

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลองและขอเสนอแนะ

4.1 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การวิจัยนี้เป็นการหาปริมาณนิโคตินในใบยาสูบตัวอย่างในเขตจังหวัดภาคเหนือของประเทศไทย ตัวอย่างที่นำมาวิจัยมี 20 ตัวอย่าง ได้มาจาก จ.เชียงใหม่ จ.น่าน จ.แพร่ จ.เชียงราย จ.พะเยา และ จ.ลำปาง โดยได้รับอนุเคราะห์จากโรงงานบ่มยาสูบบริษัทอินเตอร์เอเซียเนทวอร์ค จำกัด โดยทำการสกัดนิโคตินออกจากใบยาสูบด้วย 2 เทคนิคคือ (1) การกลั่นด้วยไอน้ำและ (2) การสกัดโดยตรงด้วยตัวทำละลายผสมระหว่าง benzene กับ chloroform ในอัตราส่วน 9:1 โดยปริมาตร

นำสารละลายนิโคตินที่สกัดจากใบยาสูบตัวอย่างโดยวิธีกลั่นด้วยไอน้ำไปวิเคราะห์หาปริมาณนิโคตินโดยวิธีอุตสาหกรรมไอโอเดตสเปกโตรโฟโตเมตรี และวิธีไทเทรชัน ส่วนการสกัดโดยตรงด้วยสารละลายผสมของ benzene กับ chloroform ในอัตราส่วน 9:1 โดยปริมาตรนั้นใช้สกัดนิโคตินจากใบยาสูบตัวอย่างที่เก็บจากตำบลบ้านลอง อำเภอสอง จังหวัดแพร่ (ตัวอย่างหมายเลข 8) เท่านั้น

ก่อนที่จะนำตัวอย่างดังกล่าวมาวิเคราะห์หาปริมาณนิโคตินต้องนำมายาอบและบดให้ละเอียดภายใต้สภาวะที่เหมาะสม และใช้เทคนิคดังกล่าวหาปริมาณนิโคตินได้ผลสรุปดังต่อไปนี้

4.1.1 อุตสาหกรรมไอโอเดตสเปกโตรโฟโตเมตรี หลังจากสกัดนิโคตินด้วยการกลั่นด้วยไอน้ำ นิโคตินสามารถระเหยปนมากับไอน้ำเดือด เมื่อนำไปผ่านในกรดไฮโดรคลอริกจะได้นิโคตินไดคลอเรต (nicotine dichlorate) ซึ่งสามารถดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 259 nm จากการศึกษาภาวะเหมาะสมของการทดลองในการสกัดนิโคตินโดยเทคนิคนี้พบว่าในการกลั่นด้วยไอน้ำเพื่อสกัดนิโคตินออกจากใบยาสูบจน

หาค่าใช้เวลาอย่างน้อย 20 นาที ตัวสกัดคือโซเดียมไฮดรอกไซด์ปริมาตร 5 และ มีความเข้มข้นเท่ากับ 30 % และความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก ในการรองรับสารละลายนิโคตินที่ได้จากการกลั่นเท่ากับ 4 mole/dm^3 ปริมาตร 10 cm^3 ความแม่นยำของเทคนิคนี้อยู่ในเกณฑ์พอใช้ กล่าวคือ มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ 7.34 % การหาค่าความถูกต้องในรูปร้อยละของการคืนกลับ โดยทำ standard addition มีค่าสูง คือ 92.20 ผลการทดลองโดยเทคนิคนี้ไม่มีอิทธิพลของ cations (เหล็ก, ตะกั่ว, แคลเซียม, แมงกานีส, ทองแดง, โซเดียม, โพแทสเซียม, นิเกิล) มารบกวนผลการวิเคราะห์ เนื่องจากการกลั่นด้วยไอน้ำสามารถแยกนิโคตินออกจากใบยาสูบตัวอย่างได้โดยที่ไม่มีโลหะอื่นออกมาปน แต่มีโซเดียมและโพแทสเซียมปนออกมาเล็กน้อย ทำให้เปอร์เซ็นต์ความคลาดเคลื่อนการวัดค่าถูกกลั่นลดลงประมาณ 0.10 และ 0.02 ตามลำดับ (ตาราง 2.12 และตาราง 2.11) ซึ่งไอออนเหล่านี้มาจากตัวสกัดนิโคตินคือ โซเดียมคลอไรด์เป็นส่วนมากและมีโพแทสเซียมไอออนน้อยกว่าโซเดียมไอออนมาก โพแทสเซียมที่พบในส่วนนี้อาจมาจาก impurity ในโซเดียมคลอไรด์ อีกส่วนนี้อาจมาจากใบยาสูบซึ่งมีปริมาณน้อย ดังนั้นในการวิเคราะห์หาปริมาณนิโคตินในใบยาสูบตัวอย่าง จึงไม่จำเป็นต้องกำจัด cations ต่าง ๆ ก่อนที่จะนำไปวัดค่าการถูกกลั่นแสง

4.1.2 ไทเทรชันอาศัยการสกัดนิโคตินโดยการกลั่นด้วยไอน้ำ ทำการทดลองและใช้สภาวะเหมาะสมการทดลองเหมือนกับเทคนิคในหัวข้อ 4.1.1.1 แต่ไม่มีกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 4 mole/dm^3 เป็นตัวรองรับ สารละลายที่กลั่นได้จะมีฤทธิ์เป็นเบสเมื่อนำมาไทเทรตกับสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่เตรียมขึ้นมาโดยทราบความเข้มข้นแน่นอน พบว่าความแม่นยำของเทคนิคนี้อยู่ในเกณฑ์ดี กล่าวคือ มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ 3.61 % การหาค่าความถูกต้องในรูปร้อยละการคืนกลับ โดยทำ standard addition มีค่า 94.63

4.1.3 การสกัดโดยตรง อาศัยคุณสมบัติเฉพาะตัวของนิโคตินในการดูดกลืนแสง เมื่ออยู่ในสารละลาย benzene กับ chloroform อัตราส่วน 9:1 โดยปริมาตร ซึ่งจะถูกกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 279 nm จากการศึกษาภาวะเหมาะสมของการทดลองในการสกัดนิโคตินโดยเทคนิคนี้ขึ้นอยู่กับชนิดและความเข้มข้นของค่างที่เหมาะสม คือ โซเดียมไฮดรอกไซด์และความเข้มข้น 4 mole/dm³ ตามลำดับ ปริมาตรของ โซเดียมไฮดรอกไซด์ 20 cm³ และจำนวนครั้งในการสกัดด้วยตัวทำละลาย (benzene: chloroform 9:1 โดยปริมาตร) 4 ครั้ง (ตาราง 2.21) ใช้สำหรับการสกัด ครั้งละ 37.50 cm³ เมื่อใช้ตัวทำละลายเท่ากันคือ 150 cm³ ความแม่นยำของเทคนิคนี้อยู่ในเกณฑ์ใช้ได้อีกคือ ความถูกต้องในรูปร้อยละของการกลับคืน โดยทำ standard addition มีค่า 92.60 ผลการทดลองที่ได้จากการวิเคราะห์ปริมาณนิโคตินในใบยาสูบ จากจังหวัดต่าง ๆ ในเขตภาคเหนือของประเทศไทย โดยใช้เทคนิคทางการกลั่นค้าย ใต้น้ำ เปรียบเทียบกันระหว่างวิธีในเครื่องกับวิธีสเปกโตรโฟโตเมตรี แสดงไว้ในตาราง 4.1

ตาราง 4.1 เปรียบเทียบปริมาณนิโคตินในใบยาสูบระหว่างวิธีไทเทรชันกับวิธี สเปกโตรโฟโตเมตรี

หมายเลขใน ยาสูบตัวอย่าง	ปริมาณนิโคตินในใบยาสูบตัวอย่าง (%)	
	ไทเทรชัน	สเปกโตรโฟโตเมตรี
1	0.84	0.74
2	0.85	0.64
3	0.89	0.67
4	1.48	1.25
5	0.98	0.87
6	0.87	0.79

ตาราง 4.1

ต่อ

หมายเลขใน ยาสูบตัวอย่าง	ปริมาณนิโคตินในใบยาสูบตัวอย่าง (%)	
	ไทเทรชัน	สเปกโตรโฟโตเมตรี
7	0.84	0.77
8	0.63	0.52
9	0.80	0.58
10	0.93	0.78
11	0.27	0.19
12	0.95	0.76
13	0.83	0.73
14	1.73	1.55
15	0.89	0.74
16	1.08	0.91
17	0.98	0.82
18	0.63	0.48
19	0.96	0.84
20	0.66	0.57

จากตาราง 4.1 จะเห็นว่าปริมาณนิโคตินในตัวอย่างใบยาสูบในเขตภาคเหนือของประเทศไทยมีค่าต่ำคือ มีค่าไม่เกิน 2 % เนื่องจากยาสูบที่ปลูกเป็นพันธุ์เวอร์จิเนีย (virginia) เมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตบุหรี่ในสหรัฐอเมริกา (15) ได้กำหนดปริมาณนิโคตินในใบยาสูบอย่างต่ำ 1.40 % และอย่างสูงไม่เกิน 3.50 %

จะเห็นว่ายาสูบตัวอย่างในเขตภาคเหนือของประเทศไทยมีบางตัวอย่างเท่านั้นที่สามารถนำไปผลิตบุหรี่ได้ แต่ก็มีข้อดีคือ ตัวอย่างใบยาสูบทั้งหมดมีปริมาณนิโคตินน้อยคือไม่เกิน 3.50 % จึงทำอันตรายต่อสุขภาพผู้สูบน้อยลงด้วย

การเปรียบเทียบระหว่างวิธีไทเทรชันกับวิธีสเปกโตรโฟโตเมตรี โดยการหา F test เพื่อเป็นการทดสอบว่าเทคนิคทั้งสองแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ในระดับความเชื่อมั่น 95 % ผลปรากฏว่าความแตกต่างในความแม่นยำของทั้ง 2 วิธี ไม่มีนัยสำคัญ (ดูหัวข้อ 3.5.3) เมื่อเปรียบเทียบปริมาณนิโคตินของทั้งสองวิธีในแต่ละตัวอย่างปรากฏว่าวิธีไทเทรชันมีปริมาณนิโคตินสูงกว่าวิธีสเปกโตรโฟโตเมตรี ที่เป็นเช่นนี้เพราะเมื่อสกัดนิโคตินออกจากใบยาสูบโดยการกลั่นด้วยไอน้ำสารที่ไอน้ำนอกจากจะมีนิโคตินและนอร์นิโคตินแล้วยังมีแอมโมเนีย (25) ซึ่งเกิดจากเนื้อเยื่อของใบยาสูบและเกิดจากการไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ของสารประกอบ amide ในใบยาสูบ สารเหล่านี้มีคุณสมบัติเป็นเบสเมื่อละลายน้ำ ดังนั้นเมื่อไทเทรตกับกรดไฮโดรคลอริกจะทำให้คานิโคตินเป็นร้อยละสูงขึ้นเล็กน้อย ซึ่งแตกต่างจากเทคนิคการกลั่นด้วยไอน้ำที่วัดปริมาณนิโคตินด้วยเครื่องมืออุตสาหกรรมไอโอเลตสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ เมื่อนำไอน้ำผ่านเข้าไปในกรดไฮโดรคลอริกจะมีนิโคตินเท่านั้นที่หาปฏิกิริยากับกรดไฮโดรคลอริกเกิดเป็นสารประกอบนิโคตินไคคลอเรต (nicotine dichlorate) เพราะนิโคตินเป็นสารประกอบ tertiary amine เมื่ออยู่ในรูปเกลือจะเสถียร (stable) ส่วนนอร์นิโคตินซึ่งส่วนใหญ่เป็นพวกอะนาบาสิน (anabasine) เป็นสารประกอบ secondary amine ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยากับกรดไฮโดรคลอริกได้เพราะฉะนั้นโดยอาศัยคุณสมบัติเฉพาะตัวในการดูดกลืนแสงของนิโคตินไคคลอเรต จึงทำให้การหาปริมาณนิโคตินโดยวิธีนี้ถูกต้องยิ่งขึ้น

ส่วนการหาปริมาณนิโคตินด้วยวิธีการสกัดโดยตรงแล้ววัดด้วยเครื่องมืออุตสาหกรรมไอโอเลตสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ในตัวอย่างใบยาสูบหมายเลข 8 ได้ปริมาณเป็นร้อยละนิโคติน 0.68 % โดยวิธี conventional เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคการกลั่นด้วยไอน้ำวัดโดยเครื่องมืออุตสาหกรรมไอโอเลตสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ และการไทเทรต

ได้ปริมาณนิโคตินเป็นร้อยละเท่ากับ 0.52 และ 0.63 ตามลำดับ จะเห็นว่าการแยกนิโคตินด้วยวิธีการสกัดโดยตรงให้ผลสูงกว่าการแยกนิโคตินด้วยการกลั่นด้วยไอน้ำ แล้วนำไปวิเคราะห์โดยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตรีและการไทเทรตที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะสารที่สกัดได้นอกจากจะมีนิโคติน นอร์นิโคติน แล้วยังมีรงควัตถุ (pigment), ไขมัน และสารอินทรีย์ต่าง ๆ ละลายอยู่ ซึ่งส่วนประกอบเหล่านี้จะมีผลทำให้ค่าการดูดกลืนแสงเปลี่ยนไป ปริมาณนิโคตินเป็นร้อยละในใบยาสูบจึงคลาดเคลื่อนด้วย ด้วยเหตุนี้เพื่อกำจัด matrix ต่าง ๆ จึงกล่าวจึงต้องใช้ standard addition ปรากฏว่าปริมาณนิโคตินเป็นร้อยละลดลงจากวิธี conventional method 0.08 คือ มีปริมาณนิโคตินเป็นร้อยละเท่ากับ 0.60 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับเทคนิคการกลั่นด้วยไอน้ำมากขึ้น

4.2 ข้อเสนอแนะ

การหาปริมาณนิโคตินโดยการแยกนิโคตินออกจากใบยาสูบตัวอย่างด้วยเทคนิคการกลั่นด้วยไอน้ำ แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณนิโคตินโดยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตรีมีความคลาดเคลื่อนเล็กน้อย ซึ่งเกิดจาก matrix ที่อาจเหลืออยู่บางส่วนเล็กน้อยคือ นอร์นิโคตินโดย peak ของนิโคตินโคคลอเรตอาจจะซ้อนทับ (overlap) กับ peak ของนอร์นิโคตินที่ละลายอยู่ในกรดไฮโดรคลอริก (26) ซึ่งเกิดขึ้นเสมอสำหรับเทคนิคอูลตราไวโอเลตสเปกโตรโฟโตเมตรีกับสารที่มีสูตรโครงสร้างคล้าย ๆ กัน ดังเช่นนิโคตินกับนอร์นิโคตินทำให้ค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้น แต่ยิ่งข้อนี้ที่ปริมาณนอร์นิโคตินในใบยาสูบมีปริมาณค่อนข้างน้อย คือ มีปริมาณ 10 % ของจำนวนนิโคตินทั้งหมดประกอบกับการสกัดนิโคตินโดยการกลั่นด้วยไอน้ำ นอร์นิโคตินระเหยปนมากับไอน้ำได้ค่อนข้างกว่านิโคติน (17) และตัวสกัดนอร์นิโคตินต้องเป็นค่าที่มีความเข้มข้นมากกว่าค่าที่ใช้สกัดนิโคติน (20) การสกัดนอร์นิโคตินจากใบยาสูบจึงจะสกัดออกหมด ดังนั้นสารละลายที่สกัดได้จึงมีนอร์นิโคตินปนมาอย่างมาก การซ้อนทับของ peak จะเกิดขึ้นอย่างมากหรือเกือบจะไม่มีเลย อย่างไรก็ตามเพื่อลดผลกระทบจาก matrix และให้ผลถูกต้องใกล้เคียงความจริงมากที่สุด จึงต้องใช้วิธี standard addition

เพื่อเป็นการแยกนอร์นิโคตินออกจากนิโคตินในสารละลายที่กลั่นได้โดยเทคนิคการกลั่นด้วยไอน้ำ จึงควรทำการกลั่นด้วยไอน้ำ 2 ครั้ง เพราะการกลั่นด้วยไอน้ำครั้งที่หนึ่งจะมีนิโคตินผสมกับนอร์นิโคตินในสารละลายที่สกัดได้ ดังนั้นเมื่อนำสารละลายที่สกัดได้ครั้งที่หนึ่งมาเติมโซเดียมไนไตรท์ (sodium nitrite) เพื่อเปลี่ยนนอร์นิโคตินเป็นสารประกอบ nitrosamine ซึ่งจะไม่ระเหยปนมากับไอน้ำเดือด (27) เมื่อกลั่นด้วยไอน้ำอีกครั้งหนึ่งจะมีแต่นิโคตินเท่านั้นที่ระเหยปนกับไอน้ำเดือดจึงสามารถแยกนิโคตินออกจากนอร์นิโคตินได้ วิธีการทดลองโดยทำการทดลองและใช้สภาวะที่เหมาะสมเหมือนกับวิธีสกัดนิโคติน โดยการกลั่นด้วยไอน้ำที่วัดด้วยเครื่องมืออุตสาหกรรมไวโอเลตสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ แต่ไม่มีกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 4 mole/dm^3 เป็นตัวรองรับ เมื่อกลั่นด้วยไอน้ำครั้งแรก นำสารละลายที่กลั่นได้ครั้งแรกนี้จำนวน 10 cm^3 ทำเป็นกลางด้วยฟีนอล์ฟทาลีน (phenolphthalein) เติมกรดอะซิติกเข้มข้น 30 % ปริมาตร 10 cm^3 และเติมโซเดียมไนไตรท์ 0.5 กรัม ตั้งทิ้งไว้ 20 นาที (นอร์นิโคตินจะเปลี่ยนเป็นสารประกอบ nitrosamine) หลังจากนั้นทำให้เป็นด่างด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์นำสารที่ได้มากลั่นด้วยไอน้ำอีกครั้งหนึ่งผ่านสารละลายที่กลั่นได้ในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 4 mole/dm^3 จำนวน 10 cm^3 ใช้เวลากลั่น 20 นาที ทำปริมาตรสุดท้ายเป็น 250 cm^3 หลังจากการกลั่นในขวดวัดปริมาตรเขย่า 1 นาที นำสารละลายที่ได้วัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องมืออุตสาหกรรมไวโอเลตสเปกโตรโฟโตมิเตอร์หาปริมาณนิโคตินได้โดยเปรียบเทียบกับกราฟของสารละลายมาตรฐานนิโคติน

เนื่องจากสารละลายที่สกัดได้จากใบยาสูบโดยกลั่นด้วยไอน้ำมีแอลคาลอยด์ที่นอกเหนือจากนิโคตินปนอยู่ (14) เช่น นอร์นิโคติน อะนาบาสีน (anabasine) ดังนั้นเพื่อต้องการหาปริมาณนิโคตินในใบยาสูบให้มีความถูกต้องสูงควรใช้โครมาโตกราฟีผิวบาง (TLC) (14) (28) ในการแยกแอลคาลอยด์ต่าง ๆ ซึ่งทำได้โดยนำสารละลายที่สกัดได้ไปแยกในเพลต (plates) silica gel ในตัวทำละลายผสมของ benzene - methanol-ammonia = 60:10:1 ปรับ pH 8 โดยใช้ borate (0.02 mole/dm^3)

เป็นบัฟเฟอร์ แล้วนำไป detect ภายใต้ UV lamp หรือนำไปอบในถัง cyanogen bromide จะทำให้เกิดจุดสีน้ำตาล หากค่า R_f เปรียบเทียบกับ R_f นิโคตินบริสุทธิ์ เพื่อหาตำแหน่งของนิโคตินซึ่งแอลคาลอยด์ต่างชนิดกันจะมีค่า R_f ต่างกันด้วย หากเอา ส่วนที่มีค่า R_f เท่ากับ R_f ของนิโคตินบริสุทธิ์นำมาสกัดด้วยสารละลายผสมของคางกับ chloroform (alkaline chloroform) นำเอาสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยใช้เครื่องมืออุลตราไวโอเลตเปรียบเทียบกับกราฟสารละลายมาตรฐานนิโคตินก็จะ หาปริมาณนิโคตินได้

ด้วยเหตุที่การหาปริมาณนิโคตินโดยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตรีไม่สามารถแยก นอร์นิโคตินออกจากนิโคตินได้หมด ดังนั้น peak ของนิโคตินอาจเกิดซ้อนทับกับ peak นอร์นิโคตินดังที่ได้กล่าวมาแล้ว เมื่อต้องการแยกแอลคาลอยด์ออกจากกันให้หมด เพื่อ หาปริมาณนิโคตินได้ถูกต้องยิ่งขึ้นต้องใช้เครื่องมือโครมาโตกราฟี (14) หรืออาจใช้ เครื่องมือโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High-Performance Liquid Chromatography) (29) การทดลองเริ่มจากนำใบยาสูบมาอบที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำยาที่บดให้ละเอียดแล้วมาสกัดด้วยโซเดียมฟอสเฟต เขมข้น 0.25 mole/dm^3 ปริมาตร 10 cm^3 และปรับ pH เป็น 7.8 เขย่าด้วยเครื่องมือ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำสารละลายมากรองในสูญญากาศด้วยกระดาษกรองของบริษัท whatman เบอร์ 2 นำสารละลายที่ได้มากรองอีกครั้งหนึ่งโดยผ่านลงใน Millipore filter ขนาด $0.45\text{-}\mu\text{m}$ แล้วนำสารละลายจำนวน $20\text{-}\mu\text{l}$ ฉีดเข้าไปในเครื่องมือ โครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง ภาวะเหมาะสมของการทดลองโดยใช้คอลัมน์ μ Bondapak C_{18} mobile phase ประกอบด้วยของผสมระหว่าง methanol 40 % กับกรด phosphoric 0.2 % โดยปริมาตร ปรับ pH เป็น 7.25 ด้วย triethylamine ใช้ flow-rate $0.5 \text{ cm}^3/\text{min}$ ซึ่งสามารถจะแยกนอร์นิโคติน, อะนาตาสีน, อะนาตาสีน (anatabine) และนิโคตินออกจากกันด้วยเวลาริเทนชัน (retention time) 11, 12.2, 13.9 และ 23.3 นาที ตามลำดับ