บทที่ 1
บทนำ

ชาเป็นพืชในตระกูล *Camellia sinensis* นิยมนำมาทำเป็นเครื่องดื่มโดยต้นกำเนิดมาจากประเทศจีน จนกลายเป็นเครื่องดื่มสากลที่ได้รับความนิยมไปทั่วโลก ชาแบ่งตามระดับการหมักได้เป็น 3 ประเภทใหญ่ ๆ ได้แก่ ชาเขียว (Green Tea) คือชาที่ไม่ผ่านการหมัก, ชาใบดำ (Black Tea) คือชาที่ผ่านการหมักจนได้ที่ และชาอู่หลง (Oolong) คือชากึ่งหมัก หรือชาที่ผ่านกระบวนการหมักเพียงกึ่งเดียวของใบชาดำ ชาแต่ละประเภทก็จะมีรสชาติ สี กลิ่น และองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกัน[1,2]

ชามีประโยชน์ต่อสุขภาพ ทำให้นักวิทยาศาสตร์ทั่วโลกมุ่งความสนใจในการศึกษาองค์ประกอบสำคัญในชา และได้รายงานการศึกษาวิจัยไว้เป็นจำนวนมาก ซึ่งผลการวิจัยพบว่า [3,4]สารเคมีที่อยู่ในใบชามีมากกว่า 500 ชนิด โดยสารกลุ่มที่มีผลต่อการทำงานของร่างกายมนุษย์และมีผลต่อเรื่องสุขภาพของมนุษย์นั้น ได้แก่ สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ กรดอะมิโน วิตามิน คาเฟอีน และน้ำตาลหลายโมเลกุล (polysaccharide)

สารสำคัญต่อฤทธิ์ทางชีวภาพของชามากที่สุดคือสารในกลุ่มโพลีฟีนอล (polyphenol) ซึ่งมีปริมาณที่แตกต่างกันไปในแต่ละชนิดของชา และในบรรดาโพลีฟีนอลทั้งหลายนั้น คาเทชิน มีความสำคัญต่อการแสดงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยามากที่สุด คุณสมบัติเด่นก็คือมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ[5] นอกจากนั้นยังพบสารเคมี เช่น อิพิแกลโลคาเทชิน (epigallocatechin), อิพิคาเทชินแกลเลต(epicatechin gallate), แกลโลคาเทชิน (gallocatechin) ซึ่งพบมากในชาใบอ่อน ทีอะนิล (theanine) พบมากในชาใบแก่ และทีอะฟลาวินส์ (theaflavins), ทีอารูบิจินส์ (thearubigins) ในชาหมักซึ่งสารเคมีเหล่านี้มีประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ที่ดี ดังนั้นการดื่มชาจะช่วยป้องกันโรคและความบกพร่องต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับอนุมูลอิสระ (free radical) เช่น มะเร็ง โรคไขมันอุดตันในเส้นเลือด โรคหัวใจ และโรคอัลไซเมอร์ นอกจากนี้ยังพบว่าชามีฤทธิ์เป็นสารปฏิชีวนะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียหลายชนิด จึงสามารถลดอาการอักเสบและติดเชื้อในช่องปากได้[5,6]

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เมี่ยงเป็นผลิตภัณฑ์ชาของท้องถิ่นทางภาคเหนือของประเทศไทย ผลิตโดยการนำใบชาสด มามัดเป็นกำ นึ่งแล้วมักทิ้งไว้จนใบชาเปลี่ยนสภาพเป็นสีเหลือง ใบยุ่ย จึงนำมาบริโภค นิยมใช้เป็นของขบเคี้ยว หรืออมเป็นของว่างระหว่างการทำงาน ยามว่างหลังอาหาร หรือชงดื่มกับน้ำร้อน ช่วยผ่อนคลาย ความเหน็ดเหนื่อย ปัจจุบันมีอยู่หลายชนิด เช่น เมี่ยงหวาน เมี่ยงเค็ม เมี่ยงหมี่ เมี่ยงขิง เมี่ยงใส่กระเทียมดอง เป็นต้น แต่การบริโภคเมี่ยงมีผลทำให้ฟันเหลือง และกลิ่นที่เป็นลักษณะเฉพาะของเมี่ยง มีผลทำให้การบริโภคเมี่ยงในปัจจุบันลดลง ดังนั้นการสกัดสารสำคัญจากใบชาเมี่ยงเพื่อหาปริมาณของสารสำคัญเหล่านั้น จึงเป็นข้อมูลที่สำคัญในการเพิ่มมูลค่าให้แก่เมี่ยง ถ้าหากสามารถทราบถึงคุณสมบัติสำคัญของใบชาเมี่ยงได้ เมี่ยงจะเป็นทางเลือกใหม่ในการเลือกวัตถุดิบทางธรรมชาติสำหรับผู้ประกอบการธุรกิจอาหาร ยา และเครื่องสำอาง คาดว่าผู้บริโภคจะให้ความสนใจกับผลิตภัณฑ์ที่ได้มาจากสารสกัดทางธรรมชาติอีกด้วย

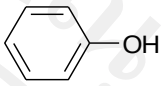
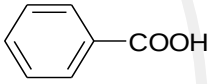
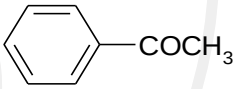
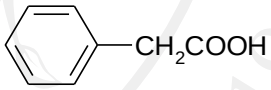
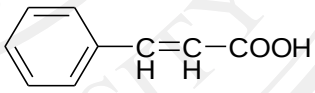
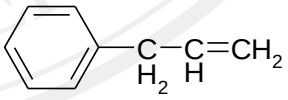
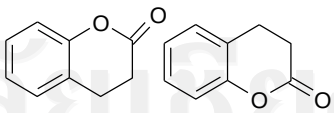
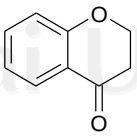
1.1 สารประกอบฟีนอลในธรรมชาติ[7]

สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) จัดเป็นสารต้านอนุมูลที่ได้รับจากภายนอก และพบได้มากในธรรมชาติอันได้แก่ พืชผัก ผลไม้ ชาเขียว ชาดำ ชอกโกแลต และไวน์แดง เป็นต้น ในปัจจุบัน พบสารประกอบฟีนอลิกมากกว่า 8,000 ชนิด ในธรรมชาติ นับจากโมเลกุลอย่างง่าย เช่น กรดฟีนอลิก ฟีนิลโปรพานอยด์ และฟลาโวนอยด์ ไปจนถึงโครงสร้างโพลีเมอร์ที่ซับซ้อน เช่น ลิกนิน เมลานิน และ แทนนิน เป็นต้น แม้ว่าปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกในธรรมชาติจะมีปริมาณที่แตกต่างกัน แต่พบว่าปริมาณโดยเฉลี่ยที่คนได้รับต่อวันจะอยู่ในช่วงตั้งแต่ 20 มิลลิกรัม – 1 กรัม ซึ่งเป็นปริมาณที่สูงกว่าปริมาณวิตามินอีที่ได้รับต่อวัน สารโพลีฟีนอลิกเป็นสารที่มีบทบาทสำคัญเนื่องจากมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ต้านไวรัส ต้านการอักเสบ ต้านการแพ้ และมีคุณสมบัติในการสลายลิ่มเลือด รวมไปถึงการเป็นสารต้านการก่อมะเร็ง และสามารถลดความดันโลหิต

โครงสร้างพื้นฐานของสารประกอบฟีนอลจะเกิดจากการรวมตัวของโมเลกุลน้ำตาลตั้งแต่ 1 โมเลกุลขึ้นไปรวมกับหมู่ไฮดรอกซิล (OH-group) โดยน้ำตาลดังกล่าวอาจเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharides) น้ำตาลโมเลกุลคู่ (disaccharide) หรือ โอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharides) ก็ได้ แหล่งของน้ำตาลชนิดที่พบมากที่สุดในโมเลกุลของสารประกอบฟีนอล คือ กลูโคส (glucose) นอกจากนี้ยังพบว่าอาจมีการรวมตัวกันระหว่างสารประกอบฟีนอลด้วยกันเอง หรือสารประกอบฟีนอลกับสารประกอบอื่นๆ เช่น กรดคาร์บอกซิลิก (carboxylic acid) กรดอินทรีย์ (organic acid) อะมีน (amine) และ ไขมันอีกด้วย โครงสร้างของสารประกอบฟีนอลกลุ่มต่าง ๆ แสดงดังตาราง 1.1

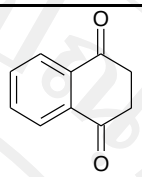
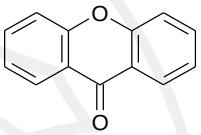
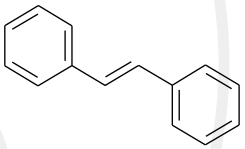
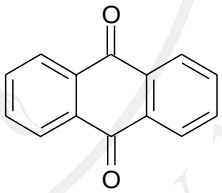
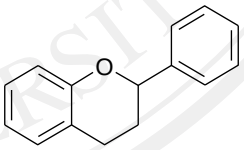
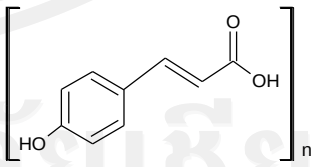
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 1.1 โครงสร้างของสารประกอบฟีนอลกลุ่มต่าง ๆ [7]

class	Basic Skeleton	Basic Structure
Simple Phenols	C_6	
Benzoquinones	C_6	
Phenolic acids	C_6-C_1	
Acetophenones	C_6-C_2	
Phenylacetic acids	C_6-C_2	
Hydroxycinnamic acids	C_6-C_3	
Phenylpropenes	C_6-C_3	
Coumarins, isocoumarins	C_6-C_3	
Chromones	C_6-C_3	

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 1.1 (ต่อ)

class	Basic Skeleton	Basic Structure
Naphthoquinones	C_6-C_4	
Xanthones	C_6-C_1-C_6	
Stilbenes	C_6-C_2-C_6	
Anthraquinones	C_6-C_2-C_6	
Flavonoids	C_6-C_3-C_6	
Lignins	$(C_6$-$C_3)_n$	

