บทที่ 1

บทนำ

สารหวานเทียม (artificial sweeteners) เป็นสารอินทรีย์สังเคราะห์ที่มีคุณสมบัติให้ความหวานใช้แทนน้ำตาลได้ ในปัจจุบันนี้ได้มีผู้นำสารหวานเทียมมาใช้แทนน้ำตาลในอุตสาหกรรมอาหารกันมาก เนื่องจากสาเหตุบางประการดังต่อไปนี้

(1) เพื่อลดปริมาณการบริโภคน้ำตาลซึ่งเป็นสารพวกคาร์โบไฮเดรท สำหรับผู้ที่ต้องการลด หรือจำกัดปริมาณแคลอรีจากอาหาร ซึ่งได้แก่ผู้ที่ต้องการควบคุมน้ำหนัก หรือผู้ป่วยเป็นโรคเบาหวานที่ต้องการจำกัดปริมาณน้ำตาลในร่างกาย เพราะสารหวานเทียมมักจะไม่ให้ปริมาณแคลอรีแก่ร่างกายเหมือนน้ำตาล

(2) เนื่องจากน้ำตาลทรายในท้องตลาดมีราคาสูงขึ้นเรื่อย ๆ และบางเวลาปริมาณน้ำตาลทรายไม่พอกับความต้องการของผู้บริโภค เพื่อลดต้นทุนจึงนำสารหวานเทียมมาใช้แทนน้ำตาล เพราะมีราคาต่ำกว่าน้ำตาลมาก เมื่อเทียบกับปริมาณที่ใช้เพื่อให้ได้รสหวานเท่า ๆ กัน ถ้าหากให้ราคาทุน เมื่อใช้น้ำตาลทรายเท่ากับ 1 ราคาของไซคลาเมทจะเท่ากับ 0.32 ในขณะที่แซคคารินจะมีราคาเพียง 0.038 เท่านั้น(1)

(3) เนื่องจากอาหารบางชนิดจำเป็นต้องมีรสหวาน และไม่ต้องการส่วนประกอบที่เป็นคาร์โบไฮเดรท เพราะจะทำให้อาหารนั้นเสื่อมคุณภาพง่ายเช่น น้ำปลา ซีอิ๊ว เป็นต้น

1.1 ชนิดของสารหวานเทียม

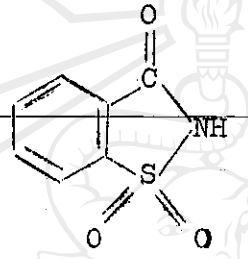
ด้วยเหตุผลต่าง ๆ ดังได้กล่าวมาแล้วได้กระตุ้นให้นักวิจัยทำการค้นคว้าเพื่อหาสิ่งที่ให้ความหวานมาทดแทนน้ำตาล ซึ่งสารสังเคราะห์ที่ได้มีผู้เตรียมขึ้นและใช้แทนน้ำตาลมีอยู่หลายชนิด แต่ที่นิยมใช้กันมากได้แก่ แซคคาริน (saccharin) ไซคลาเมท (cyclamate) และดัลซิน (dulcin)

สารหวานเทียมทั้ง 3 ชนิดนี้ถึงแม้ว่าจะให้ประโยชน์ในด้านเป็นองค์ประกอบส่วนปรุงแต่งของอาหารก็ตาม แต่ก็ให้โทษที่นับว่าร้ายแรงแต่ไม่เฉียบพลัน จากการค้นคว้าของ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นักวิทยาศาสตร์ พบว่าสารหวานเทียมเหล่านี้ไม่ให้ประโยชน์ต่อร่างกาย หรือไม่มีคุณค่าทางอาหารเลย ซ้ำยังให้โทษมากน้อยแล้วแต่ชนิดของสารและปริมาณที่ใช้ สำหรับสมบัติโดยทั่วไปและโทษของสารหวานเทียมทั้ง 3 ชนิดมีดังต่อไปนี้

1.1.1 <u>แซคคาริน</u>[2] เป็นสารอินทรีย์ที่สังเคราะห์ได้เมื่อปี ค.ศ.1879 โดย Remsen และ Fahlberg มีชื่อทางเคมีว่า O-benzoyl sulfimide มีสูตรโครงสร้างดังนี้



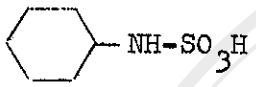
มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_6H_4CONHSO_2$ น้ำหนักโมเลกุล 183 แซคคารินมีลักษณะเป็นผงสีขาว ไม่มีกลิ่น มีรสหวานจัดมาก ประมาณ 500 เท่า ของน้ำตาลทราย (sucrose) จุดหลอมเหลวอยู่ในช่วง 226–230 องศาเซลเซียส ละลายได้ดีในเอมิลอะซีเตท (amyl acetate), เอทธิลอะซีเตท (ethyl acetate), เบนซีน (benzene), อะซีโตน (acetone) และเอทธิลอัลกอฮอล์ (ethyl alcohol) ละลายน้ำได้เล็กน้อยจึงเรียกว่า insoluble saccharin แต่เกลือโซเดียมของแซคคาริน ละลายน้ำได้ดีมากจึงเรียกว่า soluble saccharin ซึ่งมีลักษณะเป็นผลึกมีน้ำผลึก 2 โมเลกุล มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_6H_4SO_2CONNa.2H_2O$

พบว่าถ้ารับประทานแซคคาริน 5–25 กรัม จะทำให้เกิดการเบื่ออาหาร คลื่นไส้อาเจียร มีรายงานว่า[3] แซคคารินเป็นสารที่ทำให้เกิดมะเร็งในกระเพาะปัสสาวะของหนู หรืออาจเป็นสารที่เสริมการก่อมะเร็ง (promoting agent) ร่วมกับสารก่อมะเร็งตัวอื่น

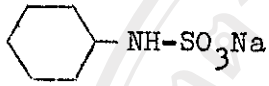
1.1.2 <u>ไซคลาเมท</u> เป็นสารอินทรีย์ที่ถูกพบเมื่อปี ค.ศ.1937 โดย Michael Svedo แห่งมหาวิทยาลัยอิลลินอยส์ ในสหรัฐอเมริกา ไซคลาเมทนี้เป็นเกลือโซเดียม หรือ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

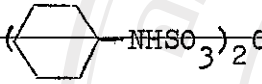
แคลเซียมของกรดไซคลามิค หรือกรดไซโคลเฮกซิลซัลฟามิค ซึ่งมีรสหวาน สูตรโครงสร้างของไซคลาเมทเป็นดังนี้



Cyclohexylsulfamic acid



Sodium cyclohexylsulfamate



Calcium cyclohexylsulfamate

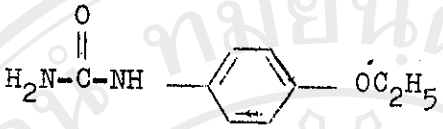
ไซคลาเมท มีลักษณะเป็นผงสีขาวมีความหวานมากกว่าน้ำตาลทรายประมาณ 30 เท่า ละลายได้ดีในน้ำ เกลือแคลเซียมของมันละลายได้ดีในเอทธิลอัลกอฮอล์ (ethyl alcohol) และโพรพิลีนไกลคอล (propylene glycol)

ได้มีผู้รายงานว่า[4] ไซคลาเมทเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดโรคมะเร็งในกระเพาะอาหารของหนูที่ใช้ทดลอง โดยทำให้ลูกหนูตายหรือคลอดช้ากว่ากำหนด และยังทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงผิดปกติในเนื้อเยื่อของไตในตับอ่อน เมื่อทดลองกับไก่พบว่าเป็นเหตุหนึ่งที่ทำให้เลือดออกภายในร่างกายได้ และเมื่อทดลองกับกระต่ายจำนวน 12 ตัว ซึ่งเลี้ยงด้วยไซคลาเมทเป็นเวลา 2 เดือน พบว่า 6 ตัวในจำนวน 12 ตัว มีการแข็งตัวของเลือดช้ากว่าปกติ

กลไกทางชีวเคมีของความเป็นพิษของไซคลาเมทเกิดโดยที่ไซคลาเมทประมาณร้อยละ 40–80 ของทั้งหมดถูกแบคทีเรียในลำไส้เปลี่ยนแปลงให้กลายเป็นไซโคลเฮกซามีน (cyclohexamine) ซึ่งเป็นสารมีพิษกว่าไซคลาเมทและเข้าใจว่าเป็นสารที่เป็นสาเหตุของความเป็นพิษของไซคลาเมท

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.1.3 ดัลซิน[5] มีชื่อทางเคมีว่า p-phenetyl carbamide หรือ p-phenetylurea มีสูตรโมเลกุลเป็น $NH_2CONHC_6H_4OC_2H_5$ และมีสูตรโครงสร้างดังนี้



ดัลซินมีชื่อทางการค้าหลายชื่อเช่น ซูครอล (sucrol), วาลซิน (valzin) ดัลซินมีลักษณะเป็นผลึกมันวาวมีจุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 173–174 องศาเซลเซียส ละลายได้เล็กน้อยในน้ำ ละลายได้ดีในเอทธิลอัลกอฮอล์ (ethyl alcohol) และอีเธอร์ (ether) ดัลซินมีความหวานมากกว่าน้ำตาลทรายถึง 200 เท่า

สำนักงานอาหารและยาของสหรัฐอเมริกามีประกาศว่าดัลซินเป็นสารมีพิษไม่ควรใช้ใส่อาหาร เนื่องจากทำให้เกิดมะเร็งที่ตับ และรบกวนการผลิตเม็ดเลือดแดงในสัตว์ทดลอง

จากอันตรายต่าง ๆ ของสารหวานเทียม ในประเทศไทยจึงได้มีประกาศของกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 4 พ.ศ.2507 เรื่อง กำหนดคุณภาพอาหารและมาตรฐานของเครื่องดื่มประเภทไม่มีอัลกอฮอล์ ได้กำหนดว่าห้ามใส่แซคคารินหรือวัตถุให้ความหวานอื่นซึ่งทำให้มีรสหวานแทนน้ำตาลลงในเครื่องดื่ม และในประกาศฉบับที่ 4 พ.ศ.2515 ก็ห้ามนำหรือสั่งดัลซิน กรดไซคลามิค และเกลือของกรดไซคลามิค รวมทั้งอาหารที่มีดัลซินหรือกรดไซคลามิค หรือเกลือของกรดไซคลามิคเข้ามาในราชอาณาจักร ดังนั้นสารหวานเทียมเหล่านี้จึงไม่ควรมีปนในอาหารเลย การตรวจสอบหาปริมาณสารหวานเทียมในอาหารจึงเป็นสิ่งที่จำเป็นต้องทำ เพื่อไม่ให้เป็นอันตรายแก่ผู้บริโภค

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2 แนวทางในการศึกษาการวิเคราะห์หาปริมาณสารหวานเทียม

เนื่องจากได้มีการใช้สารหวานเทียมใส่ในอาหารแทนน้ำตาลมาเป็นเวลานาน และสารหวานเทียมก็เป็นสารที่มีอันตรายต่อร่างกายดังได้กล่าวมาแล้ว ฉะนั้นจึงได้มีการพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารหวานเทียมโดยวิธีต่าง ๆ มากมายเพื่อควบคุมมิให้มีการลักลอบใช้สารหวานเทียมใส่ลงไปในอาหาร

Korbulak และคณะ[6, 7] ศึกษาการหาปริมาณแซคคาริน ไซคลาเมท และดัลซิน โดยวิธี thin-layer chromatography (TLC) โดยใช้ซิลิกาเจล (silica gel) เป็นสารดูดซับ และสารละลายผสมของบิวทิลอัลกอฮอล์–เอทธิลอัลกอฮอล์–แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์–น้ำ ในอัตราส่วน 40 : 4 : 1 : 9 เป็นสารละลายสำหรับแยก

Nanase และคณะ[8] ศึกษาการวิเคราะห์หาปริมาณแซคคารินโดยวิธี thin-layer chromatography และใช้ densitometer ในการหาปริมาณโดยมีซิลิกาเจลเป็นสารดูดซับ และสารละลายผสมของเฮกเซน–เอทธิลอะซีเตท–กรดฟอร์มิค ในอัตราส่วน 200:400:3 เป็นสารละลายสำหรับแยก

Coppini และ Albasini [9] ได้หาปริมาณแซคคาริน และไซคลาเมท โดยวิธี infared spectrophotometry

Nasicrowska [10] ได้ใช้ alternating-current oscillopolarography ในการหาปริมาณแซคคารินในยา

Sontag และ Kral[11] หาปริมาณแซคคารินในเครื่องดื่มที่ไม่มีอัลกอฮอล์ โดยวิธี pulse polarography

Markus[12] ศึกษาการหาปริมาณแซคคารินโดยวิธี gravimetry โดยเปลี่ยนแซคคารินให้อยู่ในรูปของซัลเฟต (SO_4^{2-}) แล้วทำให้เป็นแบเรียมซัลเฟต ($BaSO_4$) ก่อนจึงหาปริมาณของแบเรียมซัลเฟต

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Hazemoto และคณะ[13] ใช้ ion-selective electrode ในการหาปริมาณแซคคาริน โดยทำให้เกิด ion association complex ระหว่าง iron (II)-bathophenanthroline chelate และแซคคารินในไนโตรเบนซิน (nitrobenzene)

Fernandez และคณะ[14] ศึกษาการหาปริมาณแซคคารินโดยวิธี colorimetry โดยการทำให้เกิดสีกับ phenolsulphonaphthalein แล้ววัดการดูดกลืนแสงที่ 558 นาโนเมตร (nm)

Haroun และ Khattab [15] ใช้วิธี thermal analysis ในการหาปริมาณแซคคาริน ไซคลาเมท และซอร์บิทอล (sorbital)

Hussein และคณะ[16] หาปริมาณแซคคารินโดยวิธี ultraviolet spectroscopy โดยละลายแซคคารินในสารละลาย 1 % โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) แล้ววัดการดูดกลืนแสงที่ 235 และ 244 นาโนเมตร (nm)

Belcher และคณะ[17] ใช้วิธี molecular emission cavity analysis (MECA) ในการหาปริมาณแซคคาริน

Conacher และ O'Brein [18] ใช้วิธี gas-liquid chromatography (GLC) ในการหาปริมาณแซคคาริน ในรูปของ N-methyl saccharin โดยให้แซคคารินทำปฏิกิริยากับ diazomethane ใช้ระบบตรวจวัดเป็นแบบ flame ionization detector (FID)

Noda และคณะ[19] ก็ได้หาปริมาณแซคคารินโดยวิธีเดียวกับของ Conacher และ O'Brien แต่ใช้ระบบตรวจวัดเป็นแบบ flame photometric detector (FPD)

นอกจากนี้ยังมีการหาปริมาณแซคคารินโดยวิธี gas liquid chromatographyในรูปของ N-methyl saccharin แต่ใช้ตัว methylating agent ตัว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อื่น ๆ เช่น methyl iodide[20], dimethyl sulfate[21]

ในงานวิจัยนี้หลังจากที่ได้ใช้เทคนิค TLC ทดสอบหาชนิดของสารหวานเทียมในสารตัวอย่างแล้ว ก็ได้ใช้วิธีโครมาโตกราฟีก๊าซ-ของเหลวในการหาปริมาณของสารหวานเทียม เพราะวิธีโครมาโตกราฟีก๊าซ-ของเหลวนี้เป็นวิธีที่มีความว่องไว (sensitivity) และความจำเพาะเจาะจง (selectivity) สูง โดยวิเคราะห์แซคคารินในรูปของเอ็น-เมทธิลแซคคาริน โดยใช้ไดเมทธิลซัลเฟต (dimethyl sulfate) ซึ่งเป็นตัว methylating agent ที่ดี[22] ในการทำเมทธิลเลชัน (methylation) ส่วนคัลซินนั้นวิเคราะห์ได้โดยตรง[23] สำหรับไซคลาเมทต้องเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของไซโคลเฮกซีน (cyclohexene) ก่อน[24]

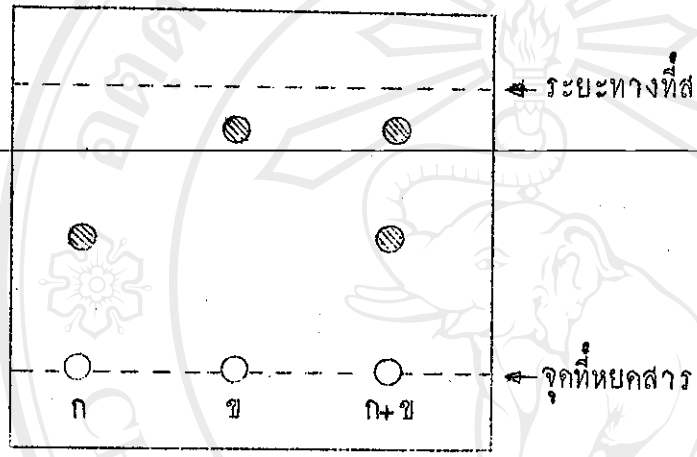
เนื่องจาก ในการศึกษาวิจัยนี้ได้ใช้เทคนิค TLC ควบคู่กับ GLC โดยตลอด จึงจะขอกล่าวถึงหลักการของเทคนิคทั้งสองพอสังเขปในบทนำนี้

1.3 หลักการของ Thin-Layer Chromatography (TLC)

Thin-layer chromatography[25] เป็นวิธีการแยกและพิสูจน์สารที่แยกออกมาโดยที่เราหยดสารละลายผสมที่ต้องการแยกลงบนแผ่นกระจกซึ่งเคลือบด้วยซิลิกาเจล (silica gel), อะลูมินา (alumina) หรือเซลลูโลส (cellulose) ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารดูดซับ (adsorbent) แล้วนำไปจุ่มในสารละลายที่จะเป็นตัวทำให้สารผสมแยกกัน การจุ่มนั้นจะต้องจุ่มโดยที่ไม่ให้สารละลายถึงจุดที่เราหยดสารผสมที่ต้องการแยกสารละลายจะขึ้นไปตามแผ่นกระจกที่เคลือบด้วยสารดูดซับผ่านจุดของสารผสม และพาเอาสารแต่ละตัวในสารผสมขึ้นไปด้วย อาศัยหลักการที่ว่าสารแต่ละตัวมีความสามารถละลายในสารละลายได้ไม่เท่ากันและสารแต่ละตัวมีแรงดูดซับต่อสารดูดซับไม่เท่ากันจึงทำให้สารแต่ละชนิดเคลื่อนที่ตามสารละลายด้วยอัตราเร็วที่แตกต่างกัน จึงทำให้สารแต่ละตัว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ถูกแยกออกจากกัน ถ้าสารแต่ละตัวมีสีอยู่แล้ว เราก็มองเห็นจุดที่แยก แต่ถ้าสารของเราไม่มีสีก็อาจหาตัวมาทำให้เกิดสี (chromogenic agent) พ่นลงไปหรืออาจส่องดูภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต ก็จะเห็นองค์ประกอบภายในสารผสมแยกออกจากกันดังแสดงในรูปที่ 1.1



รูปที่ 1.1 Thin-layer chromatographic plate

การวิเคราะห์ทางคุณภาพโดย TLC นี้จะดูจากค่า R_f

$$\text{เมื่อ } R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่สารละลายเคลื่อนที่}}$$

สำหรับสารหวานเทียมนี้นิยมใช้วิธี TLC ตรวจสอบชนิดของสารหวานเทียมในสารตัวอย่าง เนื่องจากเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว และค่าใช้จ่ายถูก สารดูดซับที่ใช้ในการแยกสารหวานเทียมมีอยู่หลายชนิดอาจจะเป็น ซิลิกาเจล อะลูมินา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

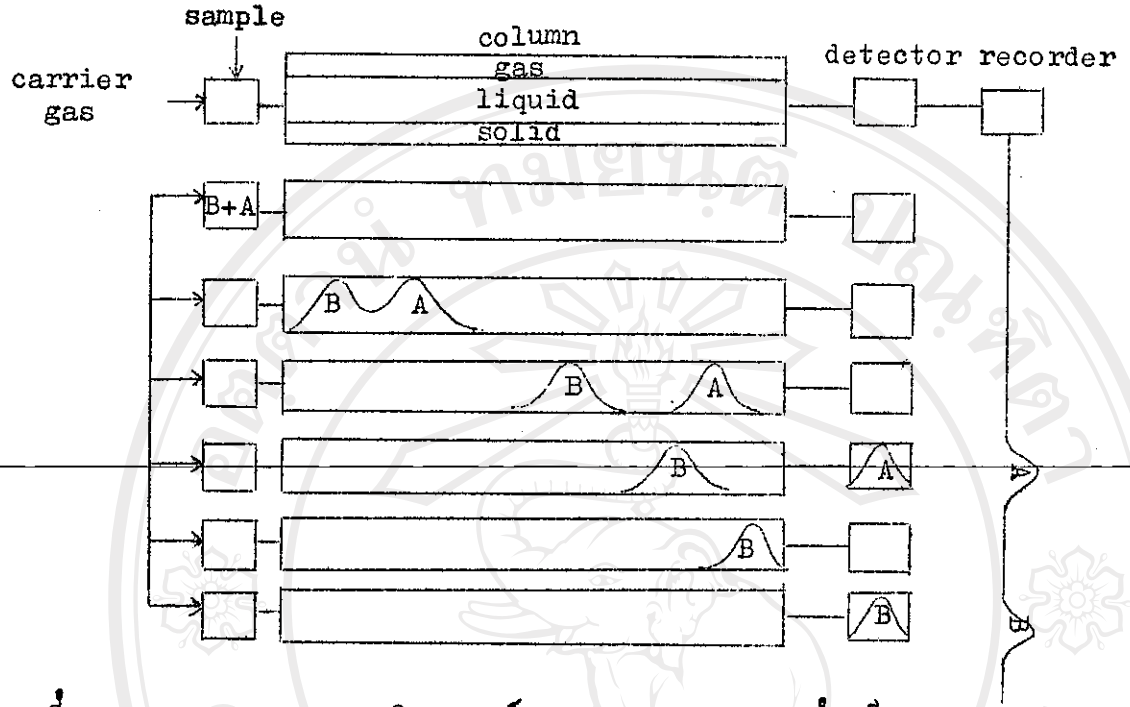
ผงโพลีเอไมด์ ผงเซลลูโลส สารละลายที่ใช้เป็นตัวแยกที่นิยมใช้มีสารละลายผสมของอะซีโตน–10 % แอมโมเนีย (9:1 v/v)[26], เอ็น–บิวทิลอัลกอฮอล์–เอทธิลอัลกอฮอล์–แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์–น้ำ (40:4:1:9 v/v)[27], เบนซีน–เอทธิลอะซีเตท–กรดอะเซติค (5:10:2)[26] สำหรับการตรวจหาจุดตำแหน่งของสารหวานเทียมนั้น เนื่องจากว่าสารหวานเทียมเหล่านี้เป็นสารไม่มีสี จึงต้องพ่นด้วยสารละลายอื่นที่ทำให้เกิดสีซึ่งมีอยู่หลายชนิดเช่น 0.1 % พินนาคริบตอลเยลโลว์ (pinacryptol yellow) ในเอทธิลอัลกอฮอล์, โบรมีน (bromine)–ฟลูโอเรสซีน (fluorescein)–แนพธิลเอทธิลีนไดอะมีน (naphthylethylene diamine), เมทธิลเรด (methyl red) ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) และซิลเวอร์ไนเตรต (silver nitrate)–ไพโรแกลลอล (pyrogallol)

1.4 หลักการของโครมาโตกราฟีก๊าซ–ของเหลว (Gas-Liquid Chromatography, GLC)

โครมาโตกราฟีก๊าซ–ของเหลวเป็นวิธีการแยกสารผสมออกจากกันโดยสารที่จะถูกแยกถูกทำให้อยู่ในสภาพที่เป็นไอหรือก๊าซก่อนที่จะเข้าสู่คอลัมน์ ภายในคอลัมน์จะมีตัวทำหน้าที่แยกที่เรียกว่าเฟสคงที่ (stationary phase) ซึ่งเป็นของเหลวที่ระเหยยากเคลือบอยู่บนสารแข็งรองรับ (solid support) เมื่อฉีดสารผสมของตัวอย่างเข้าไปในคอลัมน์ซึ่งมีก๊าซพา (carrier gas) ไหลผ่านในอัตราเร็วที่เหมาะสม องค์ประกอบแต่ละอย่างที่มีอยู่ในส่วนผสมนั้นจะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ในอัตราเร็วแตกต่างกันตามชนิดของสารนั้นๆ อัตราเร็วขององค์ประกอบแต่ละชนิดที่เคลื่อนที่ไปย่อมขึ้นอยู่กับสัมประสิทธิ์พาร์ติชั่น (partition coefficient หรือ distribution coefficient,K) ขององค์ประกอบนั้นดังนี้

$$K = \frac{\text{ความเข้มข้นของสารในเฟสคงที่}}{\text{ความเข้มข้นของสารในเฟสเคลื่อนที่}}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 1.2 การแยกสารภายในคอลัมน์ และการทำงานของเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟอย่างง่าย

ในสภาพที่เหมาะสมองค์ประกอบแต่ละอย่างของตัวอย่างจะมีสัมประสิทธิ์พาร์ติชันแตกต่างกันไป และจะถูกแยกออกจากกันอย่างสมบูรณ์ ดังแสดงในรูปที่ 1.2[28] การวิเคราะห์แบบนี้จะหาชนิดขององค์ประกอบในสารผสมตัวอย่างได้จากการวัดเวลารีเทนชัน (retention time) ซึ่งก็คือ เวลาที่เริ่มฉีดสารตัวอย่างเข้าไปในคอลัมน์จนถึงเวลาที่สารเคลื่อนที่โผล่ออกจากคอลัมน์ ซึ่งโดยปกติจะหมายถึงตำแหน่งตรงจุดยอดของพีค (peak) ในโครมาโตแกรม ส่วนปริมาณของสารหาได้จากการวัดพื้นที่ใต้พีคของสารนั้น ๆ เนื่องจากปริมาณของสารโดยปกติเป็นสัดส่วนโดยตรงกับพื้นที่ใต้พีคของสาร

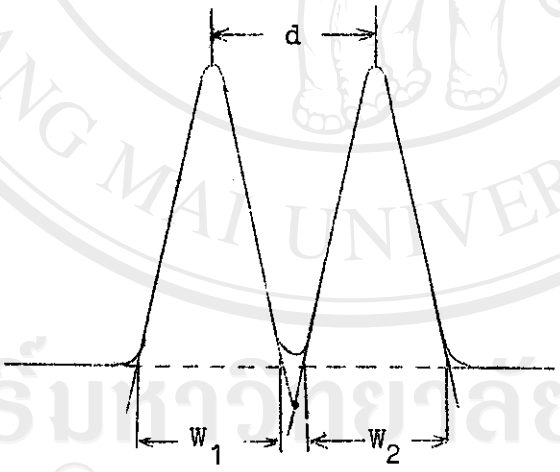
การที่สารจะแยกได้ผลดีหรือไม่ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบที่สำคัญ 2 อย่างคือ ประสิทธิภาพของคอลัมน์ และเรโซลูชัน (resolution)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

1.4.1 ประสิทธิภาพของคอลัมน์ (column efficiency) ซึ่งขึ้นอยู่กับสารที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์คือ ปริมาณของเฟสคงที่ และวิธีการบรรจุเฟสคงที่เข้าไปในคอลัมน์ สำหรับการหาประสิทธิภาพของคอลัมน์จะได้กล่าวบทที่ 2 ในหัวข้อที่ 2.3.6 ส่วนการเตรียมคอลัมน์เพื่อให้มีประสิทธิภาพดีขึ้นนั้นต้องคำนึงถึงสิ่งต่าง ๆ ดังนี้

- เลือกเฟสคงที่ให้เหมาะกับสารตัวอย่างนำไปเคลือบบนสารแข็งรองรับ โดยใช้เฟสคงที่ให้น้อยที่สุด
- ใช้สารแข็งรองรับที่มีขนาดเล็กประมาณ 100–120 mesh หรือเล็กกว่านี้
- ใช้อัตราเร็วของก๊าซพาที่เหมาะสม

1.4.2 เรโซลูชัน (resolution, R) คือความสามารถในการแยกของผสมออกจากกัน ซึ่งขึ้นอยู่กับเงื่อนไขของการทดลองที่เหมาะสม การเลือกคอลัมน์และขนาดของสารตัวอย่างที่ฉีด จากโครมาโตแกรมสามารถดูได้ว่าเรโซลูชันดีหรือไม่ โดยดูจากค่า $R^{(29)}$ ตามรูปที่ 1.3



$$R = \frac{2d}{W_1+W_2}$$

รูปที่ 1.3 การหาค่าเรโซลูชัน (resolution)

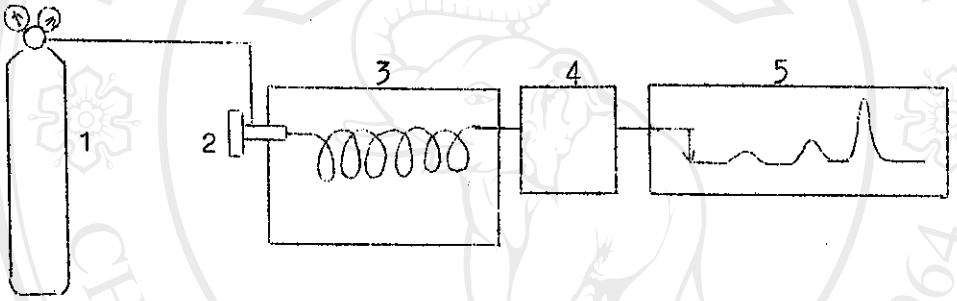
เมื่อ R = 1 การแยกจะสมบูรณ์ร้อยละ 98

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

R = 1.5 การแยกจะสมบูรณ์ร้อยละ 99.7 ซึ่งบางครั้งเรียกว่า baseline resolution

คอลัมน์ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางใหญ่จะให้เรโซลูชันน้อยกว่าคอลัมน์ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางเล็ก คอลัมน์ที่สั้นก็จะให้เรโซลูชันน้อยกว่าคอลัมน์ที่ยาว อุณหภูมิที่ใช้ก็มีผลต่อเรโซลูชันเช่นเดียวกัน คือคอลัมน์ที่ใช้อุณหภูมิต่ำจะให้เรโซลูชันที่ดีกว่า คอลัมน์ที่ใช้อุณหภูมิสูง

สำหรับเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟประกอบด้วยส่วนที่สำคัญดังแสดงในรูปที่ 1.4



รูปที่ 1.4 ส่วนประกอบของเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟอย่างง่าย

1. ก๊าซพา (carrier gas)
2. ช่องสำหรับฉีดสาร (injection port)
3. คอลัมน์ (column) ในที่อบ (oven) ที่ควบคุมอุณหภูมิได้
4. ระบบตรวจวัด (detector)
5. เครื่องบันทึกสัญญาณ (recorder)

1.4.3 ก๊าซพา (carrier gas) เป็นก๊าซที่ใช้พาสารตัวอย่างจากช่องสำหรับฉีดสาร (injection port) เข้าสู่คอลัมน์ และออกไปสู่ระบบตรวจวัด (detector)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ก๊าซพานี้จะบรรจุอยู่ในถังมีตัวควบคุมความดัน (pressure regulator) เพื่อให้ความดันคงที่ตลอดการทดลอง คุณสมบัติของก๊าซพามีดังนี้

(1) ต้องไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่มีอยู่ในคอลัมน์หรือสารตัวอย่าง

(2) เป็นก๊าซที่มีความบริสุทธิ์สูง

(3) มีการกระจายตัวต่ำ

(4) ราคาถูก

(5) เหมาะกับระบบตรวจวัดที่ใช้

ก๊าซพาที่นิยมใช้มีฮีเลียม, ไนโตรเจน, อาร์กอน ในงานวิจัยนี้ใช้ oxygen-free nitrogen เป็นก๊าซพา ก่อนที่จะผ่านเข้าไปยังคอลัมน์จะผ่านไปยัง molecular sieve trap เพื่อดูดเอาไอน้ำออกเสียก่อน

1.4.4 ช่องสำหรับฉีดสาร (injection port) เป็นส่วนที่ใช้ฉีดสารตัวอย่างเข้าไปในคอลัมน์โดยผ่านยางกันรั่ว (septum) ซึ่งยางกันรั่วจะมีหน้าที่ป้องกันมิให้ก๊าซพารั่วออกมา ช่องสำหรับฉีดสารนี้ต้องให้ความร้อนพอที่จะระเหยสารตัวอย่างที่ฉีดเข้าไปในกรณีที่สารตัวอย่างเป็นของเหลวโดยทั่วไปอุณหภูมิของช่องสำหรับฉีดสารตัวอย่างควรจะสูงกว่าอุณหภูมิของคอลัมน์ประมาณ 10 องศาเซลเซียส

1.4.5 คอลัมน์ (column) เป็นส่วนที่สำคัญของเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟ การที่สารตัวอย่างจะแยกได้ดีหรือไม่นั้นขึ้นอยู่กับการเลือกคอลัมน์ซึ่งรวมถึงเฟสคงที่และสารแข็งรองรับด้วย ถ้าแบ่งคอลัมน์ตามวิธีการบรรจุเฟสคงที่โดยทั่วไปอาจแบ่งได้เป็น 2 ประเภทคือ

(1) packed column เป็นคอลัมน์ที่บรรจุด้วยเฟสคงที่ซึ่งเป็นของเหลวเคลือบอยู่บนสารแข็งรองรับ ความยาวของคอลัมน์ชนิดนี้โดยทั่วไปมีตั้งแต่ 1-15 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลางของคอลัมน์มีขนาด 3.2-9.6 มม. คอลัมน์ที่ใช้มักทำด้วยโลหะพวก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เหล็กกล้าไร้สนิม (stainless steel), อะลูมิเนียม, ทองแดง, แก้ว หรือเทฟลอน คอลัมน์แก้วเป็นคอลัมน์ที่ดีที่สุดแต่ไม่สะดวกในการติดตั้งเพราะแตกง่าย คอลัมน์ที่เป็นแท่งตรงจะเป็นแบบที่มีประสิทธิภาพสูง แต่ในทางปฏิบัติคอลัมน์ยาวมากจะใส่ในตู้อบความร้อน (oven) ไม่ได้ จึงนิยมงอเป็นรูปตัว U หรือ W หรืออาจขดเป็นวงกลมเพื่อให้บรรจุในคอลัมน์ได้ ในกรณีที่ขดเป็นวงกลมต้องให้เส้นผ่าศูนย์กลางของวงกลมยาวกว่าเส้นผ่าศูนย์กลางของคอลัมน์ประมาณ 10 เท่าเป็นอย่างน้อย

(2) capillary column คอลัมน์แบบนี้จะไม่มีสารแข็งรองรับ จะใช้ liquid phase ไปเคลือบที่ผิวด้านในของคอลัมน์ซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลางเล็กมากขนาด 0.25-1.25 มม. มีความยาวโดยทั่วไปตั้งแต่ 30-150 เมตร เป็นคอลัมน์ที่มีประสิทธิภาพในการแยกสูงกว่า packed column หลายเท่า แต่ราคาแพงกว่า

ตำแหน่งของคอลัมน์จะมีปลายข้างหนึ่งต่อกับช่องสำหรับฉีดสาร ปลายอีกข้างหนึ่งจะต่อกับระบบตรวจวัด เนื่องจากสารตัวอย่างที่ฉีดเข้าไปจะต้องทำให้กลายเป็นไอตลอดเวลา ดังนั้นคอลัมน์จึงต้องอยู่ในตู้อบให้ความร้อน (oven)

ในงานวิจัยนี้ใช้คอลัมน์ชนิด packed column ทำด้วยทองแดงซึ่งสะดวกในการติดตั้ง โค้งงอได้ และทนทาน คอลัมน์นี้มีเส้นผ่าศูนย์กลางภายนอก 3.2 มม. มีความยาว 2 เมตร

1.4.6 สารแข็งรองรับ (solid support) เป็นสารแข็งรองรับที่ให้ liquid phase เคลือบติดอยู่ คุณสมบัติของสารแข็งรองรับมีดังนี้

(1) ไม่ทำปฏิกิริยากับเฟสคงที่ซึ่งเป็นของเหลว (liquid phase) หรือสารตัวอย่าง

(2) มีความแข็งไม่แตกง่าย ทนต่อความร้อน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(3) มีพื้นที่ผิวประมาณ 1-20 ตารางเมตรต่อกรัม

(4) มีขนาดสม่ำเสมอ และเป็นแบบเดียวกัน

สารแข็งรองรับอาจได้มาจากธรรมชาติเช่น diatomaceous earth หรืออาจได้มาจากสารที่ผลิตขึ้นเช่น อิฐทนไฟ (fire brick) หรือพวก porous polymer bead

ในงานวิจัยนี้ใช้ Chromosorb WHP เป็นสารแข็งรองรับซึ่งทำมาจาก diatomaceous earth ที่ล้างด้วยกรดเพื่อให้ถูกกัดกร่อนและมีรูพรุนมากขึ้น เป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวและทำให้มีประสิทธิภาพดีขึ้น และยังเป็นการกำจัดสิ่งสกปรกที่เกาะตามพื้นที่ผิวของสารแข็งรองรับอีกด้วย นอกจากนี้สารแข็งรองรับแบบนี้ยังถูกให้ทำปฏิกิริยากับ dimethyldichlorosilane(DMCS)หรือ hexamethyldisilazane (HMDS) ก่อนที่จะเคลือบด้วยเฟสคงที่ ทั้งนี้เพื่อลดปฏิกิริยาที่จะเกิดกับสารตัวอย่าง ซึ่งจะทำให้เกิด tailing ของพีค

1.4.7 เฟสคงที่ซึ่งเป็นของเหลว (liquid stationary phase) เป็นตัวแยกสารตัวอย่างนับว่าเป็นส่วนสำคัญที่สุดของเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟ การเลือกเฟสคงที่ให้ดีที่สุดสำหรับสารตัวอย่างนั้นไม่ใช่ของง่าย ลักษณะโดยทั่วไปของเฟสคงที่ที่ดีจะต้องมีลักษณะดังนี้

(1) เป็นของเหลวที่ไม่ระเหยที่อุณหภูมิขณะทำการทดลอง

(2) ทนต่อความร้อน

(3) มีสภาพขั้ว (polarity) เหมือนกับสารตัวอย่าง

(4) ให้สารตัวอย่างเข้าผสมได้ในสัดส่วนที่ไม่เท่ากัน

(5) ไม่ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การเลือกเฟสคงที่ให้เหมาะสมกับสารตัวอย่างจะดูจากสภาพขั้ว (polarity) ซึ่งสภาพขั้วของเฟสคงที่จะมีตั้งแต่ polar, intermediate polar และ non-polar เฟสคงที่ที่เป็น polar ก็คือสารที่มี dipole moment ส่วนสารที่ต้องการแยกก็จะจัดกลุ่มเป็น polar, intermediate polar และ non polar เช่นเดียวกัน สารที่เป็น polar จะมี hydrogen bond, donor atom และ active hydrogen ซึ่งสภาพขั้วจะลดลงตามลำดับจนเป็น non-polar เมื่อขาดตัวต่าง ๆ หลักการเลือกก็คือถ้าสารตัวอย่างเป็น polar ก็เลือกเฟสคงที่ที่เป็น polar เหมือนกัน

Rohrschneider และ McReynolds (30, 31) ได้เสนอวิธีการเลือกเฟสคงที่ตามสภาพขั้วโดยอาศัย Kovats retention index เป็นแนวทางเปรียบเทียบ

บางกรณีสารตัวอย่างมีสารหลายชนิดผสมอยู่ ถ้าใช้เฟสคงที่เพียงชนิดเดียวอาจแยกสารได้ไม่ดี จึงจำเป็นต้องใช้เฟสคงที่ 2 หรือ 3 ชนิดผสมกันในอัตราส่วนที่เหมาะสม สำหรับการหาอัตราส่วนที่เหมาะของเฟสคงที่นี้อาจใช้เทคนิคที่เรียกว่า "window diagram" ซึ่งเป็นวิธีที่เสนอโดย Laub และ Purnell (32)

ในงานวิจัยนี้ได้เลือก DC 200 เป็นเฟสคงที่ ซึ่งเป็นเมทธิล ซิลิโคน (methyl silicone) อย่างหนึ่ง จัดได้ว่าเป็นเฟสคงที่ที่เป็นแบบ non-polar เหมาะกับสารที่จะวิเคราะห์คือ แซคคารินซึ่งอยู่ในรูป derivative ของเอ็น--เมทธิล แซคคาริน ซึ่งเป็น non-polar เช่นเดียวกัน ส่วนคัลซิน และไซคลาเมทซึ่งวิเคราะห์ในรูปของไซโคลเฮกซีนก็เหมาะที่จะใช้ DC 200 เป็นเฟสคงที่เช่นเดียวกัน

1.4.8 ระบบตรวจวัด (detector) เป็นเครื่องมือที่ใช้วัดปริมาณสารตัวอย่างที่ถูกพาพาออกจากคอลัมน์ ซึ่งปริมาณของสารตัวอย่างแต่ละชนิดที่สามารถตรวจสอบได้นั้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับสัญญาณที่ระบบตรวจวัดเป็นตัวให้ ระบบตรวจวัดนี้ต้องให้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ความร้อนพอที่จะระเหยสารตัวอย่างที่ผ่านเข้ามาเพื่อไม่ตกค้างอยู่ในระบบตรวจวัด โดยทั่วไปอุณหภูมิของระบบตรวจวัดจะสูงกว่าอุณหภูมิของคอลัมน์ประมาณ 10 องศาเซลเซียส คุณสมบัติทั่วไปของระบบตรวจวัดมีดังนี้

(1) มีขีดความสามารถในการตรวจวัด (detection limit) ต่ำ ซึ่ง detection limit เป็นขนาดของสารตัวอย่างที่ให้สัญญาณเป็น 2 เท่าของสัญญาณรบกวน (noise)

(2) มีความว่องไว (sensitivity) สูง คือปริมาณสัญญาณที่ระบบตรวจวัดให้เมื่อฉีดสารตัวอย่างเข้าไปต้องมาก

(3) มีสัญญาณรบกวน (noise) น้อย

(4) มี linearity กว้างคือ ช่วงที่ระบบตรวจวัดให้สัญญาณที่เป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสารตัวอย่างจะต้องกว้าง

(5) วัดสารได้ทุกชนิด

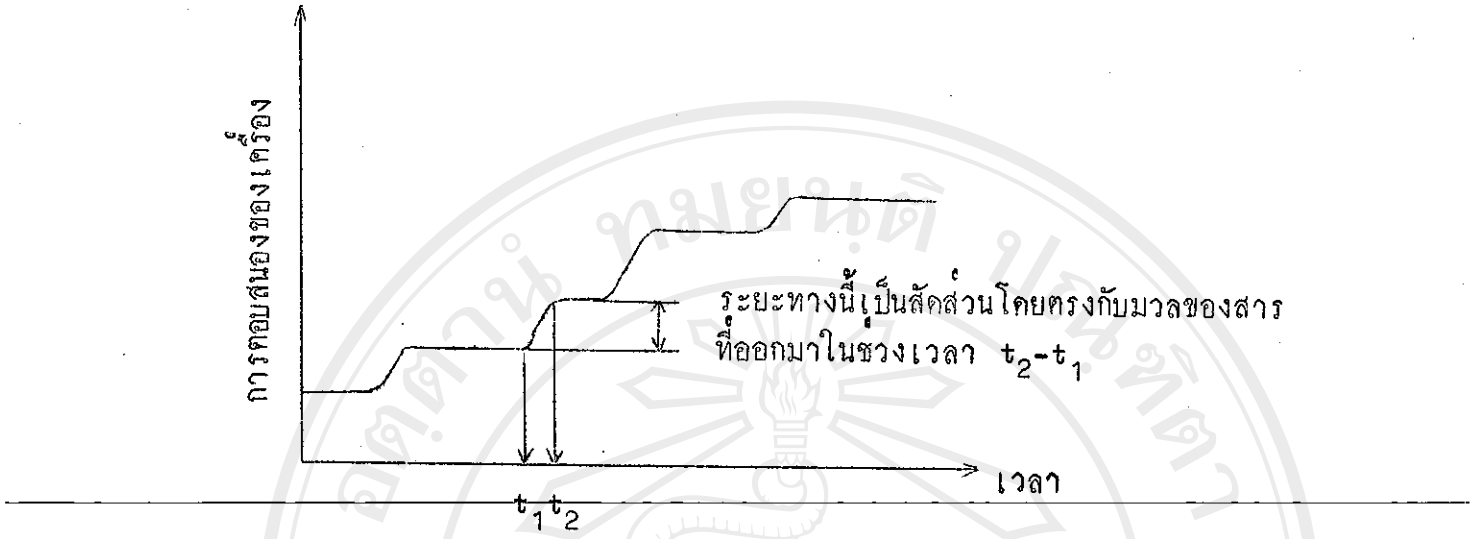
(6) ไม่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงความดันของก๊าซและอุณหภูมิ

(7) ราคาถูก

ระบบตรวจวัดแบ่งออกเป็น 2 ระบบคือ

ก. integrating detector จะให้สัญญาณเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณทั้งหมดของสารที่ออกจากคอลัมน์ โครมาโตแกรมที่ได้จากระบบตรวจวัดชนิดนี้จะมีลักษณะเป็นขั้นบันไดดังแสดงในรูปที่ 1.5

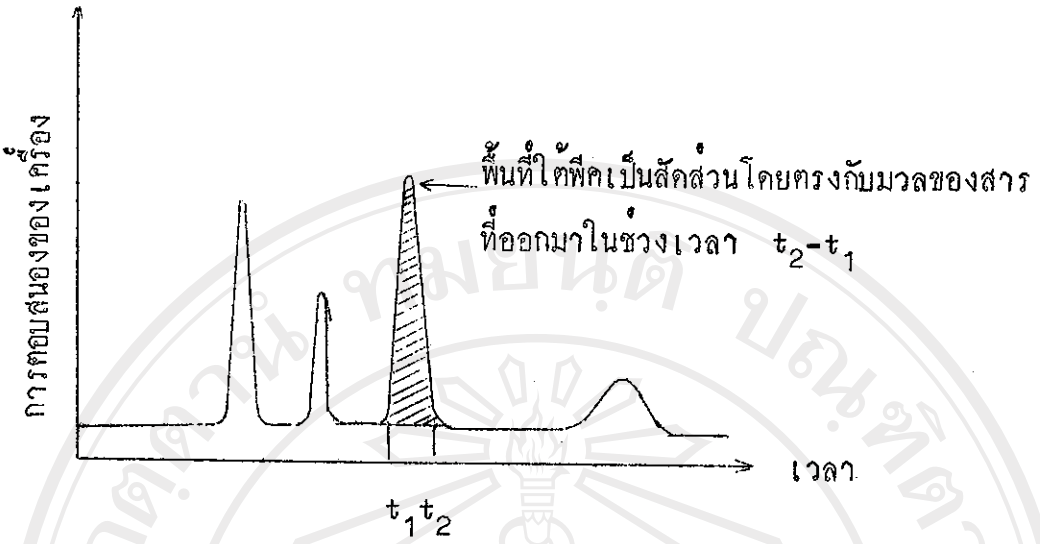
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 1.5 integral chromatogram

ข. differential detector เป็นระบบตรวจวัดที่ให้สัญญาณเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นหรือมวลของสารนั้น เมื่อมีแต่ก๊าซพาผ่านระบบตรวจวัดแบบนี้จะให้สัญญาณเป็นศูนย์ แต่เมื่อมีสารถูกแยกออกจากคอลัมน์ผ่านเข้าสู่ระบบตรวจวัดก็จะมีสัญญาณปรากฏในโครมาโตแกรม ดังรูปที่ 1.6

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

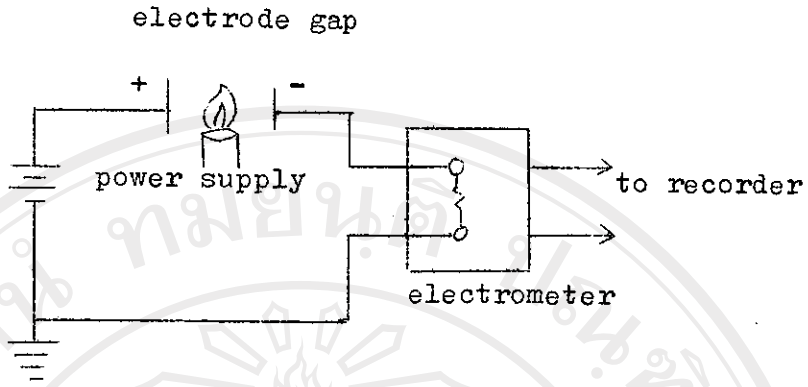


รูปที่ 1.6 differential chromatogram

ระบบตรวจวัดส่วนมากจะเป็นแบบ differential detector ชนิดของระบบตรวจวัดที่ใช้กันมากได้แก่ thermal conductivity detector (TCD) และ flame ionization detector (FID) สำหรับระบบตรวจวัดชนิดอื่นได้แก่ electron capture detector (ECD) และ alkali flame detector ใช้วัดสารเฉพาะกลุ่มเท่านั้น

ในงานวิจัยนี้ใช้ระบบตรวจวัดชนิด flame ionization detector ซึ่งอาศัยหลักการที่ว่า[33] ความสามารถในการนำไฟฟ้า (electrical conductivity) ของก๊าซเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของอนุภาคที่มีประจุ (charged particles) ภายในก๊าซ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 1.7 แผนผังวงจรของ flame ionization detector

จากรูปที่ 1.7 จะเห็นว่าระหว่างขั้วไฟฟ้าทั้งสองใน FID จะมี ionizing source อยู่ เมื่อมีก๊าซพาไหลจากคอลัมน์ผ่านเข้าไปในเปลวไฟจะไอออนไนซ์ (ionize) เกิดอนุภาคที่มีประจุและอิเลคตรอนภายในช่องว่างระหว่างขั้วไฟฟ้า (electrode gap) เป็นเหตุให้กระแสไฟฟ้าไหลผ่านช่องว่างระหว่างขั้วไฟฟ้าไปสู่ measuring resistor เกิดเป็นกระแสไฟฟ้าขยายขนาดด้วย electrometer แล้วส่งสัญญาณไปบันทึกที่เครื่องบันทึกสัญญาณ (recorder)

ช่องว่างระหว่างขั้วไฟฟ้าเปรียบเสมือน variable resistor ซึ่งค่าความต้านทานถูกกำหนดโดยจำนวนอนุภาคที่มีประจุภายในช่องว่างเมื่อมีแต่ก๊าซพาไหลผ่านจะมีอนุภาคที่มีประจุปริมาณเล็กน้อยจำนวนหนึ่งซึ่งทำให้เกิดกระแสไฟฟ้าไหลที่เรียกว่า background current แต่ background current นี้สามารถทำให้หายไปได้โดยเอา bucking voltage มาต้านทานไว้ ฉะนั้นเมื่อมีแต่ก๊าซพาไหลผ่านจะไม่มีสัญญาณออกมา จะได้สัญญาณเป็นเส้นตรง แต่เมื่อมีสารอินทรีย์ผ่านเข้ามาในเปลวไฟก็จะมีอนุภาคที่มีประจุเกิดขึ้นทำให้เกิดกระแสไฟฟ้าไหลเกิดสัญญาณขึ้น เมื่อขยายขนาดด้วย electrometer ก็จะปรากฏเป็นพีค (peak) บนเครื่องบันทึกสัญญาณ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.5 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

การศึกษาวิจัยเรื่องการหาปริมาณสารหวานเทียมโดยวิธีโครมาโตกราฟีก๊าซ–ของเหลวนี้มีวัตถุประสงค์ดังต่อไปนี้

1.5.1 เพื่อพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์สารหวานเทียมโดยวิธีโครมาโตกราฟีก๊าซ–ของเหลว

1.5.2 เพื่อหาชนิดของสารหวานเทียมซึ่งเป็นอันตรายต่อร่างกายที่มีอยู่ในตัวอย่างอาหาร

1.5.3 เพื่อหาปริมาณของสารหวานเทียมบางชนิดในตัวอย่างอาหาร

1.6 ขั้นตอนการวิจัย

ขั้นตอนในการหาปริมาณสารหวานเทียมในงานศึกษาวิจัยนี้มีขั้นตอนที่สำคัญดังนี้

1.6.1 หาเงื่อนไขของการทดลองที่เหมาะสมเพื่อวิเคราะห์แซคคาริน ดัลซิน และไซคลาเมท โดยวิธีโครมาโตกราฟีก๊าซ–ของเหลว

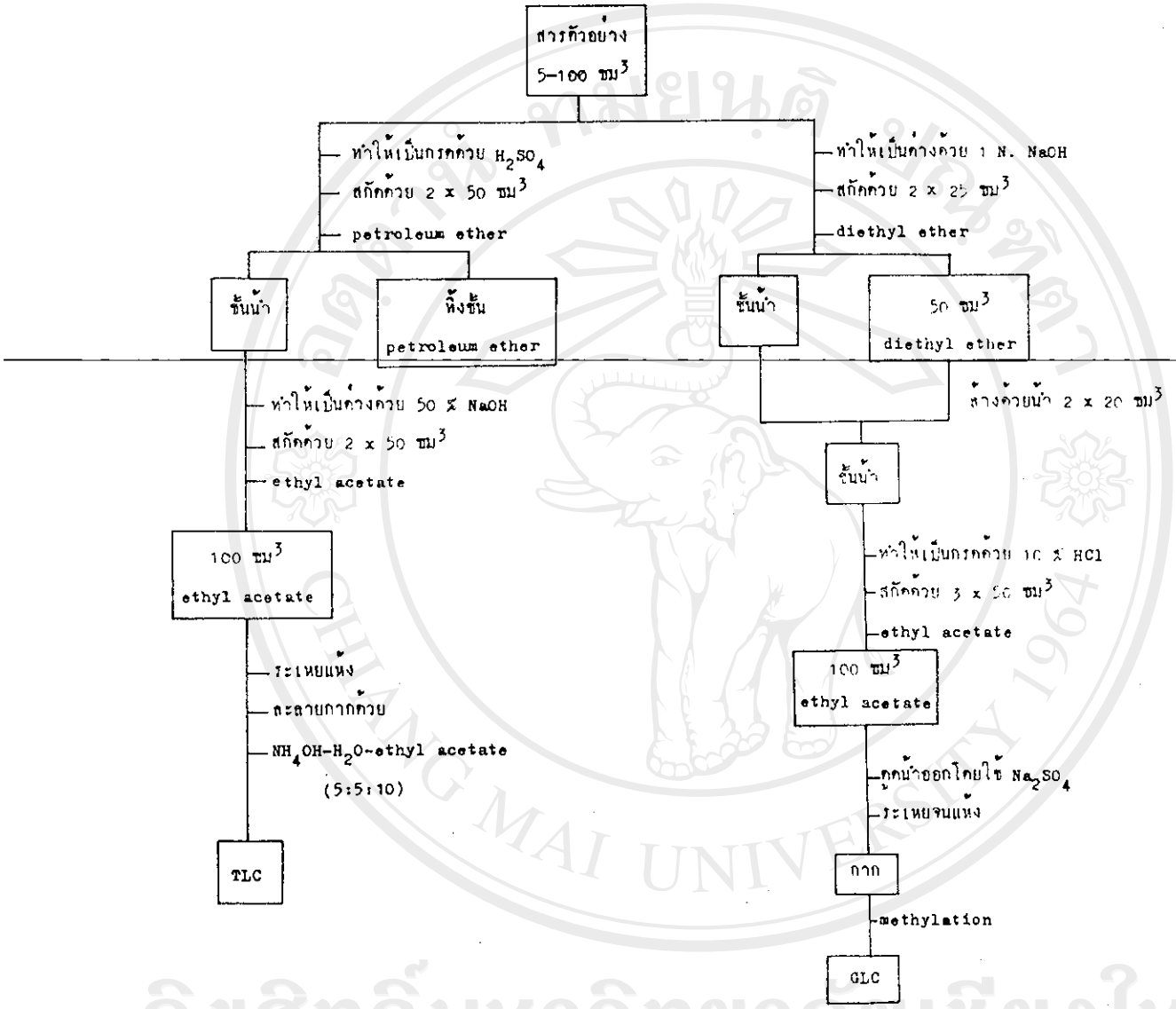
1.6.2 เก็บตัวอย่างอาหารนานาชนิดจากแหล่งต่าง ๆ ในจังหวัดเชียงใหม่

1.6.3 หาชนิดของสารหวานเทียมในสารตัวอย่างโดยวิธี thin-layer chromatography

1.6.4 หาปริมาณสารหวานเทียมที่พบในขั้นตอน 1.6.3 ในสารตัวอย่างโดยวิธีโครมาโตกราฟีก๊าซ–ของเหลว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ขั้นตอนการวิเคราะห์สารหวานเทียมในการศึกษาวิจัยนี้สามารถแสดงในรูปของแผนผังดังต่อไปนี้



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved