บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับเตย[1]

เตยเป็นต้นไม้ที่ขึ้นในเขตร้อนและเป็นต้นไม้ที่แยกเพศ คือมีต้นตัวผู้และต้นตัวเมีย ต้นตัวผู้มีดอกซึ่งมีกลิ่นหอม ส่วนต้นตัวเมียมีแต่ลูก คนนิยมเรียกต้นตัวผู้ว่าต้นลำเจียก ส่วนต้นตัวเมียเรียกว่าเตย ในประเทศไทยเรียกเตยที่ไม่มีหนามแต่มีดอกว่าต้นลำจวน แถบมลายูเรียกดอกหรือใบเตยที่มีกลิ่นหอมว่า แพนแดน (pandan) ฉะนั้นชื่อวิทยาศาสตร์จึงได้รากศัพท์มาจากชื่อพื้นเมืองว่าแพนดานัส (Pandanus)

1.1.1 เตยหอม[2-9]

เตยหอมมีชื่อโดยทั่วไปว่า fragrant screw pine มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Pandanus ordorus* Ridl. หรือ *Pandanus amaryllifolius* Roxb. อยู่ในวงศ์ (family) pandanaceae ในภาคกลางของไทยเตยหอมมีชื่อเรียกหลายชื่อ เช่น เตยหอมใหญ่ เตยหอมเล็ก เตยหอมและหวานข้าวไหม้ ทางภาคใต้และแถบมลายูเรียกว่า ปาแนะวอจิง (ปาแม๊ะออริง ปาแป๊ะออริง) ส่วนในภาษาจีนเรียกว่าพังลั้ง มีถิ่นกำเนิดในแถบทวีปแอฟริกา ทวีปเอเชีย (ไทยและมาเลเซีย) บริเวณชายฝั่งและหมู่เกาะแถบทวีปออสเตรเลีย

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ เป็นพุ่มไม้น้ำขนาดเล็กจำพวกหญ้า แตกออกเป็นกอซึ่งเกิดจากหัวหรือเหง้าที่อยู่ใต้ดินและมีลำต้นอยู่ใต้ดิน มักขึ้นตามชายน้ำชายคลองที่น้ำขึ้นลงถึง ส่วนที่โผล่ขึ้นมาเป็นเพียงก้านและใบ สูงประมาณ 2 ฟุต ลักษณะของใบคล้ายใบสับปะรด ใบเล็กเรียวยาว แยกออกจากโคนต้น มีสีเขียวเกลี้ยงเป็นมัน มีกลิ่นหอมมันๆ คล้ายดอกขจร ดอกข้าวสารและดอกชมนาด ขนาดใบยาวประมาณ 8-10 นิ้ว ปลายใบเรียวแหลม ขอบใบเรียบไม่มีหนาม ต้นแก่จะมีรากอากาศ (prop roots) คล้ายต้นลำเจียก มักขยายพันธุ์โดยการแยกต้น

การปลูกและการดูแลรักษา[6] เตยหอมเป็นพรรณไม้ที่ชอบขึ้นในที่ชื้น ขยายพันธุ์ด้วยการแยกต้น การปลูกจะเริ่มจากกำจัดวัชพืชบริเวณที่จะปลูกซึ่งพื้นที่ปลูกอาจเป็นสภาพร่องสวนเก่าที่ไม้ผลโตแล้วหรือในสภาพแปลงนาก็ได้ ถ้าอยากให้เตยเขียวเร็วให้หว่านปุ๋ยก่อนปลูก สูตร 46-0-0 อัตรา 10 กิโลกรัมต่อไร่ จากนั้นให้เจาะหรือขุดหลุมแล้วนำเตยต้นพันธุ์ที่เตรียมไว้ลงปลูกคล้ายๆ ดำนา ใช้ระยะปลูกประมาณ 30 x 30 เซนติเมตรหรือ 30 x 50 เซนติเมตร แล้วแต่ผู้ปลูกเห็นสมควร นั่นคือถ้าปลูกระยะชิด เตยจะแตกกอให้ต้นเล็กกว่าปลูกระยะห่าง การใส่ปุ๋ยมีความสำคัญมากเพราะหากปุ๋ยตกบนใบหรือยอดจะทำให้ใบหรือยอดนั้นเน่า การใส่ปุ๋ยจะใช้วิธีพ่นทางใบ โดยผสมปุ๋ยเคมีสูตร 46-0-0 อัตราครึ่งกิโลกรัมกับน้ำ 200 ลิตร ถ้าใช้ปุ๋ยเข้มข้นมากจะต้องฉีดน้ำเปล่าอีกรอบเพราะยอดเตยอาจเน่าได้ ก่อนตัดเตยขายควรให้ปุ๋ยอีกครั้ง โดยพ่นปุ๋ยก่อนตัด 10 วัน จะทำให้เตยมีใบเขียวสดและเป็นมันสวย ในช่วงที่ปลูกเตยนั้นจะต้องมีน้ำขังหรือชื้นอยู่ตลอดเวลา เตยเป็นพืชที่ดูแลง่าย แต่จะมีปัญหาโรคแมลงบ้าง เช่น หอยเชอรี่กัดกินใบอ่อนหากช่วงนั้นน้ำท่วม ตั๊กแตนหรือหนอนคืบกินใบ แต่ปัญหาไม่รุนแรงมากนัก เตยเก่ามักเป็นเชื้อราและแห้งตาย แต่เมื่อได้รับความชื้นและมีสภาพเหมาะสมก็จะแตกหน่อใหม่มาทดแทน

การเก็บผลผลิต เตยที่ปลูกใหม่จะใช้เวลาประมาณ 8-10 เดือนจึงจะเก็บผลผลิตได้ การเก็บผลผลิตจะใช้มีดตัด ซึ่งการตัดมี 2 แบบคือ แบบไว้หน่อและแบบไม่ไว้หน่อ แบบไว้หน่อคือตัดเตยต้นที่สมบูรณ์ที่สุดในกอนั้นไป ให้เหลือหน่อที่จะเริ่มโตไว้บ้าง เช่น หากในกอมีเตยอยู่ 5 ยอดให้ตัดยอดที่สมบูรณ์ไป 3 ยอดเก็บหน่อที่เหลือไว้ หากตัดหมดเลยทั้ง 5 ยอดก็จะเป็นแบบไม่ไว้หน่อ ซึ่งการตัดจะมีผลมากกับผลผลิตรุ่นต่อไป หากตัดแบบไว้หน่อเพียง 4-5 เดือนจะสามารถเก็บผลผลิตได้อีกครั้ง ทั้งนี้พบว่าในสภาพที่มีแสงแดด เตยจะแตกหน่อใหม่ดีแต่สีใบจะไม่เขียวสดใสเหมือนเตยที่อยู่ในสภาพร่ม ดังนั้นการปลูกเตยให้ได้ผลดีควรปลูกในสภาพร่มเงาและแสงรำไร เช่น ในสภาพร่องสวนที่ไม้ผลโตแล้ว

ประโยชน์ของเตยหอมตามสรรพคุณยาโบราณ [3,5,6,10] **ราก** ใช้บำรุงหัวใจให้ชุ่มชื่น แก้กระษัย น้ำเบาพิการ ขับปัสสาวะ ละลายก้อนนิ่วในไต **รากอากาศ** แก้หนองใน แก้พิษโลหิต **ต้น** ใช้ขับปัสสาวะ บำรุงหัวใจ แก้อ่อนเพลีย แก้กระษัย น้ำเบาพิการ ส่วน**ใบ** ใช้แก้ไข้ แก้ร้อนใน แก้กระหายน้ำ แก้อ่อนเพลีย ขับปัสสาวะ บำรุงหัวใจ ชูกำลัง ดับพิษไข้ รักษาโรคหัด รักษาโรคสุกใส แก้โรคผิวหนัง เนื่องจากใบมีสีเขียวมักใช้สีมาผสมอาหารหรือขนมให้น่ารับประทาน และในใบเตยมีน้ำมันหอมระเหยซึ่งมีกลิ่นหอมน่ารับประทาน เรียกว่า fragrant screw pine ทำให้อาหารที่ใส่น้ำใบเตยมีรสหอมเย็นชื่นใจ

สารเคมีที่ค้นพบ[5,10,11] benzyl acetate, carotenoids, coumarin, geraniol, linalool, linalool acetate, linalyl acetate, pandamarilactone-1, pandamarilactone-31, pandamarilactone-32, (DL)-pandamarine, ethyl vanillin, coumarin, 2-acetyl-1-pyrroline และสารกลุ่ม anthocyanin

1.1.2 การจำแนกชนิดของใบเตยที่ได้ศึกษาในประเทศไทย[12-18]

ตารางที่ 1.1 การจำแนกชนิดของใบเตย

ชื่อวิทยาศาสตร์	ลักษณะชนิดพรรณไม้	ชื่อทั่วไป
Pandanus atrocarpus Griff หรือ *Pandanus unicornutus* St. John	ไม้พุ่ม	ชองลิ, เตยใหญ่ (สุราษฎร์ธานี) เตยเหาะ, มะกูแวจาโป๊ะ, มะกูแวบูเก๊ะ (มาเลย์-นราธิวาส)
Pandanus acaulescens St. John	ไม้พุ่ม	เตยห้วย (เชียงใหม่)
Pandanus amaryllifolius Roxb.	ไม้พุ่ม	เตยหอม (กรุงเทพฯ) ปาแนะวองิง (มาเลย์-นราธิวาส)
Pandanus bifidus St. John	ไม้พุ่ม	เตยน้อย (นครราชสีมา)
Pandanus calcis St. John	ไม้พุ่มยืนต้น	จันทร์แดง (ชุมพร) ลังคาย (ระนอง,สตูล)
Pandanus capusii Mart.	ไม้พุ่ม	เตยน้ำ (อุบลราชธานี)
Pandanus distans Craib	ไม้พุ่ม	เตยแก้ว (กรุงเทพฯ)
Pandanus dubius Spr.	ไม้พุ่ม	เตยแก้ว
Pandanus humilis Lour. หรือ *Pandanus ovatus* Warb. หรือ *Pandanus similis* Craib หรือ *Pandanus toinu* St. John	ไม้พุ่ม	กูแวตีกู๊ (มาเลย์-นราธิวาส) เตย (ตราด) เตนหนู (ตรัง, นราธิวาส, ภาคอีสาน, ภาคตะวันออก) เตยหอม, ฮิชิง (ปัตตานี) เขียด (กบินทร์บุรี)

ตารางที่ 1.1 (ต่อ)

ชื่อวิทยาศาสตร์	ลักษณะชนิดพรรณไม้	ชื่อทั่วไป
Pandanus fibrosus Gagnep.ex Mart หรือ *Pandanus gressittii* B.C.Stone *Pandanus thailandicus* St. John	ไม้พุ่ม	เตยหิน, เตยน้ำ, เตย (ภาคอีสาน)
Pandanus foetidus Roxb.	ไม้พุ่ม	เตยทะเล
Pandanus furcatus Roxb.	ไม้พุ่มยืนต้น	เตยเกลียว, เกี๋ยงป่า, เกี๋ยงหลวง, เตย (ภาคเหนือ) ชั้งลี, ชนัง, มะขะนัดป่า (แม่ฮ่องสอน)
Pandanus helicopus Kurz	ไม้ยืนต้น	เกี๋ยงหลวง (เชียงใหม่) เตยทะเล, เตย (ภาคกลาง)
Pandanus houlletii Corr. หรือ *Pandanus furcatus* Balf.	ไม้ยืนต้น	เตย (ภาคใต้)
Pandanus jocundus B.C. Stone	ไม้พุ่มยืนต้น	เตยเล็ก (สกลนคร)
Pandanus kaida Kurz	ไม้พุ่มยืนต้น	เตย (ภาคกลาง) เตยสานเสื่อ (กรุงเทพฯ)
Pandanus kampotensis St. john หรือ *Pandanus odoratissimus* Linnn. f. หรือ *Pandanus smitinandii* St. John	ไม้พุ่มยืนต้น	การะเกด, เตยทะเล, ลำเจียก (ภาคกลาง) ป่าแนะ (มาเลย์-นราธิวาส)
Pandanus monotheca Martelli หรือ *Pandanus recurvatus* St. John	ไม้พุ่ม	เตยเขา (นราธิวาส)
Pandanus odorus Ridl.	ไม้พุ่ม	เตยหอม, เตยหอมใหญ่, เตยหอมเล็ก
Pandanus pygmeus Thouars	ไม้คลุมดิน	การะเกด, การะเกดหนู
Pandanus reticulosus St. John	ไม้พุ่ม	เตย, เตยใหญ่
Pandanus sanderi Mast	ไม้ประดับ	เตยด่างขาว, เตยด่างเหลือง
Pandanus sp.	ไม้ประดับ	เตยด่างไม่มีหนาม, ลำเจียก
Pandanus stellatus R. Br.	ไม้คลุมดิน	การะเกดเขียว

ตารางที่ 1.1 (ต่อ)

ชื่อวิทยาศาสตร์	ลักษณะชนิดพรรณไม้	ชื่อทั่วไป
Pandanus tectorius Bl. หรือ *Pandanus tectorius* Sol. ex Parkinson หรือ *Pandanus littoralis* Sol. ex Parkinson	ไม้พุ่มยืนต้น	การะเกด, การะเกดด่าง, ลำเจียกหนู (กรุงเทพฯ) เตยด่าง, เตยหอม (ภาคกลาง)
Pandanus tectorius Soland.	ไม้ประดับ	ลำจวนด่าง
Pandanus variegatus Mig.exot.	ไม้พุ่ม	ลำเจียกหนู, การะเกดด่าง (กรุงเทพฯ) เตยด่าง
Pandanus veitchii Mast. & Moore	ไม้ประดับ	เตยด่าง, เตยแก้ว

1.2 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับชมนาด (ชำมะนาด)[19-27]

แต่เดิมคนในสมัยก่อนมักเรียกชมนาดว่า "ชำมะนาด" ต้นชมนาดมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Vallaris glabra* Ktze. คำว่า glabra เป็นชื่อพันธุ์ (species) ของชมนาดซึ่งอาจซ้ำกันได้เช่น *Bougainvillea glabra* (ต้นตรุษจีน) พืชทั้ง 2 นี้มีชื่อพันธุ์เหมือนกัน แต่อยู่ในสกุล (genus) ต่างกัน ชมนาดเป็นพืชในวงศ์ (family) Apocynaceae คือเป็นพืชที่อยู่วงศ์เดียวกับ ลั่นทม พุดจีบ บานบุรี รำเพย ฯลฯ สมบัติของพืชในวงศ์นี้คือจะมียางเหนียวสีขาวอยู่ตามลำต้น ใบและกิ่ง ชมนาดมีชื่อทั่วไปว่า Wallaris หรือ Bread Flower ทางภาคเหนือของไทยเรียกว่าส้มอ้าย (อ้มส้าย) ภาคกลางเรียกว่า ชมนาดใหญ่ ชมนาดกลาง กรุงเทพฯเรียกว่า ชมนาดฝรั่ง ดอกข้าวใหม่ ชมนาดมีถิ่นกำเนิดในประเทศอินโดนีเซีย

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ลักษณะต้นเป็นเถาไม้เลื้อยยืนต้นขนาดใหญ่ มีเถาหรือต้นที่เหนียวและแข็งเป็นสีเขียวคล้ำตกกระ จะพาดพิงเลื้อยขึ้นไปกับต้นไม้อื่น อาจยาว 6-8 เมตร ถ้าปลูกมานานอาจใหญ่และยาวได้มากกว่านี้ ทุกส่วนของต้นมีน้ำยางขาว ลักษณะใบ เป็นไม้ใบเดี่ยวสีเขียวสด ผิวใบเป็นมันเรียบ ขอบใบมนปลายใบมักมีติ่งแหลมยาวพ้นขอบออกมาจากขอบยอดใบประมาณ 1 เซ็นติเมตร ใบออกเป็นคู่ตรงข้ามตามข้อต้น ใบแต่ละคู่สลับกันไปตามต้นหรือกิ่ง ขนาดใบยาวประมาณ 6-7 นิ้ว กว้างประมาณ 4 นิ้ว ลักษณะดอก มีสีขาวนวลหรือสีขาวอมเขียวคล้ายสีตองอ่อน ออกดอกเป็นช่อ ช่อหนึ่งมีดอกประมาณ 20-30 ดอก แต่จะทยอยบานคราวละ 10-20 ดอก แต่ละดอกมี 5 กลีบ แต่ละกลีบมีลักษณะคล้ายกนกลายกระจัง เมื่อบานเต็มที่จะเหมือนรูปถ้วยปาก

จีบคล้ายดาวหรือกระทงรูปดอกบัว ขนาดของดอกเมื่อบานเต็มที่ประมาณ 1.5-2 เซ็นติเมตร กลีบรองดอกมีสีเขียวอ่อน 5 กลีบ มีเกสรตัวผู้สีเขียวอ่อน (บางครั้งอาจเป็นสีขาวนวล) 5 อัน ลักษณะเป็นทรงกลม เกสรตัวผู้นี้จะเกาะติดเกสรตัวเมียโดยรอบซึ่งมีอยู่ 1 อัน เป็นรูปคล้ายผอบอยู่ตรงใจกลางดอก กลิ่นของดอกชมนาดนี้จะคล้ายกับกลิ่นหอมเหมือนข้าวสุกใหม่จึงถูกเรียกว่าดอกข้าวใหม่หรือคล้ายกลิ่นของใบเตยแต่แรงและเป็นเสน่ห์ชื่นใจกว่ากลิ่นใบเตย ดอกไม้นี้หอมนานและหอมทนมาก แค่เก็บไว้ในห้องที่ไม่กว้างนักเพียงดอกเดียวกลิ่นก็กระจายคลุ้งทั่วห้องอยู่นานเป็นวันเป็นคืน

ชมนาดขยายพันธุ์ได้ทั้งวิธีตอน ปักชำหรือทาบกิ่ง แต่วิธีตอนจะได้ผลดีกว่าวิธีอื่นๆ ขึ้นได้ดีในดินร่วนซุยในสภาพที่ไม่ชื้นแฉะตลอดวัน เพราะชมนาดเป็นต้นไม้ที่ชอบกลางแจ้งและแสงแดดจัด ถ้าใช้ปุ๋ยเข้าช่วยจะได้ดอกดกกว่าปกติ พันธุ์ไม้ชนิดนี้ออกดอกเพียงปีละครั้งเดียวคือระหว่างเดือนมีนาคมถึงเดือนมิถุนายน แต่ดอกจะดกมากในเดือนเมษายน

ประโยชน์ทั่วไป เนื่องจากมีใบดกจึงนิยมปลูกประดับซุ้มให้ร่มเงา ดอกมีกลิ่นหอมใช้อบน้ำทำข้าวแช่และเครื่องหอม ส่วนยางมีประโยชน์ทางยา[25] คือ นำมารักษาแผลแต่ไม่ระบุว่าแผลส่วนใด ใช้ทำยาถ่าย ทำให้อาเจียน

ยังมีชมนาดอีก 2 พันธุ์ซึ่งมีชื่อทางพฤกษศาสตร์ว่า *Valleris heynii* Spreng.[25] เป็นชำมะนาดเล็ก และ *Vallaris solanacea* [26] ซึ่งพันธุ์ solanacea นี้เป็นพันธุ์ไม้ป่าของเมืองไทย มักพบตามป่าดงดิบแจ้ง ป่าโคกและป่าแดงทั่วๆไป พืชชนิดนี้คนทางภาคเหนือมักเรียกว่า หญ้าข้าวน้อยหรือหางแม่นเครือ ส่วนชาวบ้านทางภาคอีสานมักเรียกว่าอุ่นฟูมหรือฟูมฟูม

1.3 สารหอมระเหย (Aroma)[28]

สารหอมระเหย เป็นกลิ่นทางอาหารหรือผลิตภัณฑ์ทางอาหารที่สามารถรับความรู้สึกได้โดยตรงทางจมูก

1.3.1 การแบ่งชนิดของสารหอมระเหย

(1) สารหอมระเหยธรรมชาติ

- วัสดุจากธรรมชาติ เช่น เครื่องเทศ ใบพืชที่มีกลิ่นหอม
- สารเคมีจากธรรมชาติ เป็นสารเคมีที่สกัดได้จากธรรมชาติ

(2) สารหอมระเหยสังเคราะห์

- เป็นสารเคมีที่สังเคราะห์ขึ้นและเป็นสารชนิดเดียวกับที่ได้จากธรรมชาติ นำไปใช้กับอาหารได้ เช่น วนิลาสังเคราะห์

(3) สารหอมระเหยเทียม

- เป็นสารหอมระเหยที่ทำเทียมขึ้นมีกลิ่นเดียวกับสารที่มีในธรรมชาติแต่เป็นสารคนละตัว เช่น ethyl vanillin

1.3.2 การเกิดสารหอมระเหยในสารอาหารแบ่งได้ 4 แบบคือ

(1) กระบวนการสังเคราะห์ทางชีวภาพ (biosynthesis) ได้แก่พวกสารประกอบที่เกิดขึ้นโดยตรงจากกระบวนการสังเคราะห์ทางชีวภาพ สารที่ได้เรียกเป็น primary aroma

(2) ปฏิกิริยาโดยตรงของเอ็นไซม์เกิดสารระเหยให้กลิ่นโดยปฏิกิริยาของเอ็นไซม์เป็นตัวเริ่มต้น

(3) ปฏิกิริยาโดยอ้อมของเอ็นไซม์สารระเหยเกิดจากสารตั้งต้นถูกออกซิไดซ์ซึ่งตัวออกซิไดซ์เกิดจากปฏิกิริยาของเอ็นไซม์

(4) Pyrolysis เป็นกระบวนการใช้ความร้อนแล้วทำให้เกิดกลิ่น เช่น การต้ม

1.4 น้ำมันหอมระเหย (Volatile oil หรือ Essential oil)[11,29-31]

น้ำมันหอมระเหยเป็นสารที่พบมากในส่วนต่างๆของพืชเขตร้อนเช่น ดอก ใบ ผล กลีบเลี้ยง เป็นต้น มีลักษณะเป็นน้ำมัน มีกลิ่นและรสเฉพาะตัว ระเหยได้ง่ายที่อุณหภูมิธรรมดา เบากว่าน้ำ ปกติน้ำมันหอมระเหยจะไม่มีสีแต่เมื่อตั้งทิ้งไว้นานๆ อาจถูกออกซิไดซ์ทำให้สีเข้มขึ้น ดังนั้นจึงควรเก็บไว้ในขวดสีชาที่ปิดสนิท เก็บในที่แห้งและเย็นน้ำมันหอมระเหยประกอบด้วยส่วนประกอบทางเคมีที่ซับซ้อน อาจแบ่งน้ำมันหอมระเหยตามชนิดขององค์ประกอบใหญ่ได้ดังนี้

1.4.1 การแบ่งชนิดของน้ำมันหอมระเหย

(1) Hydrocarbon volatile oil

(2) Alcohol volatile oil

(3) Aldehyde volatile oil

(4) Ketone volatile oil

(5) Phenol volatile oil

(6) Phenolic ether volatile oil

(7) Oxide volatile oil

(8) Ester volatile oil

1.4.2 การแยกน้ำมันหอมระเหยจากพืชทำได้ 5 วิธีใหญ่ๆ คือ

(1) การกลั่น (Distillation)

- กลั่นด้วยน้ำ (water distillation) มักใช้กับพืชแห้งและสารในพืชไม่สลายเมื่อถูกความร้อน เช่น การกลั่นน้ำมันสน

- กลั่นด้วยน้ำและไอน้ำ (water and steam distillation) ใช้กับพืชสดหรือพืชแห้งที่อาจจะถูกทำลายได้ด้วยความร้อน ทำได้โดยการหมักพืชในน้ำแล้วผ่านไอน้ำเข้าไป น้ำและน้ำมันจะถูกกลั่นออกมาด้วยกัน เช่น การกลั่นน้ำมันอบเชย

- กลั่นด้วยไอน้ำ (steam distillation) ใช้กับพืชสด ในระหว่างการกลั่นน้ำมันหอมระเหยที่อุณหภูมิสูงๆ องค์ประกอบบางชนิดในน้ำมันหอมระเหยจะถูกย่อย (hydrolyse) ให้เกิดการสลายตัวได้ การกลั่นที่ดีควรกลั่นให้ไอน้ำกระจายตัวแทรกเข้าไปในพืชมากที่สุด แต่ทำให้เกิดการสลายตัวของสารต่างๆน้อยที่สุด เช่น การกลั่นน้ำมันมินต์

(2) การบีบ (Expression) น้ำมันหอมระเหยบางชนิด เช่น น้ำมันจากผิวส้ม (orange oil) จะสลายตัวได้เมื่อถูกความร้อนจึงใช้การบีบน้ำมันแทนการกลั่น

(3) วิธี Enfleurage เป็นวิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหยโดยการดูดซับ วิธีนี้เคยใช้ในอุตสาหกรรมการทำน้ำหอม เนื่องจากน้ำมันหอมระเหยในกลีบดอกไม้มีปริมาณน้อยจึงใช้การบีบไม่ได้ผล ทำได้โดย เรียงกลีบดอกไม้ลงไปบนขี้ผึ้งหรือน้ำมันที่เคลือบไว้บนแผ่นแก้ว เมื่อน้ำมันหอมระเหยถูกดูดซับแล้วจึงนำขี้ผึ้งหรือน้ำมันไปสกัดน้ำมันหอมระเหยอีกครั้งหนึ่ง

(4) การสกัด (Extraction) ปัจจุบันในอุตสาหกรรมน้ำหอมจะใช้วิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากพืชโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสม เช่น benzene หรือ petroleum ether เป็นต้น โดยวิธีนี้น้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จะมีกลิ่นคงเดิมเพราะไม่เกิดการสลายตัวเนื่องจากใช้อุณหภูมิต่ำ

(5) วิธี Destructive distillation มักใช้กับการกลั่นน้ำมันจากต้นไม้ในวงศ์ Pinaceae และ Cupressuceae โดยนำมาเผาที่ที่อากาศไม่เพียงพอจะเกิดการสลายตัวได้สารระเหยออกมา

1.5 หลักการเลือกใช้ตัวทำละลาย[31]

ในการสกัดจะได้ผลดีหรือไม่ อยู่ที่การเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมซึ่งตัวทำละลายที่ดีควรมีสมบัติดังนี้

(1) เป็นตัวทำละลายที่ละลายสารที่เราต้องการสกัดได้ดีพอ
(2) ไม่ระเหยง่ายหรือยากเกินไป
(3) ไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่เราต้องการสกัด
(4) ไม่เป็นพิษ
(5) ราคาพอสมควร

ในการเลือกใช้ตัวทำละลายอาศัยหลักเกณฑ์ต่อไปนี้คือ

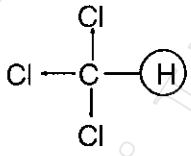
(1) สารละลายและตัวทำละลายมีคุณสมบัติความมีขั้วคล้ายกัน
(2) ละลายสารที่ต้องการมากที่สุดและละลายสารที่ไม่ต้องการน้อยที่สุด
(3) แรง (force) ซึ่งแรงที่เกี่ยวข้องในการละลายที่สำคัญคือ

- Dispersion force เป็นแรงที่เกิดจาก transient charger induced ในโมเลกุล พวกตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วจะประกอบด้วยโมเลกุลที่เรียงตัวไม่เป็นระเบียบ ทำให้พวกสารที่ไม่มีขั้วเข้าไปแทรกตัวอยู่ระหว่างโมเลกุลได้ง่าย

- Dipole-dipole force เป็นแรงที่พบในตัวทำละลายที่มีขั้วเกิดการเหนี่ยวนำในโมเลกุล เกิดเป็นขั้วบวกและขั้วลบ จะทำให้โมเลกุลของตัวทำละลายที่มีขั้วจับกันแน่น สารที่ไม่มีขั้วจะแทรกตัวเข้าไปได้ยาก

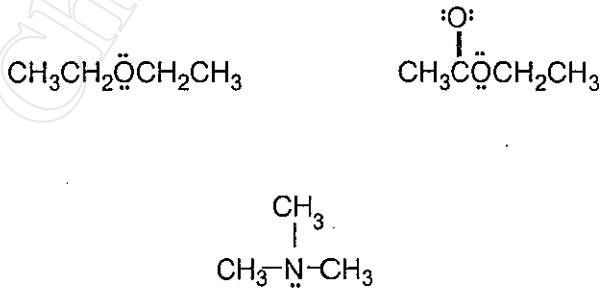
- H-bonding สารที่สามารถสร้าง H-bonding กับตัวทำละลายได้ดีก็จะละลายได้ดี แบ่งออกเป็น

ก. สารที่มี active hydrogen แต่ไม่มี donor atom เช่น $CHCl_3$



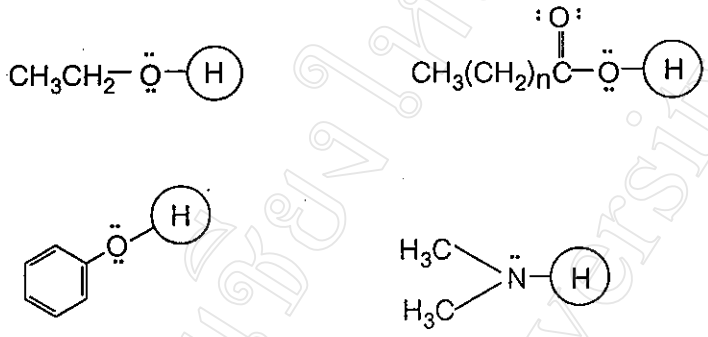
รูปที่ 1.1 ตัวอย่างสารที่มี active hydrogen แต่ไม่มี donor atom

ข. สารที่มี donor atom แต่ไม่มี active hydrogen



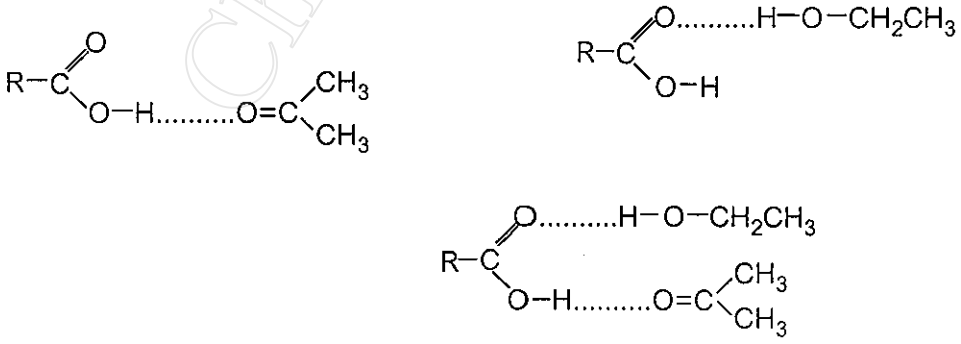
รูปที่ 1.2 ตัวอย่างสารที่มี donor atom แต่ไม่มี active hydrogen

ค. สารที่มีทั้ง donor atom และ active hydrogen



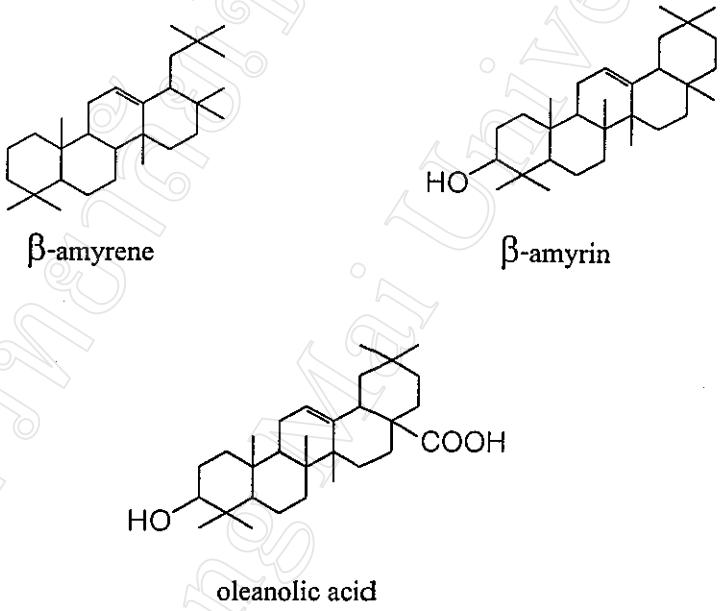
รูปที่ 1.3 ตัวอย่างสารที่มีทั้ง donor atom และ active hydrogen

ง. สารซึ่งสามารถจับกันเป็นร่างแหเกิดเป็นโมเลกุลใหม่ (network of bonding) ได้แก่ น้ำ สารพวก polyphenols และสารพวก hydroxy acids โดยทั่วไปตัวทำละลายที่มีขั้วเหมาะกับสารที่มีขั้ว และตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วเหมาะกับสารที่ไม่มีขั้ว การผสมระหว่างตัวทำละลายที่มีขั้วและไม่มีขั้วอาจทำให้การละลายดีขึ้น เช่น กรดสามารถละลายได้ทั้งใน acetone และ ethanol และส่วนผสมของตัวทำละลายทั้ง 2 แสดงดังในรูปที่ 1.4



รูปที่ 1.4 แผนภาพแสดงการเกิด H-bonding

การเลือกใช้ตัวทำละลายอาจจะอาศัยการพิจารณาสูตรโครงสร้างทางเคมีของสาร เช่น β-amyrene, β-amyrin และ oleanolic acid มีสูตรโครงสร้างคล้ายคลึงกันแต่การละลายจะแตกต่างกันคือ β-amyrene จะละลายได้ดีใน hexane เพราะเป็นสารที่ไม่มีขั้ว β-amyrin ซึ่งมี -OH เพิ่มขึ้นจะละลายได้ดีใน chloroform และ ether เพราะมีขั้วเพิ่มขึ้น ส่วน oleanolic acid มีทั้ง -COOH และ -OH จึงต้องใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วมากขึ้น เช่น ethyl acetate หรือ acetone รูปที่ 1.5 แสดงโครงสร้างของสาร β-amyrene, β-amyrin และ oleanolic acid



β-amyrene β-amyrin

oleanolic acid

รูปที่ 1.5 แสดงโครงสร้างของสาร β-amyrene, β-amyrin และ oleanolic acid

ตัวทำละลายอาจจัดเรียงตามลำดับความมีขั้วจากน้อยไปมากได้ดังนี้ cyclohexane, carbontetrachloride, benzene, chloroform, acetone, ethyl acetate, ethanol, methanol, water, acids & bases

ตัวทำละลายที่ใช้กันโดยทั่วไปได้แก่

(1) chloroform เป็นตัวทำละลายที่ดี แต่มี selectivity ต่ำ เกิด emulsion ง่าย ถ้าใช้สกัดสารที่เป็นเบสแก่อาจจะ decompose ให้กรดเกลือ

(2) ether มีอำนาจในการละลายน้อยกว่า chloroform แต่มี selectivity ดีกว่า chloroform มีข้อเสียคือ ระเหยและระเบิดง่าย เกิดออกไซด์ได้ง่ายและดูดน้ำได้มาก

(3) hexane เหมาะสำหรับสารที่ไม่มีขั้ว มักใช้เป็นตัวทำละลายสำหรับกำจัดไขมัน ข้อดีคือ ราคาถูก

(4) alcohol ที่ใช้มากคือ methanol และ ethanol เป็นตัวทำละลายเอนกประสงค์ (all purpose solvent) เนื่องจากมีอำนาจในการละลายกว้างมากและสามารถทำลายเอ็นไซม์ในพืชได้

1.6 ก๊าซโครมาโทกราฟี (Gas chromatography : GC) [32-36]

ก๊าซโครมาโทกราฟีเป็นเทคนิคของการวิเคราะห์ทางโครมาโทกราฟีที่นิยมใช้อย่างกว้างขวางสำหรับการแยกสารที่สามารถเปลี่ยนให้เป็นก๊าซเฟสที่อุณหภูมิหนึ่งได้ การแยกจะเกิดขึ้นเมื่อสารตัวอย่างที่อยู่ในก๊าซเฟสผ่านเข้าไปยังคอลัมน์ (โดยทั่วไปจะให้ความร้อนในช่วง 50-300 °C) ที่บรรจุด้วยเฟสคงที่ (stationary phase) โดยอาศัยการพาไปของเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) หรือ ก๊าซพา (carrier gas) สารตัวอย่างจะถูกแยกออกจากกันโดยขึ้นกับการกระจายตัวในก๊าซเฟสระหว่างเฟสเคลื่อนที่กับเฟสคงที่ที่เป็นของเหลว (liquild phase) ฉาบอยู่บนของแข็ง แบ่งได้เป็น 2 วิธีคือ ถ้าเฟสที่อยู่กับที่เป็นของแข็งจะเรียกว่า ก๊าซ-ของแข็งโครมาโทกราฟี (gas-solid chromatography : GSC) ส่วนใหญ่แล้ววิธีนี้ไม่ค่อยได้รับความนิยม เพราะใช้แยกเฉพาะสารที่เป็นก๊าซ หรือสารที่เป็นโมเลกุลเล็กเท่านั้น และถ้าเฟสที่อยู่กับที่เป็นของเหลวจะเรียกว่า ก๊าซ-ของเหลวโครมาโทกราฟี (gas-liquid chromatography : GLC)

ข้อจำกัดของสารตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ทาง GLC คือสารตัวอย่างจะต้องระเหยกลายเป็นไอได้ในช่วงของอุณหภูมิที่อยู่ในคอลัมน์ โดยส่วนใหญ่แล้วจะใช้ได้กับสารที่ไม่เกิดการแตกตัวเป็นไอออนที่มีขนาดเล็กและกลาง (C_1-C_{25}) สารอินทรีย์ (ทั้งของแข็งและของเหลว) และสารพวก organometallic แต่ไม่สามารถใช้ได้กับเกลือของสารอินทรีย์หรือเกลือของสารอนินทรีย์และสารพวก macromolecules รวมทั้งสารพวก biological polymers ด้วย

ผู้ตั้งทฤษฎีทั่วไปของโครมาโทกราฟีคนแรกคือ A.J.P Matin และ R.L.M. Synge โดยการพิจารณาส่วนที่เล็กที่สุดของคอลัมน์ที่ใช้ในการทำโครมาโทกราฟี ซึ่งประกอบด้วยเฟสคงที่และเฟสเคลื่อนที่ เมื่อโมเลกุลของสารตัวอย่าง A ถูกผ่านไปในคอลัมน์จะกระจายระหว่างเฟสทั้งสอง

$$A_{moblie} \rightleftharpoons A_{stationary}$$

การกระจายจะขึ้นอยู่กับสัมประสิทธิ์ของการกระจาย เมื่อการกระจายถึงสมดุลย์ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่อยู่ในแต่ละเฟสจะเป็นไปตามกฎของการกระจายคือ

$$K = C_S / C_M$$

K คือ สัมประสิทธิ์การกระจาย (partition coefficient หรือ partition ratio)

C_S คือ ความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่อยู่ในเฟสคงที่

C_M คือ ความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่อยู่ในเฟสเคลื่อนที่

ค่าสัมประสิทธิ์ของการกระจาย (K) จะมีความสัมพันธ์กันกับความเร็วของการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่างตามเฟสที่เคลื่อนที่ได้ขณะทำการ develop เมื่อค่า K เพิ่มขึ้นค่าเฉลี่ยของอัตราเร็วของสารตัวอย่างจะลดลง

1.6.1 ประสิทธิภาพของก๊าซโครมาโทกราฟี (Efficiency of gas chromatography) [33,37]

ประสิทธิภาพของก๊าซโครมาโทกราฟีอยู่ที่คอลัมน์ ซึ่งขึ้นอยู่กับจำนวนเพลตตามทฤษฎี หรือ height equivalent to a theoretical plate (HETP) สำหรับก๊าซโครมาโทกราฟีจะพิจารณาหาค่า HETP จากทฤษฎีอัตราการไหล (rate theory) หรือทฤษฎีของการอีลูท (elution) การอีลูทสารตัวอย่างจะทำให้เกิดการกระจายของสารตัวอย่างเมื่อออกจากคอลัมน์โดยมีลักษณะเป็นแบนด์หรือเป็นพีค ทั้งนี้เพราะโมเลกุลของสารตัวอย่างที่อยู่ในคอลัมน์ มีความประพฤติที่สับสนและยุ่งเหยิงไม่เหมือนกัน ซึ่งมีสิ่งสำคัญอยู่ 3 สิ่งที่เป็นสาเหตุให้โมเลกุลมีความประพฤติไม่เหมือนกันหรือไม่เป็นไปตามอุดมคติตาม Van Deemter Equation สมัยใหม่ คือ

$$H = B / u + C_S u + C_M u$$

เมื่อ B / u เป็นเทอมของ longitudinal diffusion หาได้จาก $2k_D D_M / u$

$C_S u$ เป็นเทอมของ mass transfer to and from liquid stationary phase หาได้จาก $qk'd_f^2 u / (1+k')^2 D_S$

$C_S u$ เป็นเทอมของ mass transfer to and from solid stationary phase หาได้จาก $2t_d k'u / (1+k')^2$

$C_M u$ เป็นเทอมของ mass transfer in mobile phase หาได้จาก $[f(d_p^2, d_c^2, u) / DM]u$

u คืออัตราการไหลของ mobile phase มีหน่วยเป็น cm/s

D_M คือสัมประสิทธิ์การกระจายใน mobile phase มีหน่วยเป็น cm^2/s

D_S คือสัมประสิทธิ์การกระจายใน stationary phase มีหน่วยเป็น cm^2/s

k' คือ capacity factor

d_p เส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคที่ pack ในคอลัมน์ มีหน่วยเป็น cm

d_f ความหนาของของเหลวที่เคลือบบน stationary phase มีหน่วยเป็น cm

d_c เส้นผ่านศูนย์กลางคอลัมน์

f เป็นฟังก์ชันของ (function of)

k_D, q ค่าคงที่

B สัมประสิทธิ์การกระจายของ longitudinal diffusion

C_S, C_M สัมประสิทธิ์ของ mass transfer ในstationary และ mobile phase ตามลำดับ

t_d average desorption time of analyte from surface, $t_d = 1 / k_d$ เมื่อ k_d คือ 1^{st} order rate constant for desorption

1.6.2 สรุปเทอมสำคัญและสูตรในการคำนวณทางโครมาโทกราฟี [33,37]

จำนวนของปริมาณ เทอมสำคัญและความสัมพันธ์ในโครมาโทกราฟีมีมากและค่อนข้างสับสน ตารางที่ 1.2 และ 1.3 จึงสรุปนิยามที่สำคัญและสมการในการคำนวณไว้ดังนี้

ตารางที่ 1.2 สรุปเทอมสำคัญทางโครมาโทกราฟี

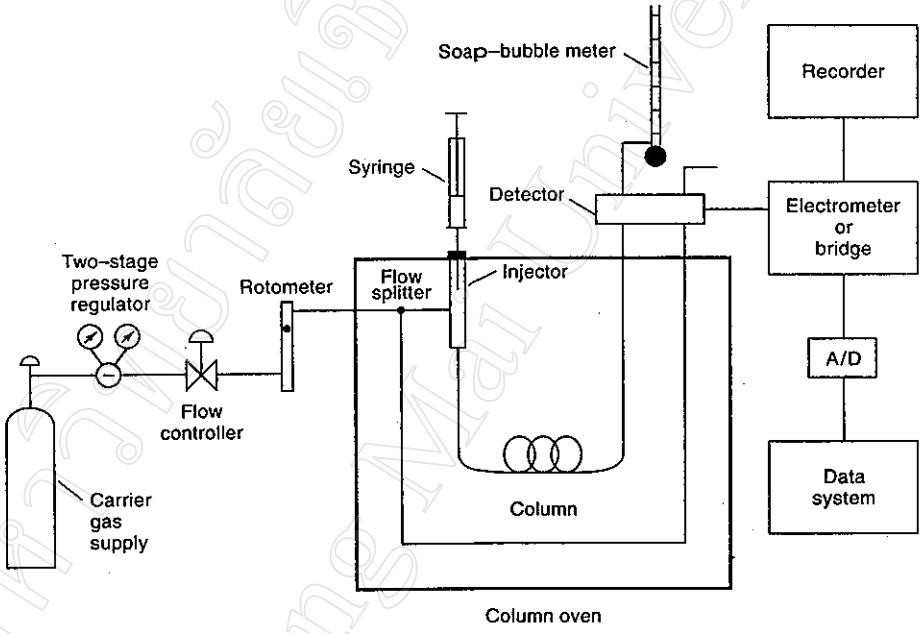
ชื่อ	สัญลักษณ์	สามารถหาได้จาก
เวลารีเทนชันของเฟสเคลื่อนที่	t_M	โครมาโทแกรม
เวลารีเทนชันของ species A และ B	$(t_R)_A$, $(t_R)_B$	โครมาโทแกรม
เวลารีเทนชันที่ปรับค่าแล้วของ species A	$(t'_R)_A$	$(t'_R)_A = (t_R)_A - t_M$
ความกว้างของพีค specie A และ B	W_A, W_B	โครมาโทแกรม
ความยาวของคอลัมน์	L	วัดได้โดยตรง
อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่	F	วัดได้โดยตรง
ปริมาตรของเฟสคงที่	V_S	ปริมาตรของคอลัมน์ที่ใช้บรรจุ
ความเข้มข้นของสารตัวอย่างในเฟสเคลื่อนที่และเฟสคงที่	C_M, C_S	วิเคราะห์จากข้อมูลที่ได้

ตารางที่ 1.3 สรุปสูตรในการคำนวณหาค่าเทอมต่างๆ ทางโครมาโทกราฟี

ชื่อ	สูตรในการคำนวณ	ความสัมพันธ์กับค่าอื่นๆ
อัตราเร็วการไหลของเฟสเคลื่อนที่	$u = L / t_M$	
ปริมาตรของเฟสเคลื่อนที่	$V_M = t_M F$	
capacity factor	$k' = (t_R - t_M) / t_M$	$k' = KV_S / V_M$
สัมประสิทธิ์การกระจาย	$K = k'V_M / V_S$	$K = C_S / C_M$
selectivity factor	$\alpha = [(t_R)_B - t_M] / [(t_R)_A - t_M]$	$\alpha = k'_B / k'_A = K_B / K_A$
resolution	$R_S = \{2[(t_R)_B - (t_R)_A]\} / (W_A + W_B)$	$R_S = (\sqrt{N} / 4)[(\alpha - 1) / \alpha][k'_B / (1 + k'_B)]$
จำนวนเพลต	$N = 16 (t_R / W)^2$	$N = 16R^2_S[\alpha / (\alpha - 1)]^2[(1 + k'_B) / k'_B]^2$
plate height	$H = L / N$	
เวลารีเทนชัน	$(t_R)_B = (16R^2_S H / u)(\alpha / \alpha - 1)^2[(1 + k'_B)^3 / (k'_B)^2]$	

1.6.3 เครื่องก๊าซโครมาโทกราฟ (Gas chromatograph)[33,37]

เครื่องก๊าซโครมาโทกราฟมีส่วนประกอบอยู่หลายส่วน ดังแสดงในรูปที่ 1.6 ทั้งแบบ GSC และ GLC จะมีส่วนประกอบต่างๆ เหมือนกัน แตกต่างกันเฉพาะชนิดของสารที่บรรจุในคอลัมน์ ดังนั้นเทคนิคและวิธีวิเคราะห์ต่างๆ จึงเหมือนกัน



รูปที่ 1.6 แสดงองค์ประกอบของเครื่องก๊าซโครมาโทกราฟ[37]

ก๊าซพาที่บรรจุไว้ในถังสามารถควบคุมความดันของก๊าซที่ปล่อยออกมาได้ สารตัวอย่างที่ถูกฉีดเข้าไปในเครื่องจะถูกความร้อนทำให้กลายเป็นไอก่อนเข้าสู่คอลัมน์ หลังจากนั้นจึงผ่านไปยังคอลัมน์โดยมีก๊าซเป็นตัวพา สารตัวอย่างจะถูกชะ (elute) ออกจากคอลัมน์ด้วยก๊าซพาแล้วเข้าสู่เครื่องตรวจวัด (detector) ซึ่งเป็นตัวแปรขนาดของสารตัวอย่างให้เป็นสัญญาณทางไฟฟ้า ยิ่งสารตัวอย่างมีปริมาณมาก สัญญาณทางไฟฟ้าที่เกิดขึ้นก็มีมาก สัญญาณทางไฟฟ้าที่เกิดขึ้นที่เครื่องตรวจวัดจะส่งไปยังเครื่องบันทึก ซึ่งจะแสดงเป็นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับค่าการตอบสนองจากเครื่องตรวจวัด (detector response)

1.6.4 ก๊าซพา (Carrier gas) [32-34]

ก๊าซพาจะต้องเป็นก๊าซเฉื่อยที่ไม่สามารถทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างได้ ก๊าซที่นิยมใช้กันโดยทั่วไปคือ nitrogen gas เนื่องจากมีราคาถูกแต่ทำให้ความไวของการทดลองลดลง (sensitivity) รองลงมาได้แก่ helium gas แต่มีราคาแพง นอกนั้นจะใช้ argon gas, hydrogen gas และ carbon dioxide gas ตามความเป็นจริงแล้ว hydrogen gas ใช้ได้ผลดีที่สุดและมีประโยชน์มากแต่ไม่ค่อยนิยมใช้เพราะเป็นก๊าซที่ลุกติดไฟได้ง่ายและสามารถทำปฏิกิริยากับสารประกอบที่ไม่อิ่มตัวได้ การเลือกใช้ก๊าซพาต้องคำนึงถึงความสามารถของเครื่องตรวจวัดต่อก๊าซพานั้นๆ ด้วย อัตราการไหลของก๊าซพามีส่วนสำคัญต่อการวิเคราะห์ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ และจะต้องมีการควบคุมอัตราการไหล (flow rate) ให้คงที่เสมอ โดยสามารถเลือกใช้อัตราการไหลให้เหมาะสมได้ตามต้องการ สรุปลักษณะที่ดีของก๊าซพาควรเป็นดังนี้

(1) มีสมบัติเฉื่อย เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยากับสารตัวอย่างหรือตัวทำละลายหรือเฟสคงที่

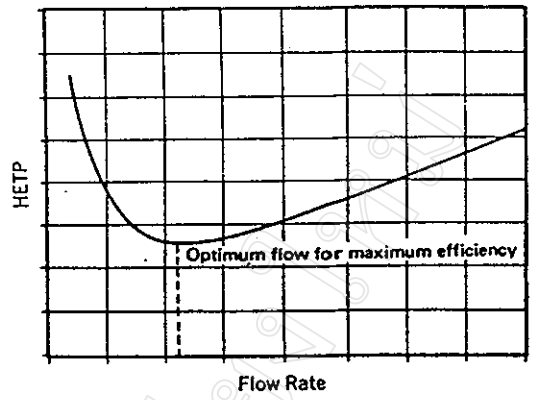
(2) เป็นก๊าซที่มีการแพร่น้อยและมีมวลโมเลกุลต่ำ

(3) หาได้ง่ายและมีความบริสุทธิ์สูง

(4) ราคาไม่แพง

(5) เป็นก๊าซที่เหมาะสำหรับใช้กับเครื่องตรวจวัดได้ ก๊าซที่ออกจากท่อก๊าซควรทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยให้ผ่านท่อที่บรรจุด้วย molecular seive เพื่อช่วยขจัดไอน้ำหรือไอน้ำมัน

นอกจากนี้ประสิทธิภาพของคอลัมน์ (column efficiency) ยังขึ้นอยู่กับการเลือกใช้อัตราการไหลของก๊าซพา โดยคอลัมน์แต่ละชนิดจะมีค่าอัตราการไหลที่เหมาะสมที่สุด (optimum flow rate) แตกต่างกัน ซึ่งสามารถหาได้โดยทำการทดลอง Van Deemter plot เป็นการเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ของค่า HETP กับอัตราการไหลของก๊าซ จะได้กราฟดังแสดงในรูปที่ 1.7



รูปที่ 1.7 แสดง Van Deemter plot[32]

optimum flow rate คืออัตราการไหลของก๊าซที่ค่า HETP ต่ำสุดหรือมีจำนวนเพลต (plate) สูงสุด การวัดอัตราการไหลของก๊าซทำได้โดยใช้เครื่องมือที่ใช้ฟองสบู่ (soap-bubble flow meter) ดังแสดงในรูปที่ 1.6

1.6.5 ระบบฉีดสารตัวอย่าง (Sample injection system)[32,33]

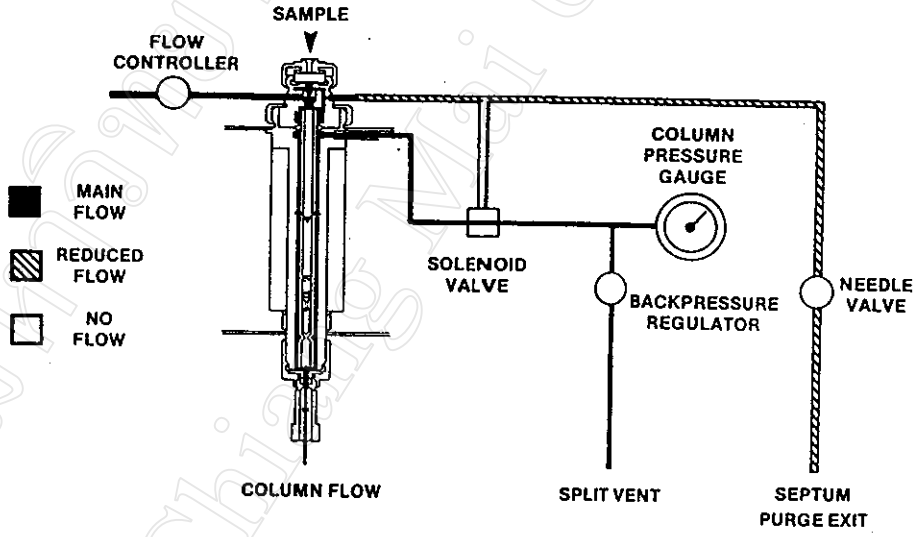
การนำสารตัวอย่างฉีดเข้าไปในเครื่องก๊าซโครมาโทกราฟเพื่อวิเคราะห์นั้น มีวิธีการที่แตกต่างกันไปแล้วแต่ชนิดของสารตัวอย่าง เช่น เป็นก๊าซ ของแข็งหรือของเหลว ถ้าเป็นของแข็งหรือของเหลวต้องดูว่าสารนั้นระเหยง่ายหรือยาก คอลัมน์ที่ใช้เป็นอะไร (packed หรือ capillary column) การออกแบบเครื่องมือในส่วนนี้จะแตกต่างกันออกไปเพื่อให้ทำงานได้ตามวัตถุประสงค์และมีประสิทธิภาพ โดยทั่วไปส่วนที่ฉีดสารตัวอย่างเข้าไป (inlet) จะมีเครื่องให้ความร้อน (heater) ประกอบอยู่ด้วย เพื่อทำให้สารตัวอย่างกลายเป็นไอ และเนื่องจากในการทดลองนี้ใช้ capillary column จึงขอกล่าวถึงเฉพาะในส่วนของการฉีดสารตัวอย่างสำหรับ capillary column เท่านั้น

ระบบฉีดสารตัวอย่างสำหรับ capillary column เนื่องจากคอลัมน์ชนิดนี้เป็นชนิดหลอดเล็ก (capillary tube) ทำให้มีความจุสารตัวอย่างต่ำเมื่อเทียบกับคอลัมน์ชนิดบรรจุด้วยสารบางชนิด (packed column) ในทางปฏิบัติจึงมีเทคนิคที่ใช้กันอยู่กับคอลัมน์ชนิดนี้ 3 แบบ คือ split injection, splitless injection และ “cool” on-column injection โดยจะขอกล่าวถึงเฉพาะ split injection และ splitless injection เท่านั้น

(1) Split injection เนื่องจากเป็นการยากที่จะฉีดสารตัวอย่างปริมาณน้อยๆ (0.001-0.5 μL) เข้าไปใน capillary column จึงทำให้ระบบนี้ได้พัฒนาขึ้น สารที่ฉีดเข้าไปจะถูกเปลี่ยนให้เป็นไอ โดยไอของสารจะมีการผสมกันก่อนที่จะถึงจุดแบ่งแยกสารตัวอย่าง ที่จุดนี้ไอของสารตัวอย่างส่วนน้อยและปริมาณแน่นอนจะเข้าไปในคอลัมน์แต่ส่วนใหญ่จะถูกระบายออก ส่วนที่เข้าคอลัมน์คำนวณได้จาก split ratio ดังสมการ

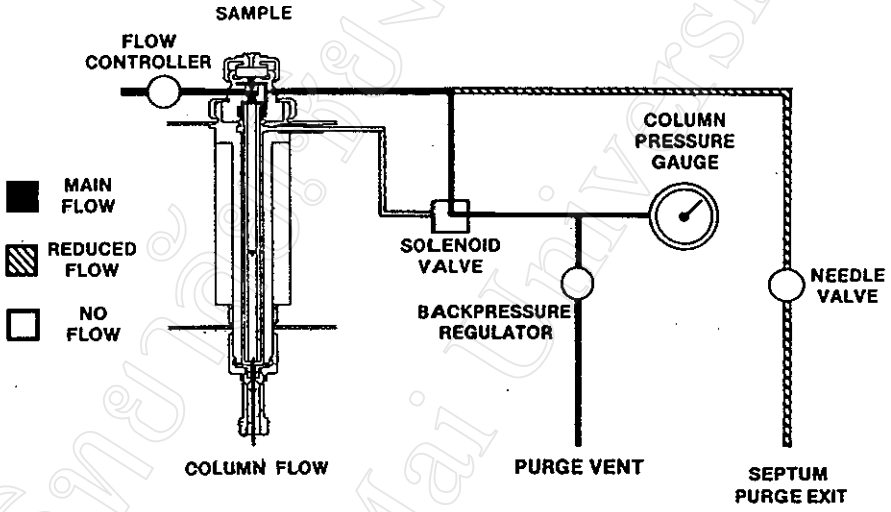
split ratio = ส่วนที่ระบายออก : ส่วนที่เข้าคอลัมน์

split ratio จะมีค่าแตกต่างกันไปจาก 10 ถึง 1,000 ต่อ 1 ลักษณะของ split injection ดังแสดงในรูปที่ 1.8



รูปที่ 1.8 แสดงลักษณะของระบบฉีดสารแบบ split injection[32]

(2) Splitless injection เป็นเทคนิคที่มีประโยชน์มากในการวิเคราะห์สารปริมาณน้อยๆ (trace analysis) โดยที่สารตัวอย่างจะถูกทำให้เจือจางด้วยตัวทำละลายแล้วให้สารตัวอย่างทั้งหมดเข้าสู่คอลัมน์ การใช้เทคนิคนี้ให้ความถูกต้องดีแต่บางครั้งต้องใช้เวลาและยุ่งยากพอสมควร ลักษณะของ splitless injection ดังแสดงในรูปที่ 1.9



รูปที่ 1.9 แสดงลักษณะของระบบฉีดสารแบบ splitless injection[32]

1.6.6 คอลัมน์ (Column)[32,33,37,38]

คอลัมน์ถือเป็นหัวใจของการแยกสารด้วยเทคนิคทางก๊าซโครมาโทกราฟี เมื่อก๊าซผสมหรือไอของสารที่ปนกันอยู่ในสารตัวอย่างผ่านคอลัมน์ สารที่บรรจุในคอลัมน์จะทำหน้าที่เป็นตัวแยกก๊าซหรือไอผสมเหล่านั้นออกจากกันเป็นส่วนๆ โครมาโทแกรมที่ได้จะดีหรือไม่จึงขึ้นกับชนิดของคอลัมน์มาก

(1) ประเภทของคอลัมน์ (Type of column) ที่ใช้กันทั่วไปมี 2 ประเภท คือ

(ก) packed column คอลัมน์ชนิดนี้มีทั้งแบบที่ทำด้วยแก้ว โลหะ (stainless steel copper หรือ aluminum) หรือทำด้วย teflon มีลักษณะเป็นหลอดที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน

ประมาณ 2-4 mm มีความยาวตั้งแต่ 2-3 m คอลัมน์ชนิดนี้สามารถใช้ในการวิเคราะห์ได้ทั้ง GSC และ GLC ถ้าทำการวิเคราะห์แบบ GSC จะใช้สารของแข็งที่เป็นตัวดูดซับ (adsorption particles) บรรจุในคอลัมน์ เช่น alumina silica เป็นต้น แต่ถ้าทำการวิเคราะห์แบบ GLC จะต้องใช้คอลัมน์แบบ partition column ซึ่งจะบรรจุด้วยอนุภาคของของแข็งที่มีสมบัติเฉื่อย (inert solid particles) แล้วฉาบบนผิว (coated) ด้วยของเหลวที่ทำหน้าที่เป็นเฟสคงที่ซึ่งจะมีจุดเดือดสูงที่เรียกว่า substrate หรือ stationary liquid phase

(ข) capillary column หรือ open tubular column คอลัมน์ชนิดนี้ใช้ได้เฉพาะการวิเคราะห์แบบ GLC เท่านั้น โดยทั่วไปจะเป็นหลอดแก้วรูเล็กๆ กลวง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในประมาณ 0.1-0.5 mm ความยาวของคอลัมน์ตั้งแต่ 2-50 m หรืออาจมากกว่านี้ โดยขดเป็นวงอยู่ในเตา (oven) คอลัมน์ชนิดนี้ส่วนใหญ่มักทำด้วย stainless steel แก้ว fused silica หรือ teflon คอลัมน์ชนิดนี้แม้ว่าจะมีประสิทธิภาพ (efficiency) ของคอลัมน์ต่อหน่วยความยาวที่ค่อนข้างต่ำ แต่สามารถใช้คอลัมน์ยาวมากๆ ได้เพราะมี pressure drop เพียงเล็กน้อยเท่านั้น ดังนั้นเมื่อใช้คอลัมน์ยาวมากๆ จึงทำให้ประสิทธิภาพในการแยกมีค่าสูง และเมื่อใช้สภาวะที่เหมาะสมแล้ว capillary column จะให้ประสิทธิภาพในการแยกดีที่สุด capillary column แบ่งได้ 3 ชนิด คือ wall-coated open tubular columns (WCOT), supported-coated open tubular columns (SCOT) และ fused-silica open tubular columns (FCOT) ซึ่งมีลักษณะและสมบัติสรุปได้ดังตารางที่ 1.4

ตารางที่ 1.4 เปรียบเทียบลักษณะและสมบัติบางประการของคอลัมน์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคก๊าซโครมาโทกราฟี

	ชนิดของคอลัมน์			
	FSOT	**WCOT**	**SCOT**	**Packed**
ความยาว, m	10-100	10-100	10-100	1-6
เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน, mm	0.1-0.53	0.25-0.75	0.5	2-4
ประสิทธิภาพ (efficiency), plates/m	2,000-4,000	1,000-4,000	600-1,200	500-1,000
ขนาดสารตัวอย่าง (sample size), ng	10-75	10-1,000	10-1,000	$10-10^6$
relative pressure	ต่ำ	ต่ำ	ต่ำ	สูง
relative speed	เร็ว	เร็ว	เร็ว	ช้า
chemical inertness	best	→		poorest
flexible?	Yes	no	no	no

(2) ของเหลวที่ทำหน้าที่เป็นเฟสคงที่ (Stationary liquid phase) ของเหลวนี้มีชื่อเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า substrate หรือ liquid phase เป็นของเหลวที่มีจุดเดือดสูง ใช้ฉาบ (coated) บน solid support เพื่อใช้เป็นตัวทำหน้าที่แยกสารตัวอย่างที่อยู่ในคอลัมน์หรือใช้ฉาบที่ผิวของ capillary column โดยทั่วไปในการแยกที่มีประสิทธิภาพของสารธรรมดาๆ แล้ว liquid phase ควรจะต้องมีโครงสร้างทางเคมีคล้ายกับองค์ประกอบที่จะแยกในสารผสม ซึ่ง liquid phase ควรมีสมบัติดังนี้

(ก) ควรเป็นตัวทำละลาย (solvent) ที่ดี เมื่อละลายได้ดี การชะ (elute) ออกจากคอลัมน์จะช้าทำให้การแยกได้ผลดี

(ข) ควรละลายสารต่างๆ ได้ต่างกัน จึงจะทำให้การแยกสารต่างๆ ออกจากกันได้ดี

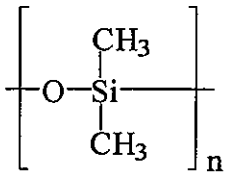
(ค) เสถียรที่อุณหภูมิสูงๆ ไม่ระเหยง่ายในช่วงอุณหภูมิที่ใช้งาน จะทำให้คอลัมน์มีอายุการใช้งานได้นาน

(ง) ต้องไม่ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างหรือกับเฟสเคลื่อนที่

(จ) ควรมีสภาพความมีขั้ว (polarity) ใกล้เคียงกับสารตัวอย่าง จะทำให้การแยกได้ผลดี

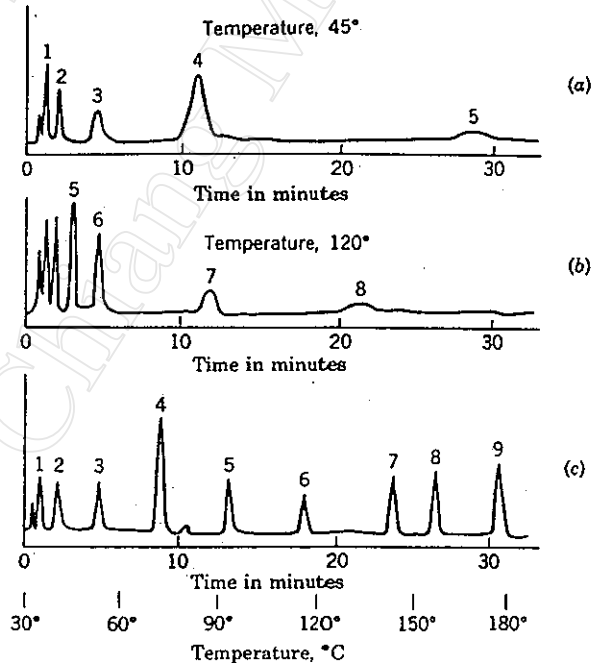
(ฉ) มีความดันไอที่อุณหภูมิภายในคอลัมน์ต่ำ

ในการทำ GLC ของเหลวที่สามารถใช้เป็น liquid phase ได้มีหลายร้อยชนิด สำหรับตัวที่ใช้ในการทดลองคือ DB-1 (100 % dimethyl polysiloxane) ซึ่งเป็นสารพวกไม่มีขั้ว (non polar) โครงสร้างแสดงดังรูปที่ 1.10



รูปที่ 1.10 โครงสร้างของ DB-1 stationary liquid phase, 100 % dimethyl polysiloxane[40]

(3) อุณหภูมิของคอลัมน์ (Column temperature) อุณหภูมิที่ใช้ต้องไม่สูงเกินไปจนทำให้เปอร์เซ็นต์ liquid phase เปลี่ยนไปซึ่งอาจทำให้คอลัมน์เสียได้ (bleeding) ปกติอุณหภูมิที่ใช้จะต่ำกว่าส่วนของระบบฉีดสารตัวอย่าง (sample injection system) ประมาณ 10 °C อุณหภูมิมีส่วนสำคัญต่อการแยกสารนั่นคือมีผลต่อค่า K และค่าเวลารีเทนชัน ที่อุณหภูมิสูงๆ องค์ประกอบของสารมีการเคลื่อนที่เร็ว ทำให้การวิเคราะห์เร็วขึ้น แต่ถ้ามีสารผสมหลายตัวจะทำให้สารเหล่านั้นถูกชะออกจากคอลัมน์ในเวลาไล่เลี่ยกัน การแยกจะเกิดขึ้นไม่ดี (poor resolution) แต่ถ้าใช้อุณหภูมิต่ำสารตัวอย่างจะใช้เวลาอยู่ในเฟสคงที่นาน ค่าเวลารีเทนชันจะมากแต่การแยกจะดีขึ้น โดยปกติในการทดลองทั่วๆ ไปจะใช้วิธีการควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์ให้คงที่ซึ่งเรียกว่า isothermal temperature จะเหมาะสำหรับสารผสมที่มีค่าเวลารีเทนชันต่างกันไม่มากนักถ้าต่างกันมากจะใช้เวลานาน แต่ถ้าใกล้กันมากก็ใช้ไม่ได้เพราะไม่สามารถแยกออกจากกันได้ วิธีการสำหรับทำให้สารผสมแยกออกจากกันได้ดีและใช้เวลาไม่นานนัก คือใช้เทคนิคการเพิ่มหรือลดอุณหภูมิอย่างเป็นระเบียบและต่อเนื่อง เรียกว่าการโปรแกรมอุณหภูมิ (temperature programming) เหมาะสำหรับสารผสมที่มีค่าเวลารีเทนชันสูงต่ำปนกัน สารที่มีค่าเวลารีเทนชันต่ำจะออกมาก่อนเมื่อใช้อุณหภูมิต่ำ ถ้าต้องการให้สารที่มีค่าเวลารีเทนชันสูงออกจากคอลัมน์สามารถทำได้โดยเพิ่มอุณหภูมิของคอลัมน์อย่างเป็นระบบ ดังแสดงในรูปที่ 1.11



รูปที่ 1.11 ผลของอุณหภูมิต่อโครมาโทแกรมที่ได้ (a), (b) คือโครมาโทแกรมที่วิเคราะห์แบบ isothermal temperature และ (c) คือโครมาโทแกรมที่วิเคราะห์แบบ temperature programming ด้วยอัตรา 5 °C ต่อนาที[33]

1.6.7 เครื่องตรวจวัด (Detector)[32,33,36,37]

เครื่องตรวจวัดจัดเป็นส่วนที่สำคัญส่วนหนึ่งของเครื่องก๊าซโครมาโทกราฟ ทำหน้าที่ตรวจวัดสารที่ออกจากคอลัมน์ว่ามีปริมาณมากน้อยเท่าไร ซึ่งขึ้นอยู่กับงานแต่ละแบบจะมีการใช้เครื่องตรวจวัดที่แตกต่างกันออกไป เครื่องตรวจวัดที่ดีควรมีลักษณะดังนี้

(1) มีสภาพไวสูง (high sentivity) เหมาะกับงานที่ใช้

(2) มีเสถียรภาพที่ดี (good stability) และมีความเที่ยงตรงสูง (reproducibility)

(3) ควรมีช่วงอุณหภูมิที่ใช้งานได้ตั้งแต่อุณหภูมิห้องจนถึงประมาณ 400 ^{o}C

(4) ควรให้ผลการวิเคราะห์เชิงปริมาณที่ช่วงความเข้มข้นที่กว้างพอที่จะวัดได้ถูกต้อง (dynamic range)

(5) ใช้เวลาในการตอบสนองที่สั้น (short response time) และไม่ขึ้นกับ flow rate

(6) ให้ผลการตอบสนองคล้ายๆ กันกับสารทุกชนิดที่วัด

(7) ไม่ทำลายสารตัวอย่าง (nondestructive of sample)

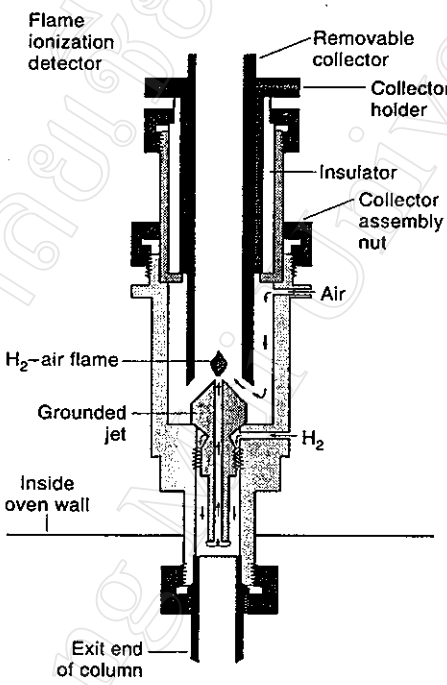
(8) มีเสียงรบกวนน้อย (low noise level)

(9) ราคาถูก

เครื่องตรวจวัดที่ใช้กันในปัจจุบันมีหลายชนิด เช่น thermal conductivity detector (TCD) flame ionization detector (FID) electron capture detector (ECD) และ flame photometric detector (FPD) เป็นต้น ซึ่งในการทดลองนี้จะขอกล่าวถึงเฉพาะ FID เท่านั้น

Flame ionization detector (FID) เป็นเครื่องตรวจวัดที่นิยมใช้กันมากที่สุดเพราะให้ผลที่มีความไวสูง มีช่วงในการใช้งานได้กว้างในการตรวจหาสารประกอบอินทรีย์ effluent จากคอลัมน์เมื่อผ่านเข้าไปในเครื่องตรวจวัดจะถูกเผาด้วยเปลวไฟ H_2 / air สารตัวอย่างจะถูกไอออไนซ์ได้อิเล็กตรอนกับไอออนบวก (positive ion) อิเล็กตรอนจะวิ่งไปยัง flame jet ไอออนบวกจะเคลื่อนที่ไปยัง collector หรือ electrode สัญญาณที่เกิดขึ้นจะถูกส่งไปยัง electrometer และบันทึกสัญญาณด้วยเครื่องบันทึกได้เป็นโครมาโทแกรม FID ให้สภาพไวที่ดีกับสารต่างๆ โดยเฉพาะสารอินทรีย์ แต่ไม่ดีกับก๊าซต่อไปนี้ He, Ar, Kr, Ne, Xe, O_2, N_2, CS_2, COS, H_2S, SO_2, NO, N_2O, NO_2, NH_3, CO, CO_2, H_2O, SiCl, $SiHCl_3$ และ SiF_4

จากการเผาไหม้ใน FID จะเกิดไอน้ำขึ้นจึงต้องตั้งอุณหภูมิของเครื่องตรวจวัดให้สูงกว่า 100 °C โดยเฉพาะเมื่อสารตัวอย่างเป็นสารประกอบคลอรีน ผลจากการเผาไหม้จะทำให้เกิดการผุกร่อนได้ง่าย สภาพไวของเครื่องตรวจวัดจะเสียไปด้วย สำหรับสารประกอบที่มีโมเลกุลใหญ่ๆ การเผาไหม้จะไม่ค่อยสมบูรณ์ทำให้เกิดเขม่าอุดตัน flame tip หรือ flame jet ได้ จึงต้องใช้อุณหภูมิของเครื่องตรวจวัดให้สูงขึ้น รูปที่ 1.12 แสดงลักษณะของเครื่องตรวจวัด FID



รูปที่ 1.12 ลักษณะของเครื่องตรวจวัดแบบ flame ionization detector (FID)[37]

1.7 การวิเคราะห์เชิงคุณภาพและเชิงปริมาณโดยวิธีก๊าซโครมาโทกราฟี (Qualitative and quantitative analysis by gas chromatography) [32,33]

ข้อมูลที่สำคัญที่สามารถนำไปใช้เพื่อการพิสูจน์สารหรือหาปริมาณของสารได้มี 3 ประการด้วยกันคือ เวลารีเทนชัน (t_R) ขนาดของพีคและลักษณะของพีคที่ได้ สามารถนำไปเป็นข้อมูลในการวิเคราะห์ทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณได้ แต่การใช้เทคนิคนี้เพียงอย่างเดียวสำหรับการวิเคราะห์สาร

โดยเฉพาะสารตัวอย่างที่ค่อนข้างซับซ้อน ควรที่จะต้องใช้เทคนิคอื่นเข้ามาช่วยประกอบในการวิเคราะห์ด้วย เช่น IR, NMR หรือ MS เพื่อให้การวิเคราะห์มีความถูกต้องและแม่นยำขึ้น

1.7.1 การวิเคราะห์เชิงคุณภาพ วิธีการต่างๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพนั้นมีด้วยกันหลายวิธี เช่น เปรียบเทียบค่าเวลารีเทนชัน ใช้ดรรชนี Kovats ใช้วิธีการอ่านกราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าเวลารีเทนชันกับ homologous series ของ carbon เป็นต้น ซึ่งจะขอกล่าวถึงเฉพาะวิธีเปรียบเทียบค่าเวลารีเทนชันเท่านั้น

การเปรียบเทียบค่าเวลารีเทนชัน ปริมาตรรีเทนชัน (V_R) หรือเวลารีเทนชัน (t_R) เป็นลักษณะเฉพาะของสารแต่ละชนิด ในการพิสูจน์ (identification) ชนิดของสารแต่ละตัวในสารผสมตัวอย่างนั้นจะต้องทำการวิเคราะห์ทั้งสารผสมตัวอย่างและสารมาตรฐานโดยใช้สภาวะการทดลองต่างๆ อย่างเดียวกัน นำค่าเวลารีเทนชันมาเปรียบเทียบกันก็จะสามารถบอกได้ว่าแต่ละพีคนั้นเป็นพีคของสารใด หรืออีกกรณีหนึ่งก็คือทำโครมาโทแกรมของสารตัวอย่างก่อน จากนั้นนำสารตัวอย่างผสมกับสารมาตรฐานที่ทราบแล้วว่าคือสารใด นำมาทำโครมาโทแกรม ถ้าโครมาโทแกรมที่ได้พีคของสารตัวอย่างมีขนาดใหญ่ขึ้น แสดงว่าสารตัวอย่างและสารมาตรฐานเป็นตัวเดียวกัน

1.7.2 การวิเคราะห์เชิงปริมาณ ปริมาณของสารตัวอย่างที่ฉีดเข้าไปในเครื่องก๊าซโครมาโทกราฟจะสัมพันธ์โดยตรงกับขนาดของพีคที่ได้ ในเครื่องก๊าซโครมาโทกราฟสมัยใหม่จะมีเครื่อง integrator หรือ คอมพิวเตอร์ใช้ร่วมอยู่ด้วย เครื่องมือเหล่านี้จะทำหน้าที่คำนวณพื้นที่ของแต่ละพีคให้ตลอดจนพิมพ์ค่าเวลารีเทนชันให้ด้วย หลังจากที่ทราบขนาดและพื้นที่พีคแล้ว สามารถนำมาคำนวณหาปริมาณของสารแต่ละชนิดในสารตัวอย่างได้ โดยใช้เทคนิคต่างๆ เช่น standard addition method, normalization method, external standard method หรือ internal standard method เป็นต้น ซึ่งจะขอกล่าวถึงเฉพาะ internal standard method เท่านั้น

Internal standard method เป็นเทคนิคที่ใช้หาปริมาณของสารได้ถูกต้องที่สุด ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับการเลือกใช้สารมาตรฐานภายใน (internal standard) ซึ่งหลักการเลือกสารที่ใช้เป็นสารมาตรฐานภายในคือ [32,39]

- สารนั้นจะต้องมีสมบัติคล้ายกับสารที่จะวิเคราะห์ซึ่งในการทดลองคือ 2-acetyl-1-pyrroline และสารมาตรฐานภายในคือ 2,4,6-trimethylpyridine แต่จะต้องเป็นสารที่ไม่เป็นองค์ประกอบหรือมีอยู่ในสารตัวอย่าง

- เป็นสารที่เสถียรโดยไม่ทำปฏิกิริยากับสารอื่น
- มีค่าเวลารีเทนชันใกล้กับสารที่จะวิเคราะห์และพีคที่ได้ต้องไม่ทับกับพีคอื่น
- สารมาตรฐานภายในที่เติมลงไปควรมีความเข้มข้นใกล้เคียงกับสารที่ต้องการวิเคราะห์
- สารนั้นควรถูกชะ (elute) ออกจากคอลัมน์หมด

การวิเคราะห์โดยเทคนิค internal standard method ทำได้โดย

(1) เตรียมสารมาตรฐานภายในให้มีปริมาณใกล้เคียงกับสารตัวอย่างที่จะวิเคราะห์
(2) เตรียมสารมาตรฐานของตัวที่จะวิเคราะห์ให้มีปริมาณใกล้เคียงกับสารตัวอย่าง
(3) ผสมสารในข้อ (1) ในปริมาณที่เท่ากันและ (2) เข้าด้วยกัน นำส่วนผสมนี้ฉีดเข้าเครื่องก๊าซโครมาโทกราฟ หาอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐานกับสารมาตรฐานภายในนำไปสร้างกราฟระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคกับปริมาณ
(4) ผสมสารมาตรฐานภายใน (ในปริมาณที่เท่ากัน) กับสารตัวอย่าง นำส่วนผสมนี้ฉีดเข้าเครื่องก๊าซโครมาโทกราฟ หาอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของสารตัวอย่างกับสารมาตรฐานภายในแล้วนำค่าที่ได้ไปอ่านจากกราฟ calibration curve ในข้อ (3) ก็จะทราบปริมาณของสารตัวอย่างได้

ข้อดีของการวิเคราะห์โดยเทคนิค internal standard method คือ

(1) ผลการวิเคราะห์ถูกต้องและแม่นยำดีมาก
(2) ผลการวิเคราะห์อาจเป็นได้ทั้งค่าสัมพัทธ์และค่าสัมบูรณ์
(3) ค่าที่วิเคราะห์ได้ไม่ขึ้นอยู่กับสภาพไวของเครื่องตรวจวัด
(4) สภาพไวของเครื่องตรวจวัดอาจจะเปลี่ยนแปลงได้ขณะทำการวิเคราะห์
(5) ผลการวิเคราะห์ไม่ขึ้นอยู่กับขนาดของสารตัวอย่างที่ฉีดเข้าไป
(6) สารตัวอย่างไม่จำเป็นต้องถูกชะออกมาหมด

ข้อเสียของการวิเคราะห์โดยเทคนิค internal standard method คือ

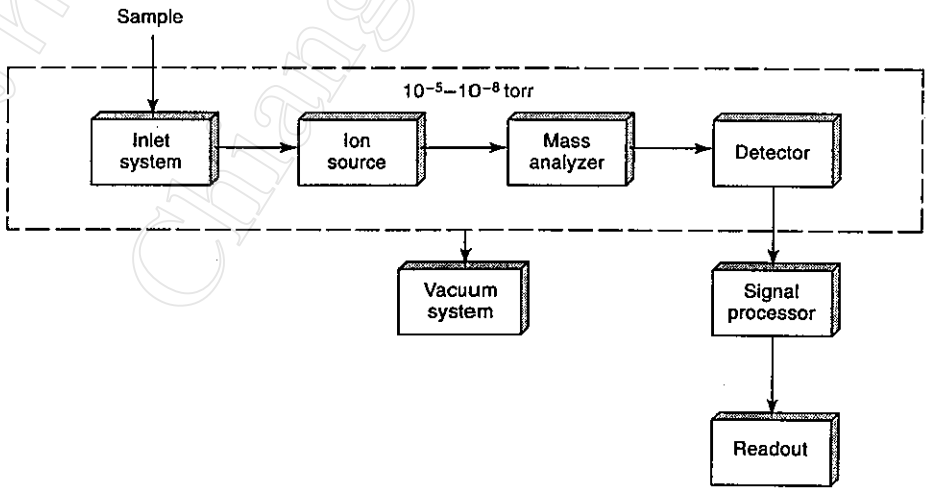
(1) สารมาตรฐานภายในจะต้องผสมลงไปในสารตัวอย่างและค่อนข้างหายาก
(2) เครื่องมือที่ใช้จะต้องทำในสภาวะเดียวกันตลอดการทดลอง

1.8 แมสสเปคโทรเมตรี (Mass spectrometry : MS) [32,37,41,42]

แมสสเปคโทรเมตรีเป็นเทคนิคที่สามารถใช้ศึกษาหาข้อมูลเกี่ยวกับโครงสร้างและมวลโมเลกุลของสาร โดยอาศัยการทำให้โมเลกุลนั้นเกิดการแตกตัวเป็นไอออน กล่าวคือสารตัวอย่างซึ่งอยู่ในสภาพก๊าซจะถูกยิงด้วยอิเล็กตรอนที่มีพลังงานสูง โดยทั่วไปพลังงานที่ใช้นี้จะอยู่ในช่วง 5-70 eV (1 eV = 23.06 Kcal/mol) ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้สารตัวอย่างที่วิเคราะห์จะต้องเสียไป (destructive of sample) แต่ข้อดีคือใช้สารตัวอย่างน้อย

1.8.1 แมสสเปคโทรมิเตอร์ (Mass spectrometer)

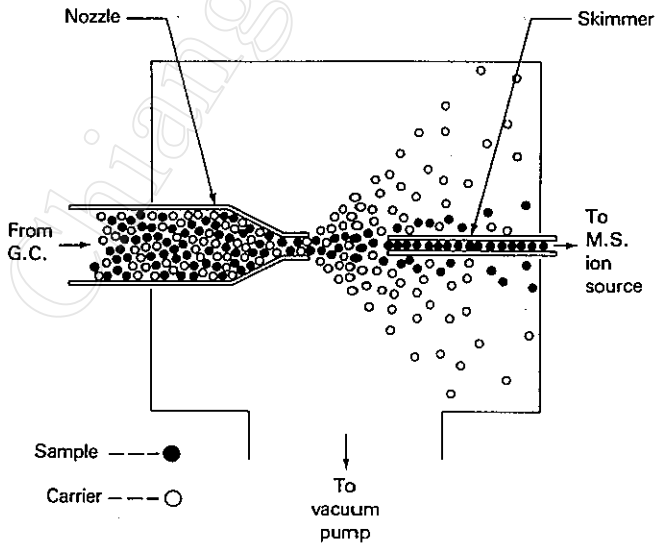
ในการวิเคราะห์สารโดยแมสสเปคโทรมิเตอร์นั้น จะต้องทำสารตัวอย่างให้เป็นไอ จากนั้นทำให้เป็นไอออน ไอออนที่เกิดขึ้นจะถูกแยกออกจากกันตามค่ามวลต่อประจุ (mass-to-charge ratio หรือ m/z) ที่แตกต่างกันแล้วส่งไปยังเครื่องตรวจวัดและเครื่องบันทึก อุปกรณ์ที่จำเป็นสำหรับเครื่องแมสสเปคโทรมิเตอร์ประกอบด้วยส่วนใหญ่ๆ 4 ส่วน คือ inlet system, ion source, mass analyzer และ detector แสดงดังรูปที่ 1.13



รูปที่ 1.13 แสดงองค์ประกอบของเครื่องแมสสเปคโทรมิเตอร์[37]

(1) ระบบนำสารเข้า (Inlet system) มีได้หลายวิธี เช่น การใส่สารตัวอย่างแบบเย็น การใส่สารตัวอย่างแบบร้อน การใส่สารตัวอย่าง โดยตรง และการใส่สารตัวอย่างที่ต่อเข้ากับเครื่องก๊าซโครมาโทกราฟ เป็นต้น ซึ่งจะขอกล่าวถึงเฉพาะวิธีการใส่สารตัวอย่างผ่านเครื่องก๊าซโครมาโทกราฟ

ในเครื่องก๊าซโครมาโทกราฟ คอลัมน์จะทำหน้าที่แยกสารผสมออกเป็นสารประกอบแต่ละชนิดแล้วจึงผ่านเข้าไปยังส่วนแยกโมเลกุล (moleclar separator หรือ jet separator) เพื่อแยกก๊าซพา (He H_2 หรือ N_2) ออกจากก๊าซผสม โดยอาศัยหลักการแพร่ผ่าน membrane (teflon membrane หรือ porous glass) ซึ่งจะทำให้สารตัวอย่างมีความเข้มข้นขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 1.14 ส่วนแยกโมเลกุลนี้มักอยู่ในตู้อบที่มีอุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิของคอลัมน์เล็กน้อย ส่วนแยกโมเลกุลมักใช้ควบคู่กับคอลัมน์ชนิดที่เป็น packed column ที่มีอัตราการไหลของก๊าซสูงและมีปริมาณสารที่แยกมาก ถ้าใช้ capillary column อัตราการไหลของก๊าซจะต่ำกว่ามากคือประมาณ 1-2 mL/min จึงจำไม่เป็นต้องใช้ interface ต่อเชื่อมระหว่างเครื่องก๊าซโครมาโทกราฟกับเครื่องแมสสเปคโทรมิเตอร์ เนื่องจากสามารถต่อ capillary column เข้าไปในส่วนของ ion source ได้โดยตรงโดยอาจต้องควบคุมอุณหภูมิตรงส่วนต่อระหว่างเครื่องก๊าซโครมาโทกราฟและเครื่องแมสสเปคโทรมิเตอร์ให้สูงกว่าอุณหภูมิสูงสุดของคอลัมน์



รูปที่ 1.14 แสดงองค์ประกอบของส่วนแยกโมเลกุล (molecular separator หรือ jet separator)[37]

(2) แหล่งกำเนิดไอออน (Ion source) ในการทำให้เกิดไอออนมีได้หลายวิธี เช่น electron impact (EI) chemical ionization (CI) field ionization (FI) field desorption (FD) fast atom bombardment (FAB) เป็นต้น ซึ่งจะขอกล่าวถึงเฉพาะ EI และ CI เท่านั้น

ก. Electron impact (EI) เป็นวิธีการทำให้โมเลกุลเกิดเป็นไอออนที่นิยมกันมากที่สุด โมเลกุลของสารตัวอย่างจะเกิดเป็นไอออนบวกด้วยการชนกับอิเล็กตรอนที่มีพลังงานสูง โดยทั่วไปพลังงานของอิเล็กตรอนที่นิยมใช้กันจะมีค่าเท่ากับ 70 eV (หรือประมาณ 1,600 Kcal/mol) แต่โมเลกุลของสารอินทรีย์โดยทั่วไปมีพันธะโควาเลนท์ที่จะต้องใช้พลังงานศักย์ที่ทำให้เกิดเป็นไอออน (ionization potential) อยู่ในช่วง 10-15 eV ดังนั้นพลังงานจำนวนนี้จึงมากเกินพอที่จะทำให้อิเล็กตรอนในโมเลกุลของสาร 1 ตัวหลุดออกไปจาก orbital วงนอกสุด ได้ไอออนที่มีประจุบวกเรียกว่า molecular ion ซึ่งโมเลกุลของสารอินทรีย์ส่วนใหญ่จะมีจำนวนอิเล็กตรอนเป็นเลขคู่ เมื่ออิเล็กตรอนหลุดออกไป 1 ตัวจึงทำให้เกิด radical cation ขึ้น ซึ่งมีอิเล็กตรอนที่ไม่เป็นเลขคู่ (unpaired electron) อยู่ 1 ตัวดังนี้

$$M + e^- \longrightarrow M^{+\cdot} + 2e^-$$

เมื่อ M คือโมเลกุลของสารตัวอย่างและ $M^{+\cdot}$ คือ molecular ion หรือ radical cation

ลำอิเล็กตรอนที่มีพลังงานสูงนี้อาจทำให้เกิด $M^{+\cdot}$ ในระดับพลังงานต่างๆ กัน $M^{+\cdot}$ มีพลังงานสูงมาก จึงเกิดการแตกตัวเป็นไอออนย่อย เช่น

$$M^{+\cdot} \longrightarrow m_1^+ \text{ หรือ } m_1^{+\cdot} + \text{โมเลกุลที่เป็นกลางหรือ radical}$$

m_1^+ เป็น fragment ion ไอออนของโมเลกุลตัวอื่นอาจมีพลังงานไม่มากพอก็จะไม่แตกตัวจึงผ่านไปยังส่วนแยกไอออนซึ่งจะถูกตรวจวัดได้ด้วยเครื่องตรวจวัดและบันทึกลงบนแผ่นกราฟที่เรียกว่า แมสสเปคตรัม ซึ่งแสดงความเข้มข้นของไอออนที่เรียกว่า ความอุดม (abundance) เป็นฟังก์ชันของอัตราส่วนของมวลต่อประจุ หรือ m/z

ข. Chemical ionization (CI) ในการแตกตัวเป็นไอออนโดยวิธีนี้สารตัวอย่างจะถูกนำเข้าสู่แหล่งกำเนิดไอออนที่ความดันประมาณ 1 ทอร์พร้อมกับก๊าซที่จะทำปฏิกิริยาด้วย เช่น methane, isobutane และ ammonia ในกรณีของ methane เมื่อถูกชนด้วยอิเล็กตรอน methane จะเกิดเป็นไอออนบวกและเกิดปฏิกิริยาที่สำคัญต่างๆ ดังนี้

$$CH_4 + e^- \longrightarrow CH_4^+, CH_3^+, CH_2^+$$
$$CH_4^+ + CH_4 \longrightarrow CH_5^+ \text{ และ } CH_3^-$$
$$CH_3^+ + CH_4 \longrightarrow C_2H_5^+ \text{ และ } H_2$$
$$CH_4 + C_2H_5^+ \longrightarrow C_3H_5^+ \text{ และ } 2H_2$$

จากนั้นไอออน CH_5^+ และ $C_2H_5^+$ จะทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของสารตัวอย่าง (M) ทำให้เกิดเป็นไอออน แล้วไอออนเหล่านี้จะผ่านเข้าส่วนวิเคราะห์มวลตามปกติ ดังสมการ

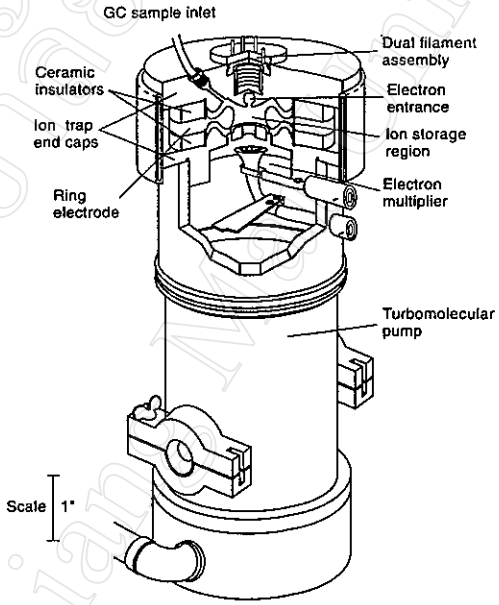
$$M + CH_5^+ \longrightarrow MH^+ + CH_4$$
$$M + C_2H_5^+ \longrightarrow MH^+ + C_2H_4$$

จะเห็นว่า molecular ion ใน CI แมสสเปคตรัมจึงมักเป็น $(M+1)^+$ แทนที่จะเป็น M^+ ความสะอาดของก๊าซที่เข้าทำปฏิกิริยาและแหล่งกำเนิดไอออนเองจะมีอิทธิพลต่อผลของ CI ดังนั้น CI จึงไม่เหมือน EI เนื่องจาก CI ทำให้ได้ความไม่คงเส้นคงวาได้ค่อนข้างมาก ตัวอย่างเช่น ไม่มีทางเป็นไปได้ที่จะจัดทำ mass spectrum library สำหรับแมสสเปคตรัมที่ได้จาก CI ในการตรวจหาเอกลักษณ์ของสาร แต่แมสสเปคตรัมที่ได้จาก EI มีความเสมอต้นเสมอปลาย สามารถที่จะใช้ในการตรวจหาเอกลักษณ์ของสารโดยการเปรียบเทียบแมสสเปคตรัมได้

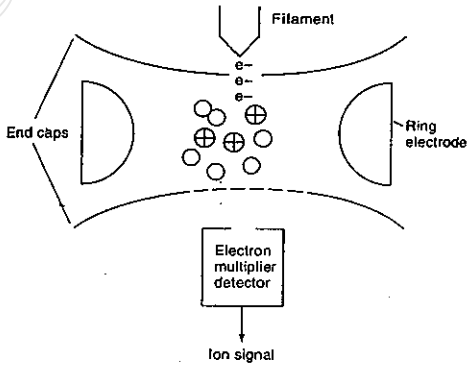
(3) เครื่องวิเคราะห์มวล (Mass analyzer) อุปกรณ์ชนิดนี้จะติดตั้งอยู่ระหว่าง แหล่งกำเนิดไอออน (ion source) และ เครื่องตรวจวัด เครื่องวิเคราะห์มวลที่สำคัญๆ มีหลายแบบ เช่น magnetic sector analyzer, quadruploe analyzer, ion trap analyzer, time-of-flight analyzer เป็นต้น ซึ่งจะขอกล่าวเพียงเฉพาะในส่วนของ ion trap analyzer

Ion trap analyzer (ion trap detector : ITD)[37,43,44] เครื่องตรวจวัดอย่างง่ายสุดที่นิยมใช้กันในเครื่องก๊าซโครมาโทกราฟ/แมสสเปคโทรมิเตอร์ ที่ใช้คอลัมน์แบบ WCOT หรือ capillary column คือ ion trap detector (ITD) รูปที่ 1.15 แสดงลักษณะของ ITD ซึ่งประกอบด้วย central doughnut-shaped, ring electrode และ end-cap electrodes 1 คู่ เมื่อเปรียบเทียบลักษณะเฉพาะของ ITD กับแมสสเปคโทรมิเตอร์อื่นๆ คือ ใน ITD บริเวณแหล่งกำเนิดไอออน (ion source) และเครื่องวิเคราะห์มวล (mass analyzer) จะเป็นบริเวณเดียวกัน ดังแสดงในรูปที่ 1.16 เป็นภาคตัดขวางของ ITD ไอออนที่เกิดจาก electron impact (EI) หรือ chemical ionization (CI) จะถูกกักเก็บไว้ใน

ย่าน RF (radio-frequency voltage) เมื่อให้ความต่างศักย์ RF ไปยัง end-cap electrodes และ ring electrode เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จะทำให้ไอออนที่ไม่เสถียรมีพลังงานมากพอที่จะหลุดออกจากย่านสนาม RF ไปยังทิศทาง end-cap electrode ด้านล่าง (ดูรูปที่ 1.16 ประกอบ) ซึ่งค่า m/z ของไอออนที่หลุดไปเหล่านี้จะสัมพันธ์กับค่า RF นั่นคือ เมื่อทำการ scan ค่า RF ก็เท่ากับว่า scan ให้ไอออนที่มีค่า m/z หลุดจากย่านสนาม RF ไปสู่เครื่องตรวจวัดนั่นเอง ข้อดีของ ITD คือ มีความทนทาน กระทัดรัด และราคาถูกกว่า analyzer แบบ magnetic sector และ quadrupole มาก แต่ก็มีข้อเสีย คือ ใน ITD จะให้ mass range ที่แคบ (m/z ≈ 600) และให้แมสสเปคตรัมที่ต่างออกไปจาก EI ปกติ จึงยากในการที่จะใช้ library search และบางครั้งจะเห็น $(M+1)^+$ แต่ถ้าทำการเจือจางสารตัวอย่างก่อนที่จะนำมาวิเคราะห์แล้ว แมสสเปคตรัมที่ได้จะคล้ายกับ EI ปกติซึ่งสามารถใช้ library search เดียวกันได้



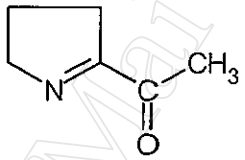
รูปที่ 1.15 แสดงลักษณะของ ion trap detector (ITD)[37]



รูปที่ 1.16 ภาคตัดขวางของ ion trap detector (ITD)[37]

1.9 ทบทวนเอกสารและวัตถุประสงค์ของการวิจัย

จุดมุ่งหมายของการวิจัยทางด้านสารหอมระเหยนั้นก็คือการบอกชนิดของสารที่มีส่วนร่วมในการให้กลิ่นของน้ำมันหอมระเหย และค้นหาสารที่มีความสำคัญในการให้กลิ่นหอมระเหยนั้นจริงๆ จำนวนสารหอมระเหยในน้ำมันหอมระเหยมีอยู่มากแต่สารที่ช่วยในการให้กลิ่นมักจะมีปริมาณน้อยกว่าสารระเหยอื่นๆ ซึ่งสารเหล่านี้มีความแตกต่างกันหลายอย่างทั้งทางด้านกายภาพและทางเคมี สารให้กลิ่นส่วนมากมักจะไม่เสถียรเมื่อแยกออกมาจากต้นกำเนิดเช่นเดียวกับสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ซึ่งในปี ค.ศ.1982 Buttery และคณะ[45] ได้เสนอให้เป็นสารหลักที่ให้กลิ่นหอมในข้าวและยังพบในใบเตยด้วย[46] สาร 2-acetyl-1-pyrroline เป็นสารพวก nitrogen-containing compound มี nitrogen (N) อยู่ในวงขนาด 5 อะตอม มีพันธะ carbon-nitrogen เป็นพันธะคู่ (C=N) และมีหมู่ acetyl เกาะกับ carbon ที่เกิดพันธะคู่ ดังรูปที่ 1.17



รูปที่ 1.17 โครงสร้างสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline

สารหอม 2-acetyl-1-pyrroline[47] มีสมบัติทางกายภาพเป็นของเหลวใสไม่มีสี เมื่อเก็บไว้เป็นเวลานานจะเปลี่ยนเป็นสีแดงหรือน้ำตาลเข้ม มีมวลโมเลกุล 111 แสดงสมบัติเป็นเบสเล็กน้อย จะไม่คงตัว (unstable) เมื่ออยู่ในรูปสารบริสุทธิ์ ฉะนั้นจึงต้องเก็บในรูปของสารละลายที่เจือจางหรือในรูปของเกลือ

ความยุ่งยากในการศึกษาแยกสารระเหยจากข้าวหรือพืชอื่นๆ คือ ปริมาณของสารที่มีน้อยมาก บางชนิดอาจต่ำกว่า 1 ppb หรือน้อยกว่านั้น ทำให้ต้องใช้สารตัวอย่างเป็นปริมาณมากเพื่อให้ได้สารที่จะนำมาทดลองเพียงพอ ตัวอย่างเช่น

ในปี ค.ศ. 1978 Yajima และคณะ[48] ได้รายงานการศึกษาสารระเหยในข้าวพันธุ์โคชิฮิคาริ (Koshihikari) โดยทำการสกัดด้วยไอน้ำใช้ภาชนะขนาดใหญ่ขนาดประมาณ 50 ลิตร ใช้ตัวอย่างข้าวครั้งละ 6 กิโลกรัม ทำซ้ำกัน 8 ครั้ง รวมใช้ตัวอย่างข้าว 48 กิโลกรัม นำสารสกัดที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคก๊าซโครมาโทกราฟี/แมสสเปคโตรเมตรี (GC/MS) พบว่ามีสารระเหยร้อยกว่าชนิดในสารสกัดที่ได้ ประกอบด้วย hydrocarbon, alcohol, aldehyde, ketone, acid, ester, phenol, pyridine และ pyrazine ซึ่งเป็นสารที่ค้นพบใหม่ถึง 92 ตัว และในปีต่อมา (ค.ศ. 1979)[49] ผู้วิจัยคณะเดิมได้ทำการศึกษากับข้าวพันธุ์คาโอริมัย (Kaorimai) ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวหอมเปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์โคชิฮิคาริซึ่งใช้ตัวอย่างข้าวถึง 60 กิโลกรัม พบว่ามีสาร indole มากกว่าในข้าวพันธุ์โคชิฮิคาริ และพบ สาร α-pyrrolidone ซึ่งไม่พบในข้าวพันธุ์โคชิฮิคาริ และยังพบอีกว่าในข้าวพันธุ์คาโอริมัย มี 4-vinylphenol, 1-hexanal และ 1-hexanol น้อยกว่าในข้าวพันธุ์โคชิฮิคาริ แม้ว่าจะไม่พบองค์ประกอบที่ให้ความหอมของข้าวพันธุ์คาโอริมัย

ประชากรที่บริโภคข้าวส่วนใหญ่ให้ความนิยมและให้ความสำคัญกับพันธุ์ข้าวหอมมากกว่าพันธุ์ข้าวไม่หอม นักวิจัยต่างๆจึงได้ทำการศึกษาสารระเหยที่เกี่ยวข้องกับความหอมของข้าวตลอดจนได้พยายามปรับปรุงวิธีการต่างๆที่ใช้ในการศึกษาสารระเหยในเมล็ดข้าว ซึ่งแต่เดิมส่วนใหญ่มักใช้วิธีการสกัดด้วยไอน้ำและสกัดสารอินทรีย์ที่ได้จากสิ่งที่กลั่นได้ (distillate) ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมอีกทีหนึ่งตามลำดับ โดยในระยะแรกของการศึกษาต้องใช้ปริมาณสารตัวอย่างค่อนข้างมาก อาจเนื่องมาจากประสิทธิภาพของทั้งวิธีการสกัดและวิเคราะห์ยังไม่ดีพอ ต่อมา Buttery และคณะ[46,47,50] ได้ศึกษาพบสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline และได้เสนอให้เป็นสารหลักที่ให้กลิ่นหอมในข้าว สารนี้มีกลิ่นหอมใกล้เคียงที่สุดกับกลิ่นของข้าวสุกและข้าวโพด เมื่อทำการศึกษากับข้าวพันธุ์ต่างๆ ซึ่งมีทั้งพันธุ์ข้าวหอม เช่น บาสมาติ 370 (Basmati 370), ข้าวดอกมะลิ 105 (Khao Dawk Mali 105) และพันธุ์ข้าวไม่หอม เช่น คาลโรส (Calrose) ซึ่งพันธุ์ข้าวส่วนใหญ่ได้มาจากศูนย์วิจัยข้าวนานาชาติประเทศฟิลิปปินส์ (IRRI) นำมาสกัดด้วยไอน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์แบบต่อเนื่อง (steam distillation continuous extraction) ตามแบบของ Likens and Nickerson[51](Likens-Nickerson steam distillation continuous extraction) พบว่าสามารถลดปริมาณข้าวได้น้อยลงเหลือเพียง 500 กรัม จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคก๊าซโครมาโทกราฟี/แมสสเปคโทรเมตรี (GC/MS) พบว่าปริมาณสารหอมของพันธุ์ข้าวหอมที่ไม่ได้ขัดสีอยู่ในระดับ 0.1-0.2 ppm พันธุ์ข้าวหอมที่ขัดสีแล้วอยู่ในระดับ 0.04-0.09 ppm และพันธุ์ข้าวไม่หอมในระดับ 0.006-0.008 ppm และจากการทดลอง Buttery ยังพบอีกว่าปริมาณสาร 2-acetyl-1-pyrroline

นอกจากจะขึ้นกับชนิดของข้าวแต่ละพันธุ์แล้วยังขึ้นกับกระบวนการขัดสีด้วย เนื่องมาจากในกระบวนการขัดสีนั้นเมล็ดข้าวจะสูญเสียเปลือกชั้นนอกออกไป

และในปี ค.ศ.1983 Buttery และคณะ[46] ได้ศึกษาสารสกัดจากใบเตยแห้ง (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.) โดยใช้เทคนิคการสกัดด้วยไอน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์แบบต่อเนื่อง นำสารสกัดมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคก๊าซโครมาโทกราฟี/แมสสเปคโตรเมตรี (GC/MS) พบว่าปริมาณสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline อยู่ในระดับ 12 ppm ซึ่งมีมากกว่าในพันธุ์ข้าวหอมที่ได้ขัดสีแล้วถึงประมาณ 10 เท่าและมากกว่าในข้าวพันธุ์ไม่หอมถึง 100 เท่า

ปี ค.ศ.1986 Buttery และคณะ[39] ได้พัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์หาปริมาณสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline จากตัวอย่างข้าวโดยใช้เทคนิคการสกัดด้วยไอน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์แบบต่อเนื่องแล้วแยกด้วย acid-phase solvent extraction ซึ่งใช้ตัวอย่างข้าวเพียง 200 กรัม นำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคก๊าซโครมาโทกราฟี (GC) พบว่าปริมาณสารหอมของพันธุ์ข้าวหอมที่ขัดสีแล้วอยู่ในระดับ 560-760 ppb ขณะที่พันธุ์ข้าวไม่หอมอยู่ในระดับไม่เกิน 6 ppb

ถึงแม้ว่าจะสามารถลดตัวอย่างข้าวได้เหลือเพียง 200 กรัมแล้วก็ตาม แต่พบว่ายังมีปริมาณที่สูงอยู่ นักวิจัยต่างๆจึงได้พยายามปรับปรุงเทคนิคการสกัดให้มีประสิทธิภาพที่ดีขึ้นโดยใช้ตัวอย่างข้าวให้น้อยลง จนมาในปี ค.ศ.1991 Tanchotikul และ Hsieh[52] ได้ทำการศึกษาการหาปริมาณสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline จากข้าวพันธุ์ต่างๆทั้งพันธุ์ข้าวหอมและไม่หอม โดยใช้เทคนิค high-resolution gas chromatography/mass spectrometry/selected ion monitoring (SIM) ซึ่งสามารถใช้ตัวอย่างข้าวเพียง 1 กรัมโดยใช้ชุดสกัดด้วยไอน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์แบบต่อเนื่องที่มีขนาดเล็กพบว่าระดับสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ของข้าวพันธุ์เดลลา (Della) ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวไม่หอมอยู่ในช่วง 76.2 ± 1.8 ppb ข้าวพันธุ์บาสมาติ (Basmati) 370 อยู่ในช่วง 87.4 ± 3.4 ppb และข้าวพันธุ์จัสมิน (Jasmine) อยู่ในช่วง 156.1 ± 8.4 ppb

ในปี ค.ศ.1980 (พ.ศ.2523) พัชรินทร์ เมทินีวงศ์[53] ได้ทำการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากใบเตยโดยวิธีการกลั่นด้วยไอน้ำ จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Thin-Layer Chromatograpy : TLC, Infrared Spectroscopy : IR และวิธีทางเคมี พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากใบเตยมีองค์ประกอบของสาร 4 ชนิด โดย 2 ชนิดแรกจะเป็นสารประกอบ ketone (อาจเป็น acyclic

หรือ cyclic ketone) ส่วนอีก 2 ชนิดนั้นทราบแต่เพียงว่าไม่ใช่ unsaturated compounds และไม่ใช่ alcohol

ในปี ค.ศ.1981 (พ.ศ.2524) ตรีรัตน์ ภูมิสถิตย์พงษ์ [54] ได้ศึกษาการสกัดกลิ่นและสีจากใบเตย โดยเปรียบเทียบระหว่างใบเตยสด ใบเตยตากในร่มและใบเตยตากแดด โดยนำมาแช่ในตัวทำละลาย acetone, n-hexane, chloroform และ 95% ethanol เป็นเวลา 7 วัน กรองและระเหยตัวทำละลายออก ได้ผลดังนี้ กลิ่นและสีที่ได้จากสกัดใบเตยทั้งตากในร่มและตากแดดมีมากกว่าในใบเตยสด 95% ethanol สามารถสกัดกลิ่นและสีจากใบเตยแห้งได้ดีที่สุดและในการระเหยตัวทำละลายออก ไม่ควรใช้อุณหภูมิสูงเกินจุดเดือดของตัวทำละลายอาจทำให้สูญเสียน้ำมันหอมระเหยได้

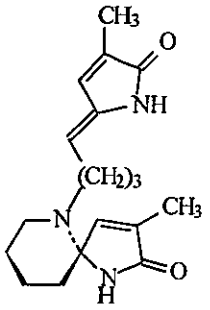
ในปี ค.ศ.1983 (พ.ศ.2526) สุวิมล ศรีเทวฤทธิ์ [1] ได้ทำการสกัดกลิ่นจากใบเตยสด ใบเตยตากในร่มและใบเตยตากแดด โดยวิธีต้มกลั่นและสกัดด้วย 95% ethanol พบว่า การสกัดโดยใช้ใบเตยสดจะให้กลิ่นเหมือนธรรมชาติมากกว่าใช้ใบเตยตากแห้ง จากนั้นได้ทำการศึกษากลิ่นจากใบเตยสดในรูปของหัวเชื้อให้มีคุณภาพในด้านกลิ่นเหมือนธรรมชาติ และมีความคงทนโดยทำการทดลองทั้งหมด 8 วิธีคือ สกัดโดยวิธีการต้มกลั่น, สกัดโดยวิธีการกลั่นด้วยไอน้ำ, สกัดโดยใช้ตัวทำละลาย, สกัดโดยใช้สารละลาย surfactant (5% tween 80 ในน้ำ 200 mL), วิธีดักกลิ่นที่ระเหยด้วยไขมัน, วิธีดักกลิ่นด้วยอุณหภูมิต่ำของไนโตรเจนเหลว, ใช้ activated carbon จับกลิ่นและใช้ porapak Q จับกลิ่น พบว่าการสกัดกลิ่นจากใบเตยถ้าใช้ความร้อนกลิ่นที่ได้จะไม่เหมือนกลิ่นของใบเตยธรรมชาติ การสกัดใบเตยด้วย 95% ethanol และวิธีดักกลิ่นด้วยไขมันจะให้กลิ่นเหมือนธรรมชาติมากกว่าการสกัดโดยวิธีอื่นแต่กลิ่นจะไม่คงทน ระเหยง่าย และจากการสกัดโดยวิธีการกลั่นด้วยไอน้ำเมื่อนำสารสกัดที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Thin-Layer Chromatography พบว่า มีองค์ประกอบในสารที่สกัดได้ 6 ชนิดประกอบด้วย linalool, linalyl acetate และ geraniol ส่วนอีก 3 ชนิดยังไม่ทราบว่าเป็นสารชนิดใด

จากปี ค.ศ.1983 Buttery และคณะ พบว่าปริมาณสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ในใบเตยแห้งมีมากกว่าในข้าวหอมมากนี่เอง ในปี ค.ศ.1993 Laksanalamai และ Ilangantileke[55] ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ในตัวอย่างข้าวดอกมะลิ 105 และใบเตย (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.) โดยใช้เทคนิคการสกัดเหมือนของ Buttery และคณะ พบว่า เนื่องจากในการหาปริมาณสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ในตัวอย่างข้าวแต่ละครั้งนั้น จะต้องทำการสังเคราะห์สารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ขึ้นมาใช้เป็นตัวเปรียบเทียบแต่ก็ยังไม่สามารถสังเคราะห์

ให้มีความบริสุทธิ์ที่สูงได้ ในกรณีเช่นนี้ สารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ที่สกัดได้จากใบเตยสามารถใช้เป็นสารอ้างอิงในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคก๊าซโครมาโทกราฟีได้ เพราะทั้งข้าวและใบเตยต่างมีสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ตัวเดียวกันที่เป็นสารหลักในการให้กลิ่นหอมแต่ในใบเตยจะมีปริมาณสูงกว่าในข้าวหอมมาก

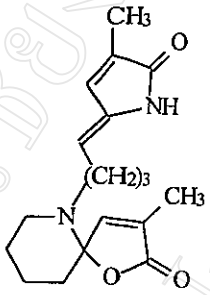
ในปี ค.ศ. 1996 Widjaja และคณะ[56] ได้ทำการศึกษาองค์ประกอบสารระเหยของพันธุ์ข้าวของออสเตรเลียทั้งชนิดข้าวหอมและไม่หอมเปรียบเทียบกับพันธุ์ข้าวหอมจัสมิน (jasmine) และบาสมาติ (basmati) พบสารระเหย 70 กว่าชนิด โดยมี alkanals, alk-2-enals, alka-2,4-dienals, 2-pentylfuran, 2-acetyl-1-pyrroline และ 2-phenylethanol ซึ่งพบว่าเป็นองค์ประกอบหลักของสารหอมระเหย และจากการทดลองพบว่า พันธุ์ข้าวหอมกูลาร่า (goolarah) และ YRF9 ของออสเตรเลียจะมีระดับของสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline สูงกว่าพันธุ์ข้าวไม่หอมเพลด์ (pelde) ขณะที่ข้าวบาสมาติจะมีระดับของสาร 2-phenylethanol สูงที่สุด และจากการทดสอบโดยการดมกลิ่นพบว่าข้าวพันธุ์ YRF9 และกูลาร่า ผู้ทดสอบส่วนใหญ่มีความเห็นว่ากลิ่นเหมือน "ใบเตย" (pandan-like) ขณะที่ข้าวพันธุ์บาสมาติ จะให้กลิ่นเหมือน "ข้าวโพด" (popcorn-like)

ในใบเตยหอมได้มีผู้วิจัยพบว่ามีสารพวก alkaloids หลายชนิดที่ทราบโครงสร้างทางเคมีบ้างแล้วโดยในปี ค.ศ. 1992 Byrne และคณะ[57] ได้ทำการศึกษาสารพวก alkaloids พบสาร (±)-pandamarine ซึ่งเป็นสารหลักในใบเตยหอม (*pandanus amaryllifolius*) โดยอาศัยวิธีทาง X-ray diffraction พบว่าผลึกสาร (±)-pandamarine นี้เป็นสารพวก triclinic คือ เป็นสารที่มีรูปแบบของผลึกที่แกนทั้งสามแกนไม่เท่ากันและติดกันเป็นมุมเฉียงดังรูปที่ 1.18

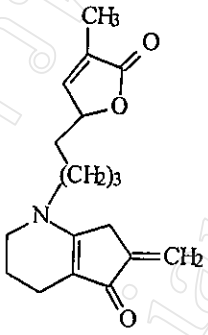


รูปที่ 1.18 โครงสร้างสาร (±)-pandamarine

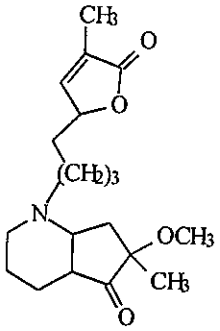
ต่อมาในปี ค.ศ. 1993 Nonato และคณะ[58] ได้ทำการวิเคราะห์สารจากใบเตยหอม (*Pandanus amaryllifolius*) โดยใช้เทคนิค 2D NMR และเทคนิคทางสเปคโทรสโคปีคือ เทคนิค inverse-detected Heteronuclear Multiple Bond Correlation (HMBC) และเทคนิค Heteronuclear Multiple Quantum Coherence (HMQC) พบว่ามี piperidine alkaloids 3 ตัวซึ่ง piperidine alkaloids ทั้ง 3 ตัวนี้จะมี C_9-N-C_9 แสดงดังรูปที่ 1.19



pandamarilactone-1



pandamarilactone-32



pandamarilatone-31

รูปที่ 1.19 โครงสร้างสาร pandamarilactone-1, pandamarilactone-32 และ pandamarilatone-31

จากการศึกษาของประดับและรัชวรรณในปี ค.ศ. 1993[59] ได้ศึกษาผลของน้ำสกัดจากใบเตยโดยนำใบเตยสดมาล้างและอบจนแห้งกรอบที่อุณหภูมิ 40-45 °C แล้วปั่นให้ละเอียด นำมาต้ม

ในน้ำกลั่นให้เดือดนาน 3 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วกรองด้วยกระดาษกรอง นำสารละลายที่กรองได้ไปทำให้แห้งด้วยวิธี Lyophilization จะได้สารสกัดจากใบเตยหอมสีน้ำตาล มีกลิ่นหอมอ่อนๆ เก็บไว้ที่แห้งและเย็น เมื่อต้องการศึกษาฤทธิ์ของใบเตยหอมให้นำสารสกัดจากใบเตยหอมมาชั่งน้ำหนักและละลายในน้ำกลั่น ผลของน้ำสกัดจากใบเตยหอมต่อการทำงานของหัวใจห้องบนที่ตัดออกจากร่างกายของหนูขาวและต่อความดันเลือดและอัตราการหดตัวของหัวใจของหนูขาวที่สลบ พบว่าน้ำสกัดจากใบเตยหอมที่ความเข้มข้น 0.066, 0.136, 0.264, 0.528 และ 1.056 mg/mL ทำให้กล้ามเนื้อหัวใจห้องบนหดตัวแรงขึ้นและมีอัตราการหดตัวลดลงชั่วคราว ปริมาณการเพิ่มความแรงของการหดตัวและการลดอัตราการหดตัวเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของน้ำสกัดจากใบเตยหอม การฉีดน้ำสกัดจากใบเตยหอมความเข้มข้น 50, 100 และ 200 mg/น้ำหนักตัว 1 kg เข้าร่างกายทางช่องท้องทำให้ความดันเลือดและอัตราการหดตัวของหัวใจลดลงเล็กน้อย ส่วนการฉีดเข้าทางหลอดเลือดดำด้วยความเข้มข้น 25, 50 และ 100 mg/น้ำหนักตัว 1 kg ทำให้ความดันเลือดและอัตราการหดตัวของหัวใจลดลงมากเพียงช่วงระยะเวลาสั้นๆ แล้วเพิ่มขึ้น แต่ 5 นาทีหลังจากฉีดยังคงมีความดันเลือดต่ำกว่าค่าเปรียบเทียบ นั่นคือการฉีดสารสกัดจากใบเตยหอมเข้าสู่ร่างกายทางช่องท้องหรือหลอดเลือดดำ มีผลทำให้ความดันเลือดลดลงเล็กน้อย จากการศึกษาของประดับและรัชวรรณ ในครั้งนี้จึงคาดว่าสารสกัดจากใบเตยหอมนอกจากจะมีผลเพิ่มความแรงในการหดตัวของกล้ามเนื้อหัวใจแล้วยังอาจมีผลทำให้หลอดเลือดขยายตัวด้วย แต่การศึกษาที่ทำในตัวจะมีผลจากปัจจัยอื่นๆ มาเกี่ยวข้องด้วยจึงยังไม่อาจสรุปได้ชัดเจนว่าสารสกัดจากใบเตยหอมซึ่งทำให้ความดันหลอดเลือดลดลงนั้นเป็นผลของสารสกัดใบเตยหอมที่ทำให้หลอดเลือดขยายตัวหรือไม่

ในปี ค.ศ. 1997 วีรนุชและประดับ[60] จึงได้ทำการศึกษาผลของสารสกัดใบเตยหอมต่อการหดตัวของหลอดเลือดแดงหางหนู โดยทำการสกัดใบเตยหอมตามวิธีของ ประดับและรัชวรรณ เมื่อต้องการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากใบเตยหอม จึงนำสารสกัดที่เตรียมไว้มาชั่งน้ำหนักและละลายในน้ำกลั่น ใช้ความเข้มข้น 100 mg/mL เป็นสารละลายตั้งต้น แล้วนำมาเจือจางตามต้องการด้วย physiological saline solution (PSS) เมื่อให้สารสกัดใบเตยหอมความเข้มข้น 1-10 mg/mL ผ่านในหลอดเลือดความเข้มข้นละ 10 นาที พบว่าไม่มีผลโดยตรงต่อการหดตัวของหลอดเลือด โดยไม่มีผลเปลี่ยนแปลงความดัน (perfusion pressure) แม้ว่าจะให้สารสกัดความเข้มข้นสูง (10 mg/mL) เป็นเวลา 30 นาทีแล้วก็ตาม แต่สารสกัดใบเตยหอมมีผลเพิ่มฤทธิ์ของ norepinephrine[61] (เป็น medical mediator ออกฤทธิ์โดยตรงต่อ receptors มีผลต่อหัวใจหลอดเลือด) ที่ทำให้หลอดเลือดหดตัว เมื่อใช้ norepinephrine ความเข้มข้น 10-200 nM ความเข้มข้นละ 20 วินาที โดยเริ่มมีผลที่สารสกัดความเข้มข้น 0.05 mg/mL และมีผลเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น และผลนี้ไม่ได้เกิดจาก Ca^{2+} ที่มีอยู่

ในสารสกัด นอกจากนั้นกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดที่มีผลเพิ่มฤทธิ์ของ norepinephrine ต่อหลอดเลือดแดงหางหนูของสารสกัดใบเตยหอมนั้นอาจไม่ขึ้นกับ Ca^{2+} นอกเซลล์

ในปี ค.ศ. 1999 Rahman และคณะ[62] นำสารสกัดจากใบเตยแช่แข็งมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคก๊าซโครมาโทกราฟี/แมสสเปคโทเมตรี (GC/MS) พบว่าในสารสกัดใบเตยมีองค์ประกอบที่เป็นสารธรรมชาติ เช่น α-tocopherol (vitamin E) และ squalene และยังพบองค์ประกอบหลักตัวอื่นๆ อีก เช่น hexadecanoic acid, 9,12,15-octadectrien-1-ol, campesterol, stigmasterol และ β-sitosterol

ในปี ค.ศ. 2000 วีระนุชและรัชวรรณ[63] ได้ทำการศึกษาฤทธิ์กระตุ้นหัวใจของสารสกัดใบเตยหอม โดยได้ทดสอบผลของสารสกัดใบเตยหอมต่อการหดตัวของหัวใจห้องบนที่ตัดแยกออกจากตัวพบว่า สารสกัดใบเตยหอมเข้มข้น 0.05-1 mg/mL ทำให้กล้ามเนื้อหัวใจห้องบนหดตัวแรงและเร็วขึ้นอย่างชัดเจนการเพิ่มความแรงและอัตราการหดตัวของหัวใจห้องบนเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสารสกัดจากใบเตยหอม นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดใบเตยหอมเข้มข้น 0.02 mg/mL ทำให้ norepinephrine เพิ่มความแรงในการหดตัวของหัวใจห้องบนได้มากขึ้น แต่ไม่มีผลเพิ่มฤทธิ์ของ isoproterenol[61] (เป็น sympathomimetic amines ที่ออกฤทธิ์ต่อ β-receptors แรงมากที่สุดโดยมี N-alkyl substitution) ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดใบเตยหอมมีฤทธิ์กระตุ้นหัวใจโดยเพิ่มทั้งความแรงและอัตราการหดตัวของหัวใจห้องบน การกระตุ้นหัวใจของสารสกัดนั้นคาดว่าออกฤทธิ์ผ่าน β-adrenoceptor

และจากการทดลองของ Tanchotikul และ Hsieh แม้ว่าจะพัฒนาจนสามารถใช้สารตัวอย่างได้น้อยลงเพียง 1 กรัมแล้วก็ตาม แต่พบว่ายังมีข้อจำกัดหลายประการ เช่น เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์มีราคาแพง ต้องอาศัยบุคลากรที่มีความชำนาญสูง ใช้เวลาในการสกัดค่อนข้างนานและมีขั้นตอนที่ยุ่งยาก ผู้วิจัยเองจึงได้พยายามปรับปรุงและพัฒนาเทคนิคการสกัดสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ให้ง่ายและสะดวกขึ้น ใช้สารตัวอย่างน้อยลงและวิเคราะห์ผลที่ได้ด้วยเทคนิคที่ไม่ซับซ้อนซึ่งแต่เดิมจะต้องอาศัยผู้ที่มีความชำนาญเฉพาะทางเท่านั้น

ดังนั้นจุดประสงค์ของงานวิจัยชิ้นนี้จึงมุ่งพัฒนาและปรับปรุงเทคนิคการสกัดสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ให้ง่ายและสะดวกขึ้น ซึ่งแต่เดิมมักใช้วิธีการสกัดด้วยไอน้ำเป็นส่วนใหญ่ พบว่าเป็นวิธีที่ยุ่งยาก ใช้เวลานานและสิ้นเปลืองสารตัวอย่าง นอกจากนี้ยังมีความแปรผันของ

สภาวะของการสกัดสูง ส่งผลให้เกิดความคลาดเคลื่อนอย่างมากในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ จึงได้ทำการศึกษาเทคนิคการสกัดสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ซึ่งเป็นสารหลักที่ให้กลิ่นหอมกับตัวอย่างพืช 2 ชนิดคือ ใบเตย (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.) และดอกชมนาด (*Vallaris glabra* Ktze.) โดยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสม (solvent extraction) ศึกษากับตัวแปร 3 ชนิดคือ ชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการสกัดและปริมาณของตัวอย่างพืช กับตัวอย่างใบเตย นำผลของตัวแปรทั้ง 3 มาทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline จากสารสกัดใบเตยและดอกชมนาด ด้วยเทคนิคก๊าซโครมาโทกราฟีโดยใช้ 2,4,6-trimethylpyridine เป็นสารมาตรฐานภายใน (internal standard) จากนั้นทำการศึกษาเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 M และสกัดต่อด้วยตัวทำละลายอินทรีย์กับตัวอย่างใบเตย นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาเชิงคุณภาพกับสารสกัดดอกชมนาดด้วยตัวทำละลาย chloroform วิเคราะห์สารสกัดด้วยเทคนิคก๊าซโครมาโทกราฟี/แมสสเปคโทรเมตรี (GC/MS)

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University