คุณสมบัติที่ได้รับความสนใจอย่างมากในปัจจุบันของสารประกอบฟีนอล คือการเป็นสารต้านออกซิเดชัน และสารต้านการกลายพันธุ์ (antimutagenic) ซึ่งเกิดจากอนุมูลอิสระ (free radical) และการใช้สารประกอบฟีนอลในการป้องกันโรคต่างๆ โดยเฉพาะโรคหัวใจขาดเลือด และมะเร็ง[8]

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารประกอบฟีนอลที่ถูกพบว่ามีคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชันนั้น สามารถพบได้ในส่วนต่างๆของพืช เช่น เมล็ด (ถั่วเหลือง ถั่วลิสง เมล็ดฝ้าย ข้าวและงา) ผล (องุ่น ส้ม และพริกไทยดำ) ใบ (ชา และเครื่องเทศต่างๆ) และส่วนอื่นๆ (มันเทศ และหัวหอม) และหนึ่งในสารประกอบฟีนอลที่เป็นที่รู้จักกันดีก็คือ flavonoids (flavones, flavonols, isoflavones, catechins, flavonones และ chalcones) และ cinnamic acid derivatives, caffeic acid, ferulic acid, chlorogenic acid และอื่นๆ) โดยสามารถพบได้ในเกือบทุกส่วนของพืชแต่จะมีความแตกต่างกันออกไปในด้านของชนิดและปริมาณ

ในอาหารและเครื่องดื่มที่มาจากพืช เช่น ผัก ผลไม้ ธัญพืชต่างๆ น้ำผลไม้ ไวน์ เบียร์ ชา และกาแฟจะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลในปริมาณที่แตกต่างกัน เนื่องจากการสร้างสารประกอบฟีนอลของพืชจะมีทั้งปัจจัยทางพันธุกรรม และสิ่งแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้อง นอกจากนี้ยังพบว่าวิธีการเพาะปลูก ระดับความสุก กระบวนการแปรรูปหรือแม้แต่วิธีการเก็บล้วนมีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งสิ้น[8]

1.2 ข้อมูลทั่วไปของชา[9]

ชา เป็นพืชชนิดหนึ่ง ซึ่งทางอนุกรมวิธานได้จัดหมวดหมู่ของ ชา ไว้ดังนี้

ชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Camellia sinensis*

Family (ตระกูล) *Theaceae*

Genus (วงศ์) *Camellia*

และได้แบ่งสายพันธุ์ย่อยออกเป็นสองกลุ่มหลักได้แก่

1.2.1 ชาจีน (*C. sinensis* var. s*inensis*)

ชาสายพันธุ์ *sinensis* หรือเรียกอาจเรียกว่าเป็นสายพันธุ์ที่เป็น “ชาจีน” สายพันธุ์นี้ต้องการการดูแลเอาใจใส่ในการปลูกมาก ชาในสายพันธุ์ *sinensis* จะมีพันธุ์ต่างๆ มากมายซึ่งได้มากจากการทดลองผสมพันธุ์ชาจากแหล่งต่างๆเข้าด้วยกัน พันธุ์ที่นิยมปลูกมีดังนี้ ชาพันธุ์อูหลงก้านอ่อน ชาพันธุ์อูหลงเบอร์ 12 ชาพันธุ์ชิงชิงอูหลง ชาพันธุ์ถิกวนอิม ชาพันธุ์สี่ฤดู

ชาแต่ละพันธุ์ก็จะมีลักษณะทางกายภาพ ขนาดและลักษณะใบที่แตกต่างกันออกไป รวมทั้งให้รสชาติของน้ำชาที่เป็นเอกลักษณ์แตกต่างกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2.2 ชาอัสสัม (*C. sinensis* var. *assamica*)

ชาสายพันธุ์ *assamica* มีการเรียกขานได้หลายชื่อที่เป็น “ชาอัสสัม” หรือ “ชาพื้นเมือง” หรือ “ชาป่า” ชาอัสสัม มีแหล่งกำเนิดมาจากประเทศอินเดีย ชาอัสสัม จะมีลักษณะใบชาที่ใหญ่กว่าชาพันธุ์จีนที่กล่าวมาข้างต้น เป็นพันธุ์ชาที่เจริญเติบโตได้ดีตามป่าที่มีร่มไม้ และแสงแดดผ่านได้พอประมาณ

ชาป่านี้มีการนำมาปลูกแรกเริ่มโดยชาวไทยภูเขาในเขตบนดอยต่างๆ ทางภาคเหนือของประเทศไทย นอกจากนำมาคั่วเพื่อชงดื่มแล้วยังมีการนำเอาใบแก่ของชามาทำเป็น “เมี่ยง” อย่างไรก็ตามการปลูกชาอัสสัมเพื่อนำใบชาไปผลิตเป็นชาเพื่อชงดื่มนั้นได้แพร่หลายมากขึ้น เนื่องจากการดูแลรักษาที่ง่ายกว่าการปลูกชาสายพันธุ์จีน ทำให้ต้นทุนการผลิตชาไม่สูงมากนัก และใบชาที่ได้สามารถนำไปผลิตเป็นชาดำ หรือ ชาเขียวได้ เป็นที่ต้องการของตลาดถึงแม้ราคาจะต่ำกว่าใบชาสายพันธุ์จีนก็ตาม

1.2.3 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของชา[10]

ชาเป็นไม้ยืนต้น สูง 6-18 เมตร (ดังรูป 1.1 ก)ใบเป็นรูปรี กว้าง 3 - 6 เซนติเมตร ยาว 8 - 20 เซนติเมตร ผิวใบเป็นคลื่นและเป็นมันลื่น ปลายใบเรียวแหลม (acuminate) ฐานใบเป็นรูปลิ่ม (cuneate) ขอบใบจักแบบฟันเลื่อย (serrate) แสดงดังรูป 1.1 ข ดอกมีใบประดับขนาดเล็ก รูปไข่ ร่วงง่าย จำนวน 2-3 ใบ มีกลีบเลี้ยงรูปไข่หรือรูปวงกลมขนาด 3-5 มิลลิเมตร 5-6 กลีบแยกกัน กลีบดอกมีสีขาว จำนวน 5-8 กลีบแยกออกจากกัน (ดังรูป 1.1 ค) ผลมีสีเขียว ลักษณะกลมเมื่อแก่แล้วเปลือกจะแห้งและแตกออก ผลมี 1-3 ช่องเมล็ด (ดังรูป 1.1 ง) แต่ละช่องจะมีเมล็ดอยู่ 1-2 เมล็ด ขนาดของผลขึ้นอยู่กับช่องเมล็ดและพัฒนาการของเมล็ด บางเมล็ดอาจไม่พัฒนาไปเป็นเมล็ดที่สมบูรณ์ ลักษณะของเมล็ด แสดงดังรูป 1.1 จ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ก

ข

ค

ง

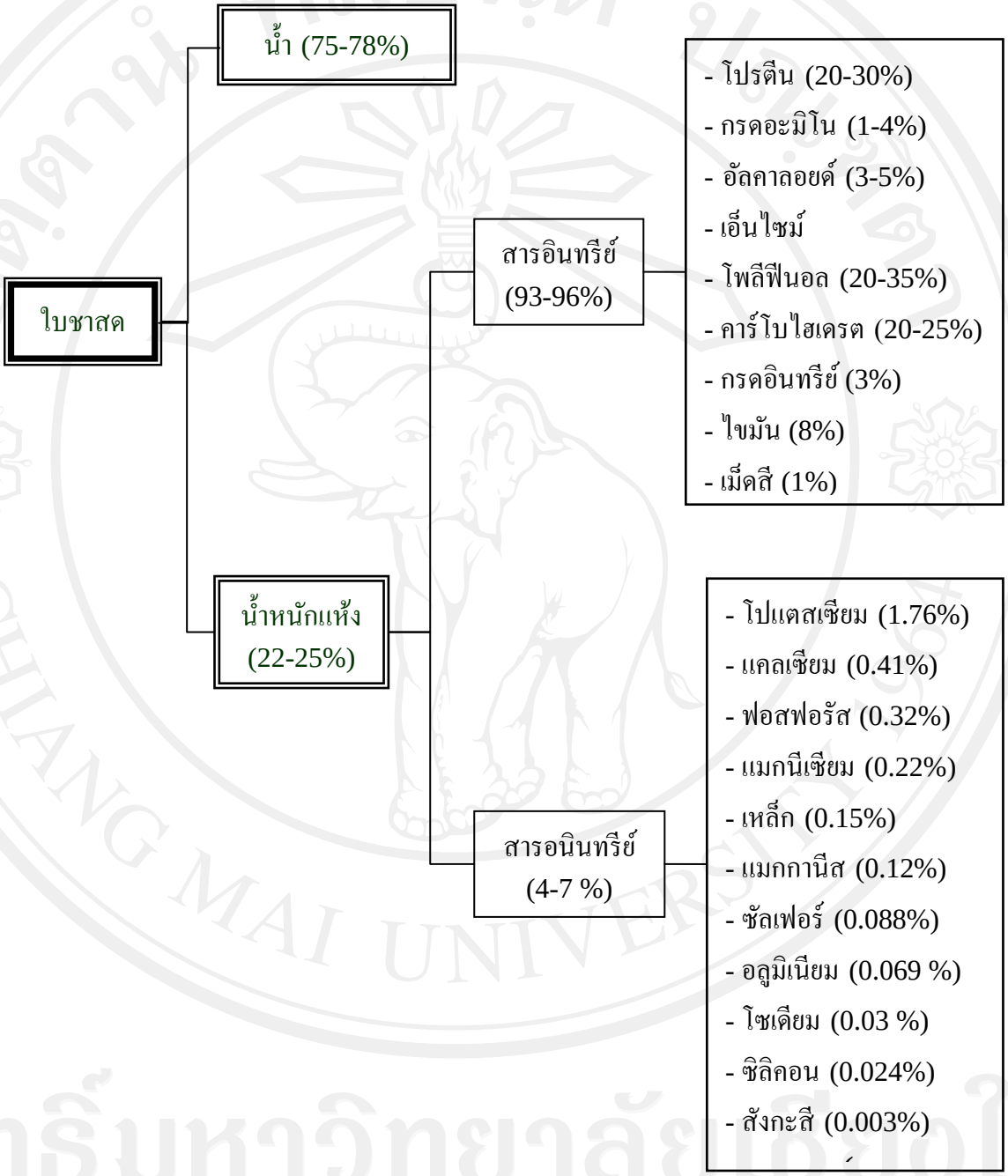
จ

รูป 1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของชา (ก. ลำต้น ข. ใบ ค. ดอก ง. ผล จ. เมล็ด)[11]

1.2.4 องค์ประกอบทางเคมีของใบชา[12]

จากการใช้ใบชามาทำเป็นเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพกันอย่างเห็นผลจากอดีตจนถึงปัจจุบัน นักวิทยาศาสตร์ได้ทำการวิเคราะห์สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบในใบชาสดจากหลากหลายสายพันธุ์ โดยเขียนเป็นแผนภาพสรุปองค์ประกอบทางเคมีสำคัญของใบชาสดแสดงในรูป 1.2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

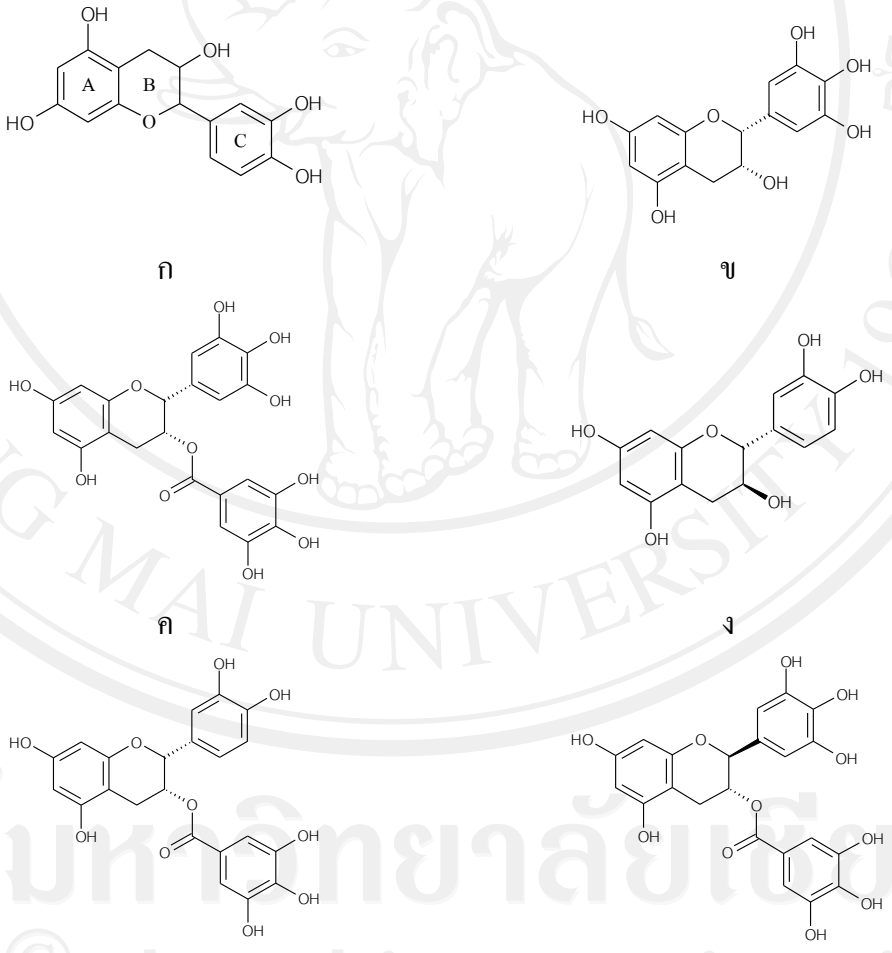


รูป 1.2 องค์ประกอบทางเคมีของใบชา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2.5 สารกลุ่มคาเทชินในชาเขียว[13]

Catechins ถือว่าเป็นกลุ่มสารที่สำคัญของพืชตระกูลชา จะเห็นว่าโครงสร้างหลักของสารกลุ่มนี้จะเป็น flavan-3-ol ซึ่งวง C จะอิ่มตัว ไม่มีพันธะคู่ ทำให้อิเล็กตรอนไม่สามารถเคลื่อนที่ไปมาระหว่างวง A และ B (รูป 1.3 ก) ดังนั้นฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจึงขึ้นกับจำนวนหมู่ฟีนอลิก ในโครงสร้าง โดยสารที่มีหมู่ฟีนอลิกมากกว่า จะทำให้ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันมากกว่า และสารที่เป็น catechin-gallate ester ที่เพิ่มหมู่ gallate เข้าไปที่ตำแหน่ง 3-OH ทำให้มีจำนวนหมู่ฟีนอลิกเพิ่มขึ้น จะมีฤทธิ์มากกว่า catechins ที่เป็นอกลัยโคน และมีฤทธิ์ใกล้เคียงกับ quercetin ซึ่งมีการเคลื่อนที่ของอิเล็กตรอนในโมเลกุลดีกว่า เนื่องจากมีโครงสร้างหลักเป็น flavonol ตัวอย่างและโครงสร้างทางเคมีของสารกลุ่มคาเทชิน แสดงดังรูป 1.3



รูป 1.3 โครงสร้างทางเคมีของสารกลุ่มคาเทชินบางชนิด

ก. Catechin (C) ข. Epigallocatechin (EGC) ค. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG)

ง. Epicatechin (EC) จ. Epicatechin gallate (ECG) ฉ. Gallocatechin gallate (GCG)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เมื่อเรียงลำดับฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารกลุ่ม catechins จากมากไปน้อย จะได้ดังนี้ epicatechin gallate ~ epigallocatechin gallate > epigallocatechin > epicatechin (เป็นไอโซเมอร์กับ catechin) ~ catechin อย่างไรก็ตาม พบว่า ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารกลุ่ม catechins จะมากกว่าวิตามินอี หรือวิตามินซีกว่า 2 เท่า[13]

จากรายงานการศึกษาในชาเขียว[13]พบว่า จะมีส่วนประกอบที่เป็นโพลีฟีนอลิกมากกว่า 44% ในจำนวนนี้เป็นสารในกลุ่ม catechins ถึงประมาณ 26.7% (สารกลุ่ม flavonols 6% และโพลีฟีนอลิกอื่น ๆ 15%) โดยสามารถเรียงลำดับสารที่ฤทธิ์ antioxidation จากมากไปน้อยได้ดังนี้ คือ epigallocatechin (34%) > epigallocatechin gallate (31%) > epicatechin gallate (6.6%) ~ epicatechin (5.6%) > catechin (1%)

องค์ประกอบในชาดำที่ออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเป็นสารฟีนอลิกประมาณ 44.94% โดยน้ำหนัก ใกล้เคียงกับปริมาณที่พบในชาเขียว แต่พบว่ามีส่วนประกอบที่เป็นสารกลุ่ม catechin-gallate เพียง 6.9% ที่เหลือจะเป็นสาร theflavins, thearubigens และสารโพลีฟีนอลิกอื่น ๆ นอกจากนี้มีรายงานว่า สาร theflavin สามารถยับยั้งการออกซิเดชันของลิพิดชนิด Low Density Lipid ที่กระตุ้นโดยไอออนทองแดง (Cu^{2+})

1.3 เมี่ยง (Pickled tea)[1]

เมี่ยง หรือ ชาหมักดอง เป็นผลิตภัณฑ์ชาท้องถิ่นของภาคเหนือของไทย ลาว และพม่า เมี่ยงแบ่งออกได้ 2 ชนิด คือ เมี่ยงฝาดและเมี่ยงเปรี้ยว เมี่ยงฝาดเป็นเมี่ยงที่ไม่ผ่านการหมักดองทำจากใบชาอ่อน นำมามัดเป็นกำนึ่ง ส่วนเมี่ยงเปรี้ยว ทำจากใบชาแก่นำมา มัดเป็นกำแล้วนำไปนึ่ง จากนั้นหมักทิ้งไว้จนใบชาเปลี่ยนสภาพกลายเป็นสีเหลืองและยุ่ย จึงนำมาบริโภค

ชาวบ้านทางภาคเหนือของประเทศไทย นิยมบริโภคเมี่ยงเป็นของขบเคี้ยวยามว่างหลังอาหาร หรือแม้กระทั่ง ระหว่างการทำงาน ชาวบ้านบางแห่งนำเมี่ยงมาชงดื่มกับน้ำร้อน เรียกว่า น้ำเมี่ยง คนเฒ่าคนแก่ทางภาคเหนือนิยมเคี้ยวเมี่ยงหลังอาหารควบคู่กับการสูบบุหรี่ขี้โย เพื่อผ่อนคลายอารมณ์ และความเหน็ดเหนื่อยจากการทำงานในไร่นา การเคี้ยวเมี่ยงช่วงให้หายง่วง ตาสว่าง อารมณ์แจ่มใส และช่วยประทังความหิวระหว่างการทำงานได้เป็นอย่างดี อาจมีการเพิ่มรสชาติโดยการเติมเกลือ ขิง แล้วแต่วัฒนธรรมการบริโภคภายในท้องถิ่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.3.1 กรรมวิธีในการผลิตเมี่ยงแบบครัวเรือน[1]

กรรมวิธีในการผลิตเมี่ยงมีการผลิตที่คล้ายคลึงกันในแต่ละจังหวัด ทางภาคเหนือของประเทศไทย กระบวนการผลิตเมี่ยงแบบครัวเรือนประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 : การเก็บเกี่ยวใบเมี่ยง ชาวสวนเมี่ยงจะใช้ตะขอที่ผูกติดกับเชือกเหวี่ยงให้เกาะกับกิ่งของต้นชาป่าพันธุ์อัสสัม แล้วดึงเพื่อโน้มกิ่งชาผูกติดกับหลักหมุดที่ตอกไว้ จากนั้นใช้มือรูด เก็บใบเมี่ยงไม่อ่อน หรือแก่เกินไป โดยทั่วไปนิยมเก็บถึงใบที่ 5 มัดใบเมี่ยงที่เก็บเป็นกำ ด้วยตอกบรรจุในภาชนะ เรียกว่า ก๋วยตาห่าง โดยจะเลือกเก็บเมี่ยงที่เป็นสีเหลืองอ่อน แล้วนำใบเมี่ยงที่เก็บได้มารวมกันแล้วเอาตอกเก็บเมี่ยงรัดตึงไว้ (รูป 1.4 ก) เก็บใบเมี่ยงในที่ไม่ให้โดนแสงแดด เพื่อป้องกันการช้ำของใบ การเก็บเกี่ยวใบเมี่ยงแบ่งออกเป็นฤดูกาลต่าง ๆ ดังนี้

เมี่ยงหัวปี เป็นเมี่ยงที่เก็บในช่วงต้นฤดูการเก็บเกี่ยวซึ่งเป็นต้นฤดูฝน ในเดือนเมษายน ถึงพฤษภาคม

เมี่ยงกลาง เป็นเมี่ยงที่เก็บในช่วงเดือนมิถุนายน ถึงเดือนกรกฎาคม ซึ่งเป็นช่วงที่ให้ผลผลิตมากที่สุด

เมี่ยงซ้อย เป็นเมี่ยงช่วงปลายฝน ประมาณเดือนสิงหาคม ถึงเดือนกันยายน

เมี่ยงเหมย เป็นเมี่ยงที่เก็บในช่วงต้นฤดูหนาวประมารเดือนตุลาคม ถึงธันวาคม เป็นช่วงที่มีคุณภาพดีมาก แต่ผลผลิตน้อย

ขั้นตอนที่ 2 : การนึ่งเมี่ยง ขั้นตอนการนึ่งด้วยด้วยไอน้ำร้อน ทำช่วงเย็นหรือกลางคืน เรียงกำเมี่ยงลงในไหนึ่ง ที่ทำด้วยไม้ และก้นไหกรุด้วยตะแกรงไม้ไผ่สาน แสดงดังรูป 1.4 ข แล้วปิดปากไหด้วยผ้าเปียกวางไหนึ่งบนหม้อดินเผาขนาดใหญ่ ใช้เศษผ้าชุบน้ำปิดช่องว่างระหว่างไหนึ่งกับหม้อดินเผา แล้วนึ่งเป็นเวลา 2 ชั่วโมง สังเกตการสุกพอดีของใบเมี่ยง จากสีใบที่เปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลืองไพรและก้านใบเละ

ขั้นตอนที่ 3 : การผึ่งเมี่ยง กำเมี่ยงที่ผ่านการนึ่งจนสุกได้ที่แล้วจะถูกนำมาเรียงผึ่งโดย ให้ก้านใบหันขึ้น เรียงผึ่งไว้ลักษณะนี้ 3 – 5 วัน แสดงดังรูป 1.4 ค จนเกิดเส้นใยเชื้อราเจริญที่ใบเมี่ยง แล้วจึงนำไปหมักเชื้อราที่เกิดบนใบเมี่ยงเข้าใจกันว่าช่วยให้เมี่ยงที่หมักเรียบร้อยแล้ว มีรสเปรี้ยวอร่อยไม่ฝาด และมีกลิ่นหอม

ขั้นตอนที่ 4 : การหมักเมี่ยง การหมักเมี่ยงเป็นการหมักแบบ lactic fermentation เมี่ยงที่ไม่ผ่านการหมักหรือหมักไม่ได้ที่ จะมีรสฝาด ไม่น่ารับประทาน นำกำเมี่ยงมาวางเรียงซ้อนทับให้เป็นระเบียบ ประมาณ 100 มัด แสดงดังรูป 1.4 ง บรรจุใส่ในถุงพลาสติกขนาดใหญ่ จากนั้นเติมน้ำสะอาดลงไปพอท่วม ปิดถุงให้แน่น เก็บไว้ที่แห้งและเย็น รอการจำหน่ายต่อไป การหมักเมี่ยงใช้ระยะเวลา ประมาณ 15 วัน ก็ใช้การได้ แสดงดังรูป 1.4 จ

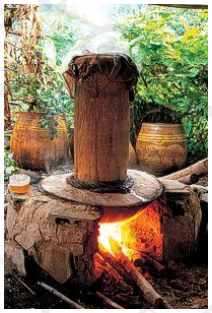
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ลักษณะของเมี่ยงที่พร้อมบริโภคได้ สังเกตจาก

1. น้ำที่ใช้หมัก มีเหลืองขุ่นข้น และมีกลิ่นหอมโชย
2. เกิดจากฝ้าสีขาวจับที่ขอบโอ่ง หรือก้อนหิน เห็นเป็นคราบ
3. ฟองอากาศเกิดน้อย หรือแทบไม่มีเลย
4. ทดลองชิมน้ำที่ใช้หมัก มีรสเปรี้ยว

เมี่ยงที่ผ่านการหมักได้ที่แล้ว เวลาที่รับประทานให้คลี่เหมี่ยงที่มัดด้วยตอกออกเรียงใบเมี่ยงซ้อนทับกัน 4 – 5 ใบ ดึงก้านใบเมี่ยงที่ชาวบ้านเรียกว่า เสี้ยน ออก โรยด้วยเกลือเล็กน้อย ก็พร้อมที่จะรับประทานได้ แสดงดังรูป 1.4 ฉ

ก



ข

ค

ง

จ

ฉ

รูป 1.4 ขั้นตอนการทำเมี่ยง

ก. การเก็บใบเมียง ข. ชุดนึ่งเมี่ยง ค. การหมักเมี่ยง ง. การผึ่งเมี่ยง จ. คำเมี่ยงพร้อมอม ฉ. เมี่ยง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.4 เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography)

โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง หรือที่นิยมเรียกกันว่า HPLC เป็นโครมาโทกราฟีรูปแบบหนึ่งที่ใช้แยกสารผสมโดยอาศัยเฟส 2 เฟส เฟสหนึ่งอยู่กับที่เรียกว่า เฟสคงที่ (stationary phase) ซึ่งอาจจะเป็นของแข็งหรือของเหลวก็ได้ และอีกเฟสหนึ่งเป็นของเหลวทำหน้าที่พาสารเคลื่อนที่ผ่านเฟสคงที่ในคอลัมน์เรียกว่า เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) และอาศัยหลักการความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ของสารประกอบในเฟสคงที่ของคอลัมน์โดยมีเฟสเคลื่อนที่เป็นตัวพาไป เมื่อต่อเข้ากับเครื่องตรวจวัด (detector) จะสามารถตรวจวัดสารที่ออกมาจากคอลัมน์ได้อย่างต่อเนื่องสามารถตรวจวัดทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ [14,15]

1.4.1 หลักการพื้นฐาน[14]

โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงมีหลายรูปแบบด้วยกัน และมีแบบจำลอง (model) ทางทฤษฎีที่ใช้อธิบายกลไกการแยกสารได้หลายแบบ แต่อย่างไรก็ดียังมีหลายสมการที่ถือได้ว่าเป็นสมการร่วมอยู่ โดยเฉพาะในกรณีที่เป็นกลไกของของเหลวกับของเหลว (liquid-liquid interaction) สามารถอธิบายด้วยสมการดังต่อไปนี้ 1.1-1.5

ค่าสัมประสิทธิ์การกระจาย (distribution coefficient, K_d) หาได้จาก

$$K_d = \frac{C_{stationary}}{C_{mobile}} \qquad \text{---------(1.1)}$$

เมื่อ $C_{stationary}$ เป็นความเข้มข้นของสารในเฟสคงที่

C_{mobile} เป็นความเข้มข้นของสารในเฟสเคลื่อนที่

สำหรับค่าแฟกเตอร์ความจุ (capacity factor, k') ซึ่งมีประโยชน์อย่างยิ่งในระบบโครมาโทกราฟของเหลวสมรรถนะสูง นั้นเป็นค่าที่สามารถหาได้จากโครมาโทแกรม (chromatogram) โดยตรง และมีสมการที่นิยามไว้ดังนี้

$$k' = \frac{K_d V_s}{V_m} \qquad \text{---------(1.2)}$$

เมื่อ V_s เป็นปริมาตรของของเหลวที่เป็นเฟสคงที่

V_m เป็นปริมาตรของของเหลวที่เป็นเฟสเคลื่อนที่

สำหรับจำนวนเพลต (Thoretical plate, N) หาได้จากสมการ (1.6)

$$N = 16\left(\frac{t_R}{W}\right)^2 \qquad \text{---------(1.3)}$$

ค่าการแยก (Resolution, R) หาได้จากสมการ (1.4)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

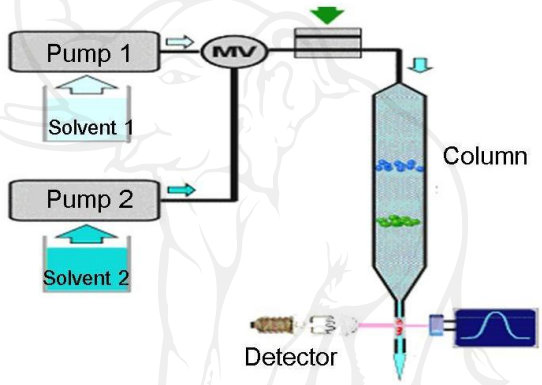
$$R_s = \frac{2(\Delta t_R)}{w_1 + w_2} \qquad \text{---------(1.4)}$$

แฟกเตอร์เหล่านี้ทั้งหมดสัมพันธ์กับค่าการแยก (resolution, R_s) ตามสมการ 1.5

$$R_s = \left(\frac{\sqrt{N}}{4}\right) \cdot \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right) \cdot \left(\frac{k'}{k' + 1}\right) \qquad \text{---------(1.5)}$$

1.4.2 ส่วนประกอบของเครื่องโครมาโทกราฟของเหลวสมรรถนะสูง[16]

ส่วนประกอบของเครื่องมือสามารถสรุปเป็นแผนภาพได้ดังรูป 1.5 ซึ่งมีส่วนประกอบที่สำคัญดังนี้



รูป 1.5 ส่วนประกอบที่สำคัญของเครื่องโครมาโทกราฟของเหลวสมรรถนะสูง

ก. ภาชนะสำหรับบรรจุเฟสเคลื่อนที่

ภาชนะสำหรับบรรจุเฟสเคลื่อนที่จะทำด้วยแก้วหรือสแตนเลสก็ได้ มีขนาดบรรจุ 1-2 ลิตร ตามปกติควรต่อกับตัวกำจัดแก๊ส (degassing system) เพื่อกำจัดแก๊สออกซิเจนหรือไนโตรเจนที่ละลายอยู่ในตัวทำละลายออก ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดฟองแก๊สในคอลัมน์หรืออาจรบกวนส่วนตรวจวัดหรือดีเทคเตอร์

ข. ระบบปั๊ม

ในโครมาโทกราฟของเหลวสมรรถนะสูงมีความต้านทานการไหลของเฟสเคลื่อนที่ ที่จะไหลผ่านคอลัมน์ซึ่งมีอนุภาคขนาดเล็กบรรจุอยู่ ความต้านทานการไหลจะมีค่าสูงเมื่อใช้อนุภาคเล็ก ๆ และเมื่อคอลัมน์มีขนาดเล็กด้วย จึงจำเป็นที่จะต้องใช้ปั๊มความดันสูงดันเฟสเคลื่อนที่ให้สามารถไหลได้ ปั๊มชนิดนี้แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1) Mechanical pump เป็นปั๊มที่ควบคุมให้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่มีค่าคงที่

2) Pneumatic pump เป็นปั๊มที่ควบคุมให้ความดันของเฟสเคลื่อนที่มีค่าคงที่

ค. อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการโปรแกรมตัวทำละลาย (Gradient elution)

โดยทั่วไปการแยกสารผสมที่ซับซ้อนและมีค่า k' แตกต่างกันมากๆ มักจะมีปัญหาเสมอ วิธีที่สะดวกที่สุดในการแก้ปัญหา คือ โปรแกรมตัวทำละลายในเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลว-สมรรถนะสูง ซึ่งโปรแกรมตัวทำละลายก็เหมือนกับการโปรแกรมอุณหภูมิ ในเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี ยกเว้นการเปลี่ยนแปลงค่า k' จะทำได้โดยการเปลี่ยนองค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ ความเป็นกรด-ด่าง ความสามารถในการแตกตัวเป็นไอออนของเฟสเคลื่อนที่ซึ่งดีกว่าการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ อุปกรณ์ที่ใช้กับ gradient elution ในโครมาโทกราฟีของเหลวแบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ

1) Low pressure gradient

เป็นแบบที่ใช้วิธีการผสมตัวทำละลายที่ความดันของบรรยากาศและจากนั้นจะถูกปั๊มต่อด้วยความดันสูงเข้าสู่คอลัมน์

2) High pressure gradient

เป็นแบบที่ตัวทำละลายที่ใช้ในการโปรแกรมตัวทำละลายจะถูกปั๊มผ่านปั๊มความดันสูงเข้าสู่ส่วนผสมตัวทำละลายความดันต่ำก่อนที่จะเข้าสู่คอลัมน์

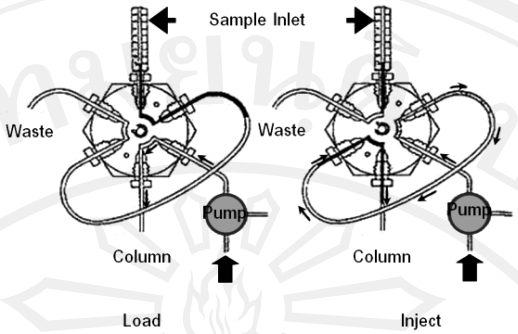
ง. อุปกรณ์สำหรับฉีดสารตัวอย่าง

การผ่านสารตัวอย่างเข้าไปยังคอลัมน์นั้นมีความสำคัญมากต่อการแยกสาร ทั้งนี้เนื่องจากสารตัวอย่างที่ผ่านเข้าไปในคอลัมน์ ควรจะอยู่ในลักษณะที่เป็นแถบที่สำคัญมากที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้ ดังนั้นวิธีการต่างๆ ที่ใช้มีมากมายแต่ที่นิยมใช้คือ ใช้ microsampling valve

จ. วาล์วสำหรับฉีดสารตัวอย่าง

การผ่านสารตัวอย่างเข้าไปในคอลัมน์ โดยใช้วาล์วดังแสดงในรูป 1.6 สารตัวอย่างที่ผ่านเข้าไปจะอยู่ในท่อซึ่งอยู่ภายนอกที่ต่อเข้ากับวาล์วนี้ วาล์วที่ใช้อยู่ในปัจจุบันสามารถนำมาใช้ได้กับสารตัวอย่างที่มีขนาดตั้งแต่ 0.50 ไมโครลิตร จนถึงมิลลิลิตร วาล์วซึ่งมีท่ออยู่ภายนอกใช้ฉีดสารตัวอย่างเข้าไปได้ในปริมาณมาก นอกจากนั้นวาล์วประเภทนี้ยังสามารถใช้งานได้ที่ความดันสูงถึง 5,000 – 6,000 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว โดยที่ไม่เกิดการรั่วไหล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูป 1.6 six-port rotary sample injection valves สำหรับเครื่องโครมาโทกราฟของเหลวสมรรถนะสูง

ฉ. คอลัมน์

ปัจจุบันคอลัมน์ที่นิยมนำมาใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างประเภทต่างๆ คือ bonded-phase column ที่มีหมู่ฟังก์ชันได้หลายชนิด มีทั้งที่เป็นขั้ว เช่น cyano หรือ amino และไม่มีขั้ว เช่น octadecyl ชนิด C_8 หรือ C_{18} ซึ่งสามารถแยกได้ทั้งสารที่มีขั้วและไม่มีขั้ว ในกรณีของที่มีขั้วจะใช้หลักการของไอออนคู่ (ion – pair) เมื่อต้องการให้เกิดการแยกสามารถใช้วิธีปรับเปลี่ยนพีเอชของเฟสเคลื่อนที่ หรือความเข้มข้นของไอออนคู่ ในกรณีของสารตัวอย่างไม่มีขั้ว สามารถทำให้เกิดการแยกได้โดยปรับความแรงของเฟสเคลื่อนที่

ช. เครื่องตรวจวัด

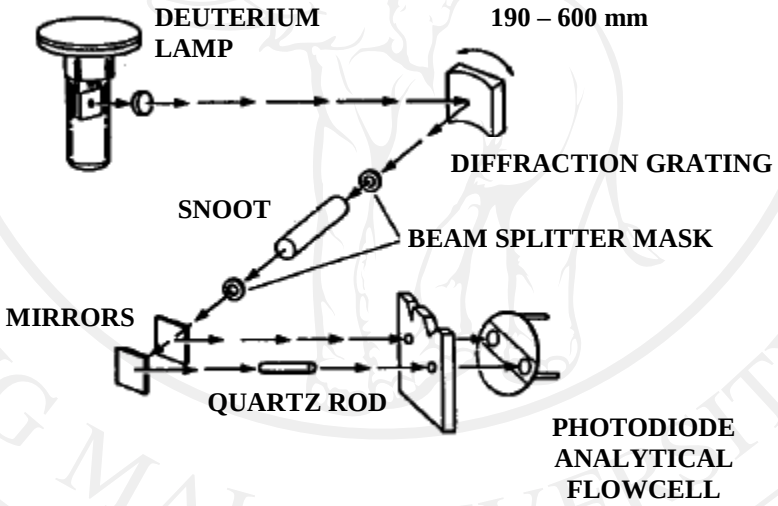
สิ่งสำคัญสำหรับเครื่องตรวจวัดในเครื่องโครมาโทกราฟของเหลวสมรรถนะสูง คือ ความไวของเครื่องตรวจวัดซึ่งสามารถทำการตรวจวัดสิ่งที่ออกมาจากคอลัมน์ได้อย่างต่อเนื่อง เครื่องตรวจวัดในเครื่องโครมาโทกราฟของเหลวสมรรถนะสูง สามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิดคือ

1) แบบ bulk property หรือ general detector
เป็นการวัดการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางกายภาพของเฟสเคลื่อนที่รวมกับของตัวถูกละลายเช่น refractive index (RI) เป็นต้น
2) แบบ solute property หรือ selective detectors
เป็นการวัดการเปลี่ยนแปลงของตัวถูกละลายเพียงอย่างเดียวเท่านั้น เช่น UV – VIS, fluorescence เป็นต้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เครื่องตรวจวัดแบบยูวี–วิสิเบิล (UV- VIS Detector) หลักการทำงานของเครื่องตรวจวัดชนิดนี้อาศัยการดูดกลืนแสงช่วงคลื่นอัลตร้าไวโอเลต (UV) และคลื่นแสงที่ตามองเห็นได้ (visible, VIS) ของสารตัวอย่าง เครื่องชนิดนี้เป็นที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง เพราะเครื่องตรวจวัดนี้มีลักษณะที่พิเศษ คือ การไหลและอุณหภูมิไม่มีผลต่อสัญญาณที่ตรวจวัดได้ และมีสภาพไวสูงกับสารประกอบอินทรีย์ส่วนใหญ่ เครื่องตรวจวัดชนิดนี้ที่นิยมใช้ เช่น fixed-wavelength UV detector variable UV-VIS detector และ photodiode-array detector

การศึกษานี้ใช้ photodiode-array detector ซึ่งประกอบด้วยหลอดดิวเทอเรียม (D_2 lamp) และหลอดทังสเตน (tungsten lamp) หลอดทั้งสองนี้สามารถใช้วัดแสงได้ในช่วง 190-800 นาโนเมตร นอกจากนี้ยังมีโมโนโครเมเตอร์ เพื่อใช้สำหรับเลือกความยาวคลื่นตามที่ต้องการได้ ลักษณะการทำงานของ photodiode-array detector แสดงดังรูป 1.7



รูป 1.7 ลักษณะของ photodiode-array detector

1.4.3 การวิเคราะห์เชิงปริมาณ

เครื่องตรวจวัดแต่ละชนิดสำหรับโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ให้สัญญาณออกมาเป็นโครมาโทแกรม ซึ่งความสูงของพีกหรือพื้นที่ใต้พีกของโครมาโทแกรมจะสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณสาร ได้แก่ วิธีสารมาตรฐานภายนอก (external standard method) วิธีสารมาตรฐานภายใน (internal standard method) และ วิธีการเติมสารมาตรฐาน (standard addition method) ในงานวิจัยนี้เลือกใช้วิธีสารมาตรฐานภายนอก ทำโดยการฉีดสารมาตรฐานบริสุทธิ์ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ในปริมาตรที่เท่ากันทุกครั้ง และนำมาสร้างกราฟระหว่างพื้นที่ใต้พีกกับความ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เข้มข้นของสารมาตรฐาน เพื่อที่จะได้กราฟมาตรฐาน สำหรับใช้ในการหาปริมาณของสารที่สนใจในตัวอย่างต่าง ๆ ได้ โดยต้องวิเคราะห์ภายใต้สภาวะเดียวกันกับสารมาตรฐานทุกประการ

1.5 โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง-แมสสเปกโทรเมทรี (liquid chromatography-mass spectrometer[17]

เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง-แมสสเปกโทรเมทรี เป็นการเชื่อมต่อเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงเข้ากับเทคนิคแมสสเปกโทรเมทรี เพื่อให้ได้เทคนิคการวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพขึ้น เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงจะสามารถแยกองค์ประกอบของสารผสมได้ ในขณะที่เทคนิคแมสสเปกโทรเมทรีมีจุดเด่นในด้านความเฉพาะเจาะจง ความว่องไว และความรวดเร็ว ในการให้ข้อมูลเกี่ยวกับ โครงสร้างขององค์ประกอบที่แยกโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

1.5.1 หลักการและทฤษฎีของแมสสเปกโทรเมทรี

เมื่อทำให้โมเลกุลเกิดการสูญเสียอิเล็กตรอน โมเลกุลจะกลายเป็นไอออนและมีประจุบวก ซึ่งถ้าโมเลกุลที่มีประจุบวกนี้มีพลังงานสูงพอ จะเกิดการแตกตัวออกเป็นส่วนย่อย ๆ ซึ่งอาจเป็นอนุภาคที่เป็นกลาง (N) อนุภาคที่เป็นแคตไอออนแรดิเคิล ($A^{\bullet+}$) หรือแคตไอออน (A^+) เช่น

$$M + e^- \rightarrow M^{\bullet+} + 2e^-$$

$$M^{\bullet+} \rightarrow A^+ + N^{\bullet}$$

$$M^{\bullet+} \rightarrow A^{\bullet+} + N$$

ในทำนองเดียวกัน ถ้าไอออนย่อย ($A^{\bullet+}$หรือ A^+) มีพลังงานมากพอก็จะเกิดการแตกตัวต่อไปอีก เป็นไอออนย่อยต่อไปเรื่อย ๆ จนเหลือพลังงานน้อยสุดที่ไม่สามารถแตกตัวต่อไปได้อีก เมื่อพิจารณาแมสสเปกตรัม จะบ่งบอกถึงลักษณะการแตกตัวของโมเลกุลไอออน หรือรวมรูปแบบการแตกตัวของแต่ละไอออนทั้งหมดเข้าด้วยกัน จะได้รูปแบบการแตกตัวของโมเลกุลที่เป็นลักษณะเฉพาะของสารแต่ละชนิด ส่วนแมสสเปกมิเตอร์จะเป็นเครื่องมือที่ใช้แยกและวัดมวลของไอออนด้วยการใช้อัตราส่วนมวลต่อประจุ (m/z) จึงมีค่าเท่ากับมวลของไอออนโดยตรง

1.5.2 องค์ประกอบของเครื่องแมสสเปกโทรมิเตอร์

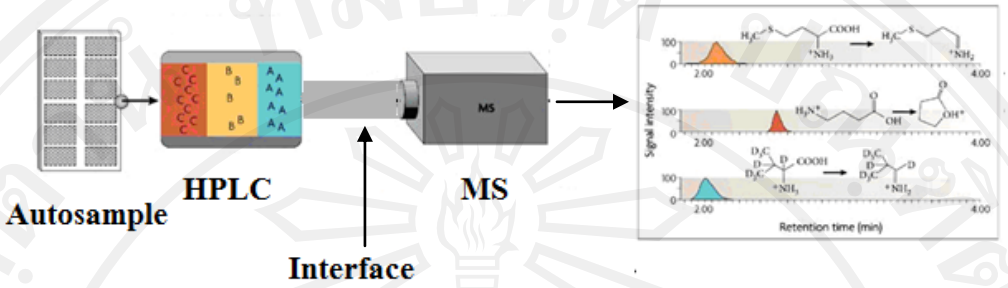
โดยทั่วไปเครื่องจะมีส่วนที่สำคัญอยู่ 3 ส่วน แสดงดังรูป 1.8 คือ

1) แหล่งที่ทำให้เกิดไอออนไนเซชัน (ionization source)

2) ส่วนที่ใช้ในการวิเคราะห์มวล (mass analyzer)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3) ส่วนที่ใช้ในการตรวจวัดไอออน (detector)



รูป 1.8 ส่วนประกอบพื้นฐานของแมสสเปกโทรมิเตอร์[17]

1) แหล่งผลิตไอออน (Ionization source)

แหล่งผลิตไอออนเป็นแหล่งที่ทำให้โมเลกุลของสารตัวอย่างเกิดเป็นไอออนและเกิดการแตกตัวซึ่งถือเป็นหัวใจสำคัญของเครื่องแมสสเปกโทรมิเตอร์ ปัจจุบันมีเทคนิคการผลิตไอออนแบบต่าง ๆ ให้เลือกมากมาย แหล่งผลิตไอออนที่ใช้กับโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแต่ละแบบมีหลักการทำงานแตกต่างกันไป ดังตาราง 1.2

การทดลองนี้ใช้ Electrospray Ionization (ESI) เป็นเทคนิคการไอออไนเซชันที่ความดันบรรยากาศ การผลิตไอออนด้วยเทคนิคนี้ เหมาะสำหรับการวิเคราะห์สารตัวอย่างซึ่งอยู่ในรูปของไอออนในตัวทำละลาย เช่น โปรตีน (ซึ่งมักจะเกิด protonation ที่หมู่อะมิโนเป็น protonated molecular ion, MH^+) เป็นต้น โดยสารละลายจะถูกส่งผ่านโพรบซึ่งเป็นท่อแคปปิลารีเล็ก ๆ ด้วยอัตรา 10-20 µL/min (หรือในบางระบบอาจสามารถไหลได้สูงถึง 100 µL/min แต่อัตราการไหลไม่ควรเกิน 20 µL/min) สารละลายนี้จะถูกสเปรย์ออกจากปลายโพรบด้วยสนามไฟฟ้าแรงสูง (3-6 kV) ที่ส่งผ่านท่อแคปปิลารีเล็ก ๆ ที่ปลายโพรบนั้นทำให้บริเวณดังกล่าวเกิดเป็นสนามไฟฟ้า ซึ่งจะทำให้ได้หยดละอองที่ละเอียด มีขนาดค่อนข้างสม่ำเสมอ และมีประจุบวกหรือลบซึ่งขึ้นอยู่กับขั้วของศักย์ไฟฟ้าที่ปลายแคปปิลลารีกับส่วนของเคาน์เตอร์อิเล็กโทรด

กรณีเลือกวิเคราะห์สารในรูปประจุบวกบริเวณปลายแคปปิลารีจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันให้ประจุบวก ส่วนบริเวณเคาน์เตอร์อิเล็กโทรดแสดงขั้วทางไฟฟ้าเป็นลบ เกิดปฏิกิริยารีดักชันเพราะฉะนั้นบริเวณเคาน์เตอร์อิเล็กโทรดก็จะเหนี่ยวนำให้ประจุบวกวิ่งเข้าหา ถ้าแรงผลักของประจุบวกที่บริเวณผิวแคปปิลารีและแรงดึงของสนามไฟฟ้าต่อประจุบวกสามารถเอาชนะแรงตึงผิวของของเหลวที่ออกจากแคปปิลารีทำให้ลักษณะของหยดของเหลวที่ออกจากปลายแคปปิลารีมีลักษณะเป็น Taylor Cone

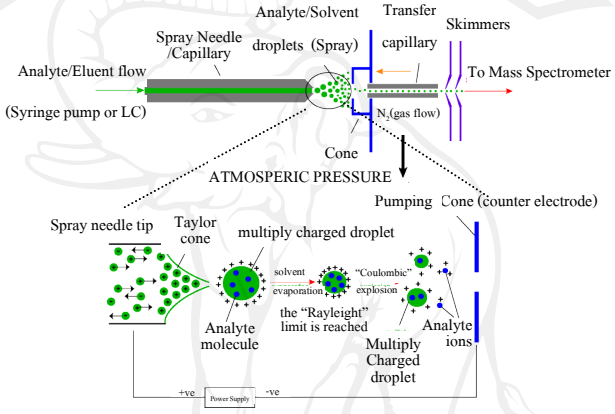
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 1.2 เทคนิคไอออนไนเซชันแบบต่าง ๆ หลักการทำงาน และประเภทของสารตัวอย่าง[17]

เทคนิค	หลักการทำงาน	สารตัวอย่างที่นิยมใช้
FI (Field Ionization)	ควอนตัมทันเนลลิ่งของอิเล็กตรอนอันเกิดจากการที่โมเลกุลสารตัวอย่างถูกแรงกระทำจากสนามไฟฟ้าแรงสูง	สารที่ง่ายต่อการแตกตัว น้ำหนักโมเลกุลในช่วง 600-1,200 อาทิ สารมีขั้ว เช่น เปปไทด์ โอลิโกแซ็กคาไรด์สารสกัดจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติต่างๆ สารไม่มีขั้ว เช่น ไฮโดรคาร์บอน
FAB (Fast Atom Bombardment)	อะตอมพลังงานสูง เช่น Xe หรือ Ar วิ่งเข้าชนสารตัวอย่าง	สารที่มีความดันไอต่ำๆ น้ำหนักโมเลกุลสูงได้ถึงประมาณ 6,000 เช่น โอลิโกนิวคลีโอไทด์ โอลิโกแซ็กคาไรด์ เปปไทด์ และไฮโดรคาร์บอนโมเลกุลใหญ่ๆ
MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization)	เมทริกซ์ดูดกลืนพลังงานจากแสงเลเซอร์ที่ยิงไปแล้วถ่ายพลังงานให้กับสารตัวอย่าง	โปรตีน คาร์โบไฮเดรต DNA RNA พอลิเมอร์สังเคราะห์
ESI (Electrospray Ionization)	เกิด ion evaporation จากการที่สารละลายของสารตัวอย่างถูกพ่นเป็นละอองฝอยด้วยการให้กระแสไฟฟ้าแรงสูงแก่ปลายโพรบที่นำสารละลาย	สารที่มีขั้วที่แตกตัวได้ง่าย นิยมใช้โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงมากๆ ได้ไม่จำกัดเนื่องจากสารเกิดไอออนที่มีประจุสูง ๆ ได้ดี
TS (Thermospray)	เกิด ion evaporation จากละอองของสารละลายที่มีสารตัวอย่างอยู่ภายในห้องที่มีความดันต่ำๆ	สารมีขั้วที่สามารถเกิดไอออนได้ เมื่ออยู่ในรูปสารละลาย
PS (Plasmaspray)	เช่นเดียวกับ TS แต่มีการใช้เข็มอิเล็กโทรดที่มีศักย์ไฟฟ้าสูง ๆ ช่วยในการไอออไนซ์สารตัวอย่าง	สารที่มีขั้วและไม่มีขั้ว
ICP (Inductively Coupled Plasma)	พลังงานความร้อนจากพลาสมาทำให้สารตัวอย่างแตกสลายกลายเป็นไอออนของอะตอม (atomic ion)	ธาตุ และไอโซโทป วิเคราะห์สารที่ปริมาณน้อย
Glow Discharge	กลุ่มแก๊สร้อนเกิดการแตกตัวเป็นไอออนภายใต้สนามไฟฟ้าแรงสูง	โลหะ โลหะผสม สารที่เป็นตัวนำไฟฟ้า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เมื่อเกิด charged droplets ซึ่งในขั้นแรกจะได้เป็นหยดของเหลวขนาดใหญ่ภายในหยดของเหลวดังกล่าวมีจำนวนประจุอยู่เป็นจำนวนมากแต่เนื่องจากภายในระบบของโพรบมีการผ่านแก๊สไนโตรเจนซึ่งทำหน้าที่เป็นแก๊สเนบูไลเซอร์ทำให้ตัวทำละลายระเหยออกไปมีผลให้ขนาดของ droplets มีขนาดเล็กลงเรื่อยๆ แต่จำนวนประจุยังคงเท่าเดิม ทำให้เกิดการผลักกันของประจุที่อยู่กันอย่างหนาแน่น เพราะขนาดของ droplets เล็กลง ซึ่ง coulombic force สามารถเอาชนะ surface tension ของของเหลวได้ กระบวนการนี้จะเป็นวัฏจักรจนกระทั่งภายใน charged droplets มีประจุเพียงแค่ประจุเดียว เกิดกระบวนการ ion evaporation อย่างรวดเร็วจนในที่สุดได้เป็นไอออนของสารตัวอย่างในสภาวะแก๊ส ซึ่งจะถูกชักนำด้วย ion optic ให้เข้าสู่ส่วนวิเคราะห์มวลต่อไป ดังรูป 1.9



รูป 1.9 ส่วนการไอออไนเซชันแบบ ESI[18]

ESI จะใช้ได้ผลดีก็ต่อเมื่อสารตัวอย่างอยู่ในรูปไอออนในสารละลายอยู่แล้ว การเตรียมสารตัวอย่างที่อยู่ในรูปไอออนสามารถทำโดยปฏิกิริยาทางเคมีง่ายๆ เช่น การใช้ตัวทำละลายที่มีกรดแอซีติกหรือฟอร์มิคอยู่ประมาณ 1-5 % เป็นตัวให้โปรตอนแก่สารตัวอย่าง หรือการใช้ตัวทำละลายหรือสารที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอน จะช่วยวิเคราะห์สารที่เป็นตัวจ่ายอิเล็กตรอนได้ดี ตัวอย่าง เช่น การใช้ 2,3-dicyano-1,4-bezoquinone ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการวิเคราะห์ 2,3-benzanthracene เป็นต้น [17]

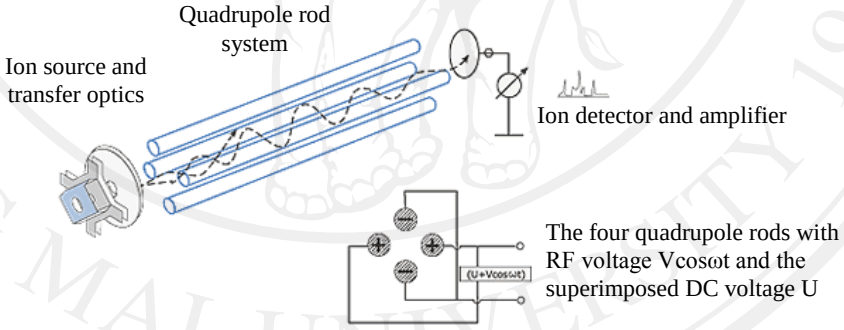
การเกิด ion evaporation อันจะนำไปสู่ MH^+ ในสภาวะแก๊สจะเกิดได้ดีต่อเมื่อสารละลายสามารถถูกสเปรย์ให้เป็นฝอยที่ละเอียดได้ ซึ่งนั้นหมายถึง การเลือกใช้ตัวทำละลายที่มีแรงตึงผิวต่ำๆ น้ำบริสุทธิ์ที่มีแรงตึงผิวค่อนข้างสูงจึงไม่ใช่ตัวทำละลายที่ดีของเทคนิค ESI แต่หากมีการผสมสารละลายอินทรีย์ที่มีแรงตึงผิวต่ำๆ อย่างเช่น เอทานอล เมทานอล ไอโซโพรพานอล, อะซิโตไนไตรล์, อะซิโตน และอื่นๆ กับน้ำ ก็จะเป็นที่นิยมในเทคนิค ESI มากกว่า เนื่องจากตัวทำละลายที่มีแรงตึงผิวสูงจะถูกสเปรย์ให้เป็นละอองฝอยได้ยากกว่าพวกที่มีแรงตึงผิวต่ำ ดังนั้น ค่าความต่างศักย์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ที่ให้ระหว่างปลายแคปปิลารีกับเคาร์เตอร์อิเล็กโทรดจึงมักถูกปรับให้สูงขึ้นในกรณีที่ใช้ตัวทำละลายที่มีแรงตึงผิวสูงๆ เพื่อเพิ่มความหนาแน่นของประจุในหยดละอองของสาร

2) ส่วนวิเคราะห์มวล (Mass Analyzer)

การแยกไอออนกระทำได้โดยอาศัยความแตกต่างของมวลต่อประจุจากการใช้สนามแม่เหล็กหรือสนามไฟฟ้าอย่างใดอย่างหนึ่งหรือทั้งสองอย่างร่วมกันก็ได้ เครื่องแยกไอออนจะมีหลายชนิด เช่น magnetic-sector analyzer, electrostatic analyzer, time-of-flight analyzer, ion cyclotron resonance analyzer ดีเทคเตอร์ที่ใช้ในการทดลองนี้ คือ quadrupole mass spectrometer การแยกไอออนทำได้โดยให้ลำไอออนผ่านศูนย์กลางของแท่งโลหะกลมที่ขนานกันสี่แท่งที่มีการให้ความต่างศักย์ทั้งแบบกระแสตรง และกระแสสลับพร้อม ๆ กัน ทำให้ได้สนามแม่เหล็กไฟฟ้าที่ทำให้ไอออนเกิดการสั่นให้ลำไอออนผ่านศูนย์กลางของแท่งโลหะกลมทั้งสี่ โดยไอออนที่มีมวลต่อประจุอันหนึ่งจะเกิดการสั่นที่เสถียรออกไปสู่ตัววัดสัญญาณ ส่วนไอออนอื่นที่มีมวลต่อประจุต่างไปทำให้เกิดการชนกับแท่งโลหะประจุจะถูกทำลายไป ดังรูป 1.10



รูป 1.10 ส่วนประกอบของ Quadrupole mass analyser[19]

3) ส่วนตรวจวัด (Detector)

ส่วนตรวจวัดเป็นอุปกรณ์ที่ทำหน้าที่ตรวจวัดไอออนโดยผ่านกลไกของการทำให้เกิดเป็นสัญญาณในรูปแบบใดรูปแบบหนึ่ง เช่น สัญญาณไฟฟ้า ขึ้นจากการตกกระทบของไอออนนั้น ๆ ส่วนตรวจวัดที่ใช้ทั่วไปในเครื่องแมสสเปกโทรมิเตอร์มีหลายอย่าง แต่ที่นิยมใช้กันมากคือ อิเล็กตรอน มัลติพลายเออร์ ดีเทคเตอร์ (electron multiplier detector)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มีรายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเทคนิคการเตรียมตัวอย่าง การสกัด และการแยกสำหรับการประยุกต์ใช้เพื่อหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในตัวอย่างชา

การเตรียมตัวอย่างมีด้วยกันอยู่สองแบบ แบบแรกจะเป็นการให้ความร้อนแก่ใบชาสด ไม่ว่าจะเป็นการอบด้วยไอน้ำ (steaming) การใช้คลื่นไมโครเวฟ (microwaving) การลวก (blanching) หรือการให้ความร้อนในตู้อบเพื่อหยุดการออกซิไดซ์ของสารประกอบพวกคาเทชินโดยเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidase) อีกแบบหนึ่งคือการสกัดโดยตรงด้วยตัวทำละลายทันทีหลังจากเก็บเกี่ยวแล้วบดให้ละเอียด จากนั้นสกัดอย่างรวดเร็วด้วยตัวทำละลายโดยไม่ผ่านกระบวนการให้ความร้อน[20]

วิธีการสกัดกลุ่มสารพวกคาเทชินในชา และสารประกอบอื่น ๆ มีหลากหลายวิธี ยกตัวอย่างเช่น การสกัดด้วยด้วยทำละลาย (solvent extraction) การสกัดด้วยน้ำเย็นและร้อน[21] ซึ่ง Lin และคณะ[22]ได้รายงานว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์มีประสิทธิภาพดีกว่าการสกัดด้วยน้ำอย่างเดียว และการสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟ[23] มีประสิทธิภาพมากกว่าเทคนิควิธีการสกัดแบบดั้งเดิม กล่าวคือใช้ระยะเวลาในการสกัดที่น้อยกว่า ใช้ปริมาณตัวทำละลายที่น้อยกว่า แต่เพิ่มอัตราของสารสกัดที่มากกว่า อย่างไรก็ตามในระดับอุตสาหกรรมการประยุกต์ใช้การสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟยังมีความยุ่งยากกว่าวิธีการให้ความร้อนโดยวิธีการดั้งเดิม[24] สำหรับการสกัดด้วยวิธีอื่นอันได้แก่ การสกัดโดยใช้น้ำที่สภาวะกึ่งวิกฤต (subcritical water extraction, SWE)[25], การสกัดโดยการใช้คลื่นอัลตราซาวนด์ (ultrasound-assisted extraction, UAE)[26] และการสกัดด้วยความดันสูงยิ่ง (ultrahigh pressure extraction, UHPE)[27] ก็เป็นอีกวิธีการสกัดหนึ่งซึ่งมีวิธีการประยุกต์ใช้ที่แตกต่างกันตามความต้องการ

Dalluge และ Nelson[28] ได้รายงานวิธีการวิเคราะห์ต่างๆ ในการหาปริมาณคาเทชินในชา ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงมีตัวตรวจวัดชนิดอัลตราไวโอเลต แมสสเปกโทรเมตรี อิเล็กโทรเคมีคอล ฟลูออเรสเซนต์ และเคมีลูมิเนสเซนต์ ซึ่งจำเป็นที่ต้องมีความว่องไวและความจำเพาะเจาะจงในการวัด เทคนิคคาพิลลารีอิเล็กโทรโฟเรสซิส 2 ชนิด ได้แก่ capillary zone electrophoresis และ micellar eletrokinetic capillary chromatography โดยมีอัลตราไวโอเลตเป็นตัวตรวจวัด และมีเทคนิคการวิเคราะห์อื่นๆ เพิ่มเติม เช่น แก๊สโครมาโทกราฟี ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี เปเปอร์โครมาโทกราฟี สเปกโทรโฟโตเมทรี ไบโอเซนเซอร์ เคมิลูมิเนสเซนต์ และ นิวเคลียร์แมกเนติค เรโซแนซ สเปกโทรสโกปี

การศึกษาวิธีการแยก การบ่งชี้ และการหาปริมาณของชาสกัด ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยแสดงดังตาราง 1.3

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 1.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์การแยก การบ่งชี้ และหาปริมาณสารสกัดจากชา

ชนิดของชา	สภาวะการสกัด	เทคนิคที่ใช้วิเคราะห์	ผลการศึกษา	เอกสารอ้างอิง
ใบชาแห้งจาก 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Camellia sinensis*, *Camellia ptilophylla* และ *Camellia assamica* var. *kucha* ประเทศจีน	ต้มใบชาสด 5 นาที น้ำร้อน 90°C 30 นาที เขย่าเมื่อครบ 20 นาที	เครื่อง HPLC ที่มีตัวตรวจวัด photodiode array คอลัมน์ ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 231 นาโนเมตร Mightysil RP-18 ขนาด 150×4.6 mm I.D., 5 μm เฟสเคลื่อนที่ในระบบเกรเดียนท์ประกอบด้วยสารละลาย (ก) อะซิโตไนไตรล์ 5% โดยปริมาตรในน้ำ และสารละลาย (ข) อะซิโตไนไตรล์ 50% โดยปริมาตรผสมกับกรดฟอสฟอริก 85% ในปริมาตร 0.05% ในน้ำ	สารสำคัญที่สามารถระบุและหาปริมาณ ได้แก่ caffeine, theobromine, theacrine, catechin, epicatechin, epigallocatechin, epigallocatechin gallate, epicatechin gallate, gallocatechin gallate และ gallocatechin	29
- Sencha และ Matcha (ชาเขียวญี่ปุ่น) - Gunpowder (ชาเขียวจีน) - Tie Kuan Yin (ชาอู่หลงจีน) และ Darjeeling black tea	บดชาให้เป็นผง แล้วสกัดด้วยน้ำ-อะซิโตไนไตรล์ ที่อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตรเป็นเวลา 40 นาทีที่อุณหภูมิห้อง	เครื่อง HPLC ใช้ตรวจตรวจวัดชนิดยูวีที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร คอลัมน์ Wakosil-II 5C18 HG ขนาด 150×3.0 mm I.D. เฟสเคลื่อนที่ในระบบเกรเดียนท์ประกอบด้วยสารละลาย (ก) น้ำ:เมทานอล:กรดฟอสฟอริก ที่อัตราส่วนโดยปริมาตร 85:15:0.1 และสารละลาย (ข) น้ำ:เมทานอล:เอทิลอะซิเตรท:กรดฟอสฟอริกที่อัตราส่วนโดยปริมาตร 85:15:1:0.1	สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด 16 ชนิด ได้แก่ สารกลุ่มคาเทชิน 8 ชนิด (epigallocatechin gallate, epigallocatechin, epicatechin gallate, epicatechin, gallocatechin gallate, catechin gallate, catechin) caffeine และสารประกอบฟีนอลิกอื่น ๆ 8 ชนิด	30

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 1.3 (ต่อ)

ชนิดของชา	สภาวะการสกัด	เทคนิคที่ใช้วิเคราะห์	ผลการศึกษา	เอกสารอ้างอิง
- green tea (Longjing Tea) จากชาสายพันธุ์ *Camillia sinensis* - pu'er tea จากชาสายพันธุ์ *Camillia assamica* - *Camillia ptilophylla* - *Camillia assamica* var. *kucha*	สกัดที่อุณหภูมิ 90°C 30 นาที ในน้ำ 50 mL เขย่าทุก ๆ 10 นาที	เครื่อง HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 และ 280 นาโนเมตร โดยใช้คอลัมน์ Discovery RP-Amide C16 ขนาด 150×4.6 mm I.D., 5 µm เฟสเคลื่อนที่ในระบบเกรเดียนท์ประกอบด้วยสารละลาย (ก) กรดฟอสฟอริก 0.05% โดยปริมาตรในน้ำ และสารละลาย (ข) อะซิโตไนไตรล์	สามารถวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกได้ดังนี้ catechins (gallocatechin, epi gallocatechin, catechin, epicatechin, epigallocatechin gallate, gallocatechin gallate, epicatechin gallate, catechin gallate), gallic acid, caffeine, theobromine, theacrine, theophyline, theanine	31
ชาเขียว 41 ตัวอย่าง ชาหมัก 25 ตัวอย่าง	สกัดชาที่บดเป็นผงแล้วด้วย - วิธี ultrasonic extraction - ชงในน้ำร้อน 10 นาที - สกัดแบบ acidic Hydrolyzed Extract	เครื่อง LC-DAD-ESI/MSD ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 350, 310 และ 270 นาโนเมตร ใช้คอลัมน์ Symmetry C18 ขนาด 250×4.6 mm I.D., 5 µm และมีการ์ดคอลัมน์ขนาด 20×3.9 mm I.D., 5 µm เฟสเคลื่อนที่ในระบบเกรเดียนท์ประกอบด้วยสารละลาย (ก) กรดฟอมิก 0.1% โดยปริมาตรในน้ำ และสารละลาย (ข) กรดฟอร์มิก 0.1% โดยปริมาตรในอะซิโตไนไตรล์	ได้สารประกอบฟีโนลิกใหม่ และได้ chromatographic profiles ของชาเขียวและชาหมัก	32

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 1.3 (ต่อ)

ชนิดของชา	สภาวะการสกัด	เทคนิคที่ใช้วิเคราะห์	ผลการศึกษา	เอกสารอ้างอิง
ชาชนิดหมัก (*Camellia sinensis*) พร้อมดื่ม จากท้องตลาดของประเทศอิตาลี	กรองแล้วฉีดโดยตรงเข้าสู่เครื่อง HPLC-UV/DAD	เครื่อง HPLC UV/DAD ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร คอลัมน์ Synergy Hydro–RP ขนาด 250×4.6 mm I.D., 4 μm เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยสารละลายอะซิโตไนไตรล์ น้ำ และกรดฟอร์มิก 1% โดยปริมาตร แล้วใช้เทคนิค LC-MS/MS ในการยืนยันผลการวิเคราะห์โดย คอลัมน์ Varian Polaris Amide C18 ขนาด 150×4.6 mm I.D., 5 μm	สามารถชี้ระบุ และหาปริมาณ ของสารประกอบฟาวานอยล์ในตัวอย่างได้ดังนี้ epigallocatechin, catechin, epigallocatechin gallate, epicatechin, gallocatechin gallate, epicatechin gallate, catechin gallate	33

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในงานวิจัยนี้ เลือกใช้วิธีการสกัดโดยวิธีการรีฟลักซ์โดยใช้ตัวทำละลายเอทานอล 50% ในน้ำ[34] จากนั้นทำการวิเคราะห์การแยก การบ่งชี้ และการหาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟฟีของเหลวสมรรถนะสูง-แมสสเปกโทรเมตรี

1.7 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

เพื่อพัฒนาวิธีการวิเคราะห์โดยเครื่องโครมาโทกราฟของเหลวสมรรถนะสูง-แมสสเปกโทรเมตรีในการแยก การบ่งชี้ และการหาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกที่สกัดจากใบชาเมี่ยงสดและเมี่ยงหมักพร้อมกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved