

การหาปริมาณนิโคตินในใบยาสูบ

2.1 คำนำ (15)

เนื่องจากนิโคตินเป็นแอลคาลอยด์ชนิดเดียวที่มีอยู่ถึง 90 % ขึ้นไปของแอลคาลอยด์ทั้งหมดในใบยาสูบ ซึ่งมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับคุณภาพของควันบุหรี่ในทางกลิ่น รส และความขวนสุม ถ้ามีนิโคตินมากแสดงถึงว่าใบยานั้นมีรสจืด แต่ถ้ามียากเกินไปจะมีรสแสบคอเนื่องจากควันค้างของนิโคติน ในทางตรงกันข้ามถ้าปริมาณนิโคตินน้อยใบยาจะขาดรสชาติ ไม่ขวนสุม ฉะนั้นเมื่อต้องการยาสูบไปผลิตบุหรี่ก็หาแร่ทำให้มีกลิ่นรส และความขวนสุมตามที่ต้องการ จึงต้องวิเคราะห์หาปริมาณนิโคตินในใบยาสูบ ซึ่งใบยาสูบชั้นดีควรมีปริมาณนิโคตินประมาณ 2.3 % นอกจากนั้นยังต้องวิเคราะห์เพื่อควบคุมปริมาณนิโคติน ในการทำบุหรี่ก็หาแร่เพราะว่าถ้ามีปริมาณนิโคตินมากอาจทำให้เกิดอันตรายต่อผู้สูบบ้างก็กล่าวแล้วในบทที่ 1 สำหรับประเทศไทยกระทรวงอุตสาหกรรมกำหนดว่า ในการทำบุหรี่ก็หาแร่ไม่ควรมีนิโคตินเกิน 12 มก./มวน

อนึ่งในการวิเคราะห์หาปริมาณนิโคตินในใบยาสูบมีหลายวิธีดังที่กล่าวมาแล้วในบทที่ 1 แต่ในบทนี้จะเป็นการวิเคราะห์หาปริมาณนิโคตินในใบยาสูบตัวอย่างโดยวิธีอุลตราไวโอเลตสเปกโตรโฟโตเมตรี (ultraviolet spectrophotometry) อาจสกัดนิโคตินออกจากใบยาสูบตัวอย่างได้ 2 วิธีคือ

1. การสกัดนิโคตินโดยวิธีกลั่นด้วยไอน้ำ (steam distillation)
2. การสกัดนิโคตินโดยวิธีการสกัดโดยตรง (direct extraction method)

2.2 การสกัดนิโคตินโดยวิธีกลั่นด้วยไอน้ำ

2.2.1 หลักการ

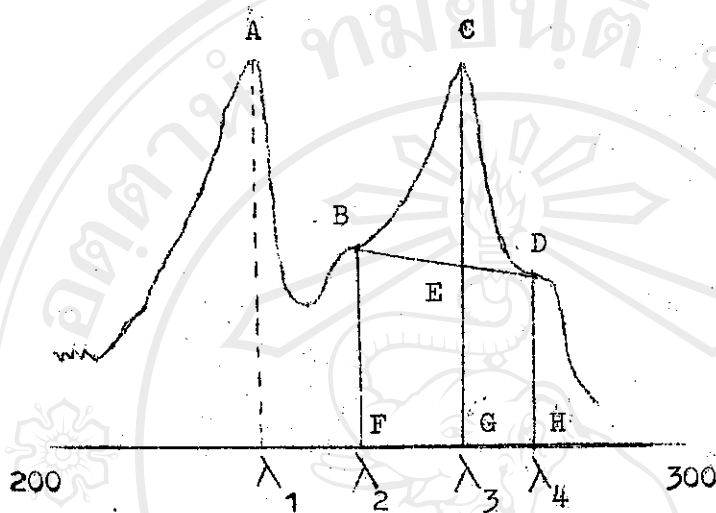
การกลั่นด้วยไอน้ำคือ (16) การกลั่นโดยใช้สารอินทรีย์และนำออกมาด้วยกัน สารที่กลั่นวิธีนี้ต้องไม่รวมเป็นเนื้อเดียวกันกับน้ำหรือไม่ละลายน้ำทั้งสารอินทรีย์และน้ำจะกลั่นออกมาที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเดือดของของเหลวทั้งสอง

เนื่องจากนิโคตินคือ สารอินทรีย์อยู่ในรูปแอลคาลอยด์ในใบยาสูบ และเป็นน้ำมันไม่มีสี ซึ่งไม่ละลายน้ำ ดังนั้นจึงสามารถแยกนิโคตินออกจากใบยาสูบได้โดยการกลั่นด้วยไอน้ำด้วยการเติมเบสลงไปเพื่อเป็นตัวสกัด จะได้นิโคตินอยู่ในรูป เบสอิสระ (free base) เมื่อนำไปทำปฏิกิริยากับกรดไฮโดรคลอริกจะได้นิโคตินไคคลอเรต (nicotine dichlorate) ซึ่งเมื่อนำไปวัดโดยเครื่องมือสเปกโตรโฟโตมิเตอร์แล้วจะดูดกลืนแสงในช่วงอุลตราไวโอเลต เพราะฉะนั้นจึงสามารถหาปริมาณนิโคตินได้โดยวิธีอุลตราไวโอเลต สเปกโตรโฟโตเมตรี โดยอาศัยคุณสมบัติเฉพาะตัวของนิโคตินในการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลตที่ให้ค่าดูดกลืนแสงสูงสุด 2 ค่าคือ ที่ความยาว 208 และ 259 nm ตามลำดับ เมื่ออยู่ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ในปี ค.ศ. 1950 Willits (13) ได้ทดลองโดยใช้เครื่องมือ Beckman Model DU spectrophotometer เป็นเครื่องมือแบบเก่าไม่มีเครื่องบันทึกสเปกตรัม ได้วัดค่าการดูดกลืนแสงของนิโคตินในย่านอุลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่นต่าง ๆ และหาปริมาณนิโคตินโดยการวัดความสูงของ peak ที่ความยาวคลื่น (λ_{max} 259 nm โดยใช้ base line technique ได้วัดค่าการดูดกลืนแสงที่เส้นฐานของ peak (236 และ 282 nm) และวัดค่าการดูดกลืนแสงของยอด peak ที่ความยาวคลื่น 259 nm ต่อมาในปี ค.ศ. 1957 Griffith (17) ได้ทำการทดลองหาปริมาณนิโคตินเหมือนการทดลองของ Willits และได้คำนวณสมการในการหาเปอร์เซ็นต์นิโคตินดังนี้

$$\% \text{ nicotine} = \frac{A_{259} - \left[\frac{A_{236} + A_{282}}{2} \right] \cdot 780}{\text{gram sample of tobacco}}$$

เมื่อ A = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่าง ๆ

สำหรับงานวิจัยนี้ได้หาเปอร์เซ็นต์โคตินโดยใช้วิธีที่เรียกว่า base line technique โดยอาศัยหลักการ จากอุลตราไวโอเลตสเปกตรัม ดังรูป 2.1



รูป 2.1 วิธีแปลนจากอุลตราไวโอเลตสเปกตรัมโดยใช้ base line technique

A	=	λ_1	nm
B	=	λ_2	nm
C	=	λ_3	nm
D	=	λ_4	nm

จากรูป 2.1 จะเห็นว่าสำหรับสารที่ดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น λ_1 (peak A) และ λ_3 (peak C) ต้องการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ λ_3 โดยใช้ base line technique (18, 19) เพราะ peak A ใกล้กับความยาวคลื่นในช่วง far UV ซึ่งอาจเกิด stray radiation ใต้งายจากความชื้น, ออกซิเจน, ไนโตรเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ใดเปลี่ยนแปลงไป

วิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน และของสารตัวอย่างโดยอาศัย base line technique ทำได้โดยการวัดปริมาณการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น λ_2 , λ_3 และ λ_4 คือ จุด B, C และ D ตามลำดับ แล้วนำไปคำนวณหาค่าการดูดกลืนแสงที่ CE (ดูรูป 2.1)

$$CE = CG - \frac{(BF + DH)}{2}$$

นำค่า CE ที่ได้จากสารมาตรฐานที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ มาเขียนกราฟเทียบกับความเข้มข้นจะได้กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรง หาปริมาณสารที่สนใจจากสารตัวอย่าง โดยนำค่า CE ที่หาได้นี้ไปเปรียบเทียบกับปริมาณการดูดกลืนแสง CE ของสารละลายมาตรฐาน ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนจากกราฟมาตรฐาน (standard graph)

2.3 การทดลอง

2.3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. Varian techtron Model 635 Ultraviolet-Visible Recording Spectrophotometer

ผลิตโดย Varian techtron PTY Ltd., Australia.,

- 1 Pen Recorder Model 135 A

ผลิตโดย Matsushita Communication Industrial Co., Ltd.,
Japan

Condition ที่ใช้ศึกษาการดูดกลืนแสงของสาร

absorbance 0-2.0 fsd

slit width 1.0 nm

2. Pye-Unicam SP 8000 Ultraviolet-Visible Recording Spectrophotometer

ผลิตโดยบริษัท Pye-Unicam Ltd., Cambridge England

Conditions ที่ใช้การศึกษา spectrum

absorbance 0-1.0 fsd

scan speed slow

3. Atomic Absorption Spectrophotometer รุ่น AA-275

ผลิตโดย Varian Techtron PTY Ltd., Australia

4. pH meter model D 812 Weilheim

ผลิตโดยบริษัท Wiss-Techn, Werkstaten, Germany

5. Hot plate

ผลิตโดยบริษัท Cenco Instrumenten MIJ. Nov. Breda, The Netherlands

6. Hollow cathode lamp of lead element, Copper element, Sodium element, Potassium element, Nickel element, Manganese element, Cadmium element และ Iron (Ferrum) element

ผลิตโดยบริษัท Varian techtron PTY Ltd., Australia

7. ตะแกรงร่อนขนาด 35 mesh

8. คู่มือสารผลิตโดย Central Scientific Division of Cenco Instruments Corporation Netherlands

2.3.2 สารเคมีที่ใช้

1. Sodium chloride, analytical grade

ผลิตโดยบริษัท E.Merck A.G.Darmstadt, Germany

2. Hydrochloric acid, analytical grade

ผลิตโดยบริษัท BDH Chemicals Ltd., England

3. Standard nicotine liquid, analytical grade
ผลิตโดยบริษัท BDH Chemicals Ltd., England
4. Sodium hydroxide, analytical grade
ผลิตโดยบริษัท BDH Chemicals Ltd., England
5. Lead nitrate, analytical grade
ผลิตโดยบริษัท BDH Chemicals Ltd., England
6. Cadmium chloride, analytical grade
ผลิตโดยบริษัท BDH Chemicals Ltd., England
7. Maganese chloride, analytical grade
ผลิตโดยบริษัท BDH Chemicals Ltd., England
8. Nickel sulphate, analytical grade
ผลิตโดยบริษัท E.Merck A.G. Darmstadt, Germany
9. Ammonium sulphate, analytical grade
ผลิตโดยบริษัท E.Merck A.G. Darmstadt, Germany
10. Ammonium dihydrogenphosphate, analytical grade
ผลิตโดยบริษัท E.Merck A.G. Darmstadt, Germany
11. Ammonium chloride, analytical grade
ผลิตโดยบริษัท E.Merck A.G. Darmstadt, Germany
12. Ferric nitrate solution, spectrograde
ผลิตโดยบริษัท BDH Chemicals Ltd., England
13. Lithium chloride, not less than 99 % on dried
ผลิตโดยบริษัท BDH Chemicals Ltd., England
14. Nitric acid, analytical grade
ผลิตโดยบริษัท May & Baker Ltd., Dagenhan England

15. Hydrogen peroxide 35 %, analytical grade

ผลิตโดยบริษัท BDH Chemicals Ltd., England

16. Copper nitrate, Purum

ผลิตโดยบริษัท BDH Chemicals Ltd., England

17. Sodium standard solution, $1000 \mu\text{g}/\text{cm}^3$, analytical grade

ผลิตโดยบริษัท E.Merck A.G.Darmstadt, Germany

18. Potassium standard solution, $1000 \mu\text{g}/\text{cm}^3$, analytical grade

ผลิตโดยบริษัท E.Merck A.G.Darmstadt, Germany

2.3.3 การเตรียมสารละลาย

2.3.3.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานของนิโคติน

ปิเปตสารละลายมาตรฐานนิโคติน 0.25 cm^3 ละลายด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น $0.05 \text{ mole}/\text{dm}^3$ จนได้ปริมาตร 500 cm^3 ในขวดปริมาตร (volumetric flask) จะได้สารละลายมีความเข้มข้น 500 ppm นำสารละลายของนิโคตินมา 1, 2, 3, 4, 5, 6 cm^3 ใส่ลงในขวดปริมาตรขนาด 100 cm^3 แล้วเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น $0.5 \text{ mole}/\text{dm}^3$ ให้มีปริมาตร 100 cm^3 จะได้สารละลายนิโคตินมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 5, 10, 15, 20, 25, 30 ppm ตามลำดับ

2.3.3.2 การเตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.5, 2, 3, 4

และ $5 \text{ mole}/\text{dm}^3$

นำกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นจำนวน 126 cm^3 เทลงในน้ำกลั่นในขวดปริมาตรขนาด 250 cm^3 แล้วทำให้ครบปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจะได้สารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น $6 \text{ mole}/\text{dm}^3$ ซึ่งเป็น stock solution สำหรับเตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้นอื่นต่อไป

All rights reserved

2.3.3.3 การเตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 %

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์มา 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้ว ทำให้มีปริมาตรครบ 100 cm^3 ในขวดปริมาตรจะได้อาหารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 % ตามลำดับ

2.3.3.4 การเตรียม interfering ions 1000 ppm

สารละลาย interfering cations และ interfering anions ที่คาดว่าจะมีผลกระทบต่อการวิเคราะห์นิกโคติน ได้เตรียมให้มีความเข้มข้น 1,000 ppm ใน deionised water จำนวน 50 cm^3 ในขวดปริมาตร ดังตาราง 2.1

ตาราง 2.1 การเตรียมสารละลาย interfering cation และ interfering anion ต่าง ๆ ให้มีความเข้มข้น 1,000 ppm จำนวน 50 cm^3 ในขวดปริมาตร

สารละลาย interfering ions	สารที่ใช้	ปริมาณที่ใช้ (กรัม)
Cd^{2+}	$\text{CdCl}_2 \cdot 2\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$	0.1015
Mn^{2+}	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.1801
Ni^{2+}	$\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.2238
Cu^{2+}	$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	0.1901
Na^+	NaCl	0.1271
K^+	KCl	0.0953
Pb^{2+}	$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	0.1299
PO_4^{2-}	$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	0.0605
SO_4^{2-}	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.0687
Cl^-	NH_4Cl	0.0754

2.3.4 การเก็บใบยาสูบตัวอย่าง

ใบยาสูบตัวอย่างได้รับความอนุเคราะห์จากคุณไพฑูรย์ ชลารักษ์ ผู้จัดการฝ่ายซื้อบริษัทอินเตอร์เอเซียโนทเบคโค เอ็กซ์พอร์ต จำกัด ซึ่งได้เก็บใบยาสูบจากจังหวัดต่าง ๆ ในเขตภาคเหนือของประเทศไทย ตามตำบล อำเภอและจังหวัดต่าง ๆ ดังตาราง 2.2

ตาราง 2.2 ตัวอย่างใบยาสูบที่ใช้ในการหาปริมาณนิโคตินจากจังหวัดต่าง ๆ

หมายเลขใบยาสูบ ตัวอย่าง	ตำบล	อำเภอ	จังหวัด
1	แม่เจดีย์	แม่จัน	เชียงราย
2	ห้วยสัก	เมือง	เชียงราย
3	ในเวียง	เมือง	เชียงราย
4	วังเหนือ	วังเหนือ	ลำปาง
5	सान	สา	น่าน
6	ม่วงชุม	เชียงคำ	พะเยา
7	บ้านเชียงของ	เชียงของ	เชียงราย
8	บ้านลอง	สอง	แพร่
9	บ้านเกาะสวรรค์	สา	น่าน
10	บ้านม่วง	เชียงม่วน	พะเยา
11	วังขง	เมือง	แพร่
12	บ้านแก่งหวาย	เมือง	เชียงราย
13	ท่าฟ้า	ปง	พะเยา
14	บ้านฮะ	หางดง	เชียงใหม่
15	บ้านถ้ำ	ดอกคำใต้	พะเยา
16	บ้านหนองนก	สา	น่าน

ตาราง 2.2 ต่อ

หมายเลขใบยาสูบ ตัวอย่าง	ตำบล	อำเภอ	จังหวัด
17	บ้านหนองแดง	เขื่องกลาง	น่าน
18	บ้านเพงษ์	แมจริม	น่าน
19	บ้านทุ่งกลาง	เมือง	แพร่
20	บ้านคอนตัน	ท่าวังผา	น่าน
* 21	บ้านกาด	สันป่าตอง	เชียงใหม่

หมายเหตุ

- * ใช้หาสภาวะ (conditions) ที่เหมาะสม โดยวิธีสกัดโดยตรง (direct extraction method)

2.3.5 การเตรียมใบยาสูบตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์

- นำตัวอย่างใบยาสูบที่เก็บมาทั้งหมดไปอบที่อุณหภูมิ $60-65^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- บดใบยาสูบด้วย mortar ไล่ละเอียด แล้วร่อนผ่านตะแกรง 35 mesh
- เก็บใบยาที่ร่อนแล้วในขวด polyethylene เพื่อป้องกันการดูดความชื้น
- นำใบยาไปชั่งประมาณ 0.2-0.3 กรัม ด้วยเครื่องชั่งอย่างละเอียด ซึ่งบรรจุใน gelatin capsules No.3

2.3.6 วิธีวิเคราะห์หาปริมาณนิโคตินในใบยาสูบตัวอย่าง

ก่อนที่จะวิเคราะห์หาปริมาณนิโคตินในใบยาสูบตัวอย่าง จึงจำเป็นต้อง
 ยิงที่จะต้องศึกษาสเปกตรัมของนิโคตินในสารละลายมาตรฐานเสียก่อน เพื่อจะได้วัด
 ค่าดูดกลืนแสงที่ λ_{max} ที่เหมาะสมต่อไป

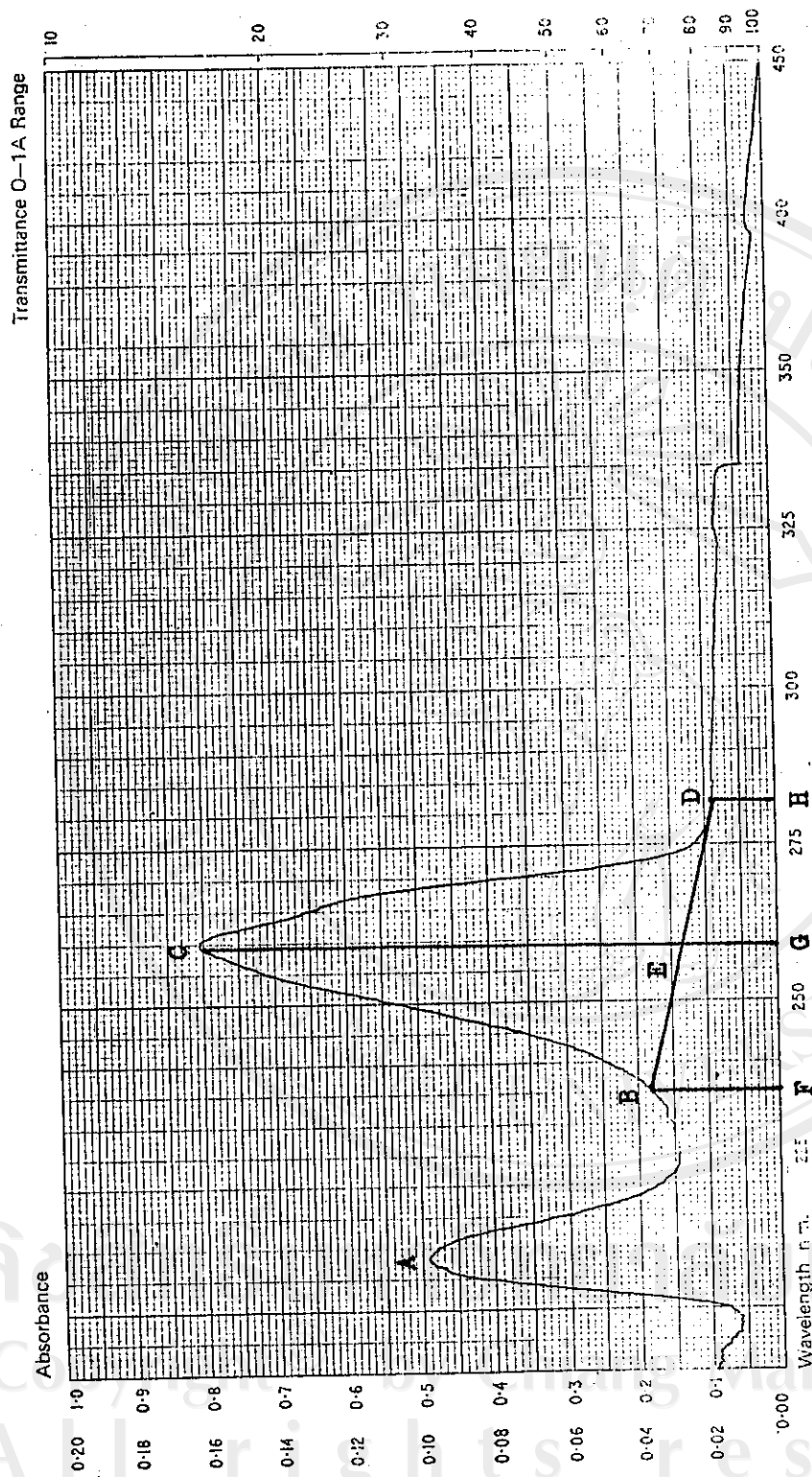
2.3.6.1 การศึกษาสเปกตรัมของสารละลายนิโคตินมาตรฐาน (40 ppm)

ใช้ปิเปตดูดสารละลายมาตรฐานนิโคตินในกรดไฮโดรคลอริก (0.05 mol/dm³) ซึ่งมีความเข้มข้น 500 ppm มาจำนวน 6 cm³ ในขวดปริมาตร 100 cm³ แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นจาก 190-450 nm ด้วยเครื่องมือ Pye-Unicam SP 8000 Ultraviolet-Visible Recording Spectrophotometer ซึ่งสามารถบันทึกสเปกตรัมโดยอัตโนมัติได้ สเปกตรัมดังรูป 2.2 จะเห็นว่าสเปกตรัมของนิโคตินประกอบด้วยสอง peaks คือที่ $\lambda_{\max}$ 208 nm และ 259 nm ตามลำดับ peak ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 259 nm เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณของนิโคติน เพราะค่าการดูดกลืนแสงสูงกว่า peak ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 208 nm และอยู่ในย่านอุลตราไวโอเลตซึ่งห่างไกลจากคลื่นแสง far UV. จึงปราศจากผลกระทบจากความขุ่น ออกซิเจน ไนโตรเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไม่เปลี่ยนแปลง

เมื่อศึกษาจาก peak ที่มี $\lambda_{\max}$ 259 nm จะเห็นว่ามีการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 3 ค่า คือ 236, 259 และ 282 nm ดังรูป 2.2 คือจุด B, C และ D ตามลำดับ จากหลักการในหัวข้อ 2.2.1 สามารถสร้าง base line technique โดยทำการวัดปริมาณการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 236, 259 และ 282 nm แล้วนำไปคำนวณหาปริมาณการดูดกลืนแสงที่ CE (รูป 2.2)

$$CE = CG - \frac{(BF + DH)}{2}$$

นำค่า CE ที่ได้นี้ไปเปรียบเทียบกับปริมาณการดูดกลืนแสง CE ของสารละลายมาตรฐานนิโคตินที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนจากกราฟมาตรฐาน



รูป 2.2 สเปกตรัมของสารละลายมาตรฐานไนโคตินในกรดไฮโดรคลอริก

2.3.6.2 การสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve)

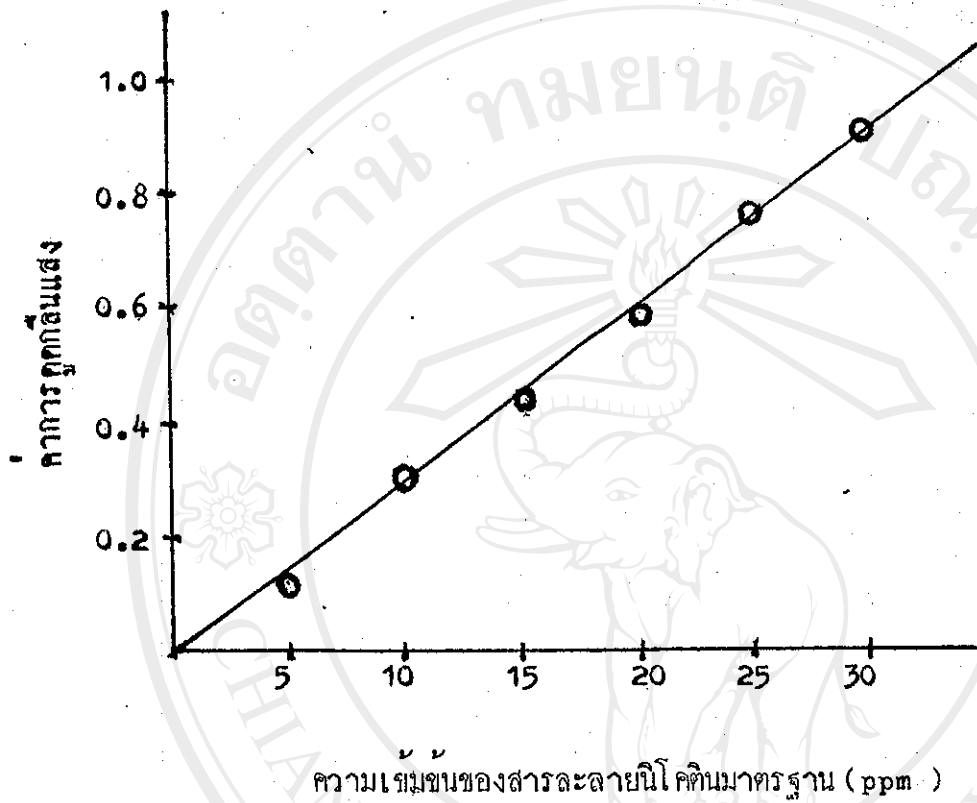
เตรียมสารละลายมาตรฐานนิโคตินซึ่งมีความเข้มข้นในช่วง 5-30 ppm นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยสเปกโตรมิเตอร์ที่มีลักษณะดังแสดงในรูป 2.2 เมื่อคำนวณค่าการดูดกลืนแสง (CE) โดย base line technique ได้ข้อมูลระหว่างปริมาณการดูดกลืนแสง และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานนิโคตินดังแสดงในตาราง 2.3

ตาราง 2.3 ค่าดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานนิโคติน (absorbance of standard nicotine solution)

ความเข้มข้นของนิโคติน (ppm)	absorbance			
	(1)	(2)	(3)	เฉลี่ย
5	0.118	0.118	0.117	0.118
10	0.300	0.302	0.298	0.300
15	0.425	0.426	0.426	0.426
20	0.593	0.597	0.595	0.595
25	0.750	0.750	0.750	0.750
30	0.902	0.906	0.904	0.904

นำข้อมูลในตาราง 2.3 ไปสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน โดยพล็อตระหว่างปริมาณการดูดกลืนแสง และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานนิโคตินได้กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรงผ่านจุดศูนย์ (รูป 2.3)

Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



รูป 2.3 กราฟมาตรฐานของปริมาณการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลายไนโตรเจนมาตรฐาน (0-30 ppm)

2.3.6.3 วิธีสกัดนิกโคตินจากใบยาสูบตัวอย่าง (17)

นำใบยาสูบที่เตรียมมาแล้วในหัวข้อ 2.2.5 มากลั่นด้วยเครื่องมือการกลั่นด้วยไอน้ำ ดังรูป 2.5 เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 25 % ซึ่งอิ่มตัวด้วยโซเดียมคลอไรด์ปริมาตร 5 cm^3 ไอน้ำที่กลั่นไอน้ำลงในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 4 mol/dm^3 มีปริมาตร 10 cm^3 นำปริมาตรสารละลายสุดท้ายหลังจากการกลั่นเป็น 250 cm^3 ด้วย deionised water ในขวดปริมาตร เขย่าสารละลายประมาณ 1 นาที เมื่อนำไปวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอุลตราไวโอเลตสเปกโตรโฟโตมิเตอร์จะได้อ่านค่าดังรูป 2.4 ขณะทำการกลั่นต้องควบคุมปริมาตรสารละลายขวดกลั่นไม่เกิน 15 cm^3 โดยใช้ตะเกียงบนเตา ดังรูป 2.5

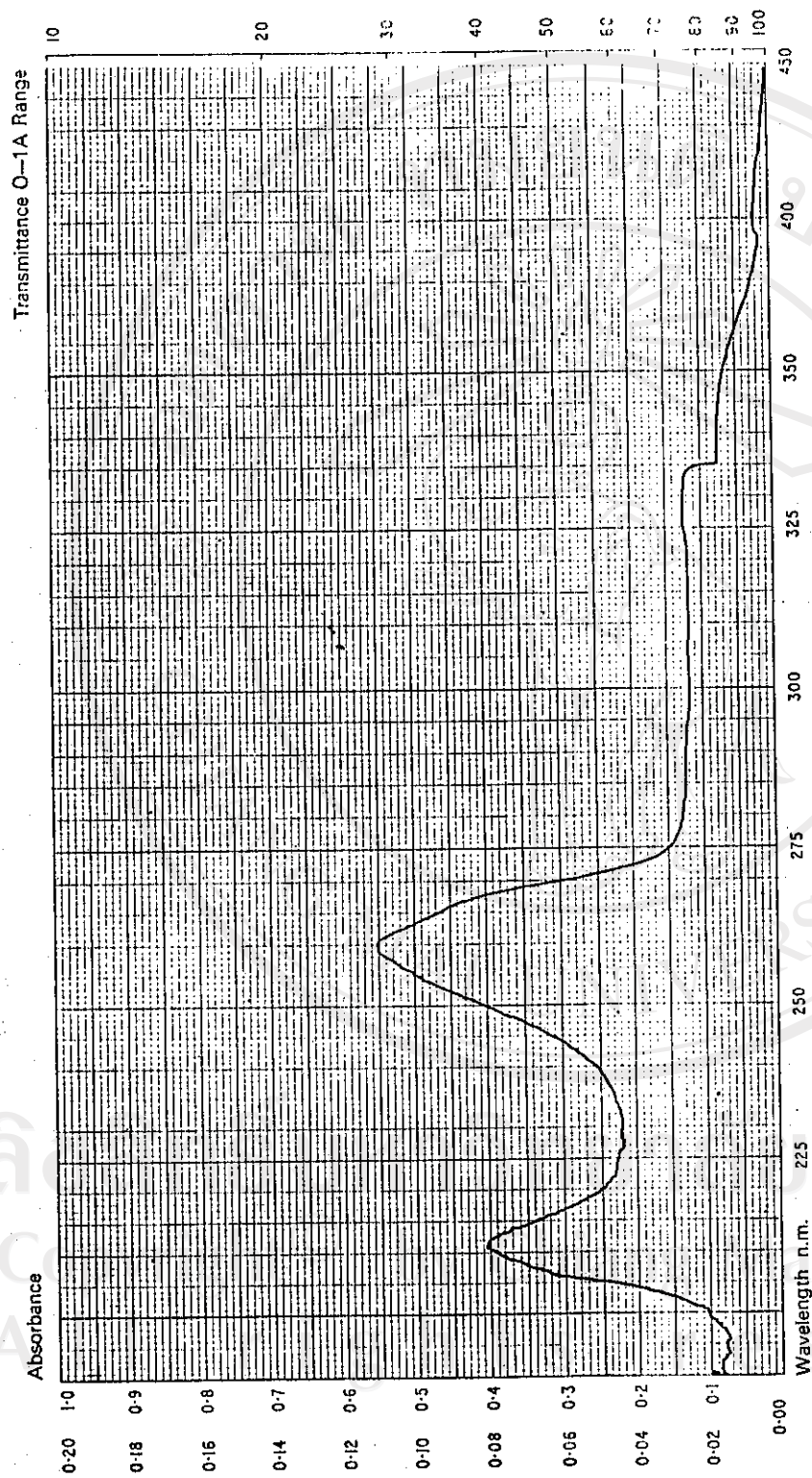
2.3.6.4 การหาปริมาณนิกโคตินในใบยาสูบตัวอย่าง

- (1) วัดปริมาณการดูดกลืนแสงที่จุด B, C และ D (ดังรูป 2.2) เช่นเดียวกับสารมาตรฐาน เพื่อคำนวณหาค่าปริมาณการดูดกลืนแสง
- (2) นำค่า CE ที่ได้ไปเทียบกับปริมาณการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน นิกโคติน ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนจากกราฟมาตรฐาน เพื่อคำนวณหาปริมาณนิกโคตินในใบยาสูบตัวอย่าง

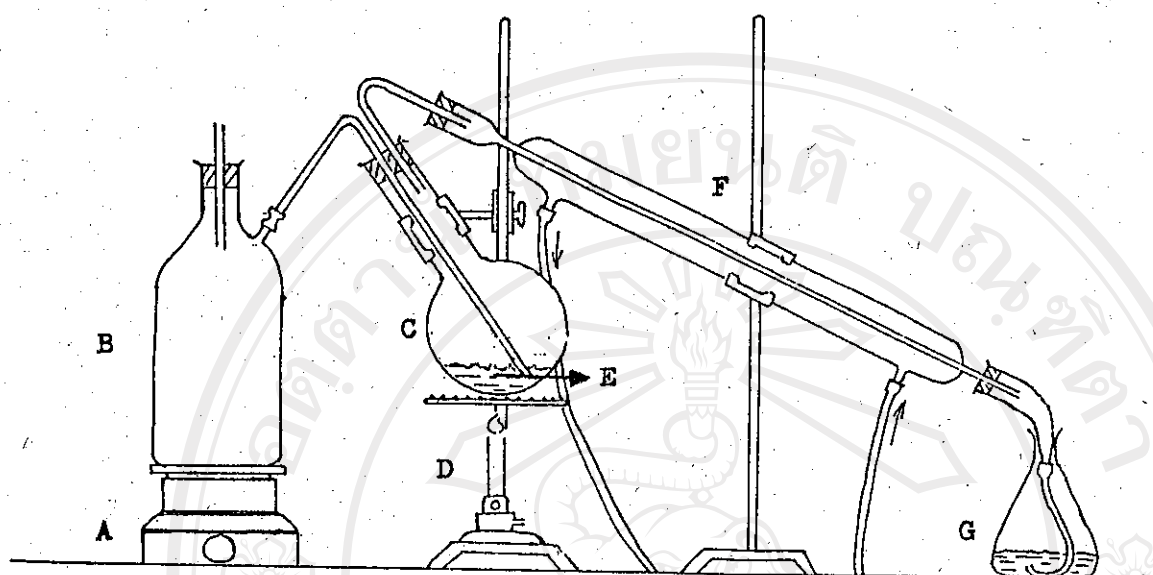
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved



รูป 2.4. สเปกตรัมของสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตได้จากการแยกด้วยวิธีโครมาโตกราฟี



รูป 2.5 เครื่องมือการกลั่นด้วยไอน้ำ

- A = Heater
- B = Water Bath
- C = Steam Distillation Flask
- D = Bunsen Burner
- E = Tobacco sample+NaOH+NaCl (saturated)
- F = Condenser
- G = Erlenmeyer Flask

2.3.7 ผลการทดลองและวิจารณ์

2.3.7.1 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมของการทดลอง

การทำปริมาณวิเคราะห์โดยวิธีใด ๆ ก็ตาม จำเป็นต้องศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิคที่เลือกใช้เสียก่อน เพื่อจะได้ผลการทดลองที่ถูกต้องและแม่นยำ ดังนั้นการสกัดนิโคตินโดยวิธีการกลั่นด้วยไอน้ำแล้วนำมาวิเคราะห์โดยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตริกจะต้องศึกษาถึงปัจจัยต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

ก. การศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการกลั่นด้วยไอน้ำ

ในการศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่าง ๆ ใช้ในยาสูบตัวอย่างจากตำบลบ้านทุ่งกลาง อ. เมือง จ. แพร่ (ตัวอย่างหมายเลข 19)

วิธีทดลองทำการทดลองเหมือนกับหัวข้อ 2.3.6.3 และหัวข้อ 2.3.6.4 โดยแปรผันเวลาที่ใช้ในการกลั่นด้วยไอน้ำ ในเวลา 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 นาที ตามลำดับ ได้ผลการทดลองดังแสดงในตาราง 2.4

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved

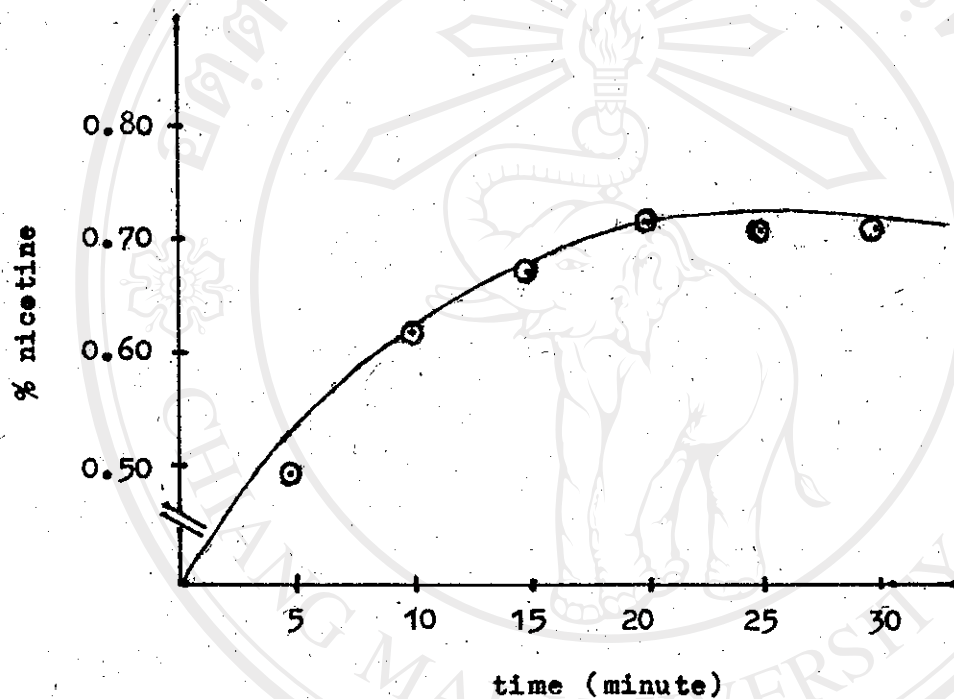
ตาราง 2.4 ผลของเวลาที่ใช้ในการกลั่นตัวไอน้ำ

time (minute)	volume of distillation (cm ³)				weight of sample(g)			absorbance *			% nicotine		
	(1)	(2)	(3)	average	(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)average
5	44.5	46.5	45	45.33	0.2368	0.2857	0.2594	0.135	0.170	0.158	0.48	0.53	0.49 0.50
10	86.5	85.5	85.5	85.83	0.2454	0.2678	0.2288	0.180	0.197	0.176	0.61	0.63	0.63 0.62
15	126	124	125	125	0.2831	0.2822	0.2574	0.220	0.213	0.220	0.70	0.65	0.66 0.67
20	165	168	167	166.67	0.2745	0.2812	0.2375	0.233	0.253	0.199	0.71	0.73	0.71 0.72
25	215	215.5	216	215.5	0.2418	0.2693	0.2527	0.208	0.223	0.208	0.72	0.70	0.69 0.70
30	252	254	252	252.67	0.2878	0.2908	0.2513	0.244	0.267	0.205	0.69	0.73	0.70 0.71

* ค่าดูดกลืนแสง (ระยะ CE)

เลขในวงเล็บหมายถึงการทดลองครั้งที่

เมื่อนำข้อมูลจากตาราง 2.4 มาเขียนกราฟระหว่างปริมาณนิโคตินที่หาได้เป็นร้อยละกับเวลาที่ใช้ในการกลั่นได้กราฟ ดังแสดงในรูป 2.6



รูป 2.6 ปริมาณนิโคตินที่หาได้เป็นร้อยละกับเวลาต่าง ๆ ที่ใช้ในการกลั่น
ถ้วยโอนำ

จากตาราง 2.3 และรูป 2.6 แสดงว่าในการสกัดโคตินโดยการกลั่นด้วยไอน้ำ ช่วงเวลา 5, 10 และ 15 นาที ปริมาณโคตินที่สกัดได้จะมีค่าเพิ่มขึ้น 0.50, 0.62 และ 0.67 % ตามลำดับ เส้นกราฟจะชันขึ้น แสดงว่าช่วงนี้การสกัดโคตินยังสกัดไม่หมด แต่พอถึงช่วงเวลา 20, 25 และ 30 นาที ปริมาณโคตินที่สกัดได้จะมีค่าเป็น 0.72, 0.70 และ 0.71 % ตามลำดับ ซึ่งค่าเหล่านี้ควรจะมีความเท่ากันและกราฟควรจะเป็นเส้นตรงขนานกับแกนราบ ค่าที่แตกต่างกันเล็กน้อยนี้อาจเกิดจากความคลาดเคลื่อนของการทดลองหรือเครื่องมือก็ได้ จากกราฟจะใช้เวลา 20 นาที เป็นเวลาน้อยที่สุดในการสกัดโคตินออกจากใบยาสูบหมกพอดี้ ดังนั้นในการทดลองต่อไปต้องใช้เวลา 20 นาที ในการสกัดโคตินด้วยการกลั่นด้วยไอน้ำ

ข. การศึกษาความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เหมาะสมในการกลั่นด้วยไอน้ำ

โซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นตัวสกัดโคตินออกจากใบยาสูบให้อยู่ในรูปเบสอิสระและพร้อมที่จะระเหยปนมากับไอน้ำเดือด ดังนั้นในการทดลองหาความเข้มข้นที่เหมาะสม ในการสกัดโคตินให้มากที่สุดจึงแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 10, 15, 20, 25, 30, 35 และ 40 % ตามลำดับ ใช้ปริมาตร 5 cm³ วิธีทดลองทำการทดลองเหมือนหัวข้อ 2.3.6.3 และหัวข้อ 2.3.6.4 โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมที่ได้ผลการทดลองในข้อ ก. ได้ผลการทดลองดังแสดงในตาราง 2.5

ตาราง 2.5 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ต่อการสกัดนิโคตินในใบยาสูบ

%ความ เข้มข้น NaOH	weight of sample (g)			absorbance *			% nicotine			
	(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)	average
10	0.2618	0.2998	0.2630	0.163	0.204	0.170	0.48	0.56	0.55	0.53
15	0.2936	0.2580	0.2875	0.203	0.173	0.216	0.58	0.56	0.63	0.59
20	0.2640	0.2482	0.2529	0.200	0.204	0.205	0.63	0.67	0.67	0.66
25	0.2965	0.2437	0.2760	0.255	0.215	0.232	0.72	0.74	0.70	0.72
30	0.2561	0.2354	0.2566	0.256	0.212	0.265	0.83	0.87	0.85	0.85
35	0.2724	0.2952	0.2579	0.185	0.214	0.169	0.55	0.61	0.56	0.57
40	0.2574	0.2642	0.2933	0.166	0.166	0.167	0.56	0.94	0.49	0.53

* ค่าที่กลั่นแสง (ระยะ 0.5)

จากตาราง 2.5 แสดงว่าการสกัดนิโคตินด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 30 % จะให้ผลดีกว่าความเข้มข้นอื่น ๆ ที่เป็นเช่นนี้เพราะในการกลั่นด้วยไอน้ำนอกจากจะมีนิโคตินปนมากับไอน้ำแล้วยังมีนอร์นิโคติน (nornicotine) ปนมาอีก (14) และโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 30 % เป็นความเข้มข้นพอดีที่สกัดนิโคตินได้มากที่สุด ถ้าความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์มากกว่านี้เช่น 35 และ 40 % ปริมาณนิโคตินที่สกัดได้จะน้อยลง แต่ปริมาณนอร์นิโคตินจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของด่าง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Aven (20) ในการหาปริมาณนิโคตินและนอร์นิโคตินโดยการกลั่นด้วยไอน้ำแล้วทำการตกตะกอน ดังนั้นในการทดลองต่อไปต้องใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 30 % ในการสกัดนิโคติน

ค. การศึกษาปริมาณของโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 30 % ที่เหมาะสมในการสกัดนิโคติน

เมื่อศึกษาพบว่าความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ 30 % สามารถสกัดนิโคตินได้มากที่สุด แต่ก็ยังสงสัยว่าจะเพิ่มลงไปปริมาณเท่าไรการสกัดจึงจะได้มากที่สุด ดังนั้นการทดลองจึงแปรผันปริมาณของโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 30 % ปริมาตร 3, 4, 5, 6 และ 7 cm³ ตามลำดับ วิธีการทดลองทำการทดลองเหมือนหัวข้อ 2.3.6.3 และหัวข้อ 2.3.6.4 และใช้ภาวะที่เหมาะสมที่ได้ผลการทดลองในข้อ ก-ข ขณะทำการกลั่นต้องควบคุมสารละลายในขวดกลั่นไม่เกิน 15 cm³ โดยใช้ความร้อนจากตะเกียง (ดูรูป 2.5) ได้ผลการทดลองดังแสดงในตาราง 2.6

ตาราง 2.6 ผลของปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 30% ต่อการสกัดนิโคติน

volume NaOH30% (cm ³)	weight of sample (g)			absorbance *			% nicotine			
	(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)	average
3	0.2584	0.2535	0.2690	0.261	0.246	0.265	0.85	0.81	0.81	0.82
4	0.2672	0.2586	0.2557	0.272	0.258	0.245	0.84	0.85	0.81	0.83
5	0.2561	0.2677	0.2645	0.258	0.277	0.274	0.83	0.86	0.87	0.85
6	0.2555	0.2498	0.2601	0.250	0.245	0.257	0.81	0.83	0.82	0.82
7	0.2540	0.2672	0.2496	0.248	0.264	0.245	0.81	0.82	0.83	0.82

* ค่าดูดกลืนแสงระยะ (CE)

จากตาราง 2.6 แสดงว่าโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 30 % ปริมาตร 3, 4, 5, 6 และ 7 cm³ สกัดนิโคตินออกจากใบยาสูบได้ปริมาณนิโคตินใกล้เคียงกัน อาจเป็นเพราะในการสกัดนิโคตินขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของคางมากกว่าปริมาณของคางที่เพิ่มลงไป แต่อย่างไรก็ตามปริมาณของโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 30 % จำนวน

5 cm³ เป็นปริมาตรพอที่จะทำให้การสกัดได้มากที่สุด ดังนั้นในการทดลองต่อไปต้องใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 30 % ปริมาตร 5 cm³ ในการสกัดนิโคติน

ง. การศึกษาความเหมาะสมในการใช้กรดไฮโดรคลอริกเป็นตัวรองรับสารละลายที่ได้จากการกลั่นด้วยไอน้ำ

ดังที่กล่าวมาแล้วในการสกัดนิโคตินโดยการกลั่นด้วยไอน้ำ นอกจากจะมีนิโคตินที่ถูกสกัดออกมาแล้วยังมีนอร์นิโคตินที่ปนมากับไอน้ำซึ่งมีไม่เกิน 10 % ของปริมาณนิโคตินในใบยาสูบ (15) เมื่อนำนอร์นิโคตินมาทำปฏิกิริยากับกรดไฮโดรคลอริกจะไม่เกิดนอร์นิโคตินไดคลอเรต (ในรูปของเกลือ) เพราะนอร์นิโคตินเป็นสารประกอบชนิด secondary amine เมื่ออยู่ในรูปของเกลือจะไม่เสถียร (unstable) ส่วนนิโคตินเป็นสารประกอบชนิด tertiary amine เมื่อทำปฏิกิริยากับกรดไฮโดรคลอริกจะได้นิโคตินไดคลอเรต เมื่ออยู่ในรูปของเกลือจะเสถียร (stable) จากเหตุผลดังกล่าวสามารถแยกนิโคตินออกจากนอร์นิโคตินให้อยู่ในรูปนิโคตินไดคลอเรตโดยการนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงจะได้อาการดูดกลืนแสงเฉพาะค่าของมันที่ความยาวคลื่น 236, 259 และ 282nm ดังรูป 2.2 ดังนั้นในการทดลองจึงจำเป็นต้องหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของกรดไฮโดรคลอริกปริมาตร 10 cm³ เป็นตัวรองรับสารละลายที่กลั่นได้ เพื่อทำปฏิกิริยาได้พอดีกับปริมาณนิโคตินที่กลั่นได้ โดยแปรผันความเข้มข้น 2, 3, 4 และ 5 mole/dm³ ตามลำดับ วิธีการทดลอง ทำการทดลองเหมือนหัวข้อ 2.3.6.3 และหัวข้อ 2.3.6.4 และใช้ภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากผลการทดลองในข้อ ก-ค ได้แก่ผลการทดลองดังแสดงในตาราง 2.7

ตาราง 2.7 ผลของความเข้มข้นต่าง ๆ ของกรดไฮโดรคลอริกที่เป็นตัวรองรับสารละลาย
ที่ได้จากการกลั่นด้วยไอน้ำ

ความเข้มข้น HCl (mole/ dm ³) ปริมาตร 10 cm ³	weight of sample (g)			absorbance *			% nicotine			
	(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)	average
2	0.2575	0.2749	0.2698	0.164	0.195	0.197	0.53	0.59	0.61	0.58
3	0.2873	0.2345	0.2407	0.221	0.201	0.191	0.64	0.71	0.68	0.68
4	0.2340	0.2483	0.2731	0.238	0.245	0.294	0.85	0.83	0.85	0.84
5	0.2501	0.2483	0.2731	0.232	0.217	0.239	0.77	0.73	0.73	0.74

• การดูดกลืนแสง (ระยะ cm)

จากตาราง 2.7 แสดงว่าความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกที่เหมาะสมเป็นตัวรองรับสารละลายนิโคตินที่ได้จากการกลั่นด้วยไอน้ำคือ 4 mole/dm³ (เพื่อทำให้มีปริมาตรเป็น 250 cm³ ด้วยน้ำกลั่น หลังจากการกลั่นจะมีความเข้มข้น 0.16 mole/dm³) ที่เป็นเช่นนี้อาจจะอธิบายได้เนื่องจากนิโคตินที่กลั่นได้จะทำปฏิกิริยาได้พอดีกับกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.16 mole/dm³ ค่าการดูดกลืนแสงมากเปอร์เซ็นต์นิโคตินก็มากตามไปด้วยในกรณีกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 2, 3 mole/dm³ เป็นตัวรองรับพบว่าได้ปริมาณนิโคตินน้อยอาจเป็นเพราะปริมาณของกรดน้อยเกินไปที่จะทำปฏิกิริยากับนิโคตินทำให้ค่าการดูดกลืนแสงต่ำ ในกรณีความเข้มข้นกรดไฮโดรคลอริกมากขึ้นทำให้เปอร์เซ็นต์นิโคตินน้อยลงอาจเกิดจากนิโคตินโคคลอเรตสลายตัวเมื่อกรดไฮโดรคลอริกมากเกินไป ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลง ดังนั้นในการทดลองหานิโคตินในตัวอย่างใบยาสูบจึงต้องใช้กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 4 mole/dm³ จำนวน 10 cm³ เป็นตัวรองรับในการสกัดนิโคติน

2.3.7.2 การศึกษาอิทธิพลของ cation และ anion บางตัวที่มีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณนิโคตินในสารละลายนิโคตินมาตรฐาน

เนื่องจากใบยาสูบตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์มีองค์ประกอบอื่น ๆ อีกมาก นอกจากนิโคตินในการศึกษาอิทธิพลของสารที่มีผลรบกวนต่อการวิเคราะห์นิโคตินในที่นี้จะศึกษาเฉพาะ cation และ anion เท่านั้นซึ่งเป็นส่วนประกอบอยู่ในใบยาสูบส่วนหนึ่งที่อาจจะเกิดสารประกอบกับนิโคตินในขณะสกัดนิโคตินโดยวิธีการกลั่นด้วยไอน้ำพร้อมกับระเหยจนมากับไอน้ำ จึงได้ศึกษาผลของ cation และ anion บางตัวที่มีผลต่อการวิเคราะห์นิโคตินในสารละลายมาตรฐานและนำสารละลายที่สกัดได้จากใบยาสูบตัวอย่างไปวิเคราะห์หาโลหะไอออนบางตัวโดยวิธีอะตอมมิคแอบซอร์พชัน ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

(1) การทดสอบเบื้องต้น โดยศึกษาอัตราส่วนความเข้มข้นระหว่าง nicotine : cation (แคลเซียม, แมงกานีส, นิเกิล, คอปเปอร์, โซเดียม, โพแทสเซียม, ตะกั่ว) และ nicotine : anion (ฟอสเฟต, ซัลเฟต, คลอไรด์) โดยให้ความเข้มข้นเป็น ppm ของ nicotine : interfering ion เป็น 1 : 1, 1 : 5, 1 : 10, 1 : 50, 1 : 100 จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยใช้ชุดตราไวโอลิตสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ภายใต้สภาวะเดียวกันและวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานนิโคตินเดี่ยว ๆ เปรียบเทียบสภาวะที่เหมาะสมของเครื่องมืออะตอมมิคแอบซอร์พชันในการวิเคราะห์ธาตุต่าง ๆ มีแสดงในตาราง 2.8

ตาราง 2.8 ภาวะที่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์ Cation ต่าง ๆ โดยวิธี AAS(21)

Condition	Cation							
	Fe	Pb	Cd	Mn	Cu	Ni	K	Ni
Wavelength (nm)	248.3	244.8	228.8	279.5	324.7	589	766.5	232.0
Spectral Band Pass (nm)	0.2	0.2	0.5	0.2	0.5	0.5	1.0	0.2
Lamp Current(ma)	5	5	3	5	3	5	5	5
Flame	AA	AA	AA	AA	AA	AP	AP	AA
Sensitivity (µg/ml)	0.045	0.092	0.011	0.021	0.04	0.003	0.009	0.05
Optimum From (µg/ml)	2.5	4	0.5	1.00	2	0.15	0.5	3
Working Range (µg/ml)	10	16	2.0	4.0	8	0.60	2.0	12
Detection Limit (µg/ml)	0.006	0.016	0.007	0.002	0.002	0.0002	0.002	0.008
Light Source	Hollow Cathode							

Flame

AA - Air-acetylene

NA - Nitrous oxide-acetylene

AH - Air hydrogen

AP - Air propane

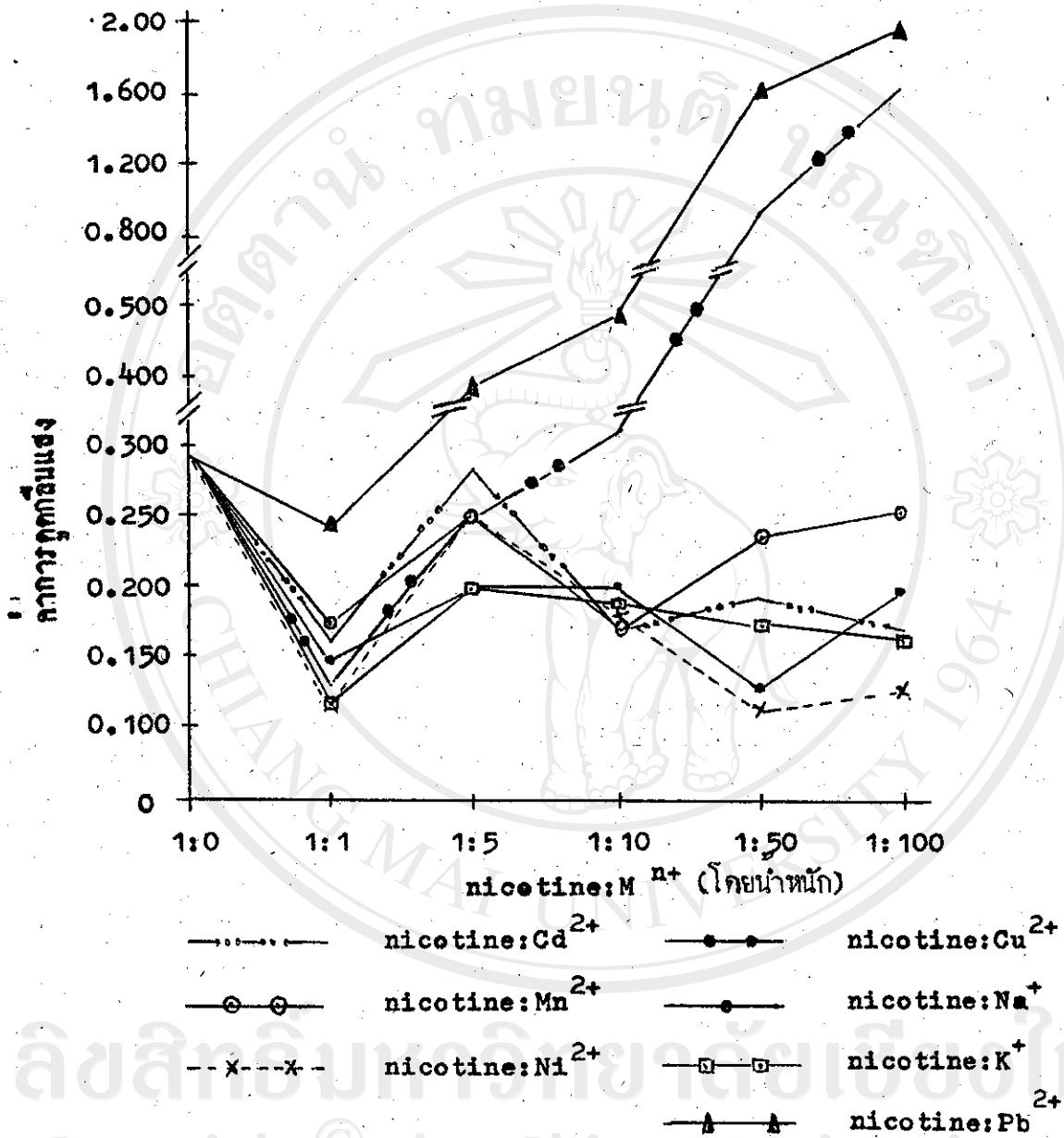
(2) ผลการศึกษาอิทธิพลของ cation บางตัวต่อการวิเคราะห์นิโคติน

ศึกษาโดยการเติม interfering cation ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (0-1000 ppm) ปริมาตร 5 cm³ ลงไปในสารละลายมาตรฐานนิโคตินเข้มข้น 10 cm³ ปริมาตร 5 cm³ โดยทำให้อัตราส่วนของนิโคตินต่อ cation ที่เติมมีอัตราส่วนต่าง ๆ ตามตาราง 2.9 และปรับ pH ~ 1.1 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (pH ~ 1.1 นี้เท่ากับสารละลายตัวอย่างที่สกัดได้) นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ $\lambda_{\max}$ 259 nm ด้วยเครื่องมืออุทราไวโอเลตสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ แล้วนำค่าที่ได้มาเขียนกราฟ ดังรูป 2.7

ตาราง 2.9 อิทธิพลของ cation ในอัตราส่วนต่าง ๆ ที่มีผลต่อการดูดกลืนแสง

อัตราส่วนความเข้มข้น nicotine : M ⁿ⁺	absorbance nicotine : M ⁿ⁺					
	1:0	1:1	1:5	1:10	1:50	1:100
nicotine : Cd ²⁺	0.290	0.162	0.200	0.172	0.188	0.281
nicotine : Mn ²⁺	0.290	0.168	0.250	0.175	0.240	0.252
nicotine : Ni ²⁺	0.290	0.125	0.188	0.181	0.122	0.178
nicotine : Cu ²⁺	0.290	0.135	0.250	0.321	0.838	1.63
nicotine : Na ⁺	0.291	0.142	0.202	0.200	0.134	0.198
nicotine : K ⁺	0.290	0.120	0.200	0.192	0.171	0.170
nicotine : Pb ²⁺	0.291	0.242	0.392	0.492	0.170	2.00

Mⁿ⁺ = cations



รูป 2.7 อิทธิพลของ cation ที่มีผลต่อค่าการเรืองแสงในการวิเคราะห์โคติน

จากตาราง 2.9 และรูป 2.7 พบว่า cation ทุกตัวมีอิทธิพลต่อการดูดกลืนแสงในการวิเคราะห์นิโคตินคือ ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงมีทั้งค่าเพิ่มขึ้นและลดลง โดยเฉพาะตะกั่วออกไซด์กับคอปเปอร์ออกไซด์จะมีผลต่อการดูดกลืนแสงน้อยลงในช่วงต้น และจะมีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ เมื่ออัตราส่วนเพิ่มขึ้น ส่วนออกไซด์ของโลหะที่เหลือมีค่าการดูดกลืนแสงลดลง เมื่ออัตราส่วนเพิ่มมากขึ้น

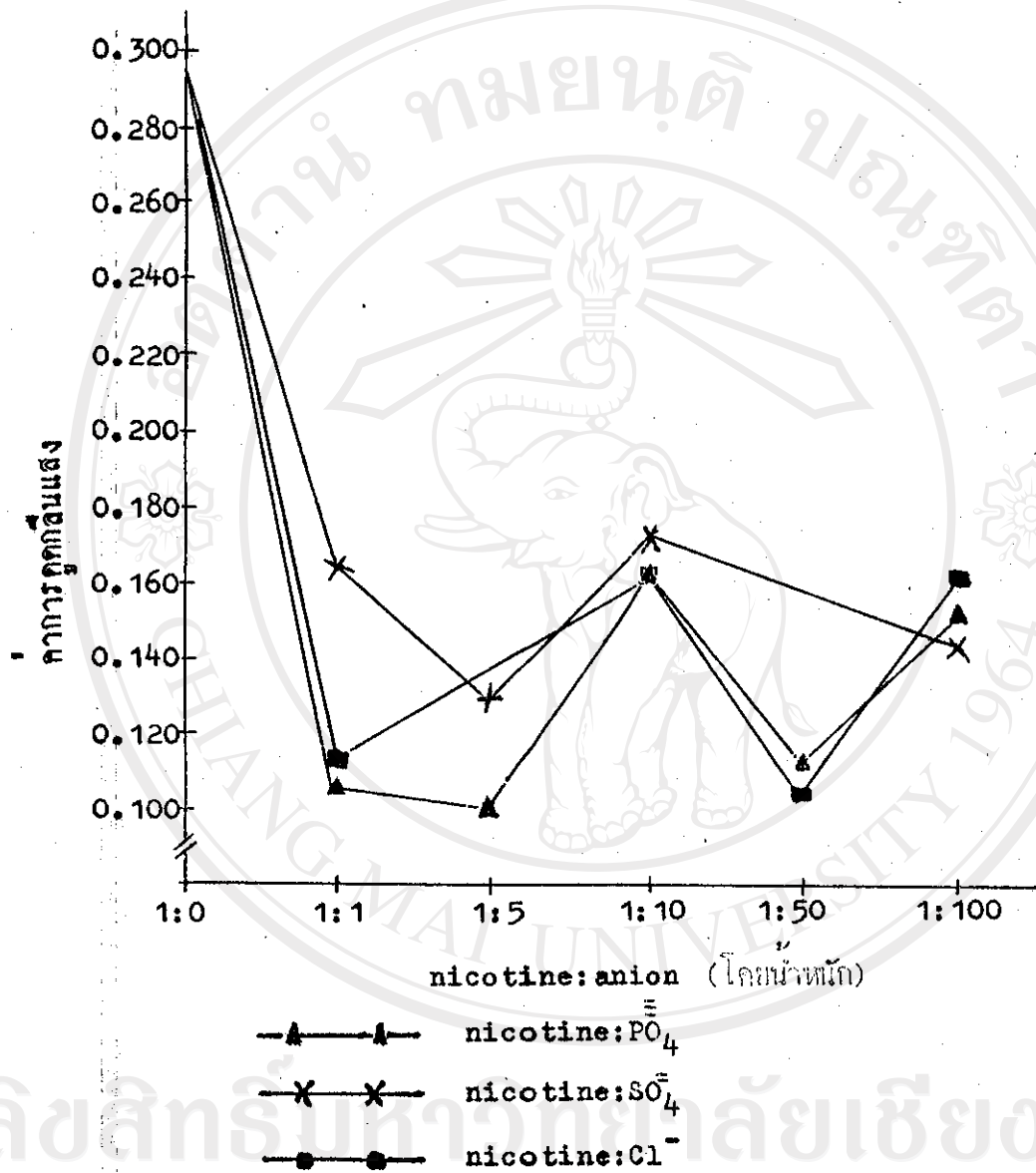
(3) ผลการศึกษาอิทธิพลของ anion บางตัวต่อการวิเคราะห์นิโคติน

ศึกษาโดยการเติม interfering anion ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (0-1000 ppm) ปริมาตร 5 cm³ ลงไปในสารละลายมาตรฐานนิโคติน 10 ppm ปริมาตร 5 cm³ โดยทำให้อัตราส่วนของนิโคตินต่อ anion ที่เติมมีอัตราส่วนต่าง ๆ ตามตาราง 2.10 และปรับ pH ~ 1.1 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (pH ~ 1.1 นี้เท่ากับสารละลายตัวอย่างที่สกัดได้) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยอุลตราไวโอเลตสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟ ดังรูป 2.8

ตาราง 2.10 อิทธิพลของ anion ในอัตราส่วนต่าง ๆ ที่มีผลต่อการดูดกลืนแสง

อัตราส่วนความเข้มข้น nicotine : X ⁿ⁻	absorbance					
	nicotine : anion					
	1:0	1:1	1:5	1:10	1:50	1:100
nicotine : Cl ⁻	0.290	0.112	0.160	0.160	0.102	0.162
nicotine : SO ₄ ⁼	0.290	0.162	0.120	0.172	0.128	0.125
nicotine : PO ₄ ⁼	0.290	0.110	0.106	0.162	0.112	0.160

Xⁿ⁻ = anion



รูป 2.8 อิทธิพลของ anion ที่มีผลต่อการดูดกลืนแสงในการวิเคราะห์โคติน

จากตาราง 2.10 และรูป 2.8 anion ที่ศึกษาได้แก่คลอไรด์ไอออน
ซัลเฟตไอออน และฟอสเฟตไอออน พบว่าจะมีอิทธิพลต่อการดูดกลืนแสงในการวิเคราะห์
นิโคตินคือ ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลง

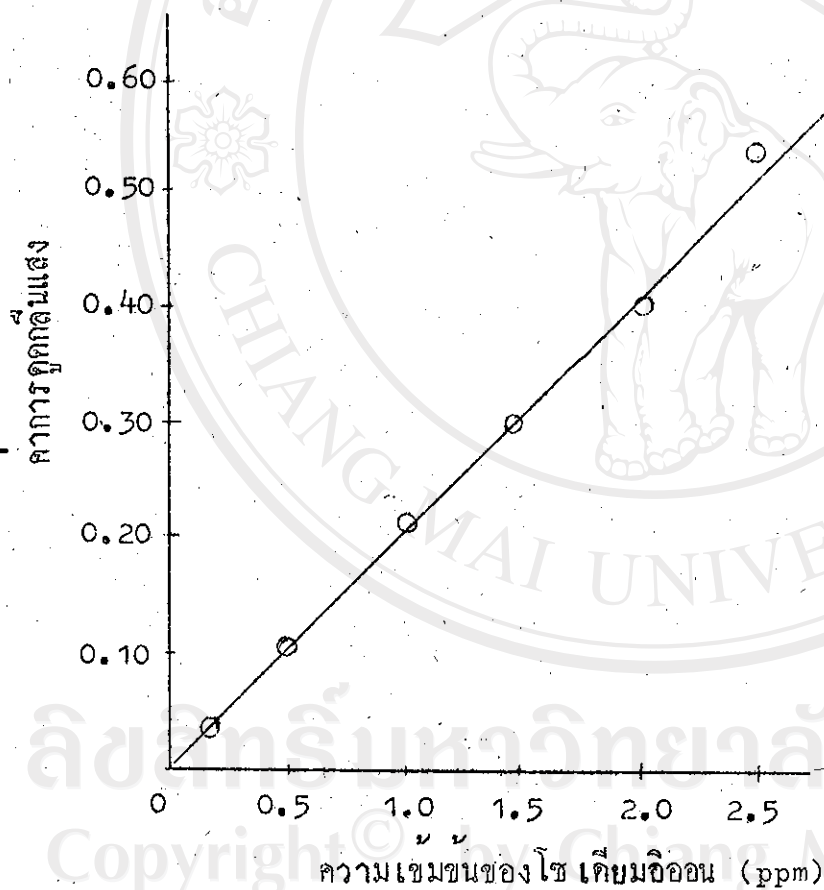
(4) การตรวจสอบว่ามี cations บางตัวในสารละลายที่สกัดจากใบยาสูบหรือไม่
วิธี เสงเคราะห์ (22) ทำการศึกษาปริมาณ cation โดยพบ cation
ต่าง ๆ เช่น เหล็ก, ตะกั่ว, แคดเมียม, แมงกานีส, คอปเปอร์, โซเดียม, โพแทสเซียม
และนิเกิล ในใบยาสูบตัวอย่าง ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ตรวจสอบดูว่าในสาร
ละลายที่สกัดได้จากใบยาสูบตัวอย่างมีไอออนดังกล่าวปะปนอยู่หรือไม่ ซึ่งทำได้โดยชั่งยาสูบ
ตัวอย่างหมายเลข 5 และหมายเลข 10 มา 0.2944 กรัม และ 0.2753 กรัมตามลำดับ
ทดลองตามสภาวะที่เหมาะสมของการทดลองตามหัวข้อ 2.3.6.3 และหัวข้อ 2.3.7.1
ข้อ ก. - ง. นำสารละลายที่สกัดได้จากใบยาสูบตัวอย่างมา 20 cm³ ใส่ในบีกเกอร์
100 cm³ เติมสารละลายผสมระหว่างกรดไนตริกเข้มข้นกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์
ในอัตราส่วน 1:2 โดยปริมาตร จำนวน 5 cm³ นำไปต้มที่อุณหภูมิ 75-85 °C จนสาร
ละลายลดลงเหลือประมาณ 10 cm³ แล้วเติม digesting reagent อีกครั้งละ 5
cm³ ทำต่อไปเรื่อย ๆ จนครบ 20 cm³ นำสารละลายที่ได้ไปปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น
25 cm³ ในขวดวัดปริมาตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยวิธีอะตอมมิก แอ็บ-
ซอร์พชันสเปกโตรโฟโตเมตรี เพื่อวิเคราะห์ cation ต่าง ๆ ที่กล่าวแล้วข้างต้นใน
เชิงคุณภาพ โดยใช้สภาวะตามตาราง 2.8 ได้ผลดังตาราง 2.11

ตาราง 2.11 ค่าดูดกลืนแสงในการศึกษาปริมาณ cation

cation	absorbance (sample No.5)	absorbance (sample No.10)
Fe ²⁺	0.000	0.000
Pb ²⁺	0.000	0.000
Cd ²⁺	0.000	0.000
Mn ²⁺	0.000	0.000
Cu ²⁺	0.000	0.000
Na ⁺	0.030	0.048
K ⁺	0.006	0.008
Ni ²⁺	0.000	0.000

จากตาราง 2.11 จะเห็นว่าไม่พบ cation ของเหล็ก, ตะกั่ว, แคดเมียม, แมงกานีส, คอปเปอร์ และนิเกิลในสารละลายนิโคตินที่สกัดได้จากตัวอย่างใบยาสูบทั้ง 2 ตัวอย่าง เพราะให้ค่าการดูดกลืนแสงเป็นศูนย์ ยกเว้นโซเดียมไอออนและโพแทสเซียมไอออน ซึ่งทำให้ค่าการดูดกลืนแสง 0.030 (สำหรับโซเดียม) และ 0.006 (สำหรับโพแทสเซียม) สำหรับสารละลายที่สกัดจากใบยาสูบตัวอย่างหมายเลข 5 ส่วนสารละลายที่สกัดจากใบยาสูบตัวอย่างหมายเลข 10 ให้ค่าการดูดกลืนแสง 0.048 (สำหรับโซเดียม) และ 0.008 (สำหรับโพแทสเซียม) จึงได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณโซเดียมและโพแทสเซียมในสารละลายนิโคตินที่สกัดจากใบยาสูบตัวอย่างหมายเลข 5 และหมายเลข 10 โดยอ่านจากกราฟมาตรฐานรูป 2.9 สำหรับโซเดียมและกราฟมาตรฐานรูป 2.10 สำหรับโพแทสเซียม

จากการศึกษาอิทธิพลของ cations ต่าง ๆ ต่อการวิเคราะห์สารละลาย นิโคตินมาตรฐาน (หัวข้อ 2.3.7.2) พบว่าโซเดียมและโปแตสเซียมมีผลกระทบต่อการ วิเคราะห์นิโคติน (5 ppm) โดยมีอัตราส่วนนิโคติน : โซเดียมหรือโปแตสเซียม (โดย น้ำหนัก) 1 : 0, 1 : 1, 1 : 5, 1 : 10, 1 : 50 และ 1 : 100 มาหาความ เข้มข้นของนิโคตินโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานในรูป 2.2 แล้วนำมาคำนวณหาความ คลาดเคลื่อนเป็นร้อยละ (percentage error) ได้ข้อมูลดังตาราง 2.12 และ 2.13



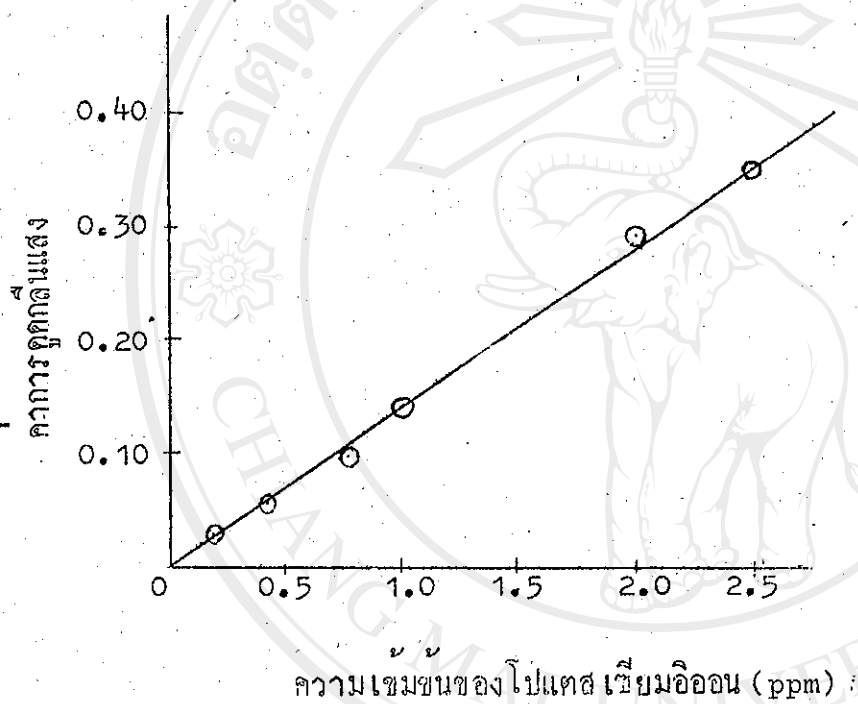
รูป 2.9 กราฟมาตรฐานของปริมาณการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลาย โซเดียมไอออนมาตรฐาน (0-25 ppm)

ตาราง 2.12 เปอร์เซ็นต์ความคลาดเคลื่อนจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความเข้มข้น (ppm) นิโคติน : โซเดียมไอออน ตามอัตราส่วนต่าง ๆ

อัตราส่วนความเข้มข้น nicotine : Na ⁺	1:0	1:1	1:5	1:10	1:50	1:100
absorbance	0.291	0.142	0.202	0.200	0.134	0.190
ppm (nicotine)	5	4.75	6.75	6.75	4.5	6.70
% error	-	-5	+35	+35	-10	+34

จากตาราง 2.11 ค่าการดูดกลืนแสงของโซเดียมไอออนในยาสูบตัวอย่าง หมายเลข 5 และ 10 เป็น 0.030 และ 0.0480 เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (รูป 2.9) เพื่อหาปริมาณโซเดียมไอออนในสารละลายจำนวน 250 cm³ ที่สกัดได้จากใบยาสูบตัวอย่างมีค่าเท่ากับ 46.88 และ 54.69 ppm ตามลำดับจากการคำนวณหาปริมาณนิโคตินในยาสูบตัวอย่างหมายเลข 5 และ 10 ได้ปริมาณนิโคตินในสารละลายจำนวน 250 cm³ ที่สกัดได้จากใบยาสูบตัวอย่างเท่ากับ 2687.50 และ 2.375 ppm. เมื่อคำนวณหาอัตราส่วนระหว่างนิโคติน : โซเดียมไอออนของใบยาสูบทั้งสองตัวอย่างมีค่าเป็น 1 : 0.017 และ 1 : 0.023 ตามลำดับ แล้วนำค่าที่เฉลี่ยได้นี้ไปเปรียบเทียบกับตาราง 2.12 และกราฟรูป 2.7 จะได้อัตราส่วนนิโคติน : โซเดียมไอออนอยู่ในช่วง 1 : 0 ถึง 1 : 1 ซึ่งมีความคลาดเคลื่อนของการดูดกลืนแสงต่างกัน -5 % ดังนั้นเมื่อคำนวณจะได้เปอร์เซ็นต์ความคลาดเคลื่อนจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงของอัตราส่วนระหว่างนิโคติน : โซเดียมไอออนทั้ง 2 อัตราส่วนมีค่าประมาณ -0.10

All rights reserved



รูป 2.10 กราฟมาตรฐานของปริมาณการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลายโปแตสเซียมไอออนมาตรฐาน (0-2.5 ppm)

ตาราง 2.13 เปอร์เซ็นต์ความคลาดเคลื่อนจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความเข้มข้น (ppm) นิโคติน : โปแตสเซียมไอออน ตามอัตราส่วนต่าง ๆ

อัตราส่วนความเข้มข้น nicotine : K ⁺	1:0	1:1	1:5	1:10	1:50	1:100
absorbance	0.290	0.120	0.200	0.192	0.171	0.170
ppm (nicotine)	5	4.75	6.75	6.50	5.75	5.75
% error	-	-5	+35	+30	+15	+15

จากตาราง 2.11 โคค่าการดูดกลืนแสงของโปแตสเซียมไอออนในใบยาสูบ ตัวอย่างหมายเลข 5 และ 10 เป็น 0.006 และ 0.008 เมื่อนำค่าเหล่านี้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (รูป 2.10) เพื่อหาปริมาณโซเดียมไอออนในสารละลายจำนวน 250 cm³ ที่สกัดได้จากใบยาสูบตัวอย่างโคค่า 9.37 และ 12.50 ppm ตามลำดับ จากการคำนวณหาปริมาณนิโคตินในยาสูบตัวอย่างหมายเลข 5 และ 10 ได้ปริมาณนิโคตินในสารละลายจำนวน 250 cm³ ที่สกัดได้จากใบยาสูบตัวอย่างเท่ากับ 2687.50 และ 2375 ppm เพราะฉะนั้นอัตราส่วนระหว่างนิโคติน : โปแตสเซียมไอออนทั้งสองตัวอย่างมีค่าเป็น 1 : 0.003 และ 1 : 0.004 ตามลำดับ เมื่อนำค่าเฉลี่ยที่ได้ไปเปรียบเทียบกับ ตาราง 2.13 และกราฟรูป 2.7 แล้วคำนวณจะได้เปอร์เซ็นต์ความคลาดเคลื่อนจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงซึ่งเกิดจากโปแตสเซียมไอออนมีค่าประมาณ -0.02

จะเห็นว่าโซเดียมไอออนและโปแตสเซียมไอออนทำให้เปอร์เซ็นต์ความคลาดเคลื่อนการวัดค่าการดูดกลืนแสงลดลงประมาณ 0.10 และ 0.02 ตามลำดับ นับว่ามีค่าน้อยมาก ซึ่งไอออนเหล่านี้มาจากตัวสกัดนิโคตินคือ โซเดียมคลอไรด์เป็นส่วนมากและมีโปแตสเซียมไอออนน้อยกว่าโซเดียมไอออนมาก โปแตสเซียมที่พบในส่วนนี้อาจมาจาก impurity

ในโซเดียมคลอไรด์ (โซเดียมคลอไรด์มักมีโปแตสเซียมคลอไรด์ปน) อีกส่วนหนึ่งอาจมาจากใบยาสูบ ซึ่งมีปริมาณน้อย ดังนั้นในการวิเคราะห์หาปริมาณนิโคตินในใบยาสูบ ตัวอย่างจึงไม่จำเป็นต้องกำจัด cations ต่าง ๆ ก่อนที่จะนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง

2.3.7.3 การศึกษาความแม่นยำ (precision) ของการวิเคราะห์

วิธีวิเคราะห์ใด ๆ ก็ตามถ้าจะใช้เป็นวิธีหลักในการวิเคราะห์จะต้องมีความแม่นยำสูง ดังนั้นเมื่อค้นพบวิธีวิเคราะห์ใด ๆ ก็ตามจำเป็นจะต้องทำการทดลองเพื่อหาความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์นั้น ๆ ด้วยความแม่นยำดังกล่าวหาได้โดยนำใบยาสูบตัวอย่างหมายเลข 2 มาวิเคราะห์หาปริมาณนิโคตินตามเทคนิคนี้ภายใต้ภาวะการทดลองที่เหมาะสม แล้วทำการทดลอง 10 ครั้ง (หรือมากกว่าก็ได้) ได้ผลดังตาราง 2.14 จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย (mean) ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) และความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation) ตามวิธีสถิติ

ตาราง 2.14 ผลการวิเคราะห์นิโคตินเพื่อศึกษาความแม่นยำของวิธีการวิเคราะห์

number of determination	weight of sample(g)	A ₂₃₆	A ₂₅₉	A ₂₈₂	$\frac{A_{259}-A_{236}+A_{282}}{2}$	% nicotine
1	0.2827	0.152	0.344	0.098	0.219	0.64
2	0.2430	0.154	0.308	0.090	0.186	0.62
3	0.2548	0.122	0.295	0.070	0.199	0.66
4	0.2557	0.140	0.299	0.070	0.194	0.64
5	0.2718	0.165	0.338	0.092	0.210	0.64
6	0.2597	0.180	0.340	0.110	0.195	0.65
7	0.2818	0.172	0.359	0.100	0.223	0.66
8	0.2850	0.162	0.342	0.098	0.212	0.61
9	0.2668	0.158	0.328	0.080	0.209	0.66
10	0.2921	0.180	0.374	0.112	0.228	0.66

A = absorbance

การคำนวณ1. Mean ($\bar{X}$) จากสูตร

$$\bar{X} = \frac{\sum X_i}{N}$$

เมื่อ X_i = ข้อมูลแต่ละค่า N = จำนวนข้อมูลทั้งหมด

$$\bar{X} = \frac{6.44}{10} = 0.644$$

2. Standard deviation (S.D.)

$$S.D. = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{N-1}}$$

$$= \sqrt{\frac{(0.14)^2}{9}}$$

ดังนั้น $S.D. = 0.047$

3. Relative standard deviation (R.S.D.) หรือ coefficient of variation

$$R.S.D. = \frac{S.D. \times 100}{\bar{X}} \%$$

$$= \pm \frac{0.047 \times 100}{0.64}$$

ดังนั้น $R.S.D. = \pm 7.34 \%$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright © Chiang Mai University

All rights reserved

2.3.7.4 การศึกษาความแม่นยำของเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์

ในการทำปริมาณวิเคราะห์ที่สำคัญอื่นหนึ่งคือ เครื่องมือที่ใช้ศึกษาการดูดกลืนแสงของสารซึ่งจะต้องมีความแม่นยำในการวัด เพื่อให้ผลการวิเคราะห์ถูกต้อง การศึกษาความแม่นยำของเครื่องมือ (Varian techtron 635 UV-VIS Recording Spectrophotometer) ทำได้โดยนำใบยาสูบตัวอย่างมาทำการทดลอง โดยชั่งยาสูบตัวอย่างหมายเลข 3 น้ำหนัก 0.2586 กรัม ทำตามภาวะการทดลองของเทคนิคนี้แล้วไปวัดการดูดกลืนแสงโดยเปรียบเทียบกับ reagent blank ที่ความยาวคลื่น 236, 259 และ 280 nm วัดซ้ำกัน 10 ครั้ง ได้ผลดังตาราง 2.15 นำค่าที่ได้มาคำนวณค่า mean, standard deviation และ relative standard deviation

ตาราง 2.15 ผลการวัดการดูดกลืนแสงของสารละลายนิโคตินที่สกัดจากใบยาสูบตัวอย่าง จำนวน 10 ครั้ง

number of determination	A ₂₃₆	A ₂₅₉	A ₂₈₂	$A_{259} - \frac{A_{236} + A_{282}}{2}$	% nicotine
1	0.158	0.336	0.092	0.211	0.68
2	0.170	0.342	0.092	0.211	0.68
3	0.168	0.336	0.092	0.206	0.65
4	0.168	0.336	0.092	0.206	0.65
5	0.168	0.338	0.092	0.208	0.68
6	0.168	0.337	0.091	0.208	0.68
7	0.167	0.336	0.092	0.207	0.68
8	0.168	0.337	0.090	0.208	0.68
9	0.168	0.336	0.091	0.207	0.68
10	0.168	0.339	0.090	0.210	0.68

จากข้อมูลข้างต้นคำนวณค่าต่าง ๆ ได้ดังนี้

1. Mean = 0.67
2. Standard deviation = 0.04
3. Relative Standard deviation = $\pm 5.97 \%$

2.3.7.5 การหาปริมาณนิโคตินในใบยาสูบตัวอย่าง

หาปริมาณนิโคตินจากใบยาสูบตัวอย่างด้วยวิธีกลั่นควยไอน้ำ โดยทำการทดลองตามหัวข้อ 2.3.6.3 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมตามหัวข้อ 2.3.7.1 ข้อ ก-ง โดยนำสารละลายที่สกัดได้จากใบยาสูบตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงควยเครื่องมืออุตราไวโอเลตสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ หาปริมาณนิโคตินในใบยาสูบตัวอย่างจากกราฟมาตรฐาน (รูป 2.3) และคำนวณหาปริมาณนิโคตินเป็นร้อยละในใบยาสูบตัวอย่างได้ผลดังตาราง 2.16

ตาราง 2.16 ปริมาณนิโคตินที่พบในใบยาสูบตัวอย่าง

Sample No	weight of sample (g)			* absorbance			% nicotine			
	(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)	average
1	0.2252	0.2327	0.2819	0.192	0.164	0.235	0.72	0.77	0.73	0.74
2	0.2617	0.2623	0.2927	0.212	0.194	0.216	0.68	0.62	0.62	0.64
3	0.2526	0.2668	0.2636	0.215	0.209	0.194	0.72	0.67	0.62	0.67
4	0.2929	0.2979	0.2706	0.444	0.438	0.400	1.26	1.24	1.25	1.25
5	0.2565	0.2343	0.2991	0.257	0.262	0.322	0.86	0.93	0.90	0.87
6	0.2119	0.2660	0.2822	0.225	0.241	0.257	0.85	0.76	0.75	0.79
7	0.2682	0.2630	0.2677	0.213	0.225	0.260	0.68	0.71	0.82	0.77
8	0.2910	0.2752	0.2686	0.185	0.162	0.170	0.52	0.50	0.54	0.52

ตาราง 2.16 ทด

sample No	weight of sample(g)			* absorbance			% nicotine			
	(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)	average
9	0.2855	0.2543	0.2749	0.196	0.176	0.193	0.60	0.57	0.58	0.58
10	0.2511	0.2817	0.2592	0.220	0.282	0.237	0.73	0.84	0.77	0.78
11	0.2492	0.2844	0.2945	0.052	0.068	0.067	0.18	0.20	0.19	0.19
12	0.2941	0.2997	0.2701	0.287	0.253	0.248	0.81	0.71	0.76	0.76
13	0.2359	0.2660	0.2757	0.269	0.236	0.232	0.74	0.74	0.72	0.73
14	0.2864	0.2931	0.2669	0.536	0.533	0.488	1.57	1.54	1.55	1.55
15	0.2531	0.2855	0.2104	0.225	0.262	0.178	0.74	0.77	0.72	0.74
16	0.2888	0.2329	0.2651	0.319	0.244	0.293	0.93	0.87	0.92	0.91
17	0.2951	0.2840	0.2803	0.279	0.278	0.287	0.78	0.81	0.87	0.82
18	0.2849	0.2728	0.2534	0.170	0.158	0.152	0.50	0.46	0.49	0.48
19	0.2538	0.2976	0.2988	0.255	0.285	0.291	0.84	0.84	0.84	0.84
20	0.2938	0.2853	0.2129	0.201	0.183	0.131	0.66	0.53	0.53	0.57

* ค่าดูดกลืนแสง (ระยะ CE)

2.3.7.6 การคำนวณหาปริมาณนิโคติน

การคำนวณหาปริมาณนิโคตินในตัวอย่างใบยาสูบนั้นทำได้โดยการคำนวณค่าปริมาณการดูดกลืนแสง แล้วนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (รูป 2.3) โดยมีสมการที่ใช้คำนวณดังนี้คือ

$$CE = CG - \frac{(BF + DH)}{2}$$

เมื่อ CG = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 259 นาโนเมตร

BF = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 236 นาโนเมตร

DH = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 282 นาโนเมตร

CE = ค่าการดูดกลืนแสงที่ต้องการ

2.3.7.7 ตัวอย่างการคำนวณ

จากตาราง 2.16 ตัวอย่างใบยาสูบหมายเลข 1 ในการคำนวณหาค่าการดูดกลืนแสงในการทดลอง ครั้งที่ (1)

$$\text{จาก } CE = CG - \frac{(BF + DH)}{2}$$

$$\text{เมื่อ } CG = 0.300$$

$$BF = 0.132$$

$$DH = 0.084$$

$$\text{แทนค่า } CE = 0.300 - \frac{(0.132 + 0.084)}{2}$$

$$= 0.192$$

เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงที่คำนวณได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน
แล้วจะได้ความเข้มข้นของนิโคติน = $6.5 \mu\text{g}/\text{cm}^3$

$$\begin{aligned} \therefore \text{ในสารละลาย } 250 \text{ cm}^3 \text{ มีนิโคติน} &= 6.5 \times 250 \mu\text{g} \\ &= 6.5 \times 250 \times 10^{-6} \text{ g} \end{aligned}$$

$$\text{น้ำหนักใบยาสูบที่ใส่} = 0.2252 \text{ g}$$

$$\begin{aligned} \therefore \text{ปริมาณนิโคตินที่มี} &= \frac{6.5 \times 250 \times 10^{-6} \times 10^2}{0.2252} \\ &= 0.72 \% \end{aligned}$$

การทำการทดลองครั้งที่ (2) และ (3) ได้ปริมาณนิโคติน 0.77 % และ 0.73 %

$$\begin{aligned} \therefore \text{ค่าเฉลี่ยปริมาณนิโคติน} &= \frac{0.72 + 0.77 + 0.73}{3} \\ &= 0.74 \% \end{aligned}$$

2.3.7.8 การศึกษาความถูกต้อง (accuracy) ของการวิเคราะห์

การหาความถูกต้องของการวิเคราะห์ใด ๆ อาจหาได้จากการหาค่าร้อยละของการคืนกลับ (percentage recovery) ซึ่งทำได้โดยการเติมสารละลายมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนลงในสารละลายนิโคตินที่ได้จากการสกัดใบยาสูบตัวอย่าง แล้ววิเคราะห์หาปริมาณของสารละลายมาตรฐานที่เติมลงไปซึ่งมีวิธีการดังนี้

(1) นำใบยาสูบตัวอย่างหมายเลข 19 มาชั่ง 0.2939 กรัม จำนวน 6 ครั้ง

(2) นำยาสูบที่ชั่งแล้วหาปริมาณนิโคตินโดยวิธีการกลั่นควยไอน้ำ ตามสภาวะที่เหมาะสมตามหัวข้อ 2.3.7.1 ข้อ ก-ง

(3) เติมสารละลายมาตรฐานที่ทราบปริมาณนิโคตินที่แน่นอน (5-25 ppm) ลงไปในสารละลายตัวอย่างที่มีน้ำหนักใบยาสูบเท่ากับที่ใส่ในข้อ 2 แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณนิโคตินโดยใช้เทคนิคเดียวกัน ได้ผลดังตาราง 2.17

- (4) นำปริมาณนิโคตินในข้อ 3 ลบด้วยปริมาณนิโคตินในข้อ 2 จะได้ปริมาณของนิโคตินที่หาได้
- (5) นำปริมาณของนิโคตินของสารละลายมาตรฐานนิโคตินที่หาได้จากข้อ 4 หารด้วยปริมาณนิโคตินของสารละลายมาตรฐานที่เติมลงไปแล้วคูณผลที่ได้ด้วย 100 ก็จะเป็น percentage recovery ของเทคนิคนี้

ตัวอย่างคำนวณ

$$\% \text{ recovery} = \frac{\text{nicotine found (ppm)} \times 100}{\text{nicotine taken (ppm)}}$$

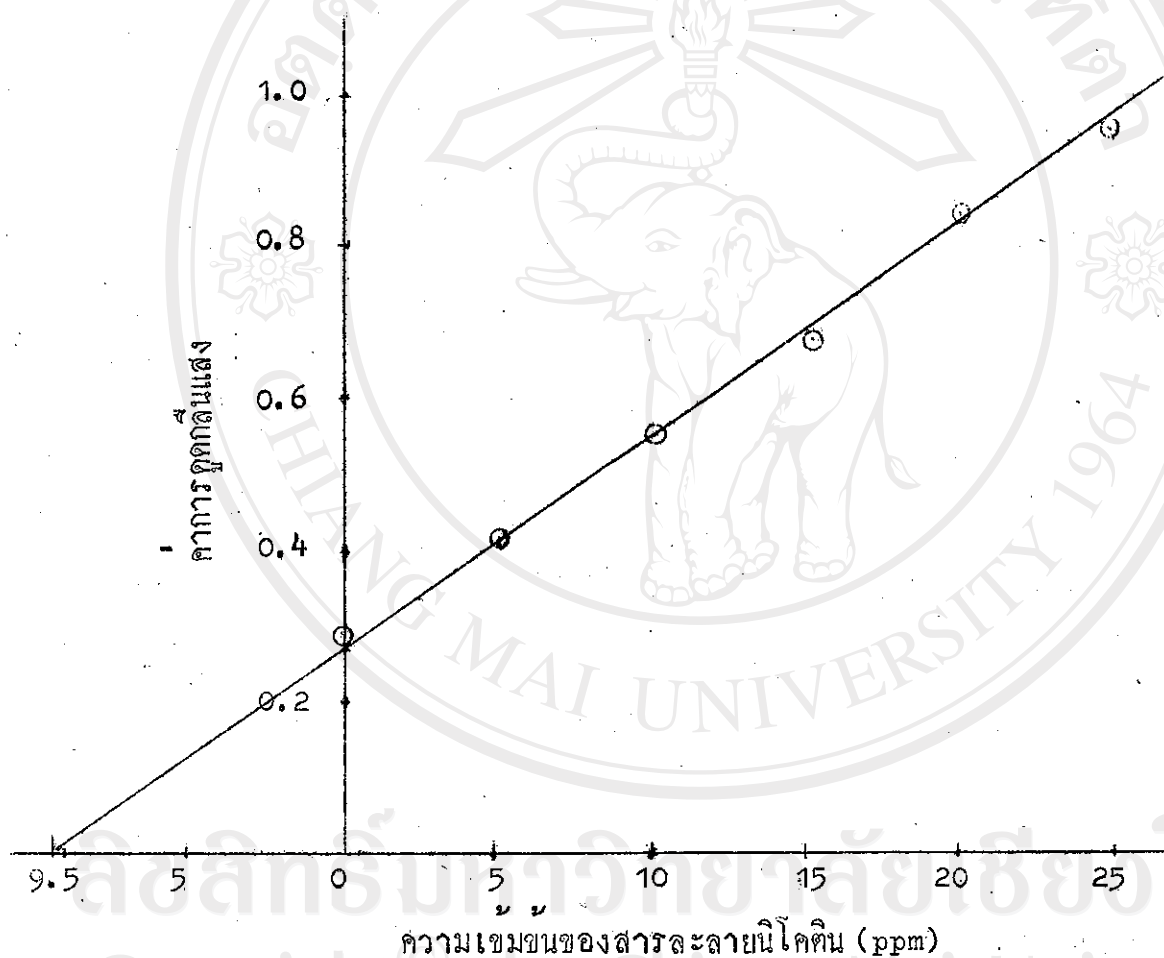
จากตัวอย่างใบยาสูบตัวอย่างหมายเลข 19 ในตาราง 2.17 เมื่อเติมสารละลายมาตรฐานนิโคติน 5 ppm ลงในสารละลายใบยาสูบตัวอย่าง จากการวิเคราะห์โดยเทคนิคนี้หาปริมาณนิโคตินได้ 4.75 ppm หา % recovery ได้ดังนี้

$$\begin{aligned} \% \text{ recovery} &= \frac{4.75 \text{ (ppm)} \times 100}{5 \text{ (ppm)}} \\ &= 95.00 \end{aligned}$$

ตาราง 2.17 การร้อยละของการกลับคืนของนิโคตินในใบยาสูบตัวอย่างหมายเลข 19

ปริมาณนิโคติน ที่เติม (ppm)	Absorbance *	ปริมาณนิโคตินที่หาได้จาก กราฟมาตรฐาน (ppm)	ปริมาณนิโคติน ที่พบ (ppm)	% recoveries
0	0.275	9.25	-	-
5	0.421	14.00	4.75	95.00
10	0.559	18.75	9.50	95.00
15	0.670	22.25	13.00	86.67
20	0.840	27.88	18.63	93.32
25	0.960	32.00	22.75	91.00
ค่าเฉลี่ย				92.20

จากตาราง 2.17 พบว่ารอยละของการคืนกลับของวิธีการกลั่นด้วยไอน้ำมีค่าตั้งแต่ 86.67-95.00 และมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 92.20 นำข้อมูลในตาราง 2.17 ไป Plot standard addition curve โดย Plot ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณสารละลายนิโคตินมาตรฐานที่เติม (ppm) ได้กราฟ ดังแสดงในรูป 2.11



รูป 2.11 standard addition curve ของการวิเคราะห์นิโคตินใน
ใบยาสูบตัวอย่าง หมายเลข 19

ณ จุดตัดของกราฟนี้จะบ่งบอกความเข้มข้นเป็น ppm ของนิโคตินในสารละลายที่ใช้วัดแล้วคำนวณหาปริมาณนิโคตินเป็นร้อยละได้เท่ากับ 0.81 เมื่อเปรียบเทียบกับ conventional method หาปริมาณนิโคตินเป็นร้อยละได้เท่ากับ 0.85 จะเห็นว่า การหาปริมาณนิโคตินโดยวิธี standard addition และวิธี conventional method มีค่าใกล้เคียงกัน ทำให้ทราบว่าการหาปริมาณนิโคตินโดยวิธีการกลั่นด้วยไอน้ำเกือบไม่มี matrix มารบกวนการวิเคราะห์โดยวิธี conventional method

2.3.8 สรุปผลการทดลอง

การวิเคราะห์หาปริมาณนิโคตินในใบยาสูบตัวอย่างโดยวิธีอุตสาหกรรมไอโอดีนสเปกโตรโฟโตเมตรี หลังจากสกัดนิโคตินจากใบยาสูบตัวอย่างด้วยเทคนิคการกลั่นด้วยไอน้ำ จากผลการทดลองพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดนิโคตินโดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 30 % ซึ่งอิมตัวด้วยโซเดียมคลอไรด์ปริมาตร 5 cm³ เป็นตัวสกัดเวลาในการกลั่นด้วยไอน้ำอย่างน้อย 20 นาที ผ่านไอน้ำที่กลั่นได้ลงในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 4 mole/cm³ ปริมาตร 10 cm³ เป็นตัวรองรับ

เมื่อศึกษาอิทธิพลของ cation บางตัวที่มีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณนิโคตินในใบยาสูบตัวอย่างโดยเทคนิคนี้ปรากฏว่าไม่มีอิทธิพลของ cation ดังกล่าวมารบกวน เมื่อศึกษาผลความแม่นยำของการวิเคราะห์ได้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.64 ความเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 0.047 ความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ ± 7.34 % และเมื่อศึกษาความถูกต้องของการวิเคราะห์ของเทคนิคนี้ได้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 92.20 % เมื่อหาปริมาณนิโคตินในใบยาสูบตัวอย่างในเขตภาคเหนือของประเทศไทยมีค่าตั้งแต่ 0.19-1.55 %

2.4 การสกัดนิโคตินด้วยวิธีตรง (direct extraction method)

2.4.1 หลักการ

นิโคตินเป็นแอลคาลอยด์ (alkaloid) ประเภทหนึ่งเมื่อทำให้เป็นค่างควายโซเคียมไฮดรอกไซด์ แอลคาลอยด์จะละลายออกมาในรูปเบสอิสระและถ้าสกัดด้วยตัวทำละลายที่เป็นสารประกอบอินทรีย์ นิโคตินจะละลายในชั้นสารประกอบอินทรีย์สามารถวิเคราะห์ได้โดยอาศัยคุณสมบัติเฉพาะตัวของนิโคตินในการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลตเมื่ออยู่ในสารละลายสารประกอบอินทรีย์ สารที่นิยมใช้ในการสกัดนิโคตินคือ สารผสมระหว่าง benzene-chloroform ในอัตราส่วนที่เหมาะสม ตัวอย่างการวิเคราะห์นิโคตินโดยเทคนิคต่าง ๆ หลังจากสกัดนิโคตินออกจากสารตัวอย่างเช่น ในปี ค.ศ. 1955 Robert และ Peter (23) ได้วิเคราะห์นิโคตินในใบยาสูบโดยวิธี potentiometric titration ในสารละลายที่ปราศจากน้ำ หลังจากสกัดนิโคตินออกจากสารตัวอย่างด้วยแอมเรียมไฮดรอกไซด์ และสารละลายผสมของ benzene กับ chloroform อัตราส่วน 9:1 โดยปริมาตรเขย่าด้วยมือ 20 นาที กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 2 ผลิตภัณฑ์ Whatman นำมาเติม acetic anhydride จำนวน 2 cm^3 แล้วไทเทรตกับสารละลายกรดเปอร์คลอริก (perchloric acid) มาตรฐาน โดยมี crystal violet เป็น indicator ที่จุดยุติของการไทเทรตสารละลายจะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเขียว ในปี ค.ศ. 1967 Jacin, Slanski และ Mashy (14) ได้วิเคราะห์นิโคตินในใบยาสูบโดยวิธีโครมาโตกราฟีแก๊ส (gas chromatography) หลังจากสกัดนิโคตินออกจากใบยาสูบด้วยแอมเรียมไฮดรอกไซด์ 0.5 กรัม ผสมกับสารละลายอิ่มตัวของแอมเรียมไฮดรอกไซด์ 10 cm^3 และสารละลายผสมของ benzene กับ chloroform อัตราส่วน 9:1 โดยปริมาตร เขย่าด้วยเครื่องมือ (wrist-action shaker) เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำสารละลายจำนวนเล็กน้อยในชั้นของ benzene-chloroform นี้นำเข้าไปในเครื่องมือ gas chromatography เพื่อหาปริมาณนิโคติน

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการสกัดนิโคตินจากสารละลายนิโคตินมาตรฐานที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน (เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน) และสกัดนิโคตินจากใบยาสูบอย่างเก็บจากตำบลบ้านลอง อำเภอสอง จังหวัดแพร่ (ใบยาสูบตัวอย่างหมายเลข 8) ด้วยสารผสมที่ประกอบด้วย benzene และ chloroform ในอัตราส่วน 9:1 โดยปริมาตร (14,23) วัตถุประสงค์ของการทดลองนี้ก็คือเพื่อนำข้อมูลที่ได้นี้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลที่ได้จากวิธีสกัดโดยการกลั่นด้วยไอน้ำ

2.4.2 การเตรียมใบยาสูบก่อนการวิเคราะห์

- 1) นำตัวอย่างใบยาสูบไปอบที่อุณหภูมิ $60-65^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- 2) บดใบยาสูบด้วย mortar ให้ละเอียด แล้วร่อนผ่านตะแกรง 35 mesh
- 3) เก็บใบยาที่ร่อนแล้วในขวด polyethylene เพื่อป้องกันการดูดความชื้น
- 4) นำยาใบชั่ง (ด้วยเครื่องชั่งอย่างละเอียด) ประมาณ 3.5-4.5 กรัม

2.4.3 การทดลอง

2.4.3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

- 1) Pye-Unicam SP 8000 ultraviolet-visible recording spectrophotometer ผลิตโดยบริษัท Pye-Unicam Ltd., Cambridge, England
conditions ที่ใช้ศึกษา spectrum

absorbance 0-1.0 fsd

scan speed fast

- 2) Filter paper (Whatman) number 1. ผลิตโดยบริษัท W & R Balston Ltd., England

2.4.3.2 สารเคมีที่ใช้

1. Standard nicotine liquid, analytical grade
ผลิตโดยบริษัท BDH Chemicals Ltd., England
2. Sodium hydroxide, analytical grade
ผลิตโดยบริษัท BDH Chemicals Ltd., England
3. Chloroform, zur analyse
ผลิตโดยบริษัท E. Merck A.G. Darmstadt, Germany
4. Benzene, zur analyse
ผลิตโดยบริษัท E. Merck A.G. Darmstadt, Germany
5. Barium hydroxide, analytical grade
ผลิตโดยบริษัท E. Merck A.G. Darmstadt, Germany
6. Potassium hydroxide, analytical grade
ผลิตโดยบริษัท E. Merck A.G. Darmstadt, Germany

2.4.4 การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์

2.4.4.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานของนิโคตินในการทำกราฟมาตรฐาน

ปิเปตสารละลายมาตรฐานของนิโคติน 0.25 cm^3 ละลายด้วย benzene: chloroform 9:1 (โดยปริมาตร) จนปริมาตรครบ 500 cm^3 ในขวดปริมาตร จะได้ stock solution ที่มีความเข้มข้น 500 ppm สำหรับเตรียมความเข้มข้น 50, 100, 150, 200 และ 250 ppm.

2.4.1 การเตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide 6 mole/dm^3) ซึ่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 60.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วทำให้ปริมาตรครบ 250 cm^3 ในขวดปริมาตรจะได้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 6 mole/dm^3 ซึ่งใช้เป็น stock solution สำหรับเตรียมความเข้มข้นอื่น ๆ ต่อไป

2.4.4.2 การเตรียมสารละลายโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ (potassium hydroxide) 6 mole/dm^3

ชั่งโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์มา 84 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วทำให้มีปริมาตรครบ 250 cm^3 ในขวดปริมาตรจะได้อาหารละลายโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 6 mole/dm^3 ซึ่งใช้เป็น stock solution สำหรับเตรียมความเข้มข้นอื่น ๆ ต่อไป

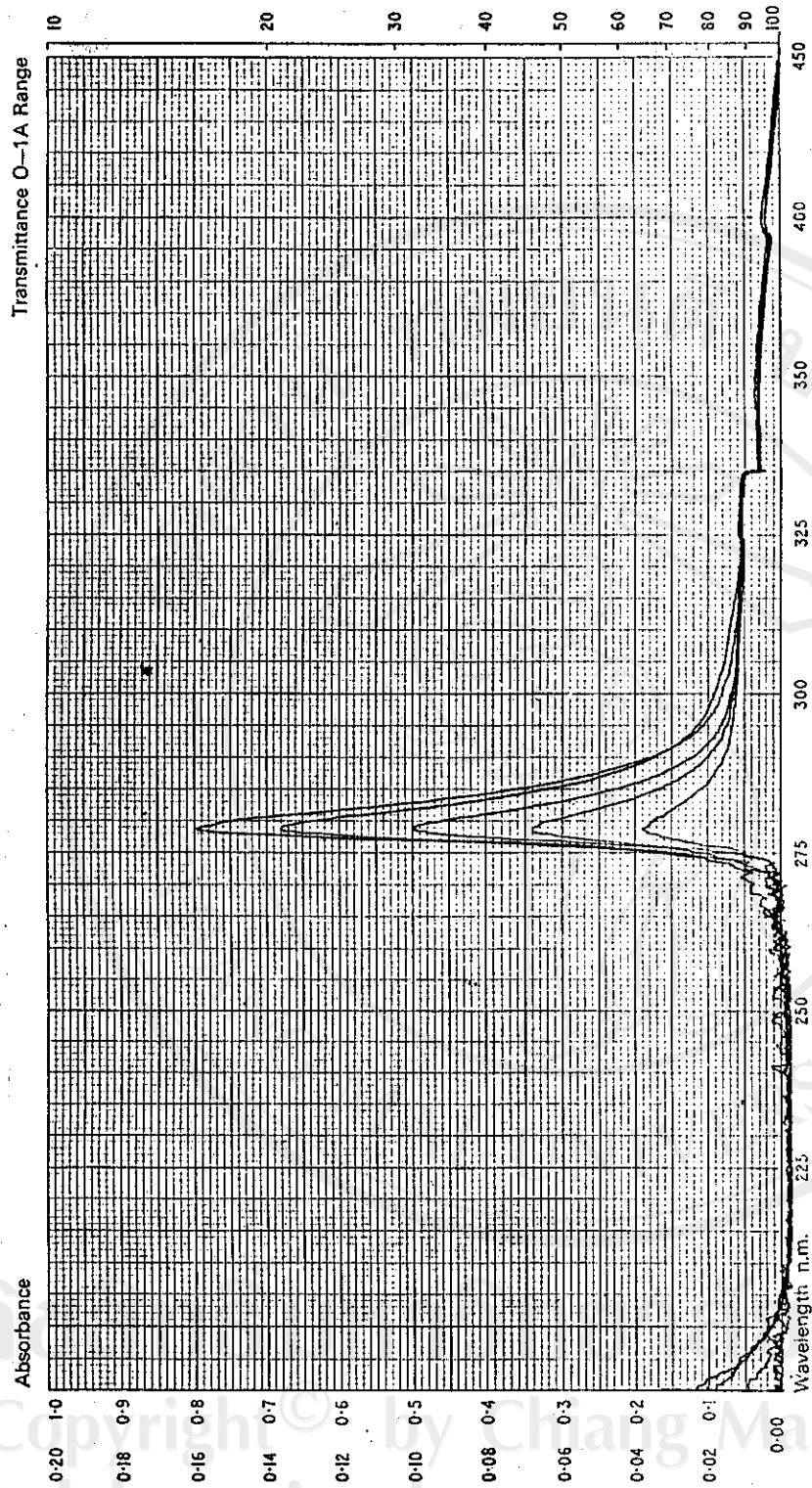
2.4.4.3 การเตรียมสารละลายแบเรียมไฮดรอกไซด์ (barium hydroxide) 3 mole/dm^3

ชั่งแบเรียมไฮดรอกไซด์มา 103 กรัม ละลายในน้ำ แล้วทำให้มีปริมาตรครบ 250 cm^3 ในขวดปริมาตร จะได้อาหารละลายแบเรียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 3 mole/dm^3 ซึ่งเป็น stock solution สำหรับเตรียมความเข้มข้นอื่น ๆ ต่อไป

2.4.5 ผลการทดลองและวิจารณ์

2.4.5.1 การศึกษาหาภาวะของการทดลอง

1) การสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve) การเตรียมกราฟมาตรฐานเตรียมได้โดยนำสารละลายนิโคตินมาตรฐานมีความเข้มข้น 50-250 ppm มาสกัดด้วย benzene-chloroform อัตราส่วน 9:1 โดยปริมาตร แล้วนำไปบันทึกสเปกตรัมได้สเปกตรัมดังรูป 2.12 เมื่อนำมาแปรผลได้ข้อมูลดังตาราง 18



รูป 2.12 สเปกตรัมของสารละลายเบนซีนในคลอโรฟอร์ม 9 : 1 โดยปริมาตร

ตาราง 2.18 ค่าดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานนิโคติน (absorbance of standard nicotine solution)

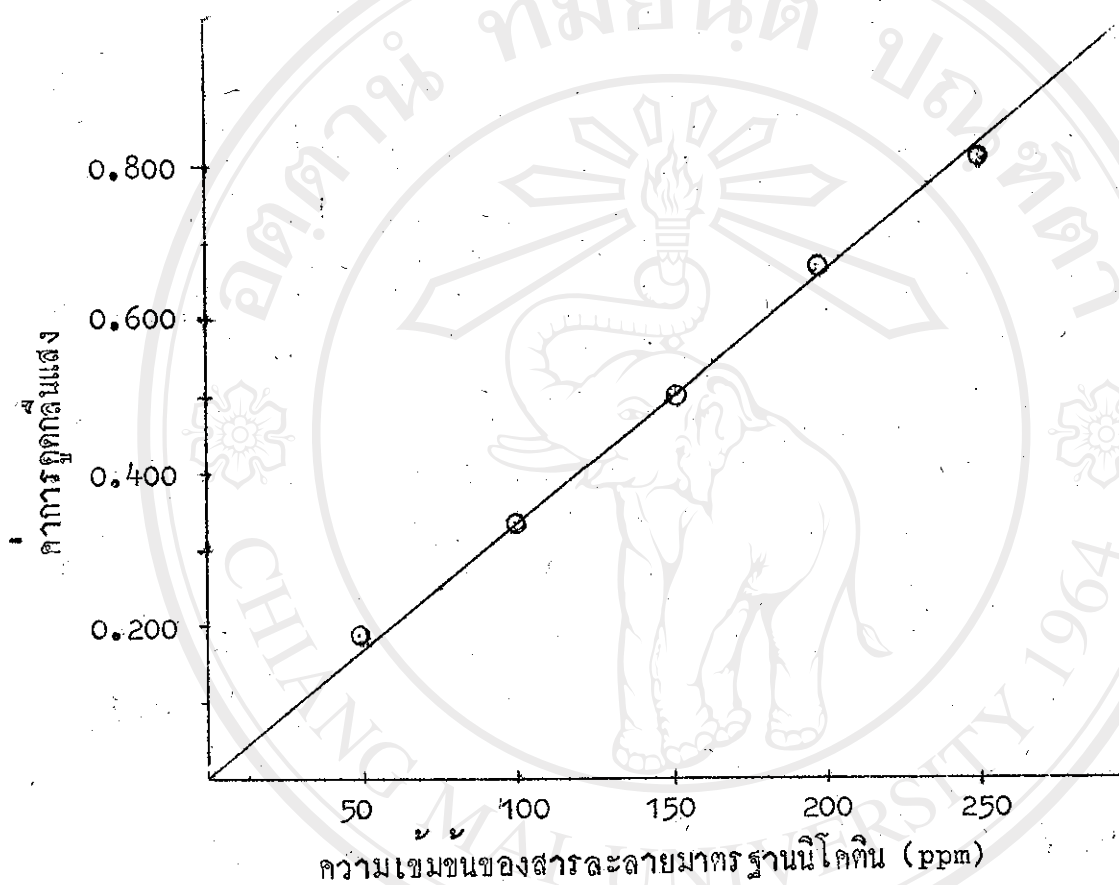
ความเข้มข้นของนิโคติน (ppm)	ค่าดูดกลืนแสง
50	0.18
100	0.33
150	0.50
200	0.67
250	0.81

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved

นำข้อมูลในตาราง 2.18 ไปสร้างเป็นกราฟมาตรฐานได้ ดังรูป 2.13



รูป 2.13 กราฟมาตรฐานของค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสาร

ละลายนิโคตินมาตรฐานในสารละลาย benzene : chloroform

9 : 1 โดยปริมาตร (50-250 ppm)

2.4.5.2 การสกัดนิกโคตินจากใบยาสูบ

1) การทดลองเบื้องต้น

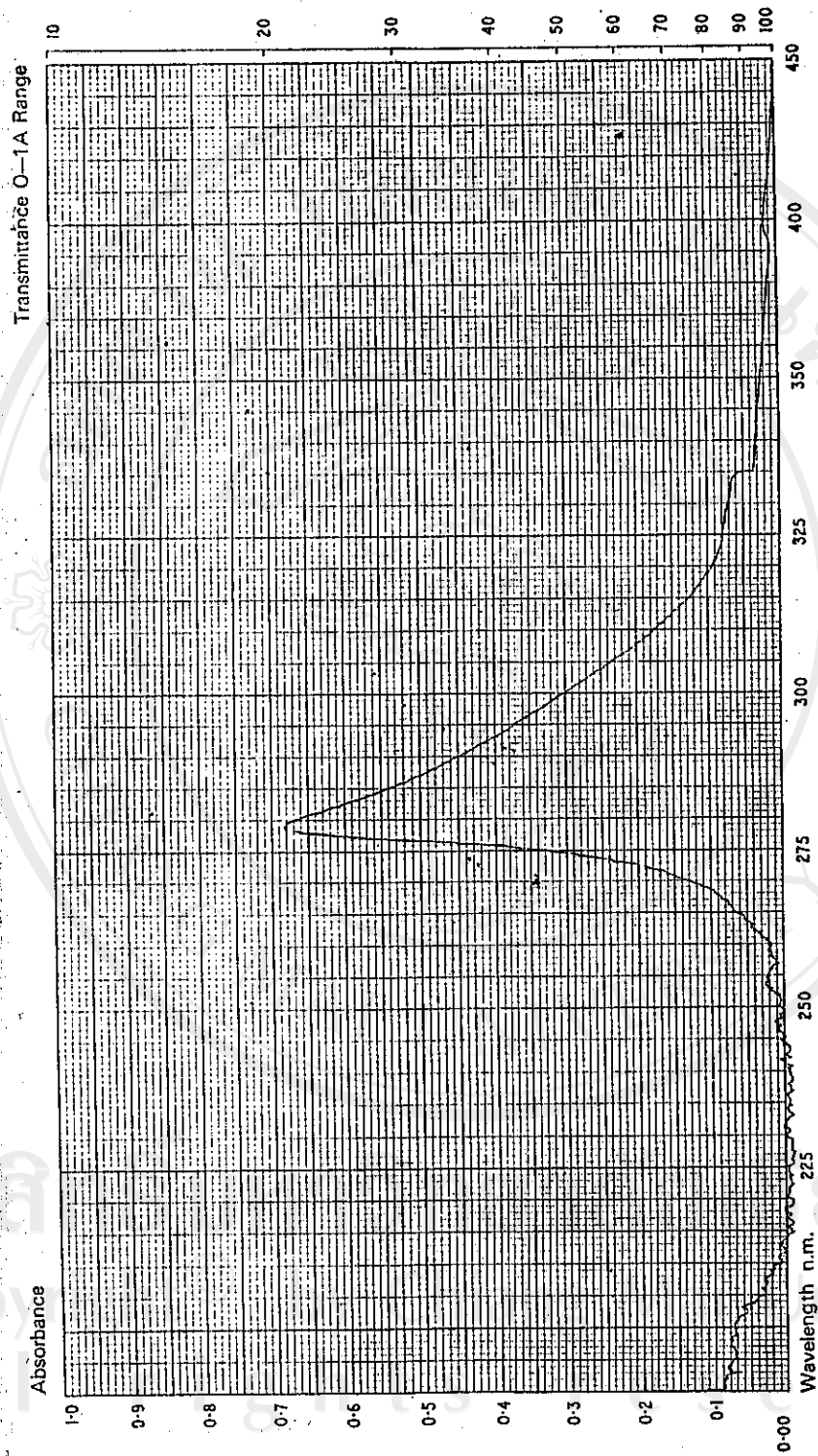
นำใบยาสูบที่เตรียมมาแล้วในหัวข้อ 2.4.2 ที่ซึ่งแล้วโดยเครื่องซึ่งอย่างละเอียดใส่ลงใน Separating funnel ขนาด 500 cm^3 แล้วเติมเบส 20 cm^3 เขย่า 20 นาที เพื่อผสมกัน เติม benzene : chloroform อัตราส่วน 9 : 1 โดยปริมาตร สกัด 3 ครั้ง ๆ ละ 50 cm^3 แยกชั้น benzene-chloroform ออกแล้วเติม anhydrous sodium sulfate เพื่อดูดเอาน้ำออก กรอง organic solution ด้วยกระดาษกรอง (Whatman No. 1) ในสูญญากาศ ทำปริมาตรสุดท้ายเป็น 200 cm^3 โดยขวดปริมาตร ปิเปตมา 10 cm^3 dilute เป็น 50 cm^3 เสร็จแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน ซึ่งควรจะโคสเปกตรัมดังรูป 2.14

เพื่อให้ได้วิธีที่มี sensitivity สูง และให้ข้อมูลเป็นที่เชื่อถือได้ จึงจำเป็นต้องทำอย่างนี้จะต้องทำการทดลองเพื่อหาสภาวะของการทดลองที่เหมาะสมต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved



รูป 2.14 สเปกตรัมของนิโคตินที่สกัดได้จากใบยาสูบ

2) การศึกษาภาวะที่เหมาะสมของการทดลอง

ในการศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่าง ๆ ใช้ใบยาสูบตัวอย่างจากตำบลบ้านภาค อำเภอสันป่าตอง จังหวัดเชียงใหม่ (ตัวอย่างหมายเลข 21)

ก. การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของคางที่เหมาะสม

ชนิดและความเข้มข้นของคางที่ใช้เป็นตัวสกัดนิโคตินจากใบยาสูบเพื่อหาชนิดและความเข้มข้นของคางเพื่อที่จะสกัดนิโคตินออกจากใบยาสูบให้ได้มากที่สุด ซึ่งทำได้โดยดำเนินขั้นตอนการทดลองตามหัวข้อ 2.4.5.2 โดยใช้คางชนิดต่าง ๆ คือ แบริยมไฮดรอกไซด์, โซเดียมไฮดรอกไซด์และโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ กำหนดภาวะของการทดลองคือ แบริยมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1, 2, 3 mole/dm³ และอิ่มตัว และใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2, 4 และ 6 mole/dm³ ได้ผลการทดลองดังแสดงในตาราง 2.19

ตาราง 2.19 ผลของชนิดและความเข้มข้นของคางที่สกัดนิโคตินออกจากใบยาสูบตัวอย่าง

base	concentration of base(mole/dm ³)	weight of sample (g)			absorbance			% nicotine		
		(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3) average
Ba(OH) ₂	1	4.2817	4.0814	4.1209	0.31	0.28	0.29	2.16	2.08	2.12
	2	4.0625	4.0309	4.0560	0.30	0.27	0.30	2.22	2.04	2.15
	3	3.9212	4.1324	4.0612	0.29	0.28	0.30	2.17	2.18	2.17
NaOH	saturated	4.0612	4.1983	3.8725	0.28	0.28	0.27	2.03	2.09	2.07
	2	4.0848	4.1064	4.2134	0.14	0.14	0.16	1.04	1.03	1.06
	4	4.1917	4.0309	4.1768	0.38	0.37	0.37	2.74	2.79	2.74
	6	4.2220	4.3465	4.0911	0.38	0.38	0.34	2.65	2.51	2.63
KOH	2	4.2409	3.9561	4.1269	0.30	0.30	0.32	2.12	2.27	2.24
	4	4.2820	4.1742	4.0840	0.38	0.36	0.35	2.69	2.58	2.61
	6	4.0567	4.0658	4.1454	0.30	0.32	2.22	2.22	2.21	2.25

จากตาราง 2.19 แสดงว่าชนิดและความเข้มข้นของค่างที่ใช้สกัดนิโคติน มีอิทธิพลต่อการสกัดนิโคตินได้ไม่เท่ากันเช่น แบริยมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 3 mole/dm^3 สกัดนิโคตินออกจากใบยาสูบได้มากที่สุดคือ 2.17 % โซเดียมไฮดรอกไซด์สกัดได้มากที่สุดคือ 2.74 % จะต้องมีความเข้มข้น 4 mole/dm^3 และโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 4 mole/dm^3 สกัดนิโคตินจากใบยาสูบได้มากที่สุด คือ 2.61 % ดังนั้นจะเห็นว่าโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 4 mole/dm^3 เป็นชนิดของค่างที่สกัดนิโคตินออกจากใบยาสูบได้มากที่สุด ซึ่งจะใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นนี้ในการทดลองต่อไป

ข. การศึกษาปริมาตรของโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 4 mole/dm^3 ที่เหมาะสมในการสกัดนิโคติน

เมื่อศึกษาพบว่าโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 4 mole/dm^3 สามารถสกัดนิโคตินได้มากที่สุด แต่ยังไม่ทราบว่า จะเติมลงไปปริมาตรเท่าไร การสกัดจึงจะมากที่สุด ดังนั้นการทดลองจึงแปรผันปริมาตรของโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 4 mole/dm^3 ปริมาตร 10, 20, 30 และ 40 cm^3 ตามลำดับ วิธีทดลองทำการทดลองเหมือนหัวข้อ 2.4.5.2 และใช้ภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากผลการทดลองในข้อ ก. ได้ผลการทดลองดังแสดงในตาราง 2.20

ตาราง 2.20 ผลของปริมาตรโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 4 mole/dm³ ต่อการสกัดนิโคติน

vol of NaOH (mole/dm ³) (cm ³)	weight of sample (g)			absorbance			% nicotine			
	(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)	average
10	4.0693	4.1608	4.0615	0.18	0.18	0.18	1.35	1.32	1.35	1.34
20	4.1917	4.0309	4.1768	0.38	0.37	0.37	2.74	2.79	2.69	2.74
30	4.1058	4.1810	4.1072	0.32	0.30	0.30	2.34	2.15	2.19	2.23
40	4.0598	4.0963	4.0441	0.28	0.28	0.28	2.09	2.08	2.10	2.09

จากตาราง 2.20 แสดงว่าปริมาตรที่เหมาะสมของโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 4 mole/dm³ คือ 20 cm³ เพราะสกัดนิโคตินได้มากที่สุด จึงใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ปริมาตรนี้ในการทดลองต่อไป

ค. การศึกษาจำนวนครั้งที่เหมาะสมในการสกัดนิโคติน

เมื่อสกัดนิโคตินด้วยค่างแล้วนิโคตินจะอยู่ในรูปแบบอิสระและเนื่องจาก

นิโคตินเป็นสารอินทรีย์ จึงละลายใน benzene : chloroform 9 : 1 โดยปริมาตร ซึ่งเป็นสารละลายอินทรีย์ ในการสกัดใช้ benzene : chloroform 9 : 1 โดยปริมาตร จำนวน 150 cm³ โดยแปรผันจำนวนครั้งในการสกัดเป็น 2, 3, 4 และ 5 ครั้งตามลำดับ วิธีการทดลองทำการทดลองเหมือนหัวข้อ 2.4.5.2 และใช้ภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากผลการทดลองในข้อ ก-ข โดยผลการทดลองดังแสดงในตาราง 2.21

ตาราง 2.21 ผลของจำนวนครั้งที่ทำการทำ solvent extraction ในการสกัดนิโคติน

จำนวนครั้งที่ ในการสกัด	ปริมาตร(cm^3) solvent ในการสกัดครั้งที่	weight of sample (g)			absorbance			% nicotine		
		(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3) average
2	75	4.0167	4.0182	4.0251	0.22	0.24	0.24	1.62	1.80	1.80
3	50	4.2164	4.1870	4.1321	0.38	0.36	0.36	2.73	2.57	2.60
4	37.50	4.0382	3.9212	4.2314	0.40	0.40	0.42	2.97	3.06	2.99
5	30	4.0650	3.9519	4.1804	0.40	0.40	0.42	2.95	3.04	2.99

จากตาราง 2.21 แสดงว่าการสกัด 2 ครั้งใช้สารสำหรับสกัดครั้งละ 75 cm³ โคปริมาณนิโคติน 1.74 % และการสกัด 3 ครั้ง ใช้สารสำหรับสกัดครั้งละ 50 cm³ โคปริมาณนิโคติน 2.63 % จะเห็นว่าถ้าเพิ่มจำนวนครั้งในการสกัดจะโคปริมาณนิโคตินเพิ่มขึ้นจะโคปริมาณนิโคตินเพิ่มขึ้นจนกระทั่งสกัด 4 ครั้ง และ 5 ครั้ง ปรากฏว่าโคปริมาณการสกัดนิโคตินได้เท่ากันคือ 2.99 % ซึ่งแสดงว่าการสกัด 4 ครั้ง ใช้สารสำหรับการสกัดครั้งละ 37.50 cm³ เป็นจำนวนครั้งน้อยที่สุดในการสกัดนิโคตินออกจากใบยาสูบได้หมดพอดี เมื่อใช้ตัวสกัดทั้งหมดปริมาตรเท่ากันคือ 150 cm³ ดังนั้นการสกัดจะใช้ benzene : chloroform 9 : 1 โดยปริมาตร สกัด 4 ครั้ง ใช้สารสำหรับสกัดครั้งละ 37.50 cm³ ในการทดลองหาปริมาณนิโคตินในใบยาสูบตัวอย่างต่อไป

2.4.5.3 การคำนวณหาปริมาณนิโคตินในใบยาสูบตัวอย่าง

ตัวอย่างการคำนวณ

จากตาราง 2.21 สามารถคำนวณหาเปอร์เซ็นต์นิโคตินได้ดังต่อไปนี้
จากการดูค่าคลิ่นแสงที่ได้ของตัวอย่างใบยาสูบนำไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน แล้วคำนวณหาปริมาณที่แท้จริงของนิโคตินในใบยาสูบ

$$\text{สารละลายนิโคตินที่ได้จากการสกัดมีค่าดูคลิ่นแสง} = 0.40$$

$$\therefore \text{ในสารละลาย } 50 \text{ cm}^3 \text{ มีนิโคติน} = 120 \times 50 \text{ } \mu\text{g}$$

$$\therefore \text{ในสารละลาย } 10 \text{ cm}^3 \text{ มีนิโคติน} = 120 \times 50 \text{ } \mu\text{g}$$

$$\text{ในสารละลาย } 200 \text{ cm}^3 \text{ มีนิโคติน} = \frac{120 \times 50 \times 200}{10} \text{ } \mu\text{g}$$

$$= \frac{120 \times 50 \times 200 \times 10^{-6}}{10} \text{ g}$$

$$\text{น้ำหนักใบยาสูบที่ใช้} = 4.0382 \text{ g}$$

$$\therefore \text{ปริมาณนิโคตินมี} = \frac{120 \times 50 \times 200 \times 10^{-6} \times 10^2}{10 \times 4.0382}$$

$$= 2.97 \%$$

$$\begin{aligned}
 \text{การทำครั้งที่ 2 และ 3 ได้ปริมาณนิโคติน} &= 3.06 \text{ และ } 2.95 \% \\
 \therefore \text{ค่าเฉลี่ยปริมาณนิโคติน} &= \frac{2.97 + 3.06 + 2.95}{3} \\
 &= 2.99 \%
 \end{aligned}$$

2.4.5.4 การหาปริมาณนิโคตินในตัวอย่างใบยาสูบโดยวิธี standard addition

ในการวิเคราะห์หาปริมาณนิโคตินในตัวอย่างใบยาสูบโดยใช้วิธีการสกัดโดยตรงอาจจะมีองค์ประกอบในใบยาสูบ เช่น นอร์นิโคติน (nornicotine) และสารอินทรีย์ต่าง ๆ รบกวนเพื่อลดค่า (compensate) ผลจาก matrix ซึ่งอาจตกค้างอยู่ในสารละลายที่สกัดได้จากใบยาสูบตัวอย่าง จึงควรใช้วิธี standard addition

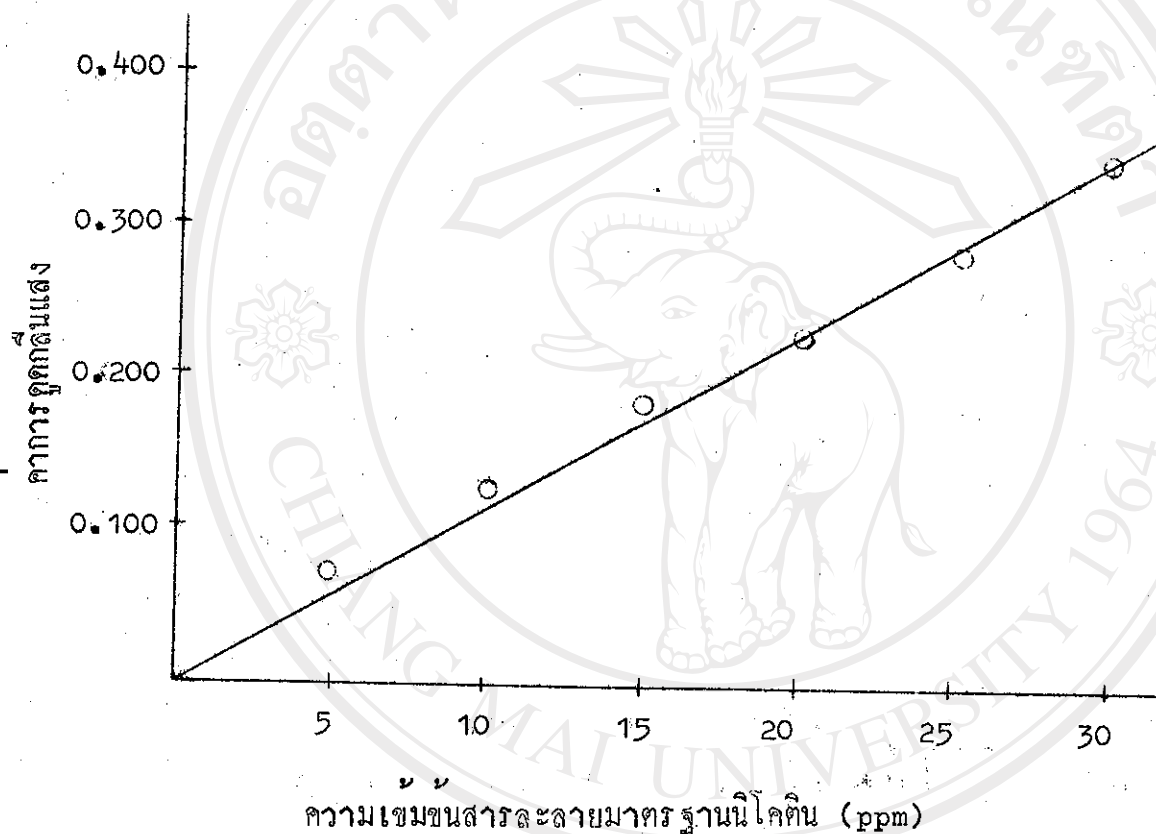
การหาปริมาณนิโคตินโดยวิธี standard addition มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

(1) การทำกราฟมาตรฐาน (calibration curve) โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานนิโคตินตามหัวข้อ 2.4.4.1 ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน (5-30 ppm) เพื่อจะได้นำกราฟมาตรฐานในการหาปริมาณนิโคตินสอดคล้องกับจำนวนนิโคตินที่เติม (ppm) ในการทำ standard addition ดังตาราง 2.22

ตาราง 2.22 ค่าดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานนิโคติน

concentration of standard nicotian solution (ppm)	absorbance
5	0.08
10	0.12
15	0.17
20	0.25
25	0.27
30	0.34

นำข้อมูลในตาราง 2.22 ไปสร้างเป็นกราฟมาตรฐานโดยพล็อตระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานนิโคตินได้กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรงผ่านจุดศูนย์ (รูป 2.15)



รูป 2.15 กราฟมาตรฐานของค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลายนิโคตินมาตรฐาน (5-30 ppm)

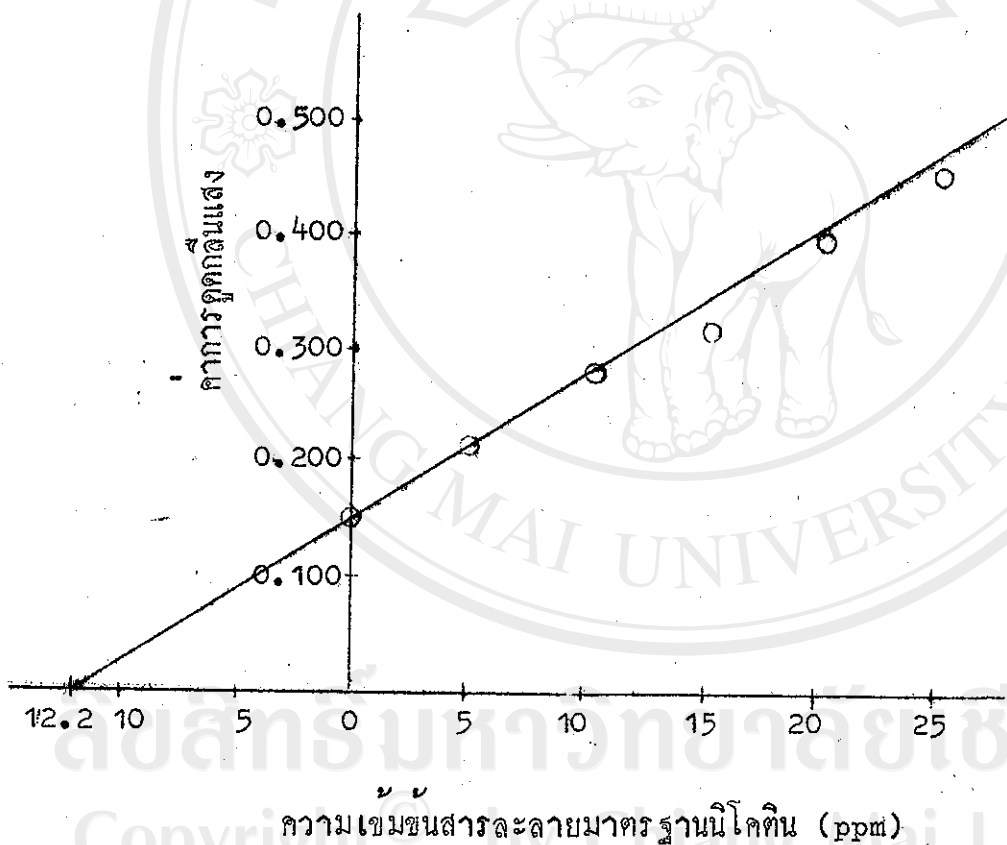
- (2) ชั่งใบยาสูบตัวอย่างหมายเลข 8 ทั้งหมด 6 ครั้งให้น้ำหนักเท่ากันคือ 4.0370 กรัม
- (3) นำยาสูบที่ชั่งแล้วหาปริมาณนิโคตินโดยวิธีการสกัดโดยตรง ทำการทดลองเหมือนหัวข้อ 2.4.5.2 และใช้ภาวะที่เหมาะสมที่ได้ผลการทดลองในหัวข้อ 2.4.6.1 ข้อ ก-ค
- (4) เตรียมสารละลายมาตรฐานที่ทราบปริมาณนิโคตินที่แน่นอน (5-30 ppm) ลงในสารละลายตัวอย่างมีน้ำหนักใบยาสูบเท่ากับที่ใช้ในข้อ 2 แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณนิโคตินโดยใช้เทคนิคเดียวกัน
- (5) นำปริมาณนิโคตินในข้อ 4 ลบด้วยปริมาณนิโคตินในข้อ 2 จะได้ปริมาณของนิโคตินที่หาได้
- (6) นำปริมาณของนิโคตินของสารละลายมาตรฐานนิโคตินที่หาได้จากข้อ 5 หาค่ายปริมาณนิโคตินของสารละลายมาตรฐานที่เติมลงไปแล้วคูณผลที่ได้ด้วย 100 ก็จะเป็น percentage recovery ของเทคนิคนี้

ตาราง 2.23 ค่า percentage recovery ของใบยาสูบตัวอย่างหมายเลข 8

สารละลายที่สกัดได้ 200 cm³ บีบออกมา 10 cm³ เจือจางให้ได้ปริมาตรเป็น 100 cm³

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานนิโคติน (ppm)	absorbance	ความเข้มข้นของนิโคตินรวมจาก calibration curve (ppm)	ความเข้มข้นของนิโคตินที่พบ (ppm)	% recovery
0	0.155	13.75	-	-
5	0.210	18.50	4.75	95.00
10	0.265	23.25	9.50	95.00
15	0.320	26.25	12.50	83.00
20	0.375	32.75	19.00	95.00
25	0.455	37.50	23.75	95.00
			เฉลี่ย	92.60

จากตาราง 2.23 นำไป Plot standard addition curve โดย Plot ระหว่าง ปริมาณค่าดูดกลืนแสงกับนิโคตินที่เติม (ppm) ได้ดังแสดงในรูป 2.16 หาปริมาณนิโคติน ในใบยาสูบตัวอย่างหมายเลข 8 เท่ากับ 0.60 % เมื่อเปรียบเทียบกับ conventional method หาปริมาณนิโคตินได้เท่ากับ 0.68 %



รูป 2.16 standard addition curve ของการวิเคราะห์นิโคตินในใบยาสูบตัวอย่างหมายเลข 8

2.4.6 สรุปผลการทดลอง

การวิเคราะห์หาปริมาณโคตินในใบยาสูบตัวอย่างโดยวิธีสกัดทราโวโอเลตสเปกโตรโฟโตเมตริกหลังจากสกัดโคตินจากใบยาสูบตัวอย่างด้วยวิธีการสกัดโคตินโดยตรง (direct extraction method) ด้วยสารละลายผสมระหว่าง benzene กับ chloroform ในอัตราส่วน 9 : 1 โดยปริมาตร จากผลการทดลองที่ได้พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโคตินในกรณีนี้ของค่าที่ใช้สกัดโคตินออกจากใบยาสูบได้มากที่สุดคือ โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 4 mole/dm^3 ปริมาตร 20 cm^3 และจำนวนครั้งที่เหมาะสมในการสกัดโคติน (ด้วยสารละลายผสมระหว่าง benzene กับ chloroform ในอัตราส่วน 9 : 1 โดยปริมาตร) 4 ครั้ง ใช้สารสำหรับการสกัดครั้งละ 37.50 cm^3 เมื่อใช้ตัวสกัดทั้งหมดปริมาตรเท่ากันคือ 150 cm^3 เมื่อศึกษาความถูกต้องของการวิเคราะห์ของเทคนิคนี้ได้ค่าเฉลี่ย 92.60 % และเมื่อนำเทคนิคนี้หาปริมาณโคตินในใบยาสูบตัวอย่างหมายเลข 8 โดยวิธี standard addition curve ได้ปริมาณโคตินเท่ากับ 0.60 % เมื่อเปรียบเทียบกับ conventional method ได้ปริมาณโคตินเท่ากับ 0.68 %

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved