิเคราะห์ความชื้นด้วยเครื่อง Refractrometer นี้เป็นวิธีการวัดค่าดัชนีการหักเหแสง (Refractive index) ของของแข็งที่ละลายได้ (Soluble solid) ในตัวอย่างน้ำผึ้ง โดยน้ำผึ้งบริสุทธิ์จะมีของแข็งที่ละลายได้ส่วนใหญ่เป็นน้ำตาล ค่าดัชนีการหักเหแสงที่อ่านได้มีหน่วยเป็นองศาบิกซ์ (˚Brix) มีวิธีการวิเคราะห์ดังนี้

1. นำตัวอย่างน้ำผึ้งแช่ลงบนอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ที่อุณหภูมิ 20 ºC
2. รอจนกระทั่งอุณหภูมิของตัวอย่างน้ำผึ้งมีอุณหภูมิ 20 ºC
3. หยดน้ำผึ้งลงบนเครื่อง Refractrometer
4. อ่านค่าที่วัดได้เป็นปริมาณของแข็งที่ละลายในน้ำผึ้ง (%)
5. นำค่าที่วัดได้ไปคำนวณหาปริมาณความชื้นตามสูตรดังนี้

เปอร์เซ็นต์ความชื้น = 100 – ค่าที่วัดได้จากเครื่อง Refractrometer

3.2.1.3 การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า (Ash content)

การวิเคราะห์ปริมาณเถ้านี้เป็นวิธีการวัดของแข็งที่อยู่ในตัวอย่างน้ำผึ้งหลังจากการเผา มีวิธีการวิเคราะห์ดังนี้

1. นำถ้วย Crucible ที่สะอาดไปอบไล่ความชื้นที่ 100 ºC เป็นเวลา 1 ชั่วโมงแล้ว เก็บถ้วย Crucible ไว้ในโถดูดความชื้น (Desiccator) เพื่อให้เย็นตัวลง
2. ชั่งน้ำหนักถ้วย Crucible แล้วจึงชั่งตัวอย่างน้ำผึ้งใส่ลงในถ้วย Crucible ประมาณ 5.0000 g บันทึกน้ำหนักจริงไว้
3. นำถ้วยใส่ตัวอย่างน้ำผึ้งตั้งบนเตาอบ (Hot air oven) เพื่อเผาไล่ควันจนหมด
4. จากนั้นนำถ้วยใส่ตัวอย่างน้ำผึ้งใส่ในเตา ปรับอุณหภูมิเตาเท่ากับ 500 ºC ทำการเผาตัวอย่างประมาณ 2 ชั่วโมง แล้วจึงปิดเตาทิ้งไว้จนถ้วย crucible เย็นลง
5. นำถ้วย Crucible ที่เย็นแล้วไปเก็บไว้ใน Desiccator เพื่อไม่ให้มีความชื้นเพิ่มจากอากาศ แล้วจึงนำมาชั่งเพื่อหาน้ำหนักสุดท้าย
6. นำค่าทั้งหมดมาคำนวณหาปริมาณเถ้า ดังสมการ

$$\text{ปริมาณเถ้า (\%)} = \frac{(\text{น้ำหนักถ้วยรวมตัวอย่างหลังเผา} - \text{น้ำหนักถ้วยเปล่าก่อนเผา}) \times 100}{\text{น้ำหนักของน้ำผึ้งที่ใช้}}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.1.4 การวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)

มีวิธีการวิเคราะห์ดังนี้

1. ชั่งตัวอย่างน้ำผึ้งจำนวน 10.00 g ใส่ในขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 ml แล้วเติมน้ำกลั่น 75 ml ละลายให้เข้ากัน

2. วัดค่า pH ด้วย pH meter จดบันทึกค่า pH ที่วัดได้

3.2.1.5 การวิเคราะห์ปริมาณกรดอิสระ (Free acidity) แล็กโตน (lactones) และปริมาณกรดทั้งหมด (Total acidity)

มีวิธีการวิเคราะห์ดังนี้ (AOAC, 2000; Finola *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2009; Ajlouni and Sujirapinyokul, 2010)

1. ชั่งตัวอย่างน้ำผึ้งจำนวน 10.00 g ใส่ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 ml แล้วเติมน้ำกลั่น 75 ml ละลายให้เข้ากัน

2. วัดค่า pH ด้วย pH meter จดบันทึกค่า pH ที่วัดได้

3. หลังจากวัด pH เริ่มต้นแล้วจึงไตเตรทสารละลายตัวอย่างน้ำผึ้ง ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.05 M จนได้ค่า pH เท่ากับ 8.5 จดบันทึกปริมาณ NaOH ที่ใช้ในการไตเตรท

4. หลังจากนั้นเติมสารละลาย 0.05 M NaOH จำนวน 10 ml ใน Erlenmeyer flask ทันที

5. ทำการไตเตรทสารละลายตัวอย่างน้ำผึ้งต่อด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 0.05 M จนกระทั่งได้ค่า pH เท่ากับ 8.3 บันทึกปริมาณสารละลาย HCl ที่ใช้ในการไตเตรท

6. นำค่าที่บันทึกไปคำนวณหาค่าปริมาณกรดอิสระ ค่าปริมาณแล็กโตน และปริมาณกรดทั้งหมดต่อกิโลกรัมของน้ำผึ้ง (milliequivalent/kg; me/kg) ดังสมการ

$$\text{Free acidity} = \frac{(\text{ปริมาณ NaOH ที่ใช้ในการไตเตรท} - \text{ปริมาณที่ใช้ไตเตรท Blank}) \times 50}{\text{น้ำหนักของน้ำผึ้ง (กรัม)}}$$

$$\text{Lactone} = \frac{(10 - \text{ปริมาณ HCl ที่ใช้ในการไตเตรต}) \times 50}{\text{น้ำหนักของน้ำผึ้ง (กรัม)}}$$

Total acidity = free acid + lactone

Blank = น้ำกลั่น (deionized water)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.1.6 การวิเคราะห์ค่า Diastase Activity

มีวิธีการวิเคราะห์ดังนี้ (AOAC, 2000; Silva *et al.*, 2009; Ajlouni and Sujirapinyokul, 2010; Gomes *et al.*, 2010)

3.2.1.6.1 การเตรียมตัวอย่างน้ำผึ้ง

1. ละลายตัวอย่างน้ำผึ้ง 5 g ด้วยน้ำกลั่นประมาณ 20 ml ในบีกเกอร์ขนาด 25 ml

2. เติมสารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตรท (Acetate buffer) ความเข้มข้น 1.59 M ค่า pH 5.3 จำนวน 2.5 ml แล้วเทสารละลายใส่ขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 25 ml

3. เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (0.5 M NaCl) จำนวน1.5 ml ผสมให้เข้ากัน

4. ปรับปริมาตรเป็น 25 ml ด้วยน้ำกลั่น

3.2.1.6.2 การเตรียมสารละลายแป้ง (Starch solution)

1. ชั่งแป้ง 2.000 g ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 90 ml ในบีกเกอร์ขนาด 250 ml แล้วนำไปต้มจนเดือด ลดความร้อนของไฟ และต้มต่อไปด้วยไฟอ่อน ๆ อีก 3 นาที ปิดฝาและตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่ อุณหภูมิห้อง

3. จากนั้นเทสารละลายแป้งใส่ขวดปรับปริมาตร แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 ml ด้วยน้ำกลั่น

3.2.1.6.3 การทำกราฟมาตรฐานของสารละลายแป้ง (Standard curve)

1. นำสารละลายแป้งในข้อ 3.2.1.6.2 ไปอุ่นไว้ที่ 40 ºC จากนั้นจึงดูดสารละลายแป้งจำนวน 5 ml ใส่หลอดทดลองขนาด 20 ml แล้วเติมน้ำกลั่นที่ทำให้อุ่นไว้ที่ 40 ºC จำนวน 10 ml จากนั้นผสมให้เข้ากัน

2. ปิเปตสารละลายแป้งเจือจางข้างต้น จำนวน 1 ml ลงในหลอดทดลองหลาย ๆ หลอด ซึ่งบรรจุด้วยสารละลายไอโอดีนที่มีความเข้มข้น 0.0007 M จำนวน 10 ml แล้วจึงเติมน้ำกลั่นลงไปในปริมาตรที่แตกต่างกันในแต่ละหลอดทดลอง เช่น 1 ml, 2 ml และ 5 ml เป็นต้น

3. นำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 660 nm (ใช้น้ำกลั่นเป็น Blank)

4. บันทึกปริมาณน้ำกลั่นที่เติมลงไปแล้วทำให้สามารถวัดค่าการดูดกลืนได้เท่ากับ 0.760 ± 0.02 เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.1.6.4 วิธีวิเคราะห์หาค่า Diastase Activity

1. ปิเปตสารละลายตัวอย่างน้ำผึ้ง จำนวน 10 ml ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 ml แล้วนำบีกเกอร์ไปแช่ไว้ใน Water bath ที่อุณหภูมิ 40 ºC แช่ทิ้งไว้ 15 นาที

2. ปิเปต Starch solution (ที่แช่ไว้ใน Water bath เช่นเดียวกับตัวอย่าง) จำนวน 5 ml ลงไปในตัวอย่างน้ำผึ้ง ผสมให้เข้ากันแล้วแช่ทิ้งไว้ใน Water bath ที่อุณหภูมิ 40 ºC

3. เมื่อครบเวลา 5 นาที ให้ดูดสารละลายดังกล่าว 1 ml เติมลงในหลอดทดลองที่บรรจุสารละลายไอโอดีน ความเข้มข้น 0.0007 M จำนวน 10 ml ผสมให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่นในปริมาณเท่ากับที่ประเมินได้จากการทำ Standardize สารละลายแป้งข้างต้น แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 660 nm ทันที

4. ทำซ้ำแบบเดียวกันทุก ๆ 5 นาที จนกระทั่งค่าดูดกลืนแสงต่ำกว่า 0.235

3.2.1.6.5 การคำนวณหาค่า Diastase Activity

1. นำค่าดูดกลืนแสงกับเวลา (นาที) มาสร้างกราฟเส้นตรง โดยลากกราฟให้ผ่านจุดให้ได้มากที่สุด

2. จากกราฟประเมินหาค่า Diastase activity (DN) โดยนำเวลาที่ปฏิกริยาของสารละลายลดลดงจนอ่านค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 0.235 หารด้วย 300 จะได้ค่า DN ซึ่งเป็นค่าแสดงการทำงานของเอนไซม์ในน้ำผึ้ง 1 g ต่อขบวนการไฮโดรไลซ์ 1% starch solution ต่อ 1ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 40 ºC

3.2.1.7 การวิเคราะห์ค่าการนำไฟฟ้า (Electrical conductivity)

มีวิธีการวิเคราะห์ดังนี้

1. ละลายตัวอย่างน้ำผึ้ง 20 g ด้วยน้ำกลั่นประมาณ 60 ml

2. เทสารละลายตัวอย่างน้ำผึ้งลงใน Volumetric flask ขนาด 100 ml ปรับสารละลายเป็น 100 ml ด้วยน้ำกลั่น

3. ปิเปตดูดสารละลายที่เตรียมได้ จำนวน 40 ml ใส่บีกเกอร์ แล้วนำไปแช่ใน Water bath ที่อุณหภูมิ 20 ºC

4. รอจนสารละลายตัวอย่างมีอุณหภูมิ 20 ºC (วัดด้วยเทอร์โมมิเตอร์) แล้วจึงวัดค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายด้วยเครื่องวัด Conductometer

แล้วจึงนำค่าที่วัดได้ไปคำนวณค่าการนำไฟฟ้าของตัวอย่าง ตามสูตรคำนวณดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

SH = K x G

SH = ค่าการนำไฟฟ้าของน้ำผึ้ง มีหน่วยเป็น mS.cm-1

K = ค่าคงที่ของเซลล์ (cell constant)

G = ค่าการนำไฟฟ้าที่วัดได้จากเครื่อง มีหน่วยเป็น mS.cm-1

การคำนวณค่า K constant

เตรียมสารละลาย Potassium chloride (KCl) ความเข้มข้น 0.1 M เพื่อใช้เป็นสารมาตรฐานในการวัดค่า cell constant โดยเทสารละลายดังกล่าวจำนวน 40 มิลลิลิตร ลงในบิ๊กเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เมื่ออุณหภูมิได้ ของสารละลาย KCl ได้ 20 องศาเซลเซียส ให้อ่านค่าการนำไฟฟ้าของสารละลาย (G) 0.1 M KCl แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณหา ค่า cell constant (K) ตามสูตรคำนวณดังนี้

K = 11.691 x 1/G

K = cell constant

G = ค่าการนำไฟฟ้าที่วัดได้จากเครื่อง มีหน่วยเป็น mS/cm

11.691 = ผลรวมของค่าการนำไฟฟ้าของน้ำและสารละลาย 0.1 M KCl ที่ 20°C

3.2.1.8 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล (น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตสและน้ำตาลซูโครส) โดย High Performance liquid chromatography (HPLC)

มีวิธีการวิเคราะห์ดังนี้ (Mendes *et al.*, 1998)

1. ละลายตัวอย่างน้ำผึ้ง 5.00 g ด้วยน้ำกลั่นประมาณ 80 ml แล้วเทสารละลายตัวอย่างน้ำผึ้งลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 ml ด้วยน้ำกลั่น

2. กรองสารละลายตัวอย่างน้ำผึ้งผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 μm แล้วจึงนำสารละลายที่กรองได้ไปวิเคราะห์ปริมาณและชนิดของน้ำตาลด้วยเครื่อง HPLC เทียบกับสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตสและน้ำตาลซูโครส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สภาวะของเครื่อง HPLC ที่ใช้ในการวิเคราะห์

- Phase column: Inersil NH_2, 5 μm, 250 x 4.6 mm
- Mobile phase: water : acetronitrile (25:75 v/v), flow rate 1 ml/min
- Detector: Refractive index detection (RID)

3.2.1.9 การวิเคราะห์ปริมาณสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอฟิวรอล (Hydroxylmethylfurfural, HMF) โดย High Performance liquid chromatography (HPLC)

มีวิธีการวิเคราะห์ดังนี้ (Mendes *et al.*, 1998)

1. ละลายตัวอย่างน้ำผึ้ง 5.00 g ด้วยน้ำกลั่นประมาณ 80 ml แล้วเทสารละลายตัวอย่างน้ำผึ้งลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 ml ด้วยน้ำกลั่น

2. กรองสารละลายตัวอย่างน้ำผึ้งผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 μm แล้วจึงนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC เทียบกับสารละลายมาตรฐาน HMF เพื่อหาปริมาณ HMF ที่มีในตัวอย่างน้ำผึ้งต่อไป

สภาวะของเครื่อง HPLC ที่ใช้ในการวิเคราะห์

- Phase column: Ultra C18 ODS (Restex, USA) 5 μm, 250 x 4.6 mm
- Mobile phase: water : methanol (90 : 10 v/v) , flow rate 1.2 ml/min
- Detector: UV detector 280 nm (diode array detector SPD-M10A)

3.2.2 การตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของตัวอย่างน้ำผึ้ง

การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณแบคทีเรีย ยีสต์ และรา ใช้วิธี Spread plate ซึ่งเป็นไปตามมาตรฐานของคู่มือการวิเคราะห์ทางแบคทีเรีย โดยมีจุดประสงค์ในการหาจำนวนของจุลินทรีย์แต่ละชนิดที่ปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างน้ำผึ้งทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ และรา ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ถึงความปลอดภัยของอาหาร

3.2.2.1 การเจือจางตัวอย่าง (BAM, 2001)

1. ชั่งตัวอย่างน้ำผึ้ง 10 g ใส่ในหลอดพลาสติกสะอาดที่มีสารละลาย Butterfield's phosphate-buffered dilution water (BPB) จำนวน 90 ml หลังจากนั้นผสมให้เข้ากัน สารละลายตัวอย่างน้ำผึ้งที่ได้ถือว่ามีความเจือจาง 10^{-1} (ตัวอย่างถูกเจือจาง 10 เท่า)

2. เตรียมสารละลายตัวอย่างน้ำผึ้งให้มีความเจือจางเพิ่มขึ้น 100 และ1,000 เท่าตามลำดับ (ตัวอย่างน้ำผึ้งมีความเข้มข้น 10^{-2} และ 10^{-3} ตามลำดับ) หรือระดับความเจือจางที่เหมาะสม โดย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปิเปตดูดสารละลายที่มีความเจือจาง 10^{-1} จำนวน 10 ml ใส่ลงในสารละลาย BPB 90 ml ซึ่งได้สารละลายตัวอย่างน้ำผึ้งเจือจางมีความเข้มข้นเท่ากับ 10^{-2}

3. ทำการเจือจางสารละลายตัวอย่างน้ำผึ้งให้มีความเข้มข้น 10^{-3}

3.2.2.2 การเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อหาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (Colony count technique) ในน้ำผึ้ง

1. ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่มีความเจือจาง 10^{-1}, 10^{-2} และ 10^{-3} ใส่ลงในจานเพาะเชื้อ 3 จาน จานละ 0.1 ml ในแต่ละระดับความเจือจาง ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar (PCA)

2. ทำ Spread plate ของผสมทุกความเจือจางบนอาหาร PCA ความเจือจางละ 3 จาน

3. นำไปอบเพาะเชื้อในตู้อบเพาะเชื้อที่มีอุณหภูมิ 30 ºC เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการนับจำนวนโคโลนีโดยนับบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วทำการคำนวณปริมาณเชื้อ

3.2.2.2.2 การเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อหาปริมาณยีสต์และเชื้อรา (Yeasts and moulds) ในน้ำผึ้ง (BAM, 2001; Iurlina and Fritz, 2005)

1. ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่มีความเจือจาง 10^{-1}, 10^{-2} และ 10^{-3} ใส่ลงในจานเพาะเชื้อ 3 จาน จานละ 0.1 ml ในแต่ละระดับความเจือจาง ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ yeast extract–glucose–chloramphenicol (YGC)

2. ทำ Spread plate ของผสมทุกความเจือจางบนอาหาร YGC ความเจือจางละ 3 จาน

3. นำไปอบเพาะเชื้อในตู้อบเพาะเชื้อที่มีอุณหภูมิ 25 ºC เป็นเวลา 5 วันจากนั้นทำการนับจำนวนโคโลนีโดยนับบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วทำการคำนวณปริมาณเชื้อ

3.2.3 การตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางสัณฐานอณูวิทยา

การตรวจสอบแหล่งที่มาของน้ำผึ้งโดยใช้วิธี Melissopalynology นั้น เป็นวิธีการตรวจละอองเกสรตัวผู้ที่อยู่ในน้ำผึ้งด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายระดับสูง เพื่อตรวจสอบชนิดของน้ำผึ้ง มีวิธีการวิเคราะห์ดังนี้ (Louveaux *et al.*, 1970; Gomes *et al.*, 2010)

3.2.3.1 การเตรียมตัวอย่างน้ำผึ้ง

1. ทำการชั่งน้ำหนักน้ำผึ้งประมาณ 1 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ และเติมน้ำกลั่น 20 ml (ที่อุณหภูมิ 20 - 40 ºC คนให้เข้ากัน

2. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2500 rpm อุณหภูมิ 25 ºC เป็นเวลา 10 นาที แล้วเทเอาสารละลายออก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. เติมน้ำกลั่นลงไป 10 ml (ที่อุณหภูมิ 20 - 40 ºC) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2500 rpm อุณหภูมิ 25 ºC เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายออกจนเหลือแต่ตะกอนละอองเกสร

4. นำเอาตะกอนละอองเกสรที่ได้ไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แล้วทำการนับและจัดจำแนกละอองเกสร

3.2.3.2 การตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบแบบใช้แสงธรรมดา

ทำการตรวจดูเกสรในสไลด์โดยทำการนับเกสรที่กำลังขยาย 400 เท่า และทำการจำแนกละอองเกสรหลัก และละอองเกสรอื่น ๆ เพื่อหา % ของเกสรที่พบ

3.2.3.3 การหา % เกสร

$$\% \text{ เกสร} = \frac{\text{จำนวนเกสรที่ต้องการทราบ}}{\text{จำนวนของเกสรทั้งหมด}} \times 100$$

3.2.3.4 การจำแนกชนิดน้ำผึ้งตามจำนวนละอองเกสรตามเกณฑ์ (Louveaux *et al.*, 1970)

เกสรหลัก (Predominant pollen) หมายถึง เกสรที่พบในน้ำผึ้งมากกว่า 45 % ของเกสรทั้งหมด

เกสรรอง (Secondary pollen) หมายถึง เกสรที่พบในน้ำผึ้งระหว่าง 16 - 45 % ของเกสรทั้งหมด

เกสรปะปนที่สำคัญ (Important minor pollen) หมายถึง เกสรที่พบในน้ำผึ้งระหว่าง 3 – 15 % ของเกสรทั้งหมด

เกสรปะปน (Minor pollen) เกสรที่พบในน้ำผึ้งน้อยกว่า 3 % ของเกสรทั้งหมด

3.2.4 การพัฒนาผลิตภัณฑ์จากน้ำผึ้ง

3.2.4.1 การเตรียมสมุนไพร

3.2.4.1.1 วิธีการเตรียมสารสกัดสีจากกระเจี๊ยบ (Roselle)

1. นำกระเจี๊ยบ 300 g มาฉีกเป็นชิ้น ๆ แล้วบรรจุลงในบีกเกอร์ 1000 ml
2. เติมน้ำ 500 ml ลงในบีกเกอร์ ให้พอท่วมกระเจี๊ยบ แช่ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน
3. นำไปกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1
4. นำไปทำ Evaporation เพื่อระเหยตัวทำละลายออก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. จากนั้นนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง freeze dryer แล้วนำไปเก็บไว้ตู้เย็น

3.2.4.1.2 วิธีการเตรียมสารสกัดสีจากแก่นฝาง (Sappan wood)

1. นำแก่นฝาง 300 g มาบรรจุลงในบีกเกอร์ขนาด 1000 ml
2. เติม ethanol 500 ml ลงไปให้พอท่วม แช่ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน
3. นำไปกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1
4. นำไปทำ Evaporation เพื่อระเหยตัวทำละลายออก
5. จากนั้นนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง freeze dryer แล้วนำไปเก็บไว้ตู้เย็น

3.2.4.2 วิธีการเตรียมยาพื้นเจลลิปสติก

1. เตรียมตำรับโดยการโปรยสารก่อเจล ได้แก่ Carbopol, Hydroxypropyl methyl cellulose (HPMC), Polyvinylpyrrolidone K-30 (PVP K30) ลงในน้ำร้อน คนตลอดเวลาจนได้สารที่เข้ากันดี
2. เติมสาร Propylene glycol, Glycerin และน้ำผึ้งลงไป
3. ปรับปริมาตรน้ำจนครบ 100 ml คนให้เป็นเนื้อเดียวกัน ดังตารางที่ 6
4. นำมาบรรจุไว้ในขวดแก้ว ปิดฝาให้สนิท

ตาราง 6 สูตรตำรับยาพื้นเจลลิปสติก

ส่วนประกอบ	ปริมาณที่ใช้ในตำรับยาพื้นเจล (% w/v)													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
น้ำผึ้ง	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Carbopol	✓	-	✓	✓	✓	-	✓	-	✓	✓	✓	-	-	-
HPMC	-	✓	✓	✓	✓	-	-	✓	✓	-	-	✓	✓	✓
PVP K30	-	-	-	-	-	✓	✓	✓	✓	-	-	-	✓	✓
Propylene glycol	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓	-	-	✓
Glycerin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓	✓	✓	✓	✓
Water	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.4.3 ศึกษาความคงตัวของตำรับยาพื้นเจลลิปสติก

เลือกตำรับยาพื้นเจลที่ดีที่สุดมา 5 ตำรับ และทำการทดสอบความคงตัวของตำรับยาพื้นเจลแบบ Heating - cooling cycle จำนวน 6 ครั้ง พร้อมสังเกตลักษณะภายนอก โดยการทดสอบ Heating - cooling cycle มีวิธีการทดสอบดังนี้

1. นำตำรับยาพื้นเจลที่ผ่านการบรรจุขวดแล้วตำรับละ 3 ขวด เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 45 ºC เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำออกมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 ºC เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำเช่นนี้อีกเป็นจำนวน 6 ครั้ง

2. ทำการวัดค่าความเป็นกรด ด่าง ดูสี ลักษณะเนื้อเจล การแยกชั้น ความเหนอะหนะ การกระจายของเนื้อยาพื้นเจล เพื่อวิเคราะห์ความคงตัวทางกายภาพ

3.2.4.4 การพัฒนาตำรับยาพื้นเจลลิปสติกเมื่อผสมกับสารสกัดสีจากกระเจี๊ยบและสารสกัดสีจากฝาง

1. นำตำรับยาพื้นเจลที่ดีที่สุดมา 1 ตำรับคือตำรับยาพื้นเจลที่ 12 มาทำการผสมสารสกัดสีจากกระเจี๊ยบ สารสกัดสีจากแก่นฝาง และน้ำผึ้ง ดังตารางที่ 7

ตาราง 7 สูตรตำรับยาพื้นเจลลิปสติกที่ผสมสารสกัดสีจากสมุนไพรและน้ำผึ้ง

ส่วนประกอบ	ปริมาณที่ใช้ในตำรับยาพื้นเจล (% w/v)			
	15	**16**	**17**	**18**
น้ำผึ้ง	-	✓	✓	✓
HPMC	✓	✓	✓	✓
Glycerin	✓	✓	✓	✓
สารสกัดสีจากกระเจี๊ยบ	-	-	✓	-
สารสกัดสีจากฝาง	-	-	-	✓
Water	✓	✓	✓	✓

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.4.5 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของตำรับยาพื้นเจลลิปสติกที่ผสมสารสกัดสีจากสมุนไพรและน้ำผึ้งด้วยวิธี DPPH radical scavenging method

มีวิธีการทดสอบดังนี้ (Meda *et al.*, 2005)

1. ทำการละลายตำรับยาพื้นเจลลิปสติกที่ผสมสารสกัดจากสมุนไพรและน้ำผึ้งด้วย Methanol โดยใช้ตำรับยาพื้นเจลแต่ละชนิดให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 1 - 100 % (v/v)

2. เตรียมสารละลาย DPPH ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.02 mg/ml

3. ดูดสารละลายตำรับยาพื้นเจลลิปสติกที่ผสมสารสกัดจากสมุนไพรและน้ำผึ้งแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 0.75 ml ใส่ลงในสารละลาย DPPH ปริมาตร 1.5 ml

4. ผสมให้เข้ากันด้วย vortex ทิ้งไว้ 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm ด้วย spectrophotometer ทำเป็นจำนวน 3 ซ้ำ

6. ใช้ methanol เป็น blank, ascorbic acid ความเข้มข้น 1 - 6 (mg/l) เป็น positive control และ sugar analogue เป็น negative control

7.นำค่าที่ได้มาคำนวณหา % Inhibition ตามสมการดังนี้

$$\% \text{ Inhibition} = [(A_{517} \text{ Control} - A_{517} \text{ Sample})/ A_{517} \text{ Control}] \times 100$$

3.2.4.6 ศึกษาความคงตัวของตำรับยาพื้นเจลลิปสติกที่ผสมสารสกัดสีจากสมุนไพรและน้ำผึ้ง

มีวิธีการทดสอบดังนี้

3.2.4.6.1 การทดสอบความคงตัวในสภาวะเร่ง

1. นำตำรับยาพื้นเจลที่ผ่านการบรรจุขวดแล้วตำรับละ 3 ขวด เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 45 ºC เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำออกมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 ºC เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำเช่นนี้อีกเป็นจำนวน 6 ครั้ง

2. ทำการวัดค่าความเป็นกรด ด่าง ดูสี ลักษณะเนื้อเจล การแยกชั้น ความเหนอะหนะ การแพร่กระจาย คราบ ฟองอากาศ กลิ่น และวัดความหนืดของยาพื้นเจล เพื่อวิเคราะห์ความคงตัวทางกายภาพ โดยสถิติที่ใช้ทดสอบ คือ One-way ANOVA

3.2.4.6.2 การทดสอบความคงตัวในระยะเวลา 2 เดือน

1. นำตำรับยาพื้นเจลที่ผ่านการบรรจุขวดแล้วตำรับละ 3 ขวด เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 ºC - 30 ºC) อุณหภูมิ 4 ºC และ 45 ºC

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. ทำการวัดค่าความเป็นกรด ด่าง ดูสี ลักษณะเนื้อเจล การแยกชั้น ความเหนอะหนะ การแพร่กระจาย คราบ ฟองอากาศ กลิ่น และ วัดความหนืด ของยาพื้นเจลด้วยเครื่อง Brookfield เพื่อวิเคราะห์ความคงตัวทางกายภาพ โดยสถิติที่ใช้ทดสอบ คือ One-way ANOVA

3.2.4.7 การทดสอบความพึงพอใจในอาสาสมัคร

นำผลิตภัณฑ์เจลลิปสติกที่ได้ทำการพัฒนามาทดสอบความพึงพอใจในอาสาสมัคร 20 คน โดยใช้แบบสอบถามให้อาสาสมัครกรอกข้อมูล การทดลองใช้ผลิตภัณฑ์ว่า รู้สึกพอใจหรือไม่ เช่น สี, กลิ่น, การกระจายตัว, ความเนียน, ความมันวาวและการเกาะติด เป็นต้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved