# การตรวจวิเคราะห์สารอินทรีย์ระเหยง่ายในเครื่องเทศและสมุนไพรด้วยเทคนิค HRAM

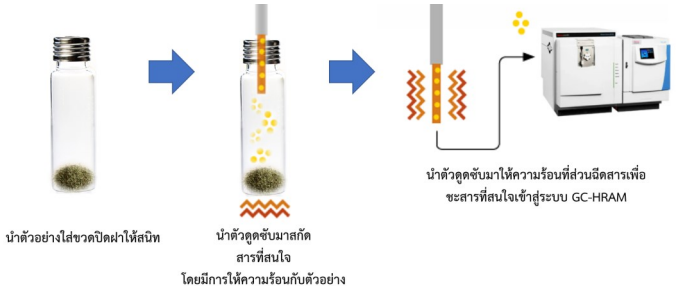
ผู้จัดทำ: รติมาศ บุญล้อม

## บทนำ

สมุนไพรที่ถูกนำมาทำเครื่องเทศ สำหรับเป็นส่วนผสมของอาหารหรือเครื่องดื่ม เป็นพืชที่โดยมากแล้วมีกลิ่นเฉพาะตัว ส่งผลให้เป็นพืชที่ได้รับความนิยมสูง และเมื่อถูกมาผลิตเพื่อการจำหน่าย ก็จะถูกปะปนด้วยพืชอื่นที่มีคุณสมบัติทางกายภาพเหมือนกันโดยตั้งใจหรือไม่ตั้งใจ ซึ่งเป็นสิ่งที่ตรวจสอบไม่ได้ด้วยสายตา ดังนั้นหากผู้ผลิตต้องการตรวจสอบคุณภาพของวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์จึงจำเป็นต้องใช้เครื่องมือในการวิเคราะห์

สารที่ให้กลิ่นในพืชสมุนไพรและเครื่องเทศ โดยมากเป็นกลุ่มสารอินทรีย์ระเหยง่าย (Volatile Organics Compounds, VOCs) เทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี จึงถูกนำมาใช้ในการแยกและวิเคราะห์ และด้วยความซับซ้อนของสาร VOCs การตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดชนิดแมสสเปคโตรมิเตอร์ชนิดที่มีความถูกต้อง และมีความละเอียดสูง (High Resolution Accurate Mass, HRAM) จะช่วยให้การวิเคราะห์สาร VOCs ที่มีความซับซ้อนและจำนวนมากได้อย่างถูกต้องมากยิ่งขึ้น

บทความนี้ได้ยกตัวอย่างการวิเคราะห์สาร VOCs ที่ตรวจพบได้ใน ออริกาโน (Oregano) ซึ่งเป็นสมุนไพรชนิดหนึ่งที่นิยมอย่างแพร่หลายและพบการผสมใบพืชอื่นเข้าไปในผลิตภัณฑ์ เช่น ใบมะกอก หรือใบเฮเซลนัท เป็นต้น โดยการวิเคราะห์สาร VOCs ในตัวอย่างออริกาโนด้วย GC-HRAM ใช้เทคนิคการเตรียมตัวอย่างแบบ Solid Phase Micro Extraction with Arrow (SPME-Arrow) ซึ่งเป็นการเตรียมตัวอย่างที่ใช้ตัว ดูดซับในการสกัดสาร VOCs ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย GC-HRAM




**รูปที่ 1 ขั้นตอนการสกัดสาร VOCs ด้วยเทคนิค SPME-arrow**

## เครื่องมือวิเคราะห์และการตั้งค่า

| TriPlus RSH Autosampler : HS-SPME Arrow parameter | |
|---|---|
| Fiber | SPME Arrow DVB/CWR/ PDMS (P/N 36SA11T3) |
| Incubation temp. (°C) | 60 |
| Incubation time (min) | 15 |
| Extraction temp. (°C) | 60 |
| Extraction time (min) | 15 |
| Desorption time (min) | 2 |
| **Trace 1310 GC : parameter** | |
| Inlet temperature (°C) | 220 |
| Injection mode | Split |
| Split ratio | 30:1 |
| Carrier gas, flow (mL/min) | 1.8(He) |
| Oven temperature program | 40°C hold 2 min,<br>ramp 1: 10 °C/min to 150<br>ramp 2: 5°C/min to 260<br>ramp 3 : 25 /min to 300<br>hold 3 min |
| **Exploris GC mass spectrometer parameters for EI** | |
| Transfer line temp. (°C) | 280 |
| Ion source Temp. (°C) | 280 |
| Electron energy (eV) | 70 |
| Aquisition mode | Full Scan |
| Mass range (Da) | 40-450 |
| Resolving power (FWHM) | 600 @ *m/z 200* |
| **Exploris GC mass spectrometer parameters for PCI** | |
| Transfer line temp. (°C) | 280 |
| Ion source Temp. (°C) | 180 |
| Ionization gas | Methane |
| Electron energy (eV) | 90 |
| Aquisition mode | Full Scan |
| Mass range (Da) | 80-450 |
| Resolving power (FWHM) | 600 @ *m/z 200* |

## การเตรียมตัวอย่าง

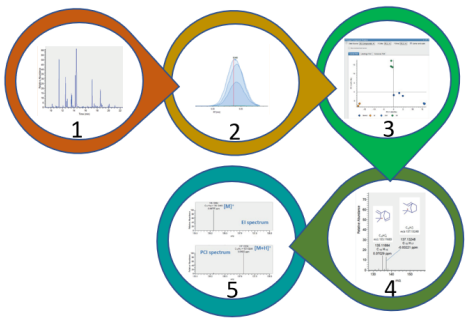
ตัวอย่างออริกาโน 3 ตัวอย่างแหล่งที่มาคนละแหล่ง

1. บดตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกัน
2. ชั่งตัวอย่าง 150 มิลลิกรัมลงในขวดเฮดสเปซขนาด 10 มิลลิลิตร ปิดฝาให้แน่น
3. ทำซ้ำตัวอย่างละ 3 ขวด
4. ทดสอบการวิเคราะห์เพื่อหาการปนเปื้อนโดยการเติมใบพืชอื่นที่มีลักษณะทางกายภาพคล้ายออริกาโนลงไปในตัวอย่างที่ความเข้มข้น 10% โดยน้ำหนัก และเตรียมตัวอย่างเช่นเดียวกับที่กล่าวมาแล้ว

### สารมาตรฐาน

สารมาตรฐานผสม C7-C30 saturated alkanes ยี่ห้อ Sigma-Aldrich สำหรับหา RI Index

### Untargeted analysis work flow

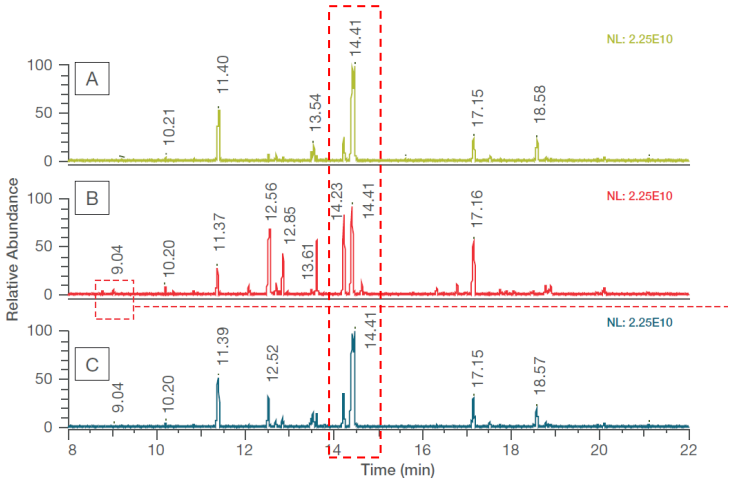



**รูปที่ 2 แสดงขั้นตอนการวิเคราะห์ Untargeted analysis**

1. วิเคราะห์ตัวอย่างในโหมด EI Full Scan เพื่อแยกสารผสม
2. แยกพีกที่ซ้อนทับโดยใช้ฟังก์ชัน deconvolution และทำนายชนิดของสารโดยใช้ฐานข้อมูล NIST library
3. วิเคราะห์พหุตัวแปร (Multivariate Analysis) เพื่อหาความสัมพันธ์ของข้อมูล
4. วิเคราะห์ตัวอย่างด้วยโหมด CI เพื่อยืนยันชนิดของสาร
5. วิเคราะห์เพิ่มเติมด้วยโหมด MS/MS เพื่อยืนยันชนิดของสาร

## ผลการวิเคราะห์

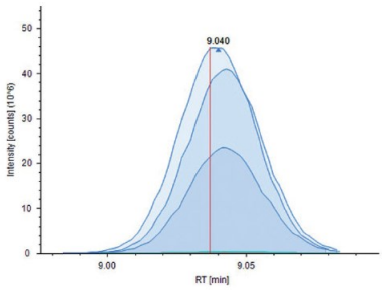
จากการเปรียบเทียบโครมาโตแกรมของตัวอย่างที่วิเคราะห์ดังรูปที่ 3 พบว่าตัวอย่างทั้งสามชนิดสามารถตรวจพบสาร Thymol (RT=14.23 นาที)และ carvacrol (RT=14.41 นาที)




**รูปที่ 3 โครมาโตแกรมเปรียบเทียบ**

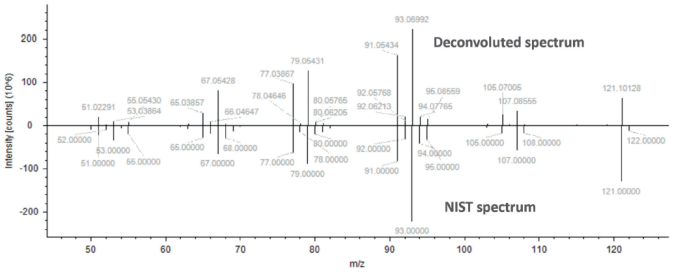
**(A) ออริกาโน (B) พืชอื่น (C) ออริกาโนผสมพืชอื่น**

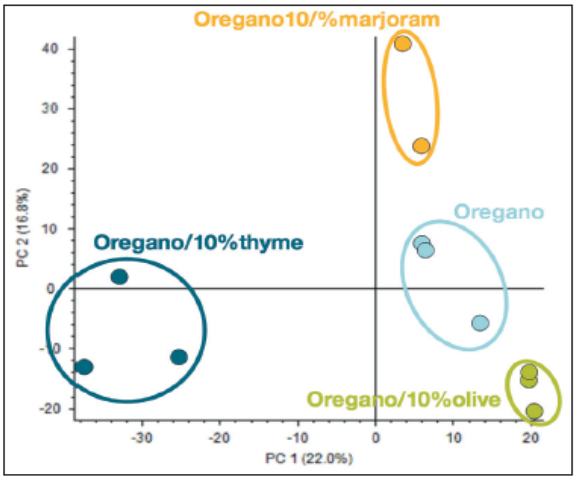
แต่มีความเข้มข้นที่แตกต่างกัน และในตัวอย่างที่ผสมพืชอื่น เข้าไปก็จะพบสารที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะของพืชนั้นๆ เช่น camphene (RT=9.04 นาที) ที่พบในใบไทม์ (Thyme) และในตัวอย่างออริกาโนผสมใบไทม์ การวิเคราะห์เพื่อระบุชนิดของสารที่พบในตัวอย่างจำเป็นต้องแยกสารผสมออกจากกันให้สมบูรณ์ เพื่อให้สามารถ Identified ได้อย่างถูกต้อง ซึ่งสามารถใช้ฟังก์ชันจากโปรแกรม Compound Discoverer® เพื่อช่วยในการวิเคราะห์ได้ทั้ง extraction, deconvolution, และ identification ดังแสดงในรูปที่ 4




**รูปที่ 4 แสดงโครมาโตแกรมของสารที่ตรวจวิเคราะห์ได้และสเปคตรัมของตัวอย่างและฐานข้อมูล NIST**

| Matched Compound | Formula | Score | HRF Score | SI | RSI |
|---|---|---|---|---|---|
| Camphene | C10H16 | 95.0 | 97.7356 | 794 | 801 |

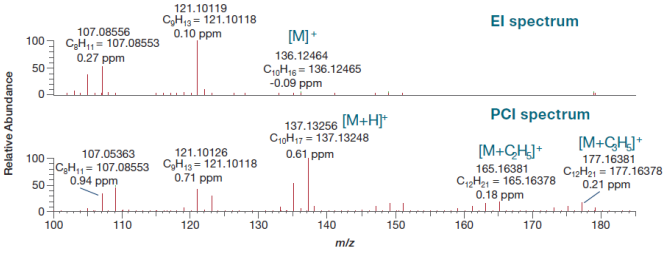





**รูปที่ 5 PCA score plot ของตัวอย่างออริกาโนและตัวอย่างออริกาโนผสมกับพืชอื่น**

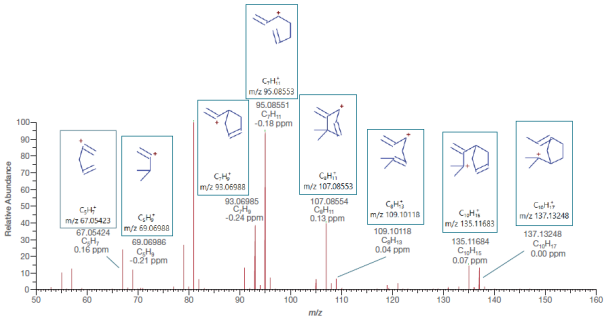
เนื่องจากการระบุเพียงชนิดของสารที่ตรวจวัดได้ ไม่สามารถช่วยแยกชนิด หรือตรวจวัดการปนเปื้อนได้อย่างชัดเจน ดังนั้นจึงได้มีการนำข้อมูลผลการวิเคราะห์ที่ได้ไปคำนวนทางสถิติศึกษาความสัมพันธ์ของข้อมูลเพิ่มเติมเพื่อประกอบการวิเคราะห์ในการแยกชนิดหรือแยกประเภทของตัวอย่างทำได้ง่ายมากยิ่งขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 5 เป็นผลการวิเคราะห์พหุตัวแปรหรือที่รู้จักในชื่อ Principal Component Analysis, PCA เพื่อดูความสัมพันธ์ของข้อมูลแต่ละชุด ซึ่งจะแสดงผลโดยแยกกลุ่มข้อมูลของตัวอย่างออริกาโนและ ตัวอย่างออริกาโนผสมที่สามารถแยกชนิดของตัวอย่างออกจากกันได้อย่างชัดเจน

การระบุชนิดของสารที่ตรวจพบได้ นอกเหนือจากการวิเคราะห์ด้วยโหมด Electron Ionization, EI เพื่อนำสเปคตรัมไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NIST แล้ว ยังสามารถยืนยันชนิดของสารได้โดยการใช้โหมด Chemical Ionization, CI ในการวิเคราะห์สเปคตรัมของสารเพิ่มเติมได้ ซึ่งเป็นการวิเคราะห์เพื่อระบุ Parent ion ตัวอย่างการวิเคราะห์ CI ด้วยโหมด positive โดยใช้แก๊สมีเทนเป็น reagent gas จะมี adducts ion 3 รูปแบบ คือ $([M+H]^+$, $[M+C_2H_5]^+$, $[M+C_3H_5]^+$ ดังแสดงในรูปที่ 6 ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบสเปคตรัมของโหมดการวิเคราะห์ EI และ PCI สำหรับการระบุชนิดของสารที่ตรวจพบได้ในตัวอย่าง




**รูปที่ 6 PCA สเปคตรัม EI และ PCI ของสาร camphene**

โหมดการวิเคราะห์แบบ MS/MS เป็นโหมดที่ใช้วิเคราะห์เพื่อหาโครงสร้างของสาร ใช้เป็นข้อมูลเพื่อยืนยันร่วมกับการวิเคราะห์ด้วยโหมดอื่นๆ เนื่องด้วยการแตกตัวซ้ำจะแสดงให้เห็นถึงโครงสร้างของสารที่ถูกแตกตัวออกเป็นองค์ประกอบต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 7 สเปคตรัมของสารที่ใช้พลังงานในการแตกตัวรอบที่สอง 10 eV




**รูปที่ 7 สเปคตรัมในโหมด MS/MS ของสาร camphene**

## สรุปผลการวิเคราะห์

การวิเคราะห์เพื่อหาสาร VOCs ในตัวอย่างสามารถทำได้ง่ายโดยใช้เทคนิคการเตรียมตัวอย่างแบบ SPME-arrow ช่วยลดขั้นตอนและลดการใช้สารละลายในการสกัด ร่วมกับการวิเคราะห์ผลโดยใช้ GC-Exploris ที่นอกเหนือจากการระบุชนิดของสารที่ตรวจพบร่วมกับการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลแล้ว ยังสามารถวิเคราะห์เพื่อยืนยันชนิดของสารที่ช่วยให้ Untargeted analysis ได้ผลการวิเคราะห์ที่คลอบคลุมและตอบโจทย์การวิเคราะห์ และมีซอฟแวร์ Compound Discoverer ช่วยในการจัดการข้อมูลทำให้การวิเคราะห์ทำได้ง่ายและสะดวกมากยิ่งขึ้นอีกด้วย

ติดตามแอพพลิเคชั่นอื่น ๆ ได้ที่ https://www.scispec.co.th

บริษัท ซายน์ สเปค จำกัด
10 กาญจนาภิเษก ซอย 0010 แยกสอง
เขตบางแค กทม. 10160
โทร 02-454-8533

/scispec
@scispec

ThermoFisher SCIENTIFIC