

## บทที่ 2

### การทดลอง

#### 2.1 เครื่องมือ วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

##### 2.1.1 เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์

- (1) เครื่องก๊าซโครมาโทกราฟี (gas chromatograph : GC) รุ่น 5890 series II plus ผลิตโดยบริษัท Hewlett Packard ประเทศสหรัฐอเมริกา
- (2) เครื่องก๊าซโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโตรมิเตอร์ (gas chromatograph/mass spectrometer : GC/MS)
  - เครื่องก๊าซโครมาโทกราฟี รุ่น 3400 ผลิตโดยบริษัท Varian ประเทศสหรัฐอเมริกา
  - เครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ รุ่น ITS 40 ผลิตโดยบริษัท Finnigan MAT ประเทศสหรัฐอเมริกา
- (3) Capillary column DB-1 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 mm ยาว 30 m ขนาดของ film thickness 0.25  $\mu$ m ผลิตโดย J&W Scientific Co., Ltd. ประเทศสหรัฐอเมริกา
- (4) Rotavapor รุ่น R-124 ผลิตโดยบริษัท Buchi ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
- (5) Vacuum pump รุ่น B-169 ผลิตโดยบริษัท Buchi ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
- (6) Water bath รุ่น B-485 ผลิตโดยบริษัท Buchi ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
- (7) Magnetic stirrer and magnetic bar
- (8) กรวยกรอง (glass funnel)
- (9) กรวยบุชเนอร์ (buchner funnel)
- (10) กรวยแยก (separatory funnel)

- (11) Syringe ขนาด 10.0  $\mu\text{L}$  ผลิต โดยบริษัท Hamilton ประเทศสหรัฐอเมริกา
- (12) กระดาษกรอง whatman เบอร์ 1, 5 และ phase separator
- (13) เครื่องปั่นละเอียด
- (14) Autopipette ขนาด 20-100  $\mu\text{L}$  ผลิตโดยบริษัท BRAND ประเทศเยอรมัน
- (15) เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง (analytical balance) รุ่น VI-1mg ผลิตโดยบริษัท Acculab ประเทศสหรัฐอเมริกา

### 2.1.2 สารเคมี

- (1) Dichloromethane AR grade 99.8% ผลิต โดยบริษัท J.T.Baker ประเทศสหรัฐอเมริกา
- (2) Diethyl ether AR grade 99.8% ผลิต โดยบริษัท J.T.Baker ประเทศสหรัฐอเมริกา
- (3) 2,4,6-Trimethylpyridine AR grade 99% ผลิต โดยบริษัท E.MERCK ประเทศเยอรมัน
- (4) Ethyl acetate AR grade 99.8% ผลิต โดยบริษัท E.MERCK ประเทศเยอรมัน
- (5) Toluene AR grade 99.5% ผลิต โดยบริษัท BDH ประเทศอังกฤษ
- (6) Hydrochloric acid AR grade เข้มข้น 35.4% ผลิต โดยบริษัท BDH ประเทศอังกฤษ
- (7) Calcium chloride Lab grade 90% ผลิต โดยบริษัท BDH ประเทศอังกฤษ
- (8) n-Hexane AR grade 99% ผลิต โดยบริษัท BDH ประเทศอังกฤษ
- (9) Methanol HPLC grade 99.8% ผลิต โดยบริษัท BDH ประเทศอังกฤษ
- (10) Chloroform AR grade 99-99.5% ผลิต โดยบริษัท Carlo Erba ประเทศอิตาลี
- (11) Sodium hydroxide Com. grade ผลิต โดยบริษัท Carlo Erba ประเทศอิตาลี
- (12) สารมาตรฐานสังเคราะห์ 2-Acetyl-1-pyrroline
- (13) 2-Acetylpyrrole purum 98% ผลิต โดยบริษัท Fluka ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
- (14) 5% Rhodium on activated Alumina puriss 5%Rh ผลิตโดยบริษัท Fluka ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
- (15) Silver carbonate purum 99% ผลิต โดยบริษัท Fluka ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
- (16) Benzene AR grade 99.8% ผลิต โดยบริษัท Lab-Scan ประเทศไทย

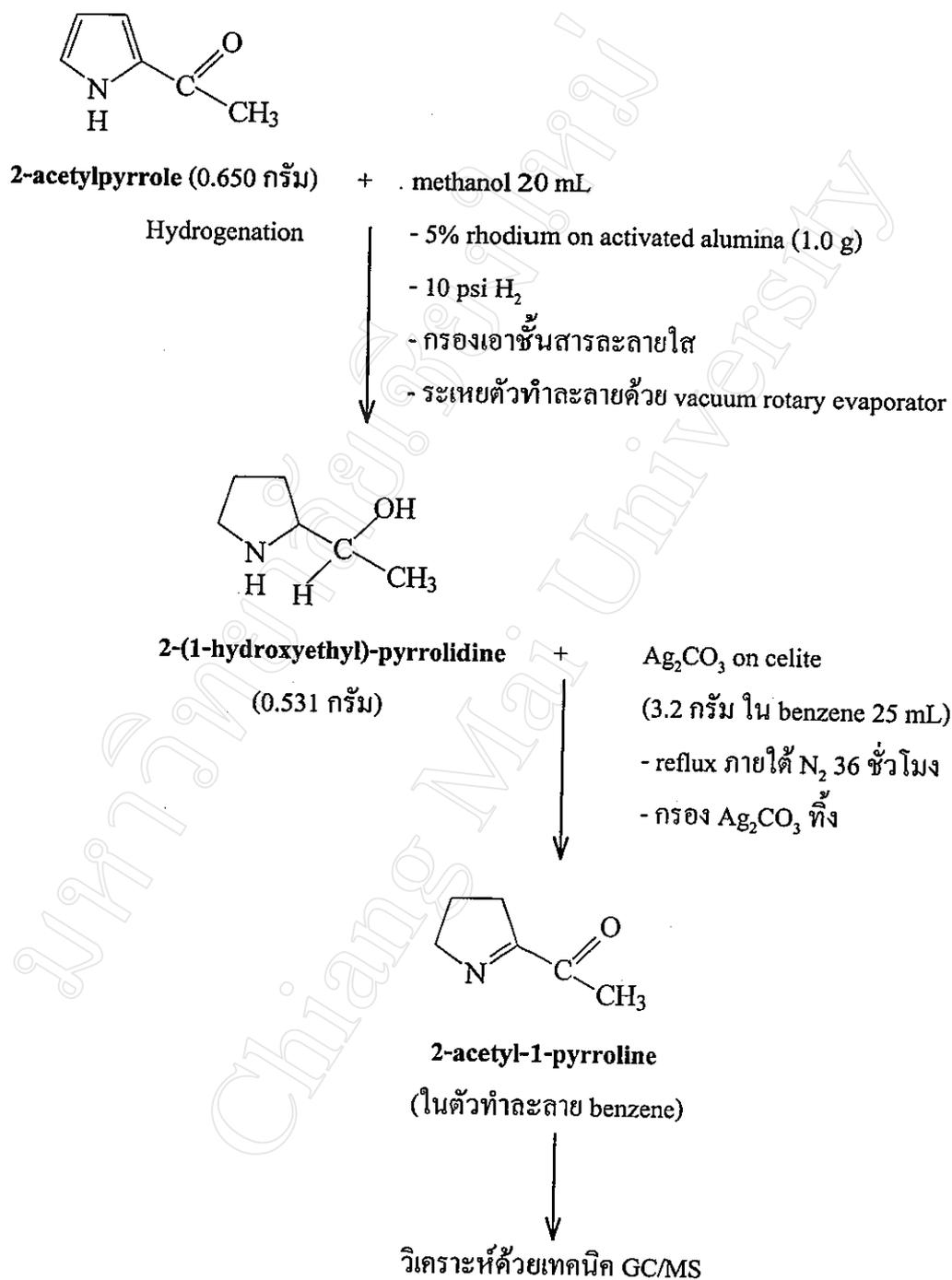
## 2.2 วัตถุดิบที่ใช้

ไบโอดีเซล ซึ่งได้จากตลาดต้นพยอม (หลังมหาวิทยาลัยเชียงใหม่) อ.สุเทพ อ.เมือง จ.เชียงใหม่

ดอกขมนาค ได้รับความอนุเคราะห์จากคุณชินวร กระแสชัย อ.แก้วนวรรฐ จ.เชียงใหม่ และภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ช่วงเวลาที่เก็บคือระหว่าง 17.00-18.00 น.

## 2.3 การสังเคราะห์สารหอม 2-acetyl-1-pyrroline

การสังเคราะห์สารหอม 2-acetyl-1-pyrroline เพื่อนำมาใช้เป็นสารมาตรฐานในการบอกชนิดและปริมาณของสารดังกล่าว โดยวิธีการสังเคราะห์ดัดแปลงมาจากวิธีของ Büchi and Wuest<sup>(62)</sup> และของ Buttery และคณะ<sup>(42)</sup> มี 2 ขั้นตอนคือ ใช้ 2-acetylpyrrole เป็นสารตั้งต้นทำปฏิกิริยา hydrogenation โดยมี 5% rhodium on activated alumina เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาซึ่งจะให้ผลผลิตเป็น 2-(1-hydroxyethyl)-pyrrolidine นำผลผลิตที่ได้ไปทำปฏิกิริยา oxidation กับ silver carbonate ( $\text{Ag}_2\text{CO}_3$ ) ในสารละลาย benzene จะได้สารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ที่ละลายใน benzene นำสารที่สังเคราะห์ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคก๊าซโครมาโทกราฟี/แมสสเปคโตรเมตรี (GC/MS) เทียบเวลาริเทนชันและแมสสเปคตรัมที่ได้กับสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ที่มีในสารสกัดจากไบโอดีเซล และเทียบแมสสเปคตรัมจากสารอ้างอิง ขั้นตอนการสังเคราะห์แสดงดังรูปที่ 2.1 หน้า 46 โครมาโทแกรมและแมสสเปคตรัมแสดงดังรูปที่ 3.1 และ 3.3 หน้า 56 และ 58 ส่วนการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความบริสุทธิ์ของสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ที่สังเคราะห์ได้แสดงในข้อ 3.2 หน้า 60



รูปที่ 2.1 แผนผังแสดงการสังเคราะห์สารหอม 2-acetyl-1-pyrroline

## 2.4 การเตรียมสารมาตรฐานภายใน 2,4,6-trimethylpyridine (TMP) เข้มข้น 0.5 ppm ในตัวทำละลายต่างๆ

เมื่อความหนาแน่นของ TMP คือ 0.914 g/mL และเปอร์เซ็นต์ความบริสุทธิ์คือ 99%

$$\begin{aligned} \therefore \text{TMP จะมีความเข้มข้น} &= (0.914 \times 99) / 100 \\ &= 0.9049 \text{ g/mL} \\ &= 0.9049 \times 10^6 \text{ ppm} \end{aligned}$$

- เตรียม stock TMP 1000 ppm 100 mL จากสารละลาย TMP เข้มข้น  $0.9049 \times 10^6$  ppm

$$\begin{aligned} C_1 V_1 &= C_2 V_2 \\ 1000 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL} &= 0.9049 \times 10^6 \text{ ppm} \times V_2 \\ V_2 &= (1000 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL}) / 0.9049 \times 10^6 \text{ ppm} \\ V_2 &= 111 \text{ } \mu\text{L} \end{aligned}$$

(เมื่อ C คือ ความเข้มข้นและ V คือ ปริมาตรของสารละลาย)

- เตรียม stock TMP 0.5 ppm 500 mL จากสารละลาย TMP เข้มข้น 1000 ppm

$$\begin{aligned} C_1 V_1 &= C_2 V_2 \\ 0.5 \text{ ppm} \times 500 \text{ mL} &= 1000 \text{ ppm} \times V_2 \\ V_2 &= (0.5 \text{ ppm} \times 500 \text{ mL}) / 1000 \text{ ppm} \\ V_2 &= 0.25 \text{ mL} \end{aligned}$$

นั่นคือเปิด TMP 1000 ppm มา 0.25 mL แล้วเจือจางด้วยตัวทำละลายให้มีปริมาตร 500 mL จะได้ 2,4,6-trimethylpyridine เข้มข้น 0.5 ppm

## 2.5 การสกัดสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline จากใบเตยสดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์และการศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการสกัด

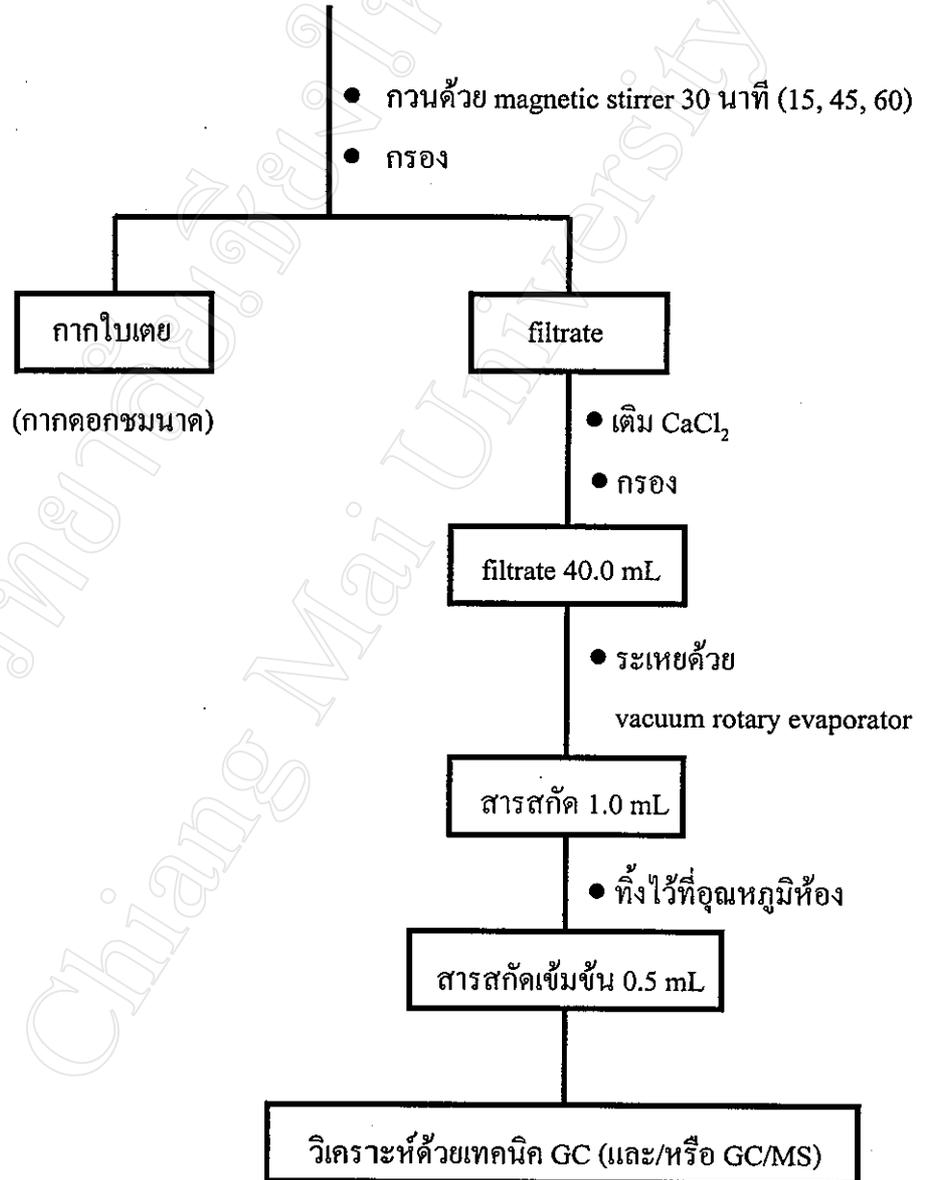
### 2.5.1 การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของตัวทำละลายอินทรีย์

นำตัวอย่างใบเตยสดประมาณ 10 กรัมล้างน้ำให้สะอาด ผึ่งให้แห้ง หั่นฝอยและปั่นให้ละเอียดแล้วใส่ในขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask) ขนาด 100 mL ที่บรรจุตัวทำละลาย chloroform 70.0 mL ที่มี 2,4,6-trimethylpyridine 0.5 ppm เป็นสารมาตรฐานภายใน (internal standard) คนอย่างสม่ำเสมอด้วย magnetic stirrer เป็นเวลา 30 นาที กรองกากใบเตยทิ้งแล้วเติม calcium chloride ลงในสารละลายที่กรองได้เพื่อขจัดน้ำ จากนั้นกรองอีกครั้งแล้วนำสารละลายใสมา 40.0 mL ระเหยตัวทำละลาย chloroform ออกด้วย vacuum rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40°C จนสารสกัดมีปริมาตรเหลือ 1.0 mL ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องต่อไปอีกจนสารสกัดมีปริมาตรเหลือเพียง 0.5 mL แล้วจึงนำสารสกัดเข้มข้น (concentrated extract) ที่ได้มาทำการวิเคราะห์ต่อด้วยเทคนิคก๊าซโครมาโทกราฟี (GC) ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งและทำการทดลองซ้ำกับตัวทำละลายอินทรีย์ dichloromethane, toluene, n-hexane, diethyl ether, ethyl acetate และ methanol ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3.1 หน้า 64 โครมาโทแกรมแสดงดังรูปที่ 3.5-3.6 หน้า 62-63 และขั้นตอนการสกัดแสดงดังรูปที่ 2.2 หน้า 49

### 2.5.2 การศึกษาช่วงเวลาที่ใช้ในการสกัดสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline จากใบเตยสดด้วยตัวทำละลาย chloroform

ทำการสกัดสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline จากใบเตยสดประมาณ 10 กรัมโดยใช้ตัวทำละลาย chloroform เช่นเดียวกับข้อ 2.5.1 แต่เปลี่ยนช่วงเวลาเป็น 15, 30, 45 และ 60 นาที แต่ละช่วงเวลาทำการสกัดซ้ำ 3 ครั้ง นำสารสกัดเข้มข้นที่ได้มาทำการวิเคราะห์ต่อด้วยเทคนิคก๊าซโครมาโทกราฟี ได้ผลของอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคระหว่างสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ต่อสารมาตรฐานภายใน 2,4,6-trimethylpyridine แสดงในตารางที่ 3.2 หน้า 70 โครมาโทแกรมแสดงดังรูปที่ 3.7-3.10 หน้า 66-69 และผลการคำนวณความเข้มข้นแสดงในตารางที่ 3.8 หน้า 90

ใบเตยสดปั่นละเอียดหรือคอกขนาดสดประมาณ 10 กรัม ในตัวทำละลายอินทรีย์ 70.0 mL



รูปที่ 2.2 แผนผังแสดงการสกัดตัวอย่างพืชด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

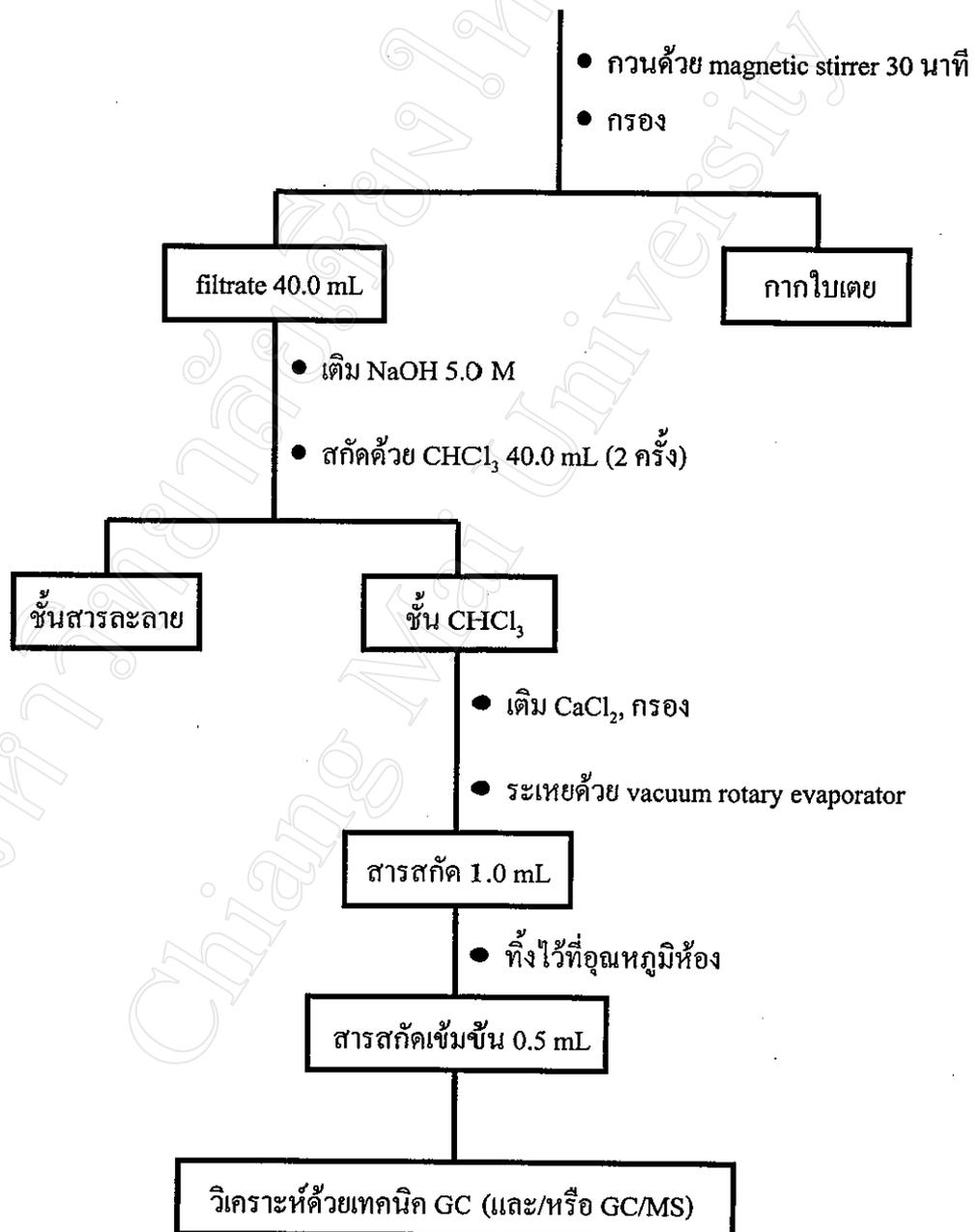
### 2.5.3 การศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของไบโเคยสดในการสกัดสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ด้วยตัวทำละลาย chloroform

ทำการสกัดสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline จากไบโเคยสดโดยใช้ตัวทำละลาย chloroform เป็นเวลา 30 นาที เช่นเดียวกับข้อ 2.5.1 แต่เปลี่ยนปริมาณไบโเคยสดเป็น 3, 5, 7, 10 และ 13 กรัม แต่ละปริมาณของไบโเคยสดทำซ้ำ 3 ครั้ง นำสารสกัดเข้มข้นที่ได้มาทำการวิเคราะห์ต่อด้วยเทคนิคก๊าซโครมาโทกราฟี ได้ผลของอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคระหว่างสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ต่อสารมาตรฐานภายใน 2,4,6-trimethylpyridine แสดงในตารางที่ 3.3 หน้า 79 โครมาโทแกรมแสดงดังรูปที่ 3.12-3.16 หน้า 73-77

### 2.6 การสกัดสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline จากไบโเคยสดโดยวิธีการสกัดด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 M

นำตัวอย่างไบโเคยสดล้างน้ำให้สะอาด ผึ่งให้แห้งแล้วนำมาหั่นฝอยและบดให้ละเอียดประมาณ 10 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 100 mL ที่บรรจุสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 M 70.0 mL ที่มี 2,4,6-trimethylpyridine 0.5 ppm เป็นสารมาตรฐานภายใน คนอย่างสม่ำเสมอด้วย magnetic stirrer เป็นเวลา 30 นาที กรองกากไบโเคยทิ้ง นำสารละลายใสมา 40.0 mL ทำให้เป็นเบสเล็กน้อยด้วย sodium hydroxide 5.0 M และสกัดต่อทันทีด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ chloroform ปริมาตร 40.0 mL 2 ครั้งในกรวยแยก แยกเก็บชั้นของ chloroform ที่ได้จากการสกัดทั้ง 2 ครั้งมารวมกันแล้วเติม calcium chloride ลงในชั้น chloroform ที่สกัดได้เพื่อขจัดน้ำ จากนั้นกรองอีกครั้งแล้วระเหยตัวทำละลาย chloroform ออกด้วย vacuum rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40°C จนสารสกัดมีปริมาตรเหลือ 1.0 mL ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องต่อไปอีกจนสารสกัดมีปริมาตรเหลือเพียง 0.5 mL แล้วจึงนำสารสกัดเข้มข้นที่ได้มาทำการวิเคราะห์ต่อด้วยเทคนิคก๊าซโครมาโทกราฟี ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3.4 หน้า 83 โครมาโทแกรมแสดงดังรูปที่ 3.18 หน้า 82 และขั้นตอนการสกัดด้วยสารละลายกรดแสดงดังรูปที่ 2.3 หน้า 51

ไบโอดีเอสบีขนาดประมาณ 10 กรัมในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 M 70.0 mL



รูปที่ 2.3 แผนผังแสดงการสกัดไบโอดีเอสบีด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 M

## 2.7 การสกัดสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline จากดอกขมนาดสดด้วยตัวทำละลาย chloroform

ทำการสกัดสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline จากดอกขมนาดสดประมาณ 10 กรัม ใช้ตัวทำละลาย chloroform ที่เวลา 30 นาที โดยวิธีการสกัดเช่นเดียวกับข้อ 2.5.1 ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง นำสารสกัดเข้มข้นที่ได้มาทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคก๊าซโครมาโทกราฟี ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3.5 หน้า 85 และโครมาโทแกรมแสดงดังรูปที่ 3.19 หน้า 84

## 2.8 การวิเคราะห์หาปริมาณสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline จากใบเตยและดอกขมนาด โดยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย chloroform

ปีเปตสารมาตรฐานสังเคราะห์ 2-acetyl-1-pyrroline ใน benzene มา 1.0  $\mu\text{L}$  ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 100 mL ที่บรรจุตัวทำละลายอินทรีย์ chloroform 70.0 mL ที่มี 2,4,6-trimethylpyridine 0.5 ppm เป็นสารมาตรฐานภายใน คนให้เข้ากันจากนั้นแบ่งสารละลายที่ได้มา 40.0 mL ระเหยตัวทำละลาย chloroform ออกด้วย vacuum rotary evaporator ที่  $40^{\circ}\text{C}$  จนสารละลายผสมมาตรฐานมีปริมาตรเหลือ 1.0 mL ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องต่อไปอีกจนสารละลายมาตรฐานผสมมีปริมาตรเหลือเพียง 0.5 mL ทำการทดลองซ้ำแต่เปลี่ยนปริมาตรสารมาตรฐานสังเคราะห์ 2-acetyl-1-pyrroline จาก 1.0  $\mu\text{L}$  เป็น 25.0, 50.0 และ 100.0  $\mu\text{L}$  จะได้สารละลายผสมมาตรฐานเพื่อนำมาสร้างกราฟมาตรฐานด้วยเทคนิคก๊าซโครมาโทกราฟี ใช้ capillary column DB-1 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.25 mm ความยาว 30 m ใช้ nitrogen gas ( $\text{N}_2$ ) เป็นก๊าซพา (carrier gas) อัตราการไหลของ  $\text{N}_2$  2.0 mL ต่อนาที อุณหภูมิของ injector  $230^{\circ}\text{C}$  ทำงานในระบบ split mode โดยมี split ratio 10:1 ส่วนอุณหภูมิคอลัมน์ตั้งไว้แบบโปรแกรมอุณหภูมิ (temperature program) โดยมีอุณหภูมิเริ่มต้น  $50^{\circ}\text{C}$  อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ  $10^{\circ}\text{C}$  ต่อนาที อุณหภูมิสุดท้าย  $230^{\circ}\text{C}$  ใช้ FID เป็นเครื่องตรวจวัด (detector) ตั้งอุณหภูมิไว้ที่  $250^{\circ}\text{C}$  สรุปการเตรียมสารละลายผสมมาตรฐานได้ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 การเตรียมสารละลายผสมมาตรฐาน

สารละลายผสม มาตรฐานที่	ปริมาตร	
	2AP ( $\mu\text{L}$ )	TMP (mL)
1	1.0	40.0
2	25.0	40.0
3	50.0	40.0
4	100.0	40.0

จากโครมาโทแกรมที่ได้หาพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐาน 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) กับสารมาตรฐานภายใน 2,4,6-trimethylpyridine (TMP) ดังสมการ

$$\text{อัตราส่วนพื้นที่ใต้พีค} = \frac{\text{พื้นที่ใต้พีค 2AP}}{\text{พื้นที่ใต้พีค TMP}}$$

นำผลที่ได้มาเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างอัตราส่วนของพื้นที่ใต้พีคกับอัตราส่วนโดยน้ำหนักของสารมาตรฐาน 2-acetyl-1-pyrroline กับสารมาตรฐานภายใน 2,4,6-trimethylpyridine ได้ข้อมูลแสดงดังตารางที่ 3.7 หน้า 87 และกราฟมาตรฐานแสดงในรูปที่ 3.20 หน้า 88

จากตารางที่ 3.2 และ 3.5 หน้า 70 และ 85 นำผลของอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ต่อสารมาตรฐานภายใน 2,4,6-trimethylpyridine มาคำนวณหาปริมาณสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline จากกราฟมาตรฐาน ได้ผลแสดงดังตารางที่ 3.8-3.9 หน้า 90-91 ตามลำดับ

## 2.9 การวิเคราะห์เชิงคุณภาพของสารสกัดจากดอกขมนาด

การวิเคราะห์สารสกัดจากดอกขมนาดด้วยเทคนิคก๊าซโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโตรเมตรี (GC/MS) นั้น ส่วนของเครื่องก๊าซโครมาโทกราฟีใช้ capillary column DB-1 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.25 mm ยาว 30 m film thickness 0.25  $\mu\text{m}$  ใช้ nitrogen gas ( $\text{N}_2$ ) เป็นก๊าซพา อัตราการไหลของ  $\text{N}_2$  2.0 mL ต่อนาที อุณหภูมิของ injector 230  $^{\circ}\text{C}$  ทำงานในระบบ split mode โดยมี split ratio 10:1 ส่วนอุณหภูมิก่อตั้งไว้แบบโปรแกรมอุณหภูมิ (temperature program) โดยมีอุณหภูมิเริ่มต้น 50  $^{\circ}\text{C}$  อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 10  $^{\circ}\text{C}$  ต่อนาที อุณหภูมิสุดท้าย 230  $^{\circ}\text{C}$  และคงอุณหภูมิไว้ที่ 230  $^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 12 นาที

ส่วนของแมสสเปกโตรมิเตอร์ซึ่งต่อเข้ากับเครื่องก๊าซโครมาโทกราฟีผ่าน transfer line ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 250  $^{\circ}\text{C}$  ion source ของเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ทำงานที่อุณหภูมิ 220  $^{\circ}\text{C}$  พลังงานเฉลี่ยของอิเล็กตรอน 70 eV ส่วนวิเคราะห์มวลสารเป็นแบบ ion trap ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3.11 หน้า 94-105 และโครมาโทแกรมแสดงดังรูปที่ 3.21 หน้า 93