

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของสารหวานเทียมในอาหารต่าง ๆ ในจังหวัดเชียงใหม่ โดยใช้วิธีทีนเลเยอร์โครมาโตกราฟี (thin-layer chromatography) และโครมาโตกราฟีก๊าซ (gas chromatography) ควบคู่กัน

จากการทดลองหาปริมาณสารหวานเทียมโดยวิธีโครมาโตกราฟีก๊าซนี้ได้หาเงื่อนไขที่เหมาะสมเพื่อจะวิเคราะห์ แซคคาริน ไซคลาเมท และคัลซิน โดยใช้เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟีที่มีระบบตรวจสอบเป็นแบบเปลวไอออนไนซ์เซชัน (flame ionization detector) คอลัมน์ที่ใช้เป็น DC 200 เคลือบอยู่บน Chromosorb WHP เงื่อนไขของการวิเคราะห์สารหวานเทียมแต่ละตัวพอจะสรุปได้ดังต่อไปนี้

แซคคารินต้องเตรียมอนุพันธ์ (derivative) โดยการเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของเอ็น-เมทิลแซคคาริน (N-methyl saccharin) ก่อนจึงนำไปฉีดเข้าเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟีโดยมีเงื่อนไขของการทดลองดังนี้

อุณหภูมิของคอลัมน์	220	องศาเซลเซียส
อุณหภูมิของอินเจคเตอร์ (injector)	250	องศาเซลเซียส
อุณหภูมิของเครื่องตรวจจับ (detector)	250	องศาเซลเซียส
อัตราการไหลของก๊าซพา	64	ซม ³ /นาที
อัตราส่วนของอากาศต่อไฮโดรเจน	25:20	ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

คัลซิน นำไปฉีดได้โดยตรงโดยมีเงื่อนไขของการทดลองเหมือนแซคคาริน ส่วนไซคลาเมทต้องเปลี่ยนให้เป็นไซโคลเฮกซีน (cyclohexene) ก่อนที่จะนำไปฉีดโดยมีเงื่อนไขของการทดลองเหมือนกับแซคคาริน แต่เปลี่ยนอุณหภูมิของคอลัมน์เป็น 85°C และอุณหภูมิของอินเจคเตอร์และเครื่องตรวจจับเป็น 175°C

ในการสุ่มตัวอย่างอาหารมาวิเคราะห์สารหวานเทียมนี้ได้เก็บตัวอย่างอาหารทั้งชนิดที่มีียี่ห้อ และไม่มีียี่ห้อ สารตัวอย่างส่วนมากเป็นพวกน้ำหวานและของหมัก

คองทั้งหลาย เพราะอาหารพวกนี้ต้องใช้หน้าศาลมากผู้ผลิตจึงมักจะลักลอบใช้สารหวานเทียม แทนน้ำตาลอยู่เสมอ ชนิดของตัวอย่างอาหารและสถานที่เก็บได้แสดงไว้แล้วในหัวข้อที่ 2.1

ก่อนที่จะหาปริมาณสารหวานเทียมในสารตัวอย่างให้นำสารตัวอย่างมาหา ชนิดของสารหวานเทียมโดยใช้วิธีทีนเลเยอร์โครมาโทกราฟี (TLC) เพราะเป็นวิธีที่ทำได้ ง่าย สะดวก และรวดเร็ว การหาชนิดของสารหวานเทียมโดยวิธีโครมาโทกราฟีที่ใช้นั้น มีเงื่อนไขของการทดลองที่ไม่เหมือนกันไม่อาจหาชนิดของสารหวานเทียมที่เดี่ยวพร้อมกันทั้ง 3 ตัวได้ ทำให้ไม่สะดวกในการหาชนิดของสารหวานเทียม แต่แซคคารินและคัลซินอาจหา พร้อมกันได้ เนื่องจากมีเงื่อนไขของการทดลองเหมือนกันโครมาโทแกรมของแซคคารินและ คัลซินแสดงอยู่ในรูปที่ 3.15 ซึ่งจะเห็นว่าพีคของคัลซิน และเมทิลแซคคารินไม่รบกวนกัน

ในขั้นตอนการสกัดสารหวานเทียมออกจากสารตัวอย่างนั้น เนื่องจากว่าอาหาร บางชนิดมีสารกันบูด ไขมัน หรือสารแต่งกลิ่นผสมอยู่ของสกัดสารเหล่านี้โดยใช้บีโตรีเลียม อีเธอร์ (petroleum ether) สารตัวอย่างบางชนิดเวลาสกัดจะเกิดอิมัลชัน (emulsion) ต้องทำการแยกอิมัลชันโดยเอาไปเหวี่ยง (centrifuge) เมื่อสกัดเอาสารอื่นออกแล้วสาร หวานเทียมที่มีอยู่ในสารตัวอย่างยังคงละลายอยู่ในชั้นน้ำ จากนั้นจึงสกัดสารหวานเทียมออก จากชั้นน้ำ โดยใช้เอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) ผลการวิเคราะห์หาชนิดของสาร หวานเทียมในตัวอย่างอาหารโดยวิธี TLC นี้ แสดงอยู่ในตารางที่ 3.2 ค่า R_f ของสาร หวานเทียมทั้ง 3 ชนิด เมื่อใช้ซิลิกาอัลกอสอด-เอทิลอัลกอสอด-แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์- น้ำ ในอัตราส่วน 40:4:1:9 เป็นน้ำยาแยกจะเป็นดังนี้

	R_f
แซคคาริน	0.37
ไซคลาเมท	0.29
คัลซิน	0.63

จากตารางที่ 3.2 จะเห็นว่าสารหวานเทียมที่นำมาใส่ในอาหารมีอยู่เพียงชนิดเดียวคือ แซคคาริน ส่วนไซคลาเมทและคัลซินไม่พบว่ามีการนำมาใส่ในอาหาร ทั้งนี้คงเป็นเพราะว่าแซคคารินราคาถูก และหวานกว่าน้ำตาลทรายถึง 500 เท่า ในขณะที่ไซคลาเมทและคัลซินหวานกว่าน้ำตาลทรายเพียง 30 และ 200 เท่า ตามลำดับ ซึ่งถ้าต้องการให้ความหวานเท่ากันจะใช้แซคคารินในปริมาณที่น้อยกว่าไซคลาเมทและคัลซิน

เนื่องจากในสารตัวอย่างได้ตรวจพบว่ามีแค่แซคคาริน จึงทำการวิเคราะห์หาปริมาณแซคคารินโดยวิธีโครมาโทกราฟีก๊าซเพียงชนิดเดียว สำหรับการหา

ปริมาณแซคคารินโดยวิธีโครมาโทกราฟีก๊าซนี้ต้องเตรียมอนุพันธ์ (derivative) ของแซคคารินให้อยู่ในรูปของเอ็น-เมทิลแซคคาริน เพราะแซคคารินเป็นสารที่มีจุดหลอมเหลวสูงประมาณ 224°C และเป็นสารจำพวกมีสภาพขั้ว (polar) ซึ่งระเหยยาก และการที่เป็นสารมีสภาพขั้วนี้ทำให้ถูกดูดซับโดยเฟสที่เป็นของเหลว (liquid phase) จึงต้องลดสภาพขั้วลงโดยทำให้เป็นเอ็น-เมทิลแซคคาริน โดยที่ methyl group จะเข้าแทนที่ไฮโดรเจนในแซคคารินตรง N-H bond ได้เอ็น-เมทิลแซคคารินมีสูตรดังนี้



แซคคาริน

เอ็น-เมทิลแซคคาริน

เมื่อ methyl group เข้าแทนที่ไฮโดรเจนในแซคคารินแล้ว แซคคารินก็จะไม่มีไฮโดรเจนที่จะไปเกิดพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) ก็จะทำให้สภาพขั้วลดลง และจุดหลอมเหลวก็จะต่ำลง เอ็น-เมทิลแซคคารินที่เตรียมขึ้นมีจุดหลอมเหลว $131-132^{\circ}\text{C}$

การเตรียมเอ็น-เมทิลแซคคารินนี้ ได้มีผู้เตรียมโดยใช้ diazomethane⁽¹⁸⁾ และ methyl iodide⁽⁴³⁾ แต่ diazomethane มีข้อเสียคือ เป็นก๊าซที่ระเหยง่าย และเตรียมได้ยาก และถ้าใช้ methyl iodide เป็นตัว methylating agent ปฏิกริยาจะเกิดช้ามาก ในงานวิจัยนี้ใช้ dimethyl sulfate ซึ่งเป็นตัว methylating agent ที่ดี ในการทำเมทิลเลชัน (methylation) ปฏิกริยาเกิดสมบูรณ์ภายในเวลา 10 นาที ดังจะเห็นได้จากกราฟรูปที่ 3.10

เอ็น-เมทิลแซคคารินที่เตรียมขึ้นมานี้ไม่มีสารมาตรฐานมาเปรียบเทียบ เพื่อยืนยันว่าสารที่เตรียมขึ้นเป็นเอ็น-เมทิลแซคคารินจริง จึงต้องนำสารที่เตรียมได้มาพิสูจน์โครงสร้างโดยใช้วิธีทาง infrared spectroscopy (IR) และทาง nuclear magnetic resonance (NMR)

จาก IR spectrum ของแซคคารินในรูปที่ 3.2 จะเห็นว่า มีพีคที่สำคัญ คือ

3000-3175	cm ⁻¹	strong, broad	N-H stretching
1750	cm ⁻¹	strong	C=O stretching
1640	cm ⁻¹	medium	N-H bending

จาก IR spectrum ของเอ็น-เมทิลแซคคารินในรูปที่ 3.3 จะเห็นว่า ค่าแห่งของพีคที่ 3000-3175 cm⁻¹ ซึ่งเป็น N-H stretching หายไป

จากการเปรียบเทียบ NMR spectrum ของแซคคารินและของเอ็น-เมทิลแซคคารินจะเห็นว่า NMR spectrum ของเอ็น-เมทิลแซคคารินจะมีพีคของ N-CH₃ ที่ค่าแห่ง 3.18 ppm ในขณะที่ NMR spectrum ของแซคคารินไม่ปรากฏพีคตรงค่าแห่งนี้

เมื่อนำเอ็น-เมทิลแซคคารินไปหาจุดหลอมเหลวจะได้ $131-132^{\circ}\text{C}$
ซึ่งตามสมบัติของเอ็น-เมทิลแซคคารินก็จะมีจุดหลอมเหลวอยู่ที่ $131-132^{\circ}\text{C}$ เช่นเดียวกัน
จากหลักฐานทั้ง 3 อย่างนี้พอที่จะสรุปได้ว่าสารที่เตรียมขึ้นในงานวิจัยนี้
เป็นเอ็น-เมทิลแซคคาริน

ในการหาปริมาณแซคคารินในสารตัวอย่างนั้นได้ใช้วิธีเติมสารมาตรฐาน
ภายใน (internal standard) ลงไปเป็นตัวเปรียบเทียบโดยทั่วไปแล้วตัวสารมาตรฐาน
ภายในจะต้องเป็นสารที่ให้พีคไม่ซ้ำกับพีคที่ต้องการวิเคราะห์หรือพีคอื่น ๆ แต่คงอยู่ใกล้กับ
พีคของสารที่ต้องการวิเคราะห์ เพราะจะได้ไม่เสียเวลาในการวิเคราะห์มาก นอกจากนี้
นี้สารมาตรฐานภายในจะต้องไม่ทำปฏิกิริยากับสารต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้อง ในงานวิจัยนี้เลือก
เมทิลพาล์มมีเตทเป็นสารมาตรฐานภายใน เพราะมีสมบัติใกล้เคียงกับสมบัติของ
สารมาตรฐานภายในที่ได้กล่าวมาแล้ว ซึ่งการวิเคราะห์เชิงปริมาณโดยการเติมสารมาตรฐาน
ภายในนี้มีความแม่นยำสูง (44) เพราะว่ามีคองระวังเกี่ยวกับปริมาตรของสารผสมที่ฉีดเข้า
เครื่องก๊าซโครมาโทกราฟี โดยปกติแล้วการฉีดสารเข้าเครื่องก๊าซโครมาโทกราฟีแต่ละครั้ง
ควรมีปริมาตรที่เท่ากัน พื้นที่ใต้พีคที่ได้อาจจะไม่ค่อยเท่ากันเนื่องจากเทคนิคของการฉีด แต่ถ้า
ใช้วิธีการเติมสารมาตรฐานภายในลงไปจะตัดปัญหาเหล่านี้ลงไปได้ นอกจากนี้ยังไม่ต้อง
คำนึงถึงความไวในการวัดของเครื่องตรวจวัดด้วย

เทคนิคในการหาพื้นที่ใต้พีคอาจทำได้หลายวิธี ซึ่ง Gill และคณะ (45)
ได้หาความแม่นยำของวิธีการต่าง ๆ ที่จะหาพื้นที่ใต้พีค โดยหาออกมาในรูปของความเบี่ยง
เบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation, RSD) ดังต่อไปนี้

- (1) ใช้ planimeter ได้ RSD 4.0 %
- (2) ใช้วิธีสร้างรูปสามเหลี่ยม (triangulation) ได้ RSD 4.0 %
- (3) คำนวณโดยใช้สูตรความสูงคูณความกว้างของพีคที่ครั้งหนึ่งของความ
สูงได้ RSD 2.5 %

- (4) ใช้วิธีสกัดกระดาษแล้วชั่งได้ RSD 1.7 %
- (5) ใช้ disc integrator ได้ RSD 1.3 %
- (6) ใช้ electronic digital integrator ได้ RSD 0.4 %

จะเห็นได้ว่าวิธีสกัดกระดาษแล้วชั่งเป็นวิธีหนึ่งที่ทำให้ความแม่นยำสูง ในงานวิจัยนี้ได้ใช้เทคนิคการสกัดกระดาษบันทึกสัญญาณแล้วชั่งในการหาพื้นที่ใต้พีค พีคของสารที่นำมาคั้นนี้ต้องขยายให้ได้พีคที่กว้างขึ้นโดยการเพิ่มอัตราเร็วของกระดาษบันทึกสัญญาณ ทั้งนี้เพื่อลดความคลาดเคลื่อนจากการตัดพีค ในการหาพื้นที่พีคนั้น เหตุที่ไม่ใช้ disc integrator หรือ electronic digital integrator ก็เพราะว่าในบางครั้งที่พีคที่ได้ไม่อยู่ที่ base line ซึ่งทำให้การคำนวณออกมาคลาดเคลื่อน สำหรับวิธีสกัดพีคจากกระดาษบันทึกสัญญาณแล้วชั่งนั้นอาจมีข้อผิดพลาดอยู่บ้างเนื่องจากความหนาของกระดาษไม่สม่ำเสมอและเทคนิคในการตัด จากการหาความแม่นยำของเทคนิคนี้ได้ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.14 และความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ 2.8 ซึ่งนับว่าเป็นเทคนิคที่ทำให้ความแม่นยำสูง

จากผลการวิเคราะห์หาปริมาณแซคคารินในตารางที่ 3.13 พบปริมาณแซคคารินอยู่ในช่วง 3.45-130 มก./100 ซม³ สำหรับอาหารที่มีลักษณะเป็นของเหลว และ 0.01-0.13 % (w/w) สำหรับอาหารที่เป็นของแข็ง เป็นที่น่าสังเกตว่าอาหารที่มียีสหอยมักจะไม่มีเติมสารหวานเทียมลงไป เพราะกระทรวงสาธารณสุขควบคุมทั่วถึง อาหารที่มียีสหอยบางชนิดพบว่ามีการเติมสารหวานเทียมลงไปด้วยอาจจะเนื่องจากว่าเป็นผลิตภัณฑ์ของโรงงานเล็ก ๆ หรือเป็นอุตสาหกรรมภายในครัวเรือนที่กระทรวงสาธารณสุขควบคุมไปไม่ถึง แต่ถ้าเป็นอาหารที่ไม่มียีสหอยแล้วมักจะเติมสารหวานเทียมจำพวกแซคคารินแทนน้ำตาลเกือบทุกชนิด

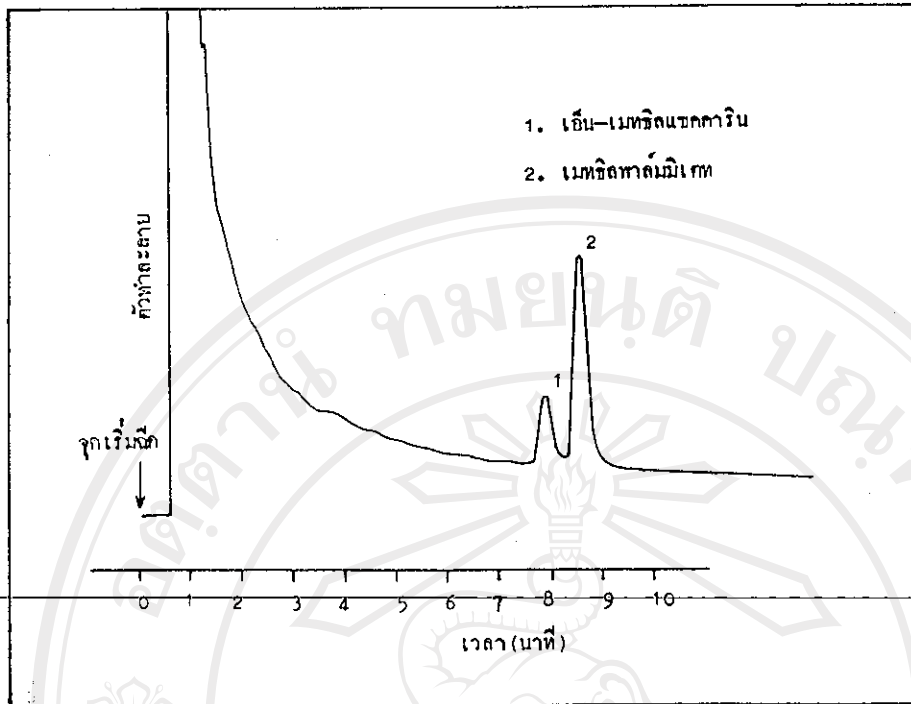
ตารางที่ 4.1 ชนิดและปริมาณของสารหวานเทียมที่พบในอาหารต่าง ๆ ในเขตจังหวัด
เชียงใหม่

ชนิดของอาหาร	ปริมาณแซคคาริน มก./100 ซม ³
น้ำกระเทียมคอง	130.00
น้ำมะนาว	9.20
น้ำลูกทอ	52.00
น้ำววย	7.60
น้ำกระทอน	40.00
น้ำเงาะววย	3.60
น้ำมะพร้าว	4.00
น้ำรากบัว	3.45
น้ำมะขามคอง	35.20
ชนิดของอาหาร	ปริมาณแซคคาริน % (w/w)
มะม่วงเค็ม	0.01
กระเทียมคอง	0.13
ลูกทอ	0.04

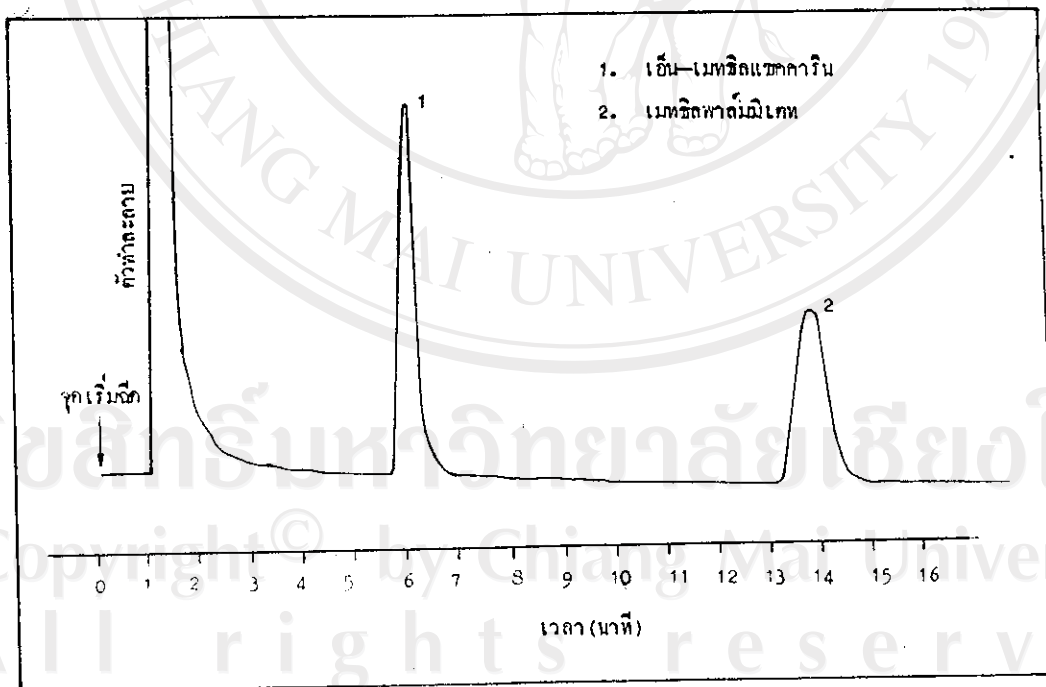
การวิเคราะห์เชิงปริมาณโดยใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟีก๊าซนี้จะได้ผลดีหรือไม่ขึ้นอยู่กับ การเลือกภาวะที่เหมาะสมของเครื่องมือ และเฟสที่เป็นของเหลว (liquid phase) ก็เป็นอีกส่วนหนึ่งที่สำคัญ ในงานวิจัยนี้ได้เลือกเฟสที่เป็นของเหลวที่เป็น non-polar เพราะสารที่นำมาวิเคราะห์ได้เตรียมเป็นอนุพันธ์ (derivative) เพื่อลด polarity ลง ในที่นี้ได้เลือกใช้ methyl silicone เป็นเฟสที่เป็นของเหลว โดยนำคอลัมน์ที่บรรจุด้วยเฟสที่เป็นของเหลวจำพวก methyl silicone หลาย ๆ ชนิดมาเลือกใช้ทั้งนี้

- (1) 4 % SE 30 + 6 % OV 210 เคลือบอยู่บน Gas chrom Q ขนาด 80-100 mesh
- (2) 3 % OV 1 เคลือบอยู่บน Gas chrom Q ขนาด 80-100 mesh
- (3) 10 % DC 200 เคลือบอยู่บน Chromosorb WHP ขนาด 80-100 mesh

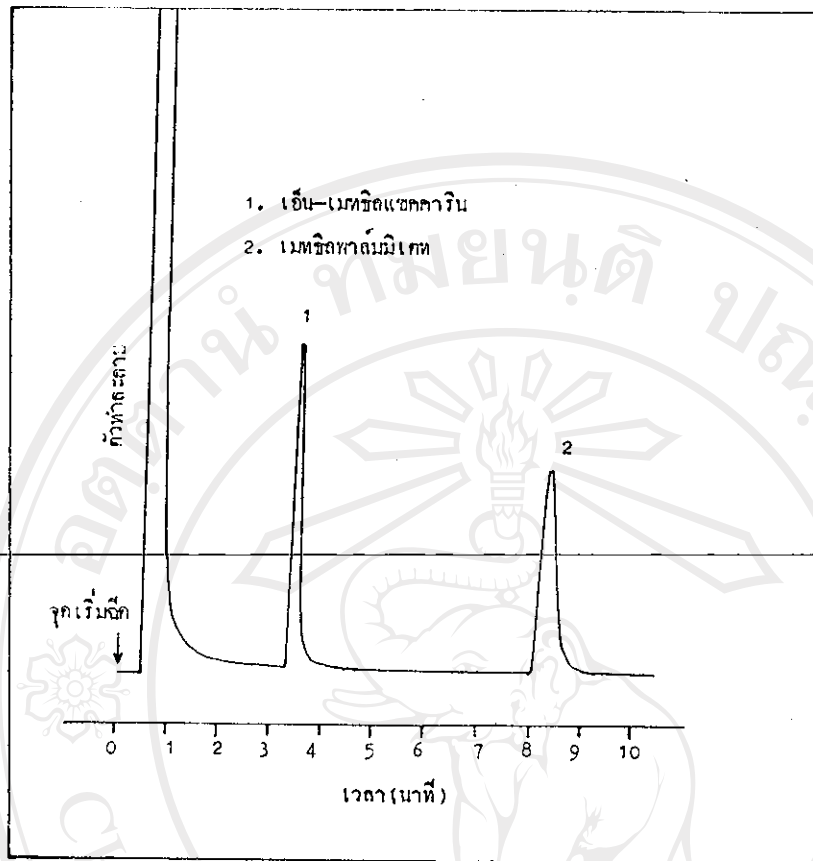
ผลการแยกเอ็น-เมทิลแซคคาริน และเมทิลพาล์มิเททโดยใช้เฟสที่เป็นของเหลวชนิดต่าง ๆ แสดงอยู่ในโครมาโตแกรมรูปที่ 4.1, 4.2 และ 4.3



รูปที่ 4.1 โครมาโตแกรมของเอ็น-เมทิลแซคคาริน และเมทิลพาล์มิเท ใช้ 4 % SE 30 + 6 % OV 210 เป็นเฟสของเหลว



รูปที่ 4.2 โครมาโตแกรมของเอ็น-เมทิลแซคคาริน และเมทิลพาล์มิเท ใช้ 3 % OV 1 เป็นเฟสของเหลว



รูปที่ 4.3 โครมาโตแกรมของเอ็น-เมทิลแซคคาริน และเมทิลพาล์มมีเตท ใช้ 10 % DC 200 เป็นเฟสของเหลว

จากโครมาโตแกรมในรูปที่ 4.1, 4.2 และ 4.3 จะเห็นว่าเมื่อใช้ 4 % SE 30 + 6 % OV 210 เป็นเฟสของเหลว พีกของเอ็น-เมทิลแซคคาริน และเมทิลพาล์มมีเตทจะแยกกันไม่ชัด ถ้าใช้ 3 % OV 1 และ 10 % DC 200 เป็นเฟสของเหลว พีกของเอ็น-เมทิลแซคคาริน และเมทิลพาล์มมีเตทจะแยกกันได้ดี แต่โครมาโตแกรมที่ได้จากเฟสของเหลวที่เป็น 3 % OV 1 จะเสียเวลามากกว่า ฉะนั้น 10 % DC 200 จึงเป็นเฟสของเหลวที่เหมาะสม

อัตราส่วนของอากาศและไฮโดรเจนก็เป็นส่วนสำคัญที่ทำให้การทอบสนองของระบบตรวจวัดดีหรือไม่ดี ถ้าอัตราส่วนของอากาศและไฮโดรเจนเหมาะสมจะทำให้ความไวของระบบตรวจวัดดี จากรูปที่ 3.6 และ 3.7 จะเห็นว่าความดันของอากาศและไฮโดรเจนประมาณ 25 และ 20 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ตามลำดับ ทำให้การทอบสนองของระบบตรวจวัดที่ดีที่สุด ซึ่งอัตราส่วนของอากาศต่อไฮโดรเจน 25:20 นี้ เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมที่ใช้ในงานวิจัยนี้

ประสิทธิภาพของคอลัมน์คู่ได้จากจำนวนแผ่นทางทฤษฎี (theoretical plates) คอลัมน์ที่ใช้นี้มีจำนวนแผ่นทางทฤษฎีประมาณ 3400 แผ่น หรือ 1700 แผ่นต่อเมตร ที่อัตราเร็วของก๊าซพา 64 ซม³/นาที ซึ่งเป็นอัตราเร็วของก๊าซพาที่เหมาะสมที่ทำให้ประสิทธิภาพของคอลัมน์สูงที่สุด โดยทั่ว ๆ ไปจำนวนแผ่นทางทฤษฎีไม่ควรจะต่ำกว่า 500 แผ่นต่อเมตร (46) ในที่นี้คอลัมน์ที่ใช้นี้มีจำนวนแผ่นทางทฤษฎี 1700 แผ่นต่อเมตร ซึ่งถือว่าเป็นคอลัมน์ที่มีประสิทธิภาพดี

จากรูปที่ 3.12 จะเห็นว่า linearity cut off ของเอ็น-เมทิลแซคคารินอยู่ที่ประมาณ 60 ไมโครกรัม ซึ่งเป็นช่วงที่กว้างในการทดลองความเข้มข้นของสารละลายที่เตรียมควรจะอยู่ในช่วงที่เป็นเส้นตรงของกราฟนี้คือตั้งแต่ 0 ถึง 60 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร การหาปริมาณแซคคารินโดยวิธีนี้มีความเบี่ยงเบนมาตรฐาน 1.22 และมีความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ 2.48 % นับว่าเป็นเทคนิคที่มีความแม่นยำสูง ร้อยละของการกลับคืนอยู่ในช่วง 93.72-101.15 สารตัวอย่างบางชนิดที่มีสารอื่น ๆ จำพวกกรดเบนโซอิก (benzoic acid), กรดซอร์บิก (sorbic acid) ซึ่งเป็นสารกันบูดปะปนอยู่ด้วย ก็ไม่มีผลต่อการวิเคราะห์หาปริมาณของแซคคารินเพราะสารพวกนี้มีเวลาริเทนชัน (retention time) ต่างกับของเอ็น-เมทิลแซคคาริน และเมทิลพาล์มมีเทอ (18) นับว่าการวิเคราะห์โดยวิธีนี้มีความจำเพาะเจาะจง (selectivity) สูง นอกจากนี้ยังพบว่าขีดจำกัดต่ำสุด (detection limit) ของวิธีนี้เป็น 3 ppm ทั้งนี้หาได้จากความเข้มข้นของสารละลายเอ็น-เมทิลแซคคารินที่ให้สัญญาณมีความสูงเป็น 2 เท่าของสัญญาณรบกวน (noise)