



## โครงการ

# การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

**ชื่อโครงการ** การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารระเหยง่ายในกระชายด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี ร่วมกับเคโมเมตริกซ์

Characterization of Volatile Compounds in Fingerroot by Gas Chromatography-Mass Spectrometry Combined with Chemometrics

**ชื่อนิสิต** นายพงศภัค ธนวนิชนาม

**ภาควิชา** เคมี

**ปีการศึกษา** 2559

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารระเหยง่ายในกระชายด้วยวิธี  
แก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี ร่วมกับเคมีเมตริกซ์

Characterization of Volatile Compounds in Fingerroot by  
Gas Chromatography-Mass Spectrometry Combined with  
Chemometrics

โดย

นายพงศภัค ธนวนิชนาม

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2559

โครงการ การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารระเหยง่ายในกระชายด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี-  
แมสสเปกโตรเมตรี ร่วมกับเคโมเมทริกซ์

โดย นายพงศภัค ธนวนินนาม

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต  
สาขาวิชาเคมี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

.....<sup>ดร.เควี รัตนาภู่</sup>.....ประธานกรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรุณศิริ ชิตางกูร)  
.....<sup>Dr. K</sup>.....อาจารย์ที่ปรึกษา  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ธรรมบุญ หนูจักร)  
.....<sup>ดร. 2</sup>.....กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ชนิษฐา พุดหอม)

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

.....หัวหน้าภาควิชาเคมี  
(รองศาสตราจารย์ ดร.วุฒิชัย พาราสุข)  
วันที่ ..... เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2560

คุณภาพของการเขียนรายงานเล่มนี้อยู่ในระดับ  ดีมาก  ดี  พอใช้

ชื่อโครงการ การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารระเหยง่ายในกระชายด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี ร่วมกับเคโมเมทริกซ์

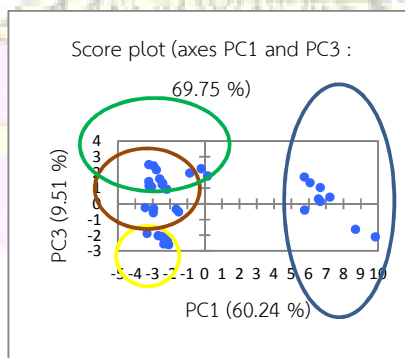
ชื่อนิสิตในโครงการ นายพงศภัค ธนวนินนาม เลขประจำตัว 5633108623

ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.ธรรมบุญ หนูจักร

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2559

### บทคัดย่อ

ได้พิสูจน์ทราบเอกลักษณ์ของสารระเหยง่ายในกระชายด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี (GC-MS) ร่วมกับเทคนิคเฮดสเปซโซลิดเฟสไมโครเอกซ์แทรกชัน (HS-SPME) โดยใช้แคปิลลารีคอลัมน์ประเภท HP-5MS ขนาด 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm จากการออกแบบการทดลองโดยการวิเคราะห์ทีละตัวแปร (single factor optimization) ร่วมกับการออกแบบการทดลองชนิด central composite design (CCD) เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างกระชายด้วย HS-SPME พบว่าสภาวะที่เหมาะสมของ HS-SPME คือ อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดเท่ากับ 40 องศาเซลเซียส ระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดเท่ากับ 30 นาที สำหรับตัวอย่างกระชายส่วนราก (rootlet) และ 70 องศาเซลเซียส 60 นาที สำหรับตัวอย่างกระชายส่วนเหง้า (rhizome) จากการพิสูจน์ทราบเอกลักษณ์ของสารระเหยง่ายในกระชายโดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NIST08 สามารถพิสูจน์ทราบเอกลักษณ์ของสารระเหยง่ายได้ทั้งหมด 30 ชนิด โดยเมื่อใช้วิธีเคโมเมทริกซ์ชนิดการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (PCA) พบว่าสามารถจำแนกกลุ่มของกระชายที่มาจากแหล่งเพาะปลูกที่แตกต่างกันได้เป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ จังหวัดนครปฐม พืชโลก เพชรบูรณ์ และระนอง ด้วยรูปแบบ PCA ที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงบ่งชี้ได้ว่าสามารถใช้วิธี HS-SPME-GC-MS ร่วมกับวิธีเคโมเมทริกซ์ในการพิสูจน์ทราบกระชายที่มาจากแหล่งเพาะปลูกที่แตกต่างกันได้



คำสำคัญ : กระชาย, สารระเหยง่าย, เฮดสเปซโซลิดเฟสไมโครเอกซ์แทรกชัน, แก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี, เคโมเมทริกซ์

Project Title Characterization of Volatile Compounds in Fingerroot by Gas Chromatography-Mass Spectrometry Combined with Chemometrics

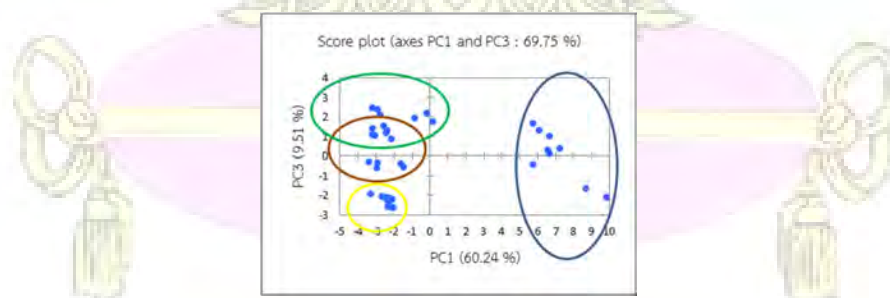
Student Name Pongsapak Thanavanichnam Student ID 5633108623

Advisor Name Associate Professor Thumnoon Nhujak, Ph.D.

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic year 2016

### Abstract

Volatile compounds in fingerroot were identified by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) combined with headspace solid phase microextraction (HS-SPME) using a capillary column of HP-5MS (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm). Using an experimental design called single factor optimization combined with central composite design, the following optimal HS-SPME conditions were obtained: extraction temperature of 40 °C and extraction time of 30 minutes for rootlet, but 70 °C and 60 minutes for rhizome. Thirty volatile compounds were identified by comparing their mass spectra with those in the NIST08 database. Using principal components analysis (PCA), the fingerroot could be classified into four groups with different patterns of PCA, in consistent with their geographical origins: Nakhon Pathom, Phitsanulok, Phetchabun and Ranong. This indicates that HS-SPME-GC-MS combined with chemometrics can be used for identification of the volatile compounds in the fingerroot from different geographical origins.



Keywords: Fingerroot, Volatile compounds, Headspace solid phase microextraction, Gas chromatography-mass spectrometry, Chemometrics

## กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ธรรมนุญ หนูจักร อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการที่ท่านได้ใส่ใจ ดูแล ช่วยเหลือ และให้คำแนะนำในการแก้ไขปัญหาต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นตลอดระยะเวลาในการทำวิจัย รวมทั้งท่านได้ให้คำปรึกษาในการเขียนรายงานฉบับนี้ให้สำเร็จ ลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรุณศิริ ชิตางกูร ที่ท่านได้ให้คำปรึกษา และคำแนะนำเพิ่มเติมเกี่ยวกับเนื้อหาที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยนี้ อีกทั้งท่านยังได้กรุณาสละเวลาเพื่อตรวจทาน แก้ไข และให้เกียรติเป็นประธานกรรมการในการสอบงานวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ชนิษฐา พุดหอม ที่ท่านได้ให้คำปรึกษา และคำแนะนำเพิ่มเติมเกี่ยวกับเนื้อหาที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยนี้ อีกทั้งท่านยังได้กรุณาสละเวลาเพื่อตรวจทาน แก้ไข และให้เกียรติเป็นกรรมการในการสอบงานวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณภูวดล ธรรมราษฎร์ ที่คอยให้คำปรึกษาชี้แนะ ให้ความรู้ในการใช้เครื่องมือ และให้ความช่วยเหลือทุกด้านที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุนการดำเนินงานวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบพระคุณ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์ และสารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ ตลอดจนบุคลากรฝ่ายต่าง ๆ ที่คอยให้ความช่วยเหลือโดยตลอดมา

## สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ค	
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	Error! Bookmark not defined.
กิตติกรรมประกาศ.....จ	
สารบัญ.....ฉ	
สารบัญรูป.....ช	
สารบัญตาราง.....ฎ	
คำอธิบายและคำย่อ.....ฎ	
<b>บทที่ 1 บทนำ.....1</b>	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....1	
1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....2	
1.3 ทฤษฎีและความรู้พื้นฐาน.....4	
1.4 วัตถุประสงค์และขอบเขตของงานวิจัย..... 18	
1.5 ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย..... 18	
<b>บทที่ 2 การทดลอง..... 19</b>	
2.1 การหาอัตราส่วนของสารที่เข้าคอลัมน์ (splitless and split ratio)..... 19	
2.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างกระชายด้วยเทคนิค เฮดสเปซ โดยการวิเคราะห์ทีละตัวแปร (single factor optimization)..... 21	
2.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างกระชายด้วยเทคนิค เฮดสเปซ โดยใช้การออกแบบการทดลองชนิด central composite design (CCD).....22	
2.4 การระบุชนิดสารระเหยง่ายที่สำคัญซึ่งจะใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่าง กระชายจากแหล่งเพาะปลูกต่าง ๆ..... 23	
2.5 การวิเคราะห์ตัวอย่างกระชายจาก 4 แหล่งเพาะปลูก..... 24	
2.6 การประมวลผลโดยวิธีเคโมเมทริกซ์..... 24	
<b>บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง..... 25</b>	
3.1 การหาอัตราส่วนของสารที่เข้าคอลัมน์..... 25	

3.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างกระชายด้วยเทคนิค เฮดสเปซ โดยการวิเคราะห์ที่ละตัวแปร (single factor optimization).....	27
3.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างกระชายด้วยเทคนิค เฮดสเปซ โดยใช้การออกแบบการทดลองชนิด central composite design (CCD).....	30
3.4 การระบุชนิดสารระเหยง่ายที่สำคัญซึ่งจะใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่าง กระชายจากแหล่งเพาะปลูกต่าง ๆ.....	33
3.5 การวิเคราะห์ตัวอย่างกระชายจาก 4 แหล่งเพาะปลูก.....	41
3.6 การประมวลผลโดยวิธีเคโมเมทริกซ์.....	46
<b>บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง</b> .....	<b>54</b>
เอกสารอ้างอิง.....	56
ภาคผนวก.....	59
ประวัติผู้วิจัย.....	67





## สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1-1 ส่วนประกอบอุปกรณ์โซลิตเฟสไมโครเอกซ์แทรกซ์ชัน .....	5
รูปที่ 1-2 ขั้นตอนการสกัดสาร .....	5
รูปที่ 1-3 ขั้นตอนการปลดปล่อยสาร .....	6
รูปที่ 1-4 แผนภาพแสดงขั้นตอน ความสัมพันธ์ของตัวแปร และผลการทดลองในการทดลอง ทั่วไป .....	9
รูปที่ 1-5 แสดงการออกแบบการทดลองแบบ CCD ที่ประกอบไปด้วยจำนวนการทดลองจาก full factorial, star และการทดลองซ้ำ (replication).....	11
รูปที่ 1-6 รูปแบบของเมทริกซ์ และเวกเตอร์ที่เปลี่ยนรูปมาจากสมการเชิงเส้น .....	13
รูปที่ 1-7 กราฟพื้นที่ตอบสนอง (ซ้าย) และ contour plot (ขวา) โดยมีเครื่องหมาย x เป็นจุด ที่บ่งบอกค่าของตัวแปร $x_1$ และ $x_2$ ที่ให้ค่าการตอบสนองสูงที่สุด.....	15
รูปที่ 1-8 รูปแสดงการวิเคราะห์ด้วยเมทริกซ์ของการวิเคราะห์ข้อมูลแบบ PCA .....	16
รูปที่ 1-9 การจัดกลุ่มข้อมูลด้วย PCA.....	17
รูปที่ 1-10 loading plot ของ PCA.....	17
รูปที่ 1-11 score plot ของ PCA .....	18
รูปที่ 3-1 ก) โครมาโทแกรมของตัวอย่างกระชายด้วยสภาวะ splitless.....	25
รูปที่ 3-1 ข) โครมาโทแกรมของตัวอย่างกระชายด้วยสภาวะ split ratio 10:1.....	26
รูปที่ 3-1 ค) โครมาโทแกรมของตัวอย่างกระชายด้วยสภาวะ split ratio 20:1.....	26
รูปที่ 3-1 ง) โครมาโทแกรมของตัวอย่างกระชายด้วยสภาวะ split ratio 50:1.....	27
รูปที่ 3-2 ก) กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดสารระเหยง่ายใน ตัวอย่างกระชายส่วนราก (rootlet) กับ พื้นที่ใต้พีทกรวมของสารในโครมาโทแกรมเฉลี่ย.....	28
รูปที่ 3-2 ข) กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ใช้ในการสกัดสารระเหยง่ายในตัวอย่าง กระชายส่วนราก (rootlet) กับ พื้นที่ใต้พีทกรวมของสารในโครมาโทแกรมเฉลี่ย.....	29
รูปที่ 3-2 ค) กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดสารระเหยง่ายใน ตัวอย่างกระชายส่วนเหง้า (rhizome) กับ พื้นที่ใต้พีทกรวมของสารในโครมาโทแกรมเฉลี่ย.....	29
รูปที่ 3-2 ง) กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ใช้ในการสกัดสารระเหยง่ายในตัวอย่าง กระชายส่วนเหง้า (rhizome) กับ พื้นที่ใต้พีทกรวมของสารในโครมาโทแกรมเฉลี่ย.....	30

รูปที่ 3-3 ก) กราฟพื้นที่ตอบสนอง (ซ้าย) และ contour plot (ขวา) ของพื้นที่ได้พีกรวมของสารในโครมาโทแกรมระหว่างตัวแปรอิสระอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด ( $x_1$ ) และระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด ( $x_2$ ) สารระเหยง่ายในตัวอย่างกระชายส่วนราก (rootlet).....32

รูปที่ 3-3 ข) กราฟพื้นที่ตอบสนอง (ซ้าย) และ contour plot (ขวา) ของพื้นที่ได้พีกรวมของสารในโครมาโทแกรมระหว่างตัวแปรอิสระอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด ( $x_1$ ) และระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด ( $x_2$ ) สารระเหยง่ายในตัวอย่างกระชายส่วนเหง้า (rhizome).....32

รูปที่ 3-4 ก) โครมาโทแกรมของสารระเหยง่ายที่สำคัญทั้งหมดที่สกัดได้จากตัวอย่างกระชายส่วนราก (rootlet).....39

รูปที่ 3-4 ข) โครมาโทแกรมของสารระเหยง่ายที่สำคัญทั้งหมดที่สกัดได้จากตัวอย่างกระชายส่วนเหง้า (rhizome).....40

รูปที่ 3-5 ก) โครมาโทแกรมของสารระเหยง่ายที่สำคัญทั้งหมดที่สกัดได้จากตัวอย่างกระชายส่วนราก (rootlet) จากจังหวัดนครปฐม.....42

รูปที่ 3-5 ข) โครมาโทแกรมของสารระเหยง่ายที่สำคัญทั้งหมดที่สกัดได้จากตัวอย่างกระชายส่วนเหง้า (rhizome) จากจังหวัดนครปฐม.....42

รูปที่ 3-5 ค) โครมาโทแกรมของสารระเหยง่ายที่สำคัญทั้งหมดที่สกัดได้จากตัวอย่างกระชายส่วนราก (rootlet) จากจังหวัดพิษณุโลก.....43

รูปที่ 3-5 ง) โครมาโทแกรมของสารระเหยง่ายที่สำคัญทั้งหมดที่สกัดได้จากตัวอย่างกระชายส่วนเหง้า (rhizome) จากจังหวัดพิษณุโลก.....43

รูปที่ 3-5 จ) โครมาโทแกรมของสารระเหยง่ายที่สำคัญทั้งหมดที่สกัดได้จากตัวอย่างกระชายส่วนราก (rootlet) จากจังหวัดเพชรบูรณ์.....44

รูปที่ 3-5 ฉ) โครมาโทแกรมของสารระเหยง่ายที่สำคัญทั้งหมดที่สกัดได้จากตัวอย่างกระชายส่วนเหง้า (rhizome) จากจังหวัดเพชรบูรณ์.....44

รูปที่ 3-5 ช) โครมาโทแกรมของสารระเหยง่ายที่สำคัญทั้งหมดที่สกัดได้จากตัวอย่างกระชายส่วนราก (rootlet) จากจังหวัดระนอง.....45

รูปที่ 3-5 ซ) โครมาโทแกรมของสารระเหยง่ายที่สำคัญทั้งหมดที่สกัดได้จากตัวอย่างกระชายส่วนเหง้า (rhizome) จากจังหวัดระนอง.....45

รูปที่ 3-6 ก) กราฟแสดงผล PCA ในการจัดกลุ่มตัวอย่างกระชายส่วนราก (rootlet) จากทั้ง 4 แหล่งเพาะปลูก.....46

รูปที่ 3-6 ข) กราฟแสดงผล PCA ของสารระเหยง่ายที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะของตัวอย่างกระชายส่วนราก (rootlet) จากแต่ละแหล่งเพาะปลูก.....47

รูปที่ 3-6 ค) แผนภูมิเปรียบเทียบสารระเหยง่ายที่เป็นสารระเหยหลัก (ตัวแทน) ของตัวอย่าง

กระชายส่วนราก (rootlet) จากจังหวัดเพชรบูรณ์กับจังหวัดอื่น ๆ.....	48
รูปที่ 3-6 ง) แผนภูมิเปรียบเทียบสารระเหยง่ายที่เป็นสารระเหยหลัก (ตัวแทน) ของตัวอย่าง กระชายส่วนราก (rootlet) จากจังหวัดระนองกับจังหวัดอื่น ๆ.....	48
รูปที่ 3-6 จ) แผนภูมิเปรียบเทียบสารระเหยง่ายที่เป็นสารระเหยหลัก (ตัวแทน) ของตัวอย่าง กระชายส่วนราก (rootlet) จากจังหวัดพิษณุโลกกับจังหวัดอื่น ๆ.....	49
รูปที่ 3-6 ฉ) แผนภูมิเปรียบเทียบสารระเหยง่ายที่เป็นสารระเหยหลัก (ตัวแทน) ของตัวอย่าง กระชายส่วนราก (rootlet) จากจังหวัดนครปฐมกับจังหวัดอื่น ๆ.....	49
รูปที่ 3-6 ช) กราฟแสดงผล PCA ในการจัดกลุ่มตัวอย่างกระชายส่วนเหง้า (rhizome) จากทั้ง 4 แหล่งเพาะปลูก.....	50
รูปที่ 3-6 ซ) กราฟแสดงผล PCA ของสารระเหยง่ายที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะของตัวอย่าง กระชายส่วนเหง้า (rhizome) จากแต่ละแหล่งเพาะปลูก.....	51
รูปที่ 3-6 ฌ) แผนภูมิเปรียบเทียบสารระเหยง่ายที่เป็นสารระเหยหลัก (ตัวแทน) ของตัวอย่าง กระชายส่วนเหง้า (rhizome) จากจังหวัดเพชรบูรณ์กับจังหวัดอื่น ๆ.....	52
รูปที่ 3-6 ญ) แผนภูมิเปรียบเทียบสารระเหยง่ายที่เป็นสารระเหยหลัก (ตัวแทน) ของตัวอย่าง กระชายส่วนเหง้า (rhizome) จากจังหวัดระนองกับจังหวัดอื่น ๆ.....	52
รูปที่ 3-6 ฎ) แผนภูมิเปรียบเทียบสารระเหยง่ายที่เป็นสารระเหยหลัก (ตัวแทน) ของตัวอย่าง กระชายส่วนเหง้า (rhizome) จากจังหวัดพิษณุโลกกับจังหวัดอื่น ๆ.....	53
รูปที่ 3-6 ฏ) แผนภูมิเปรียบเทียบสารระเหยง่ายที่เป็นสารระเหยหลัก (ตัวแทน) ของตัวอย่าง กระชายส่วนเหง้า (rhizome) จากจังหวัดนครปฐมกับจังหวัดอื่น ๆ.....	53



## สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2-1 ตารางแสดงรูปแบบการทดลองที่ออกแบบโดยใช้การออกแบบชนิด CCD.....	22
ตารางที่ 3-1 สารระเหยง่ายที่สำคัญ 30 สาร ในตัวอย่างกระชาย, ค่า retention time (RT), ค่า linear retention index (LRI) และโครงสร้าง.....	33
ตารางที่ A-1 แสดง %Normalization ของสารระเหยง่ายลำดับที่ 1-15 ในตัวอย่างกระชาย ส่วนราก (Rootlet) และเหง้า (Rhizome) จากจังหวัดนครปฐม.....	59
ตารางที่ A-2 แสดง %Normalization ของสารระเหยง่ายลำดับที่ 16-30 ในตัวอย่างกระชาย ส่วนราก (Rootlet) และเหง้า (Rhizome) จากจังหวัดนครปฐม.....	60
ตารางที่ A-3 แสดง %Normalization ของสารระเหยง่ายลำดับที่ 1-15 ในตัวอย่างกระชาย ส่วนราก (Rootlet) และเหง้า (Rhizome) จากจังหวัดพิษณุโลก.....	61
ตารางที่ A-4 แสดง %Normalization ของสารระเหยง่ายลำดับที่ 16-30 ในตัวอย่างกระชาย ส่วนราก (Rootlet) และเหง้า (Rhizome) จากจังหวัดพิษณุโลก.....	62
ตารางที่ A-5 แสดง %Normalization ของสารระเหยง่ายลำดับที่ 1-15 ในตัวอย่างกระชาย ส่วนราก (Rootlet) และเหง้า (Rhizome) จากจังหวัดเพชรบูรณ์.....	63
ตารางที่ A-6 แสดง %Normalization ของสารระเหยง่ายลำดับที่ 16-30 ในตัวอย่างกระชาย ส่วนราก (Rootlet) และเหง้า (Rhizome) จากจังหวัดเพชรบูรณ์.....	64
ตารางที่ A-7 แสดง %Normalization ของสารระเหยง่ายลำดับที่ 1-15 ในตัวอย่างกระชาย ส่วนราก (Rootlet) และเหง้า (Rhizome) จากจังหวัดระนอง.....	65
ตารางที่ A-8 แสดง %Normalization ของสารระเหยง่ายลำดับที่ 16-30 ในตัวอย่างกระชาย ส่วนราก (Rootlet) และเหง้า (Rhizome) จากจังหวัดระนอง.....	66

## คำอธิบายและคำย่อ

คำย่อ

CCD	=	central composite design
DOE	=	Design of Experiment
DVB	=	divinylbenzene
GC-FID	=	gas chromatography with flame ionization detector
GC-MS	=	gas chromatography-mass spectrometry
HS-SPME	=	headspace-solid phase microextraction
MLR	=	multiple linear regression
PCA	=	principal component analysis
PDMS	=	polydimethylsiloxane



# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

กระชายเป็นพืชสมุนไพรที่ได้จากธรรมชาติ นิยมปลูกกันมากบริเวณประเทศจีนและประเทศในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้รวมถึงประเทศไทย โดยกระชายเป็นพืชที่มีสรรพคุณนานับประการ เช่น ช่วยขับลม แก้ท้องอืดท้องเฟ้อ มีสารต้านอนุมูลอิสระ<sup>[1]</sup> สารออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ทั้งยังมีกลิ่นที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัว ในปัจจุบันมีการนำกลิ่นของกระชายมาใช้ประโยชน์เป็นอย่างมาก เช่น ใช้เติมลงไปในอาหารเพื่อลดความคาว ใช้ปรุงอาหารบางชนิดเพื่อให้มีกลิ่นหอมเป็นเอกลักษณ์ เป็นต้น กระชายยังเป็นพืชที่มีคุณค่าทางอาหารมากมาย เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ใยอาหาร รวมทั้งวิตามินและแร่ธาตุหลายชนิด โดยเฉพาะวิตามินเอและแคลเซียม

กระชายเป็นพืชที่มีกลิ่นเป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัว เนื่องจากมีสารระเหยง่าย (volatile compounds) หลายชนิดเป็นองค์ประกอบ โดยแต่ละแหล่งเพาะปลูกจะมีองค์ประกอบของสารระเหยในปริมาณที่แตกต่างกัน ทำให้กลิ่นของกระชายแต่ละแหล่งเพาะปลูกอาจไม่เหมือนกัน แต่กระชายที่ปลูกในแต่ละภาคของประเทศไทยมีลักษณะภายนอกที่เหมือนกัน ทำให้การระบุแหล่งที่มาด้วยการสังเกตจากลักษณะภายนอกเพียงอย่างเดียวมีความถูกต้องน้อย ดังนั้นการสกัดสารระเหยง่ายจากกระชาย และตรวจสอบด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี ซึ่งเป็นวิธีที่เหมาะสมในการวิเคราะห์องค์ประกอบของกระชายซึ่งเป็นสารอินทรีย์ที่ระเหยง่าย ทำให้สามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารระเหยง่ายในกระชายได้ แล้วจึงนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบ และจัดกลุ่มข้อมูลซึ่งจะช่วยบอกแหล่งที่มาของกระชายได้

เนื่องจากการศึกษาเกี่ยวกับการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารระเหยง่ายในกระชายที่มาจากแต่ละแหล่งเพาะปลูกเพื่อใช้ระบุแหล่งที่มาของกระชายพบว่ยังไม่เป็นที่แพร่หลาย ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษา และเปรียบเทียบสารระเหยง่ายในกระชายที่มาจากแต่ละแหล่งเพาะปลูก โดยเลือกใช้เทคนิคเฮดสเปซ-โซลิดเฟสไมโครเอกซ์แทรกชัน (headspace-solid

phase microextraction, HS-SPME) ซึ่งเป็นเทคนิคการสกัดและเก็บสารตัวอย่างที่ได้รับความนิยมมากในด้านเคมีวิเคราะห์ เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ทำได้ง่าย ใช้เวลาน้อย และไม่มีการใช้ตัวทำละลายทำให้เกิดของเสียน้อย จากนั้นตรวจวัดสารระเหยง่ายโดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี (gas-chromatography-mass spectrometry, GC-MS) ซึ่งเป็นวิธีที่เหมาะสมมากในการวิเคราะห์สารประกอบอินทรีย์ที่กลายเป็นไอได้ง่าย การตรวจวัดด้วยแมสสเปกโตรเมตรีนั้นสามารถทำนายชนิดขององค์ประกอบที่มีอยู่ในสารได้ค่อนข้างแม่นยำ โดยอาศัยการเปรียบเทียบข้อมูลทางมวลและรูปแบบการแตกตัวจำเพาะของสารกับฐานข้อมูลที่มีอยู่ นอกจากนี้ยังสามารถวิเคราะห์ได้ทั้งในเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพได้อย่างถูกต้อง และยังสามารถนำวิธีเคโมเมตริกซ์ (chemometrics) ซึ่งเป็นวิธีที่เกี่ยวข้องกับสถิติหลายตัวแปร (multivariate statistical analysis) มาช่วยในการออกแบบการทดลอง การประมวลผลการทดลอง และการจัดกลุ่มข้อมูล เนื่องจากผลการวิเคราะห์ที่ได้จาก GC-MS มีจำนวนมากและซับซ้อน การนำเทคนิคเคโมเมตริกซ์มาประยุกต์ใช้จะทำให้สามารถระบุแหล่งที่มาของกระชายได้อย่างถูกต้องมากยิ่งขึ้น

## 1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Arthur และ Pawliszyn<sup>[2]</sup> ได้พัฒนาเทคนิคเฮดสเปซ-โซลิดเฟสไมโครเอกซ์แทรกชัน (HS-SPME) ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถตรวจวัดสารระเหยง่ายในอาหาร และเครื่องดื่มได้ โดยเป็นเทคนิคในการสกัดสารระเหยง่ายในตัวอย่าง และเก็บสารตัวอย่างที่ได้รับความนิยมมากในด้านเคมีวิเคราะห์ เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ทำได้ง่าย ประหยัดเวลา และไม่ต้องใช้ตัวทำละลายในการสกัดสาร อีกทั้งยังเป็นเทคนิคที่ใช้ได้กับสารตัวอย่างที่มีคุณสมบัติเป็นสารระเหยง่ายที่อยู่ในรูปของแข็ง ของเหลว และแก๊ส<sup>[3]</sup>

เทคนิค HS-SPME ได้ประสบความสำเร็จในการวิเคราะห์องค์ประกอบสารระเหยง่ายในอาหาร เช่น Yang และคณะ<sup>[4]</sup> ได้ใช้เทคนิค HS-SPME ร่วมกับ GC-FID วิเคราะห์กลิ่นของกาแฟคั่วบด น้ำผลไม้ และรสชาติของเนยในน้ำมันพืช Xiao และคณะ<sup>[5]</sup> ใช้เทคนิค HS-SPME ร่วมกับ GC-MS เพื่อวิเคราะห์สารระเหยง่ายในอัลมอนด์และเปรียบเทียบปริมาณสารระเหยง่ายเหล่านั้นระหว่างอัลมอนด์ที่ผ่านการคั่วที่เวลาต่าง ๆ M. Riu และคณะ<sup>[6]</sup> ศึกษากลิ่นของเปียร์แอลกอฮอล์ต่ำโดยใช้เทคนิค HS-SPME และ Ruiz และคณะ<sup>[7]</sup> ศึกษาสารระเหยง่ายที่ให้กลิ่นในผลิตภัณฑ์ประเภทเนื้อโดยใช้เทคนิค HS-SPME ร่วมกับ GC-MS

เนื่องจากข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์สารระเหยง่ายจัดเป็นข้อมูลที่มีความซับซ้อนและมีจำนวนมาก ดังนั้นการพิจารณาและการประมวลผลข้อมูลจึงต้องอาศัยเทคนิคทางเคมีเมทริกซ์มาช่วยในการจำแนกข้อมูล ซึ่งเคมีเมทริกซ์เป็นเทคนิคที่อาศัยหลักการที่เกี่ยวข้องกับสถิติหลายตัวแปร เพื่อใช้ในการจัดแบ่งกลุ่มตามความเหมือนและความต่างกันของสารตัวอย่าง จากข้อมูลของสารเคมีที่ตรวจวัดได้จาก GC-MS

ตัวอย่างงานวิจัยที่ใช้เทคนิคทาง GC-MS ร่วมกับเคมีเมทริกซ์ เช่น Cheng และคณะ<sup>[8]</sup> ได้ศึกษาสารระเหยง่ายในผลหยางเหมย (bayberry) 3 สายพันธุ์ คือ Biqi, Dongkui และ Fenhongzhong ที่ถูกเก็บเป็นเวลาที่ต่าง ๆ โดยใช้เทคนิค GC-MS และนำข้อมูลของสารระเหยที่ได้มาประมวลผลด้วยวิธีเคมีเมทริกซ์ชนิด PCA เพื่อบอกความแตกต่างของหยางเหมย แต่ละสายพันธุ์ได้

Pillonel และคณะ<sup>[9]</sup> ได้ศึกษาความแตกต่างกลิ่นของชีสชนิดแอมเม็นทอล (emmental cheese) เพื่อหาความแตกต่างของสารระเหยง่ายที่ให้กลิ่น และสารระเหยที่เป็นเอกลักษณ์ของชีสที่มาจากประเทศในยุโรปที่แตกต่างกันโดยใช้เทคนิค GC-MS/FID และนำข้อมูลของสารระเหยที่ได้มาประมวลผลด้วยวิธีเคมีเมทริกซ์ชนิด PCA ทำให้สามารถแยกชีสชนิดแอมเม็นทอลที่มาจากแหล่งผลิตที่แตกต่างกันได้

นอกจากนี้ Freitas และคณะ<sup>[10]</sup> ได้ศึกษาสารระเหยง่ายที่ให้กลิ่นของกาแพที่ใช้กระบวนการคั่ว และกระบวนการผลิตที่เหมือนกัน แต่มาจากแหล่งผลิตที่แตกต่างกันทั้งหมด 8 แหล่ง โดยใช้เทคนิค GC-MS แล้วนำข้อมูลของสารระเหยง่ายที่ได้จากการวิเคราะห์มาประมวลผลด้วยวิธีเคมีเมทริกซ์ชนิด PCA เพื่อบอกความแตกต่างของกาแพที่มาจากแหล่งผลิตที่แตกต่างกันได้

Mohd Khairul และคณะ<sup>[11]</sup> ได้ศึกษาเปรียบเทียบสารที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากพืช 3 ชนิด คือ กระจ่าง ขมิ้นขาว และเปราะหอม โดยใช้เทคนิค GC-MS พบว่าในน้ำมันหอมระเหยซึ่งสกัดจากกระจ่างมีสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบหลัก 3 ชนิด คือ nerol, L-camphor และ cineole โดยพิจารณาจากค่า %Normalization



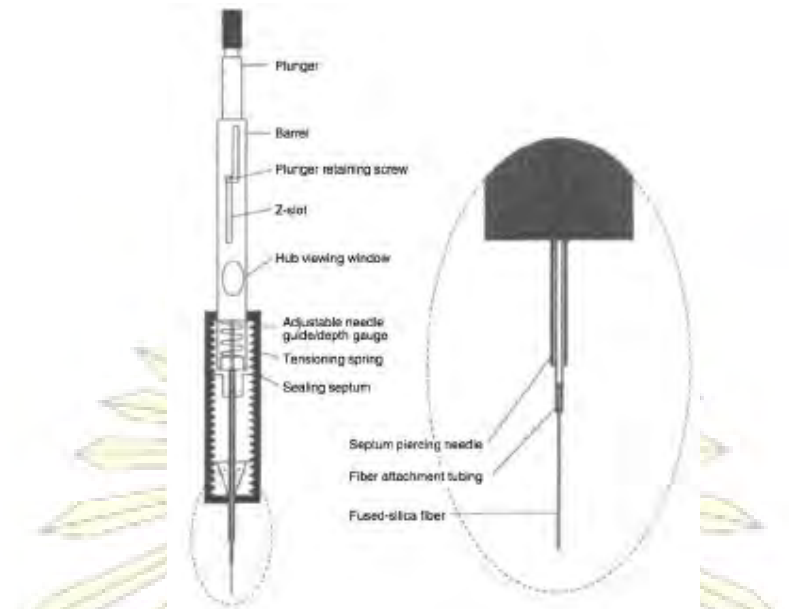
### 1.3 ทฤษฎีและความรู้พื้นฐาน

#### 1.3.1 เทคนิคเฮดสเปซ-โซลิดเฟสไมโครเอกซ์แทรกชัน (HS-SPME)

ในปี ค.ศ. 1990 Arthur C.L. และ Pawliszyn J.<sup>[12]</sup> ได้พัฒนาเทคนิค HS-SPME ขึ้น ซึ่งเป็นเทคนิคการสกัดสารระเหยง่ายในตัวอย่าง (ของแข็ง ของเหลว หรือแก๊ส) ที่บรรจุอยู่ในขวดเก็บตัวอย่างให้ออกมาอยู่ในเฮดสเปซ (headspace, HS) เพื่อให้ไฟเบอร์ของ SPME ดูดซับสารระเหยง่ายจากเฮดสเปซ ดังรูปที่ 1-1 แล้วจึงปล่อยสารระเหยง่ายดังกล่าวเข้าสู่ส่วนปล่อยสารของเครื่อง GC ดังนั้นหลักการของ HS-SPME ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน<sup>[13]</sup> คือ (1) Extraction Step โดยพอลิเมอร์ที่เคลือบอยู่บนไฟเบอร์จะทำหน้าที่ดูดซับสารระเหยง่ายจากตัวอย่างบริเวณเฮดสเปซในขวดเก็บตัวอย่าง (2) Desorption Step นำไฟเบอร์ที่ดูดซับสารตัวอย่างมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS เพื่อปลดปล่อยสารตัวอย่างออกจากไฟเบอร์ที่บริเวณส่วนฉีดสารของเครื่อง GC-MS

ข้อดีของการเตรียมสารโดยเทคนิค HS-SPME คือ เป็นเทคนิคการสกัดที่ง่าย มีประสิทธิภาพสูง ใช้เวลาน้อย และไม่ต้องใช้ตัวทำละลายในการสกัดทำให้เกิดของเสียน้อย

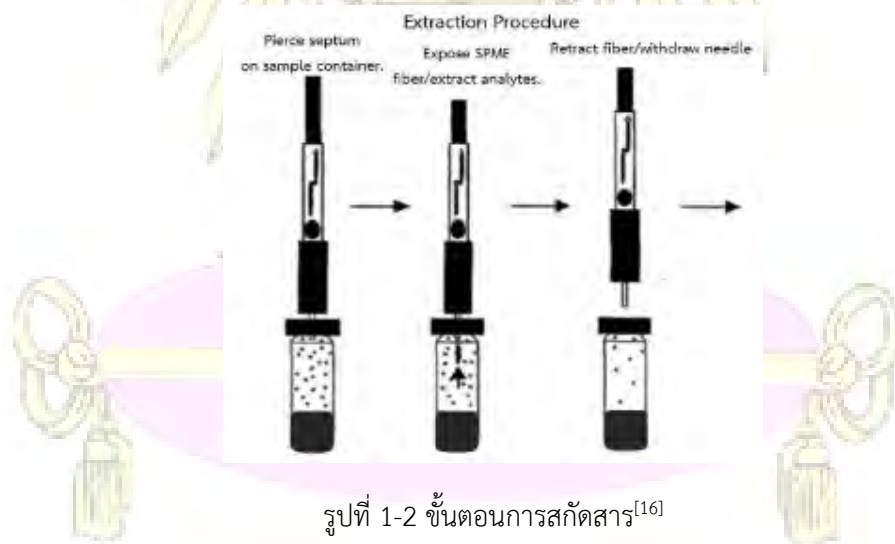
ข้อด้อยของการเตรียมสารโดยเทคนิค HS-SPME คือ เป็นอุปกรณ์ที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ มีราคาสูง การใช้งานต้องระมัดระวัง เนื่องจากไฟเบอร์ค่อนข้างเปราะหักง่าย และในตัวอย่างที่เป็นของแข็งผลของสารรบกวน (matrix effect) จะส่งผลต่อการวิเคราะห์ค่อนข้างมาก<sup>[14]</sup>



รูปที่ 1-1 ส่วนประกอบอุปกรณ์โซลิดเฟสไมโครเอกซ์แทรกชัน<sup>[15]</sup>

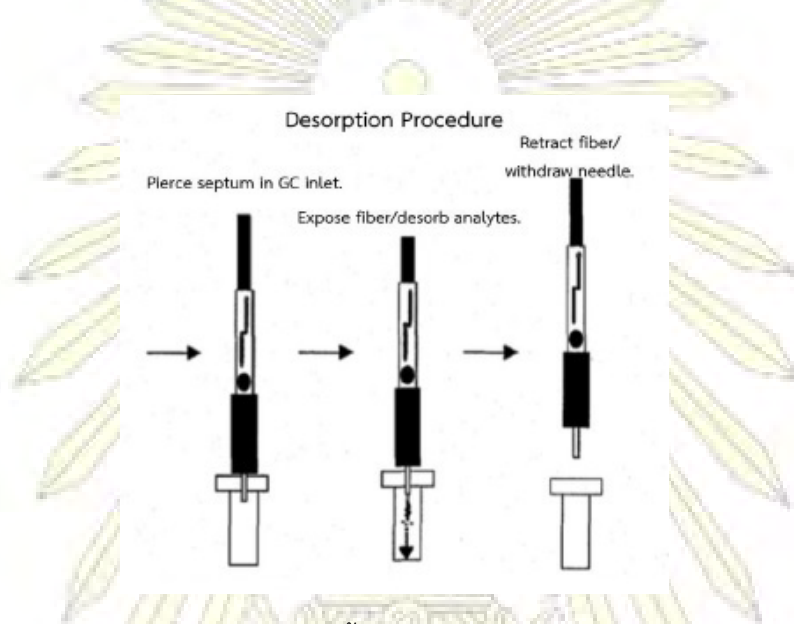
หลักการทำงานของ SPME ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนการสกัดสารและขั้นตอนการปลดปล่อยสาร

ขั้นตอนการสกัดสารประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ดังรูปที่ 1-2



รูปที่ 1-2 ขั้นตอนการสกัดสาร<sup>[16]</sup>

- 1) เจาะเข็ม SPME ผ่าน septum ของขวดบรรจุสารตัวอย่าง
  - 2) ปลดปล่อยไฟเบอร์ออกมาจาก septum piercing needle ลงไปในบริเวณเฮดสเปซ เพื่อให้เกิดการดูดซับของสารระเหยง่ายบนไฟเบอร์
  - 3) เก็บไฟเบอร์เข้าไปใน septum piercing needle และดึงเข็ม SPME ออกจากขวดบรรจุสารตัวอย่าง เพื่อเข้าสู่ขั้นตอนการปลดปล่อยสาร
- ขั้นตอนการปลดปล่อยสารประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ดังรูปที่ 1-3



รูปที่ 1-3 ขั้นตอนการปลดปล่อยสาร<sup>[16]</sup>

- 1) นำ septum piercing needle เจาะเข้าไปที่ส่วนฉีดยาของเครื่อง GC-MS
- 2) ปลดปล่อยไฟเบอร์ออกมาจาก septum piercing needle เพื่อปลดปล่อยสารที่ต้องการวิเคราะห์ให้เข้าสู่ส่วนฉีดยาของเครื่อง GC-MS
- 3) เมื่อครบกำหนดเวลาที่ปลดปล่อยสารออกจากไฟเบอร์ทั้งหมด ให้เก็บไฟเบอร์เข้าไปใน septum piercing needle และนำเข็ม SPME ออกจากส่วนฉีดยาของเครื่อง GC-MS

### 1.3.2 แก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี (GC-MS)

เป็นเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณสารที่กลายเป็นไอได้ง่าย ซึ่งเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมอย่างมาก เนื่องจากมีประสิทธิภาพสูง มีความจำเพาะ (specificity) ต่อการ

วัดสูง มีสภาพไว (sensitivity) ในการวัดสูง และให้ข้อมูลแมสสเปกตรัม (mass spectrum) ของสารที่สามารถใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์สารได้อย่างมีประสิทธิภาพ

### 1.3.2.1 หลักการแก๊สโครมาโทกราฟี

โครมาโทกราฟี เป็นเทคนิคการแยกสารที่เกี่ยวข้องกับสมดุลการกระจายตัว (distribution) ขององค์ประกอบต่าง ๆ ในตัวอย่างระหว่างวัฏภาค (phase) 2 ชนิด คือ วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ซึ่งทำหน้าที่พาองค์ประกอบของตัวอย่างให้เคลื่อนที่ผ่านวัฏภาคนิ่ง (stationary phase) ซึ่งทำหน้าที่แยกสารผสมออกจากกัน โดยอาศัยความแตกต่างของการเกิดอันตรกิริยา (interaction) ระหว่างองค์ประกอบตัวอย่างแต่ละชนิดกับวัฏภาคนิ่ง โดยความแตกต่างดังกล่าวเป็นผลจากความแตกต่างของคุณสมบัติทางเคมีของสาร ทำให้สารแต่ละชนิดมีการเคลื่อนที่ผ่านวัฏภาคนิ่งด้วยอัตราการเคลื่อนย้าย (migration rate) ที่แตกต่างกัน ทำให้สารผสมเกิดการแยกออกเป็นองค์ประกอบเดี่ยว ๆ ในที่สุด สำหรับแก๊สโครมาโทกราฟี (gas chromatography) เป็นเทคนิคหนึ่งในโครมาโทกราฟีที่ใช้แก๊สพา (carrier gas) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ เหมาะสำหรับการใช้แยกสารที่ระเหยง่าย (volatility) และมีเสถียรภาพทางความร้อน (thermal stability) โดยแก๊สพาจะต้องมีความบริสุทธิ์สูง ซึ่งแก๊สที่นิยมใช้เป็นแก๊สพา คือ ไนโตรเจน ฮีเลียม หรือ ไฮโดรเจน โดยทั่วไปนิยมใช้แก๊สฮีเลียมสำหรับคอลัมน์แคปิลลารี (capillary column) เมื่อตัวอย่างที่กลายเป็นไอที่จุดฉีด (injection port) แก๊สพาจะพาองค์ประกอบของตัวอย่างเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์แคปิลลารี ซึ่งเป็นท่อปลายเปิดที่ผนังด้านในเคลือบด้วยวัฏภาคนิ่งซึ่งโดยทั่วไปเป็นวัฏภาคของเหลว (liquid phase) ที่สามารถทนอุณหภูมิของเตาคอลัมน์ (column oven) ได้สูง องค์ประกอบในตัวอย่างจะถูกแยกออกมาจากคอลัมน์ตามลำดับของจุดเดือด หรือความมีขั้วของสาร และตรวจวัดด้วยดีเทคเตอร์ (detector) ที่เหมาะสม ผลที่ได้จากการแยกและตรวจวัดสารที่ออกมาจากคอลัมน์เรียกว่า โครมาโทแกรม (chromatogram) ซึ่งให้ข้อมูลที่สำคัญ 2 ชนิด คือ รีเทนชันไทม์ (retention time) เป็นเวลาที่สารแต่ละชนิดถูกรั้งอยู่ในคอลัมน์ เป็นข้อมูลที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพหรือบ่งบอกชนิดของสารเทียบกับรีเทนชันไทม์ของสารมาตรฐาน อีกชนิดหนึ่ง คือ ความสูงหรือพื้นที่ของพีก (peak) การที่ผลการแยกของสารในเทคนิค GC ปรากฏให้เห็นเป็นพีกในโครมาโทแกรม (chromatogram) นั้นเป็นผลจากการกระจายตัวขององค์ประกอบแต่ละชนิดในคอลัมน์

ภายหลังการแยก ซึ่งสารแต่ละชนิดจะมีรีเทนชันไทม์ที่แตกต่างกันเป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัวซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณสาร<sup>[17]</sup>

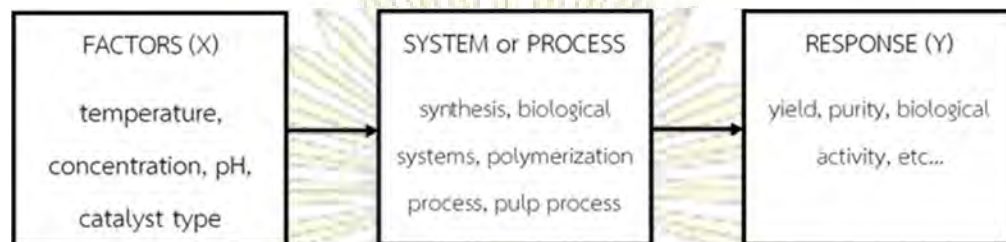
### 1.3.2.2 หลักการแมสสเปกโตรเมตรี

แมสสเปกโตรเมตรี (mass spectrometry) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารประกอบที่ไม่ทราบชนิด (unknown compound) และใช้ในการศึกษาโครงสร้างของโมเลกุลได้เป็นอย่างดี โดยอาศัยหลักการเคลื่อนที่ของมวลที่มีประจุ (charged particle) หรือ ไอออน ในสนามไฟฟ้าหรือสนามแม่เหล็ก พฤติกรรมการเคลื่อนที่ดังกล่าวขึ้นอยู่กับค่ามวลต่อประจุ (mass to charge ratio,  $m/z$ ) ของไอออน การทราบประจุของไอออนจะทำให้เราทราบค่าของมวลของไอออนนั้น ๆ กระบวนการที่เกิดขึ้นในส่วนของแมสสเปกโตรมิเตอร์ เริ่มต้นที่ไอออนถูกผลิตขึ้นจากโมเลกุลของสารที่ถูกนำเข้ามาที่แหล่งกำเนิดไอออน (ion source) ไอออนที่เกิดขึ้นจะถูกแยกด้วยหน่วยวิเคราะห์มวล (mass analyzer) และถูกนับจำนวนด้วยดีเทคเตอร์ วิธีการแตกตัวเป็นไอออน (ionization method) ที่สำคัญได้แก่ การแตกตัวของโมเลกุลเป็นไอออนโดยอิเล็กตรอน (electron ionization, EI) และ การแตกตัวของโมเลกุลเป็นไอออนโดยวิธีทางเคมี (chemical ionization, CI) ซึ่งรูปแบบการแตกตัวเป็นการกำหนดชนิด และความอุดม (abundance) ของไอออนที่เกิดขึ้น ไอออนเหล่านี้แบ่งออกเป็น 2 รูปแบบหลัก ๆ คือ ไอออนโมเลกุล (molecular ion) ซึ่งเป็นไอออนที่มีมวลเท่ากับโมเลกุลของสารในสภาพเริ่มต้น ทำให้ทราบมวลโมเลกุลของสาร อีกรูปแบบ คือ ไอออนย่อย (fragment ion) ซึ่งเกิดจากการแตกออกของโครงสร้าง หรือเป็นไอออนที่มีมวลมากขึ้นซึ่งเกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างโมเลกุลของสารในสภาพเริ่มต้นกับแก๊สที่ทำให้เกิดการแตกตัวเป็นไอออนทางเคมี ผลจากการวิเคราะห์มวลสารโดยเทคนิคแมสสเปกโตรเมตรี คือ แมสสเปกตรัม (mass spectrum) ซึ่งเป็นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่ามวลต่อประจุ กับ ความอุดมของไอออน (ion abundance) เป็นข้อมูลที่ทำให้ทราบมวลโมเลกุล โครงสร้างโมเลกุล รวมทั้งปริมาณของสารที่ทำการวิเคราะห์<sup>[17]</sup>

### 1.3.3 การออกแบบการทดลอง (Design of Experiment, DOE)

การทดลอง คือ กระบวนการหรือวิธีศึกษาเพื่อให้ได้ผลลัพธ์เป็นข้อมูล ซึ่งการทดลองทางเคมีทั่วไปนักวิจัยจะต้องทดลองโดยแบ่งออกเป็น 3 ส่วน ดังรูปที่ 1-4 ได้แก่ กำหนดตัวแปร

อิสระที่มีผลกระทบต่อการทำงาน หลังจากนั้นกำหนดปริมาณ หรือค่าของตัวแปรอิสระนั้นเพื่อนำไปใช้ในการทดลอง และตรวจวัดผลของตัวแปรเหล่านั้นจากผลการทดลอง หรือค่าการตอบสนองทั้งในเชิงปริมาณ และเชิงคุณภาพ โดยบันทึกผลการทดลองในรูปแบบของตัวเลขหรือสเปกตรัม



รูปที่ 1-4 แผนภาพแสดงขั้นตอน ความสัมพันธ์ของตัวแปร และผลการทดลองในการทดลองทั่วไป<sup>[18]</sup>

การทดลองโดยทั่วไปนักวิจัยจะทำการทดลองโดยกำหนดค่าตัวแปรอิสระทีละ 1 ค่า (variable) อย่างไม่เป็นระบบเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของระบบที่มีความซับซ้อน และให้ตัวแปรอิสระตัวอื่น ๆ เป็นค่าคงที่ จากนั้นจึงหาค่าตัวแปรอิสระตัวอื่น ๆ ต่อไป เรียกการทดลองแบบนี้ว่า การเปลี่ยนค่าตัวแปรอิสระเดียวในแต่ละการทดลอง (change one separate factor at a time, COST)<sup>[18]</sup> ซึ่งจะเป็นการทดลอง และเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้กับผลการทดลองเดิม การทำการทดลองแบบนี้โดยปราศจากการออกแบบการทดลองที่ดีจะเปรียบเสมือนการลองผิดลองถูกไปที่ละขั้น

ในปี ค.ศ. 1920 นักสถิติและนักวิทยาศาสตร์ชาวอังกฤษชื่อ Fisher R.A.<sup>[18]</sup> ได้คิดค้นการออกแบบการทดลองที่เหมาะสมขึ้น (design of experiment, DOE) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อออกแบบการทดลองโดยปรับเปลี่ยนตัวแปรอิสระที่มีทั้งหมดพร้อม ๆ กันเพื่อให้ได้ผลการทดลองที่ดีที่สุด มีจำนวนการทดลองที่น้อยที่สุด และได้ผลการทดลองที่น่าเชื่อถือ อีกทั้งยังทำให้แปลผลการทดลองได้ง่าย ถูกต้อง และแม่นยำ โดยพิจารณาถึงความสัมพันธ์ของตัวแปรแต่ละตัว และลักษณะการดำเนินไปของแต่ละปฏิกิริยา ซึ่งการออกแบบการทดลองนั้นสามารถจำแนกตามวัตถุประสงค์ในการทดลองเป็น 3 ขั้นตอน ดังนี้

1.3.3.1 การออกแบบการทดลองของตัวแปรที่ถูกคัดเลือก (screening design) คือ การออกแบบการทดลองเพื่อพิจารณาปัจจัยที่มีความสำคัญต่อความสำเร็จในการทดลอง

1.3.3.2 การทำนายผลการทดลองในเชิงปริมาณ (quantitative modeling) คือ การสร้างสมการทางคณิตศาสตร์เพื่อทำนายผลการทดลองในเชิงปริมาณโดยอาศัยการสร้างกราฟมาตรฐาน

1.3.3.3 การหาค่าของตัวแปรที่เหมาะสม (optimization) คือ กระบวนการกำหนดค่าตัวแปร เพื่อทำการทดลองให้ได้ผลการทดลองที่ดีที่สุด

### 1.3.4 การออกแบบการทดลองของตัวแปรที่ถูกคัดเลือก (Screening design)

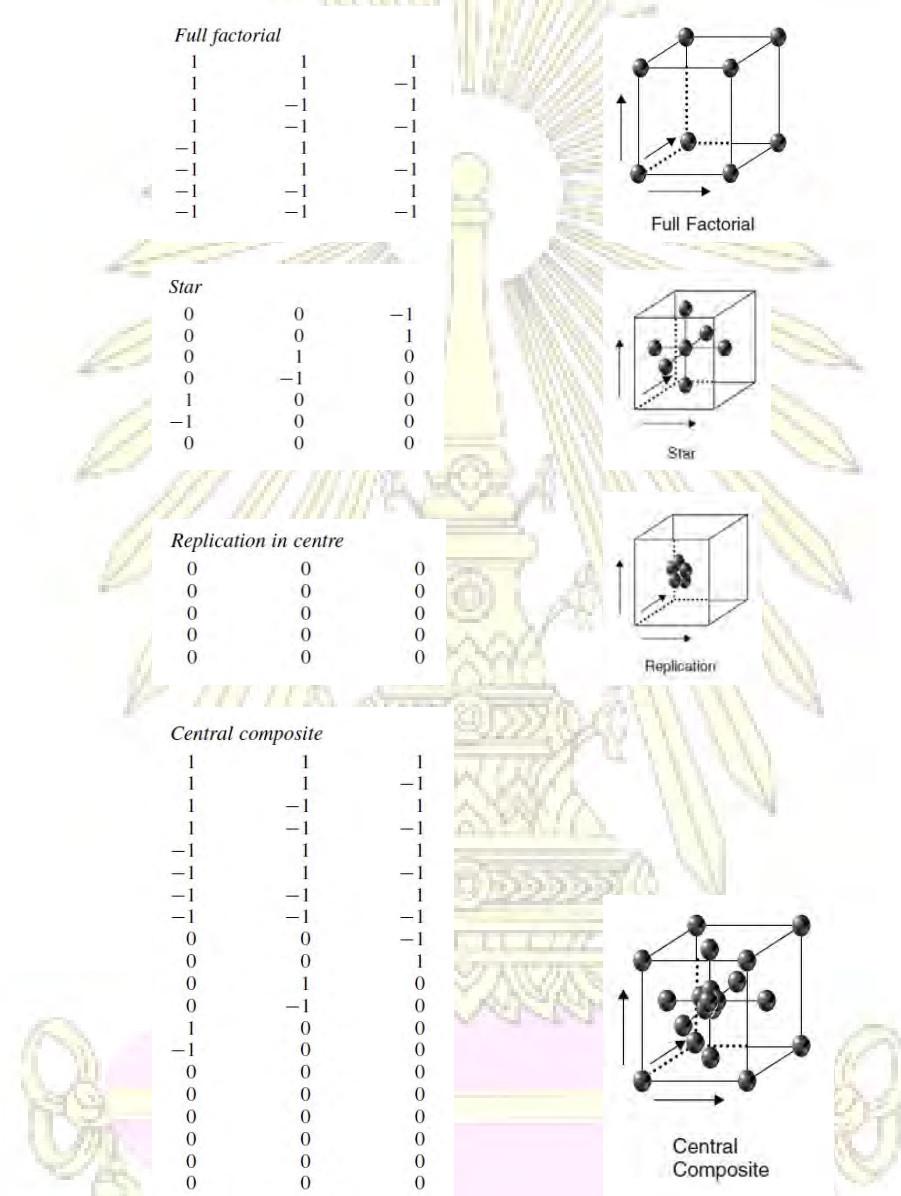
การออกแบบการทดลองที่เป็นพื้นฐาน ได้แก่ ฟูลแฟคทอเรียล (full factorial design) แฟรคชันนัลแฟคทอเรียล (fractional factorial design) และเซ็นทรัลคอมโพสิสต์ (central composite design) ซึ่งในงานวิจัยครั้งนี้เลือกการออกแบบการทดลองแบบเซ็นทรัลคอมโพสิสต์ (central composite design)<sup>[19]</sup>

#### 1.3.4.1 เซ็นทรัลคอมโพสิสต์ (Central composite Design, CCD)

การออกแบบการทดลองทางเคมีทั่วไปนั้นตัวแปรอิสระบางตัวไม่ส่งผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการทดลองจึงไม่จำเป็นต้องนำมาพิจารณาในการวิเคราะห์ ดังนั้นจึงสามารถใช้ระบบออกแบบการทดลองที่มีประสิทธิภาพได้ ซึ่งเมื่อจำนวนตัวแปรอิสระถูกจำกัดก็สามารถใช้วิธีการออกแบบการทดลองที่เรียกว่า central composite design (CCD) ซึ่งเป็นที่นิยมในการใช้ออกแบบการทดลองทางเคมีทั่วไป

หลักการของ CCD สามารถอธิบายได้ด้วยตัวอย่างการออกแบบการทดลองที่ตัวแปรอิสระถูกกำหนดไว้จำนวน 3 ตัว ( $f=3$ ) และตัวแปรอิสระแต่ละตัวถูกควบคุมให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไป 2 ระดับค่า ( $l=2$ ) ดังรูปที่ 1-5 ซึ่งการแบบการทดลองแบบ CCD อธิบายได้ด้วยการจำลองการออกแบบการทดลองในกล่องลูกบาศก์ และแกนของกล่องลูกบาศก์มีความสัมพันธ์กับตัวแปรอิสระแต่ละตัว จากนั้นกำหนดรหัส (coded value) ให้กับตัวแปรอิสระทุกตัว โดยให้ค่ากลางของตัวแปรอิสระมีรหัสเป็น 0 ค่าสูงสุดมีรหัสเป็น 1 และค่าต่ำสุดมี

รหัสเป็น -1 จะได้ว่าจำนวนการทดลองตามสมการฟูลแฟคทอเรียล (full factorial design)<sup>[20]</sup> เท่ากับ  $2^3 = 8$  การทดลอง จำนวนการทดลองที่เกิดจากออกแบบการทดลองแบบ star<sup>[20]</sup> คือ 7 การทดลอง และจำนวนการทดลองที่เกิดจากการทดลองซ้ำ (replication) คือ 5 การทดลอง ดังนั้นจำนวนการทดลองทั้งหมดของ CCD คือ  $8+7+5 = 20$  การทดลอง



รูปที่ 1-5 แสดงการออกแบบการทดลองแบบ CCD ที่ประกอบไปด้วยจำนวนการทดลองจาก full factorial, star และการทดลองซ้ำ (replication)<sup>[20]</sup>



### 1.3.5 สมการทางคณิตศาสตร์ในเชิงปริมาณ (quantitative modeling)

หลังจากออกแบบการทดลอง และได้ผลการทดลองแล้ว ขั้นตอนต่อไป คือ พิจารณาผลการทดลองที่ได้ทั้งหมด สมการทางคณิตศาสตร์สามารถสร้างได้จากค่าตอบสนองเพื่อช่วยในการวิเคราะห์ และจากการออกแบบการทดลองที่เป็นระบบจะทำให้สามารถสร้างสมการทางคณิตศาสตร์สำหรับวิเคราะห์ผลการทดลองที่มีความถูกต้องสูง โดยสามารถเขียนสมการเชิงเส้นของการทดลองที่มี 3 ตัวแปรอิสระได้ดังนี้

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + \dots$$

$y$  = ผลตอบสนอง (response)  
 $b_0$  + ค่าตัดแกน (intercept or average)  
 $b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 +$  ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linear terms)  
 $b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 +$  ความสัมพันธ์กำลังสอง (quadratic terms)  
 $b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 +$  ความสัมพันธ์ระหว่างสองตัวแปร (interaction term)

จากสมการเชิงเส้นตรงของระบบที่มีตัวแปรอิสระ 3 ตัว จะสามารถสร้างได้ทั้งหมด 11 พารามิเตอร์ จากสมการเชิงเส้นจะทราบเพียงค่าตอบสนอง ( $y$ ) และค่าของตัวแปรอิสระ ( $x_1, x_2, x_3$ ) ซึ่งค่าสัมประสิทธิ์ ( $b$ ) ที่ไม่ทราบได้โดยตรงจากการทดลองซึ่งสามารถหาค่าสัมประสิทธิ์ได้จากวิธี multiple linear regression (MLR) โดยวิธีการนี้จะเปลี่ยนค่าของผลการทดลองและค่าตัวแปรอิสระให้อยู่ในรูปของเมทริกซ์ และเวกเตอร์ดังสมการ

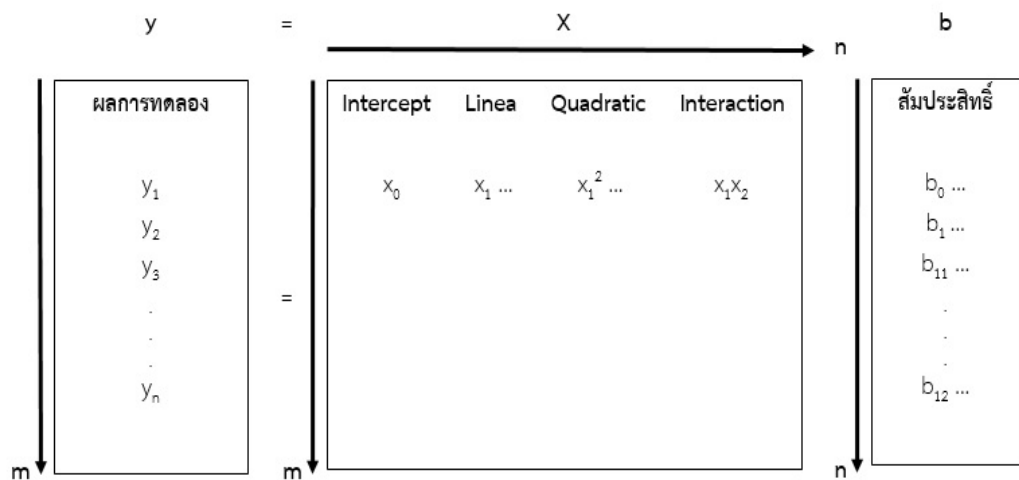
$$y = X \cdot b$$

โดยที่  $y_{(m \times 1)}$  คือ ค่าตอบสนองของ  $m$  การทดลอง

$b_{(n \times 1)}$  คือ สัมประสิทธิ์ของ  $n$  พารามิเตอร์ในสมการเชิงเส้น

$X_{(m \times n)}$  คือ ค่าของ  $n$  พารามิเตอร์ในสมการเชิงเส้นของ  $m$  การทดลอง

โดยโครงสร้าง และมีติของสมการ  $y = X \cdot b$  ของตัวอย่างสมการเชิงเส้นที่ถูกเปลี่ยนมาอยู่ในรูปเมทริกซ์นั้นแสดงได้ดังรูปที่ 1-6



รูปที่ 1-6 รูปแบบของเมทริกซ์ และเวกเตอร์ที่เปลี่ยนรูปมาจากสมการเชิงเส้น<sup>[20]</sup>

จากรูปแบบของเมทริกซ์ และเวกเตอร์ค่าสัมประสิทธิ์สามารถหาได้โดยหลักของการวิเคราะห์เชิงเส้นหลายตัวแปร (multiple linear regression, MLR) ค่าสัมประสิทธิ์ก็สามารถหาได้ดังนี้

(ก) ข้อมูลเป็นเมทริกซ์สมมูล (square matrix) คือ เมทริกซ์ที่มีจำนวนแถวเท่ากับจำนวนคอลัมน์ จะสามารถหาค่าสัมประสิทธิ์ ( $b$ ) ได้โดยตรงจากหลักการ MLR เมื่อทราบค่าตอบสนอง ( $y$ ) และค่าของพารามิเตอร์ในสมการเชิงเส้น ( $X$ ) จะได้ว่า  $b = X^{-1} \cdot y$  และเมื่อพิจารณาการทำนายค่าตอบสนองจากค่าสัมประสิทธิ์ที่คำนวณได้จากสมการ  $\hat{y} = X \cdot b$  จะได้ว่าค่าตอบสนองอ้างอิง (ที่ได้จากการคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์) มีค่าเท่ากับค่าตอบสนองที่ถูกทำนายขึ้นโดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ นั่นคือ  $\hat{y} = y$

(ข) ข้อมูลไม่เป็นเมทริกซ์สมมูล จะได้ว่า  $b = (X^T X)^{-1} X^T y$  โดยที่  $X^T$  คือ การเปลี่ยนตำแหน่งของเมทริกซ์ (transpose) โดยถ้าพิจารณาค่าตอบสนองจากค่าสัมประสิทธิ์ที่คำนวณได้จากสมการ  $\hat{y} = X \cdot b$  จะได้ว่า ค่าตอบสนองอ้างอิง (ที่ได้จากการคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์) มีค่าไม่เท่ากับค่าตอบสนองที่ทำนายขึ้นโดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ นั่นคือ  $\hat{y} \neq y$  เนื่องจากค่าสัมประสิทธิ์ ( $b$ ) คำนวณจาก pseudo-inverse ของข้อมูล  $(X^T X)^{-1} X^T$  ซึ่งเป็นการประมาณของข้อมูลตั้งสมการ

$$y \approx Xb \text{ so } X^T y \approx X^T Xb \text{ or } (X^T X)^{-1} X^T y \approx (X^T X)^{-1} (X^T X) \cdot b \approx b$$

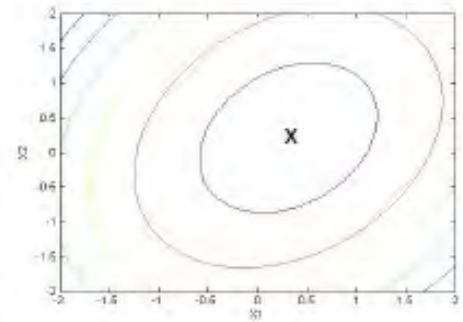
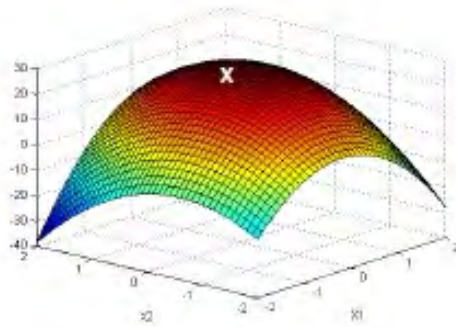
ดังนั้นค่าสัมประสิทธิ์ที่ได้จากการคำนวณจะทำให้สมการเชิงเส้นมีความถูกต้อง เนื่องจากค่าสัมประสิทธิ์ที่ได้จะคำนวณมาจากทุกการทดลอง ไม่ได้มาจากการทดลองใดการทดลองหนึ่ง นอกจากนั้นค่าสัมประสิทธิ์ยังบอกถึงความสำคัญของตัวแปรอิสระได้โดยดูจากค่าสัมบูรณ์ (absolute value) ของตัวแปรนั้น ๆ โดยตัวแปรที่มีค่าสัมประสิทธิ์สัมบูรณ์สูง แสดงว่าตัวแปรอิสระนั้นมีผลกระทบ หรือมีความสำคัญต่อค่าตอบสนองสูงด้วยเช่นกัน อีกทั้งเครื่องหมายของค่าสัมประสิทธิ์ยังบ่งบอกถึงความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระ และค่าตอบสนองด้วย โดยถ้าค่าสัมประสิทธิ์ของตัวแปรอิสระใด ๆ มีค่าเป็นบวก แสดงถึงการแปรผันตรงระหว่างค่าตอบสนอง และตัวแปรอิสระนั้น ๆ และถ้าค่าสัมประสิทธิ์ของตัวแปรอิสระใด ๆ มีค่าเป็นลบ แสดงถึงการแปรผกผันระหว่างค่าตอบสนอง และตัวแปรอิสระนั้น ๆ อีกทั้งสมการเชิงเส้นยังสามารถใช้ทำนายค่าการตอบสนองเมื่อเปลี่ยนแปลงตัวแปรอิสระได้โดยไม่ต้องทำการทดลองเพิ่ม และจะเห็นได้ว่าจากสมการเชิงเส้นที่สมบูรณ์จะสามารถวิเคราะห์ผลการทดลองได้ง่าย และแม่นยำมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับวิเคราะห์จากผลการทดลอง หรือค่าตอบสนองโดยตรง

### 1.3.6 การหาค่าของตัวแปรที่เหมาะสม (Optimization)

การหาค่าที่เหมาะสมของตัวแปรอิสระเพื่อให้ผลการตอบสนองที่ดีที่สุด สามารถทำได้หลายวิธีซึ่งวิธีหนึ่งที่เป็นวิธีที่ง่าย และไม่ต้องใช้โปรแกรมการคำนวณที่ซับซ้อน คือ วิธีการสร้างพื้นที่ตอบสนอง (response surface modeling) โดยหลังจากที่ได้ค่าสัมประสิทธิ์ของสมการเชิงเส้นของการทดลองจนเป็นสมการสมบูรณ์แล้ว จะสามารถแทนค่าตัวแปรอิสระลงไปในสมการเพื่อให้ได้ค่าตอบสนองที่คำนวณขึ้นตามสมการดังนี้

$$\hat{y} = b_0 + b_1x_1 + \dots + b_{11}x_{11} + \dots + b_{12}x_1x_2 + \dots$$

หลังจากที่ได้ค่าตอบสนอง ค่าของตัวแปรอิสระ และค่าสัมประสิทธิ์แล้ว สามารถนำมาสร้างกราฟพื้นที่ตอบสนองได้ดังรูปที่ 1-7 ซึ่งเห็นได้ว่าจะสามารถสังเกตเห็นสภาวะที่เหมาะสมที่ให้ค่าตอบสนองสูงที่สุดได้ง่ายจากกราฟพื้นที่ตอบสนองนี้ โดยวิธีดังกล่าวเป็นที่นิยมอย่างมากสำหรับนักเคมีวิเคราะห์ในการหาสภาวะที่เหมาะสม เช่น การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกสารด้วยเทคนิค HPLC หรือ GC เป็นต้น



รูปที่ 1-7 กราฟพื้นที่ตอบสนอง (ซ้าย) และ contour plot (ขวา) โดยมีเครื่องหมาย x เป็นจุดที่บ่งบอกค่าของตัวแปร  $x_1$  และ  $x_2$  ที่ให้ค่าการตอบสนองสูงที่สุด

### 1.3.7 เคโมเมตริกซ์

เคโมเมตริกซ์ คือ วิธีการประมวลผลข้อมูลที่ถูกนำมาใช้อย่างมากในทางเคมีวิเคราะห์ ซึ่งเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับใช้จัดกลุ่มผลการทดลองที่มีปริมาณมาก และกรองข้อมูลที่สำคัญออกมาโดยใช้ความรู้พื้นฐานทางสถิติ การนำเสนอข้อมูลของเคโมเมตริกซ์สามารถแบ่งออกได้ 2 วิธี ได้แก่ unsupervised method และ supervised method<sup>[20]</sup>

#### 1.3.7.1 Unsupervised method

เป็นหลักการที่สามารถประยุกต์ใช้ทางเคมีได้โดยตรง โดยเป็นหลักการวิเคราะห์ข้อมูลเชิงสำรวจซึ่งสามารถใช้จัดกลุ่มของตัวอย่าง แบ่งออกเป็น 2 วิธี ได้แก่ hierarchiral cluster analysis (HCA) และ principal component analysis (PCA)

#### 1.3.7.2 Supervised method

หลักการของการวิเคราะห์ข้อมูลแบบ supervised นั้นจะต้องกลุ่มของข้อมูลก่อนจึงจะสามารถจัดกลุ่มของข้อมูลในระดับของคลาส (class) ได้ อีกทั้งยังเป็นวิธีการทำนายและจัดกลุ่มของข้อมูลที่ยังไม่ทราบกลุ่มได้อีกด้วย

### 1.3.8 Principal Component Analysis (PCA)

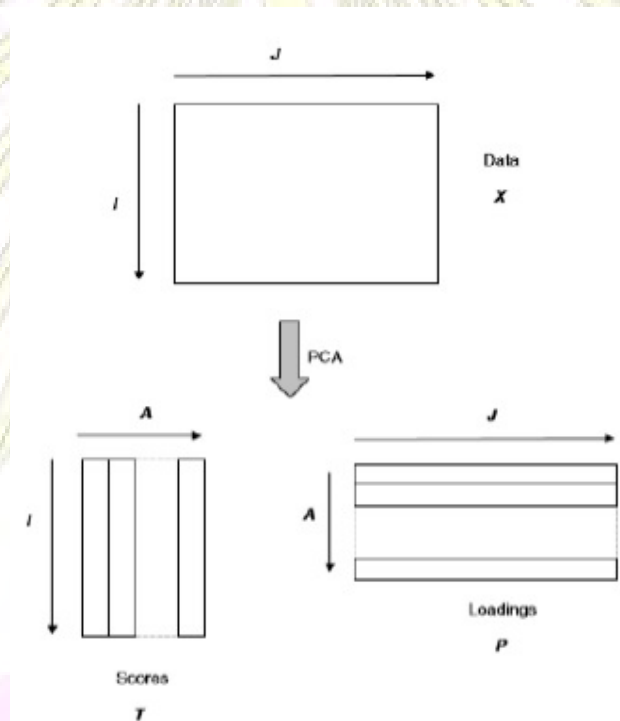
เป็นวิธีการศึกษาความสัมพันธ์ของข้อมูลเพื่อหาสิ่งที่คล้ายคลึง และแตกต่างกันของชุดข้อมูล วิธีนี้สามารถลดปริมาณตัวแปรเมื่อข้อมูลนั้นมีความสัมพันธ์กัน โดย PCA จะประมวลผลข้อมูลในรูปแบบทางคณิตศาสตร์ คือ เมทริกซ์ โดยมีรูปแบบของสมการ คือ

$$X = T \cdot P + E$$

โดย T เรียกว่า score คือ ข้อมูลที่อยู่ในแนวแถว

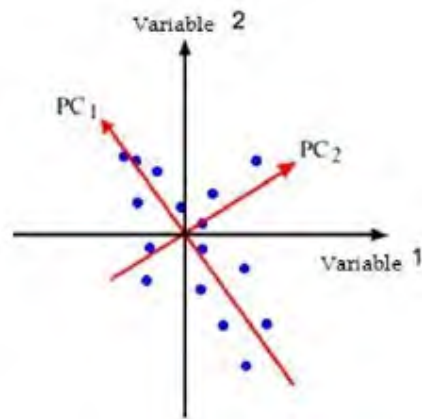
P เรียกว่า loading คือ ข้อมูลที่อยู่ในแนวคอลัมน์

และจำนวนคอลัมน์ในเมทริกซ์ T จะมีจำนวนเท่ากับจำนวนแถวในเมทริกซ์ P ดังรูปที่ 1-8



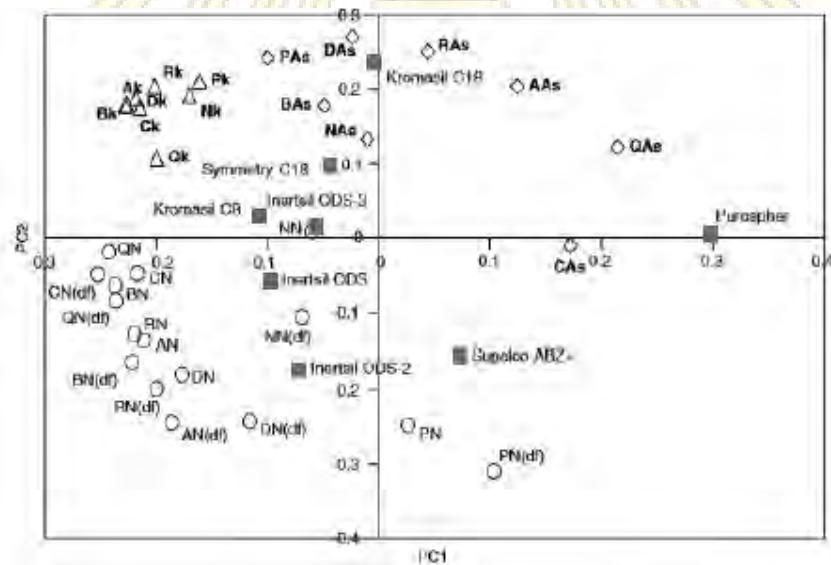
รูปที่ 1-8 รูปแสดงการวิเคราะห์ด้วยเมทริกซ์ของการวิเคราะห์ข้อมูลแบบ PCA<sup>[18]</sup>

สำหรับการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้สิ่งที่จำเป็น คือ ชุดข้อมูลที่อยู่ในแนวคอลัมน์เรียกว่าตัวแปร (variable) เป็นปริมาณของสารชนิดต่าง ๆ ที่ตรวจวัดได้ และข้อมูลที่อยู่ในแนวแถวเรียกว่าตัวอย่าง (sample) ซึ่งเป็นชนิดของตัวอย่างที่ใช้ศึกษา และต้องใช้แกน PC1 และ PC2 ที่ลากผ่านจุดสำคัญขององค์ประกอบหลักในการอธิบายจุดสำคัญในกราฟ ดังรูปที่ 1-9

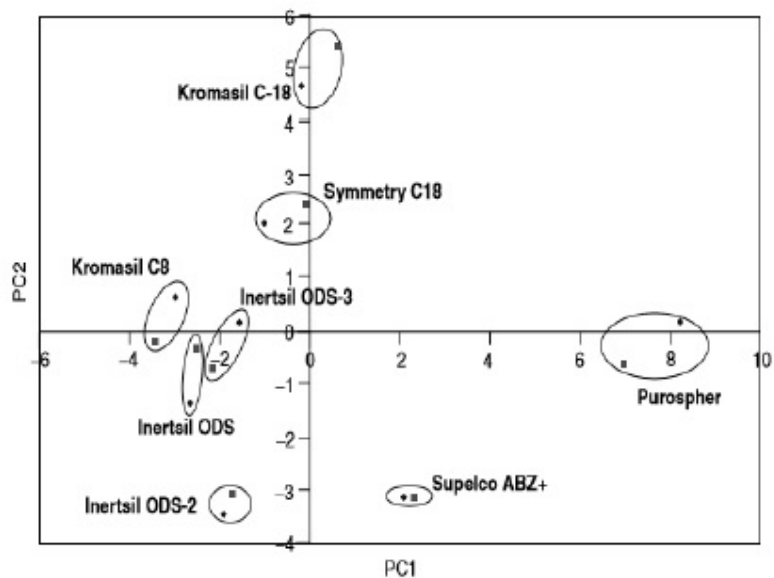


รูปที่ 1-9 การจัดกลุ่มข้อมูลด้วย PCA<sup>[19]</sup>

การประมวลผลด้วย PCA ข้อมูลจากการประมวลผลของตัวอย่างจะแทนด้วยจุดหนึ่งจุด ดังนั้นข้อมูลที่มีองค์ประกอบคล้ายกันจะมีตำแหน่งใกล้เคียงกัน และข้อมูลที่แตกต่างกันจะมีตำแหน่งที่กระจายตัวออกไป ซึ่งสามารถแบ่งกราฟผลของ PCA ออกได้ 2 แบบ ได้แก่ loading plot และ score plot ดังรูปที่ 1-10 และรูปที่ 1-11 ตามลำดับ



รูปที่ 1-10 loading plot ของ PCA<sup>[18]</sup>



รูปที่ 1-11 score plot ของ PCA<sup>[18]</sup>

#### 1.4 วัตถุประสงค์และขอบเขตของงานวิจัย

##### วัตถุประสงค์

เพื่อจำแนกตัวอย่างกระชายตามแหล่งเพาะปลูกโดยเปรียบเทียบจากสารระเหยง่าย ซึ่งได้จากการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค HS-SPME-GC-MS ร่วมกับวิธีเคโมเมทริกซ์

##### ขอบเขตของงานวิจัยประกอบด้วย

- หาสภาวะที่เหมาะสมของการวิเคราะห์สารระเหยง่ายในตัวอย่างกระชายโดยเทคนิค HS-SPME-GC-MS
- วิเคราะห์ตัวอย่างกระชายจาก 4 แหล่งเพาะปลูก ได้แก่ จังหวัดนครปฐม พิษณุโลก เพชรบูรณ์ และ ระนอง โดยเทคนิค HS-SPME-GC-MS
- ประมวลผลการทดลอง และจัดกลุ่มข้อมูลกระชายโดยวิธีเคโมเมทริกซ์ชนิด PCA

#### 1.5 ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย

ได้ทราบวิธีการจำแนกกระชายตามแหล่งเพาะปลูกโดยใช้เทคนิค HS-SPME- GC-MS ร่วมกับวิธีเคโมเมทริกซ์

## บทที่ 2

### การทดลอง

#### เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์ประกอบด้วย
  - 1.1 เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีของ Agilent รุ่น 7890A
  - 1.2 ตัวตรวจวัดแมสสเปกโตรมิเตอร์ของ Agilent รุ่น 7000
2. คอลัมน์ที่มีรูขนาดเล็ก (capillary column) HP-5MS (30m x 0.25mm x 0.25µm)
3. อุปกรณ์โซลิดเฟสไมโครเอกซ์แทรกชัน (solid phase microextraction) ของ Supelco (50/30 µm DVB/CAR/PDMS)
4. ขวด (vial) ขนาด 20 มิลลิลิตร
5. ฝาอะลูมิเนียม (crimp)
6. เครื่องหนีงฝาอะลูมิเนียม (crimper)
7. เครื่องให้ความร้อน (hot plate)

#### สารเคมี

1. แก๊สฮีเลียม
2. แก๊สไนโตรเจน
3. ตัวอย่างกระชายจาก 4 จังหวัด ได้แก่ นครปฐม พิษณุโลก เพชรบูรณ์ และระนอง

#### 2.1 การหาอัตราส่วนของสารที่เข้าคอลัมน์ (splitless and split ratio)

##### 2.1.1 กำหนดสภาวะของเครื่อง GC-MS

อุณหภูมิของเตาอบ	50	องศาเซลเซียส
อุณหภูมิของส่วนฉีดสาร	250	องศาเซลเซียส
อุณหภูมิของแหล่งกำเนิดไอออน	230	องศาเซลเซียส



	อุณหภูมิของ MS quadrupole	150	องศาเซลเซียส
	อัตราการไหลของแก๊สไนโตรเจน	1.50	มิลลิลิตรต่อนาที
	อัตราการไหลของแก๊สฮีเลียม	2.25	มิลลิลิตรต่อนาที
	อัตราการไหลของแก๊สตัวพา	35	เซนติเมตรต่อวินาที
2.1.2	กำหนดสภาวะอุณหภูมิในคอลัมน์ของเครื่อง GC-MS		
	อุณหภูมิเริ่มต้น	50	องศาเซลเซียส
	อุณหภูมิมกกลาง	200	องศาเซลเซียส
	อุณหภูมิสุดท้าย	260	องศาเซลเซียส
	เวลาเริ่มต้น	0	นาที
	เวลากลาง	0	นาที
	เวลาสุดท้าย	1	นาที
	อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 1	3	องศาเซลเซียสต่อนาที
	อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 2	60	องศาเซลเซียสต่อนาที
2.1.3	ชั่งตัวอย่างกระชายที่หั่นเป็นชิ้นเล็ก $1.000 \pm 0.001$ กรัม ลงในขวดบรรจุ (vial) ขนาด 20 มิลลิลิตร จากนั้นปิดขวดด้วยฝาอะลูมิเนียมแล้วนำไปให้ความร้อนด้วยเครื่องให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที โดยระหว่างให้ความร้อนใช้อุปกรณ์ HS-SPME สำหรับดูดซับสารระเหยง่าย และปลดปล่อยสารในส่วนปลดปล่อยสารของเครื่อง GC-MS เป็นเวลา 5 นาที		
2.1.4	ตั้งสภาวะของเครื่อง GC-MS เป็น splitless และทดลองฉีดสารระเหยง่ายในตัวอย่างกระชายเข้าเครื่อง GC-MS จากนั้นพิจารณาโครมาโทแกรมที่ได้		
2.1.5	ตั้งสภาวะของเครื่อง GC-MS เป็น split ratio และทดลองฉีดสารระเหยง่ายในตัวอย่างกระชายเข้าเครื่อง GC-MS โดยเริ่มการทดลองจากค่า split ratio 10:1 20:1		

และ 50:1 จากนั้นพิจารณาโครมาโทแกรมของแต่ละอัตราส่วนแล้วนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกัน

Split ratio คำนวณได้จากสูตร

$$\text{Split ratio} = \frac{(\text{อัตราการไหลของสารที่ฉีดเข้าสู่คอลัมน์} + \text{อัตราการไหลของสารที่ฉีดทิ้งทาง split vent})}{\text{อัตราการไหลของสารที่ฉีดเข้าสู่คอลัมน์}}$$

2.1.6 เลือกอัตราส่วนของสารที่ฉีดเข้าสู่คอลัมน์ที่ให้โครมาโทแกรมที่มีลักษณะของพีกแยกออกจากกันได้มากที่สุด และเห็นพีกชัดเจน เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

## 2.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างกระชายด้วยเทคนิคเฮดสเปซ โดยการวิเคราะห์ทีละตัวแปร (single factor optimization)

2.2.1 กำหนดสภาวะของเครื่อง GC-MS ดังการทดลองที่ 2.1.1 และกำหนดสภาวะอุณหภูมิในคอลัมน์ของเครื่อง GC-MS ดังการทดลองที่ 2.1.2

2.2.2 ชั่งตัวอย่างกระชายส่วนที่หั่นเป็นชิ้นเล็ก  $1.000 \pm 0.001$  ลงในขวดบรรจุ (vial) ขนาด 20 มิลลิลิตร จากนั้นปิดขวดด้วยฝาอะลูมิเนียม

2.2.3 หาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัดสารระเหยง่ายในตัวอย่างกระชาย โดยเริ่มสกัดที่อุณหภูมิ 40 50 60 และ 70 องศาเซลเซียส ซึ่งจะกำหนดเวลาในการสกัดไว้ที่ 60 นาที โดยแต่ละอุณหภูมิทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง นำสารระเหยง่ายที่สกัดได้ฉีดเข้าเครื่อง GC-MS ปลดปล่อยสารในส่วนปลดปล่อยสารของเครื่อง GC-MS เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นพิจารณาโครมาโทแกรมของแต่ละอุณหภูมิ

2.2.4 หาพื้นที่ใต้พีกของสารรวม (total peak area) ในแต่ละโครมาโทแกรม และเลือกอุณหภูมิในการสกัดที่ให้โครมาโทแกรมที่มีพื้นที่ใต้พีกของสารรวมมากที่สุด

2.2.5 หาเวลาที่เหมาะสมในการสกัดสารระเหยง่ายในตัวอย่างกระชาย โดยเริ่มสกัดที่เวลา 30 45 และ 60 นาที ซึ่งจะกำหนดอุณหภูมิในการสกัดไว้ตามที่เลือกจากการทดลองที่ 2.2.4 โดยแต่ละเวลาทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง นำสารระเหยง่ายที่สกัดได้ฉีดเข้าเครื่อง GC-MS ปลดปล่อยสารในส่วนปลดปล่อยสารของเครื่อง GC-MS เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นพิจารณาโครมาโทแกรมของแต่ละเวลา

2.2.6 หาพื้นที่ใต้พีคของสารรวม (total peak area) ในแต่ละโครมาโทแกรม และเลือกเวลาในการสกัดที่ให้โครมาโทแกรมที่มีพื้นที่ใต้พีคของสารรวมมากที่สุด

### 2.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างกระชายด้วยเทคนิคเฮดสเปซ โดยใช้การออกแบบการทดลองชนิด central composite design (CCD)

2.3.1 กำหนดสภาวะของเครื่อง GC-MS ดังการทดลองที่ 2.1.1 และกำหนดสภาวะอุณหภูมิในคอลัมน์ของเครื่อง GC-MS ดังการทดลองที่ 2.1.2

2.3.2 ชั่งตัวอย่างกระชายส่วนที่หั่นเป็นชิ้นเล็ก  $1.000 \pm 0.001$  ลงในขวดบรรจุ (vial) ขนาด 20 มิลลิลิตร จากนั้นปิดขวดด้วยฝาอะลูมิเนียม

2.3.3 ออกแบบการทดลองในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างกระชาย ได้แก่

2.3.3.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างกระชายโดยใช้เทคนิคเฮดสเปซ (Extraction Temperature)

2.3.3.2 เวลาที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างกระชายโดยใช้เทคนิคเฮดสเปซ (Extraction Time)

ตารางที่ 2-1 ตารางแสดงรูปแบบการทดลองที่ออกแบบโดยใช้การออกแบบชนิด CCD

การทดลอง	coded value	X <sub>1</sub> อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด (°C)	coded value	X <sub>2</sub> เวลาที่ใช้ในการสกัด (minute)
1	-1.414	36	0	40
2	-1	40	-1	30
3	-1	40	1	50
4	0	50	-1.414	26
5	0	50	0	40
6	0	50	0	40
7	0	50	0	40

การทดลอง	coded value	X <sub>1</sub> อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด (°C)	coded value	X <sub>2</sub> เวลาที่ใช้ในการสกัด (minute)
8	0	50	0	40
9	0	50	1.414	54
10	1	60	-1	30
11	1	60	1	50
12	1.414	64	0	40

2.3.4 นำสารระเหยง่ายที่สกัดได้ในแต่ละสภาวะฉีดเข้าเครื่อง GC-MS ปลดปล่อยสารในส่วนปลดปล่อยสารของเครื่อง GC-MS เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นพิจารณาโครมาโทแกรมของแต่ละสภาวะ

2.3.5 หาพื้นที่ใต้พีกของสารรวม (total peak area) ในโครมาโทแกรมของแต่ละสภาวะ

2.3.6 สร้างพื้นที่ตอบสนอง (response surface modeling) เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสม (optimized condition) ในการเตรียมตัวอย่างกระชายด้วยเทคนิคเฮดสเปซ

2.3.7 นำผลการทดลองที่ได้เปรียบเทียบกับผลการทดลองที่ 2.2.4 และ 2.2.6

**2.4 การระบุชนิดสารระเหยง่ายที่สำคัญซึ่งจะใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างกระชายจากแหล่งเพาะปลูกต่างๆ**

2.4.1 นำโครมาโทแกรมของสารระเหยง่ายในตัวอย่างกระชายที่ได้จากการสกัดในสภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 2.2.4 และ 2.2.6 มาเลือกพีกของสารระเหยง่ายที่สำคัญซึ่งใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างกระชายจากแหล่งเพาะปลูกต่าง ๆ

2.4.2 ระบุชนิดสารระเหยง่ายที่สำคัญโดยเปรียบเทียบข้อมูลสารดังกล่าวกับ mass spectrum library NIST08 ซึ่งเป็นซอฟต์แวร์ที่ติดตั้งไว้กับเครื่อง GC-MS และเปรียบเทียบค่า linear retention index (LRI) ของสารระเหยง่ายที่สำคัญ ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบค่า retention time (RT) ของสารดังกล่าวกับสารละลายมาตรฐานอัลเคนโซ่ตรง C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub> ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตรในเฮกเซน กับงานวิจัยอื่น ๆ

$$\text{โดย } LRI = 100n + 100 \left[ \frac{t - t_n}{t_{n+1} - t_n} \right]$$

t คือ retention time ของสาร (อยู่ระหว่าง  $C_n$  และ  $C_{n+1}$ )

$t_n$  คือ retention time ของ  $C_n$

$t_{n+1}$  คือ retention time ของ  $C_{n+1}$

## 2.5 การวิเคราะห์ตัวอย่างกระชายจาก 4 แหล่งเพาะปลูก

2.5.1 กำหนดสภาวะของเครื่อง GC-MS ดังการทดลองที่ 2.1.1 และกำหนดสภาวะอุณหภูมิในคอลัมน์ของ เครื่อง GC-MS ดังการทดลองที่ 2.1.2

2.5.2 ชั่งตัวอย่างกระชายส่วนที่หั่นเป็นชิ้นเล็ก  $1.000 \pm 0.001$  ลงในขวดบรรจุ (vial) ขนาด 20 มิลลิลิตร จากนั้นปิดขวดด้วยฝาอะลูมิเนียมแล้วนำไปให้ความร้อนด้วยเครื่องให้ความร้อนที่อุณหภูมิ และเวลาที่ได้จากการทดลองที่ 2.2.4 และ 2.2.6

2.5.3 นำสารระเหยง่ายที่สกัดได้ในแต่ละแหล่งเพาะปลูกฉีดเข้าเครื่อง GC-MS ปลดปล่อยสารในส่วนปลดปล่อยสารของเครื่อง GC-MS เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นพิจารณาโครมาโทแกรมของแต่ละแหล่งเพาะปลูก

2.5.4 หาพื้นที่ใต้พีคของสารระเหยง่ายที่สำคัญที่เลือกไว้จากการทดลองที่ 2.4.1 ในโครมาโทแกรมของแต่ละแหล่งเพาะปลูก

## 2.6 การประมวลผลโดยวิธีเคโมเมทริกซ์

2.6.1 นำพื้นที่ใต้พีคของสารระเหยง่ายที่สำคัญที่ได้จากการทดลองที่ 2.5.4 มาคำนวณ %Normalization

$$\text{โดย } \% \text{Normalization} = \frac{\text{พื้นที่ใต้พีคของสารนั้น } \eta}{\text{พื้นที่ใต้พีครวมของสารทั้งหมด}}$$

2.6.2 นำข้อมูลที่ได้ไปประมวลผลด้วยวิธีเคโมเมทริกซ์ชนิด PCA โดยใช้โปรแกรม XLSTAT 2017 เพื่อจัดกลุ่มตัวอย่างกระชายที่มาจากแหล่งเพาะปลูกที่ต่างกัน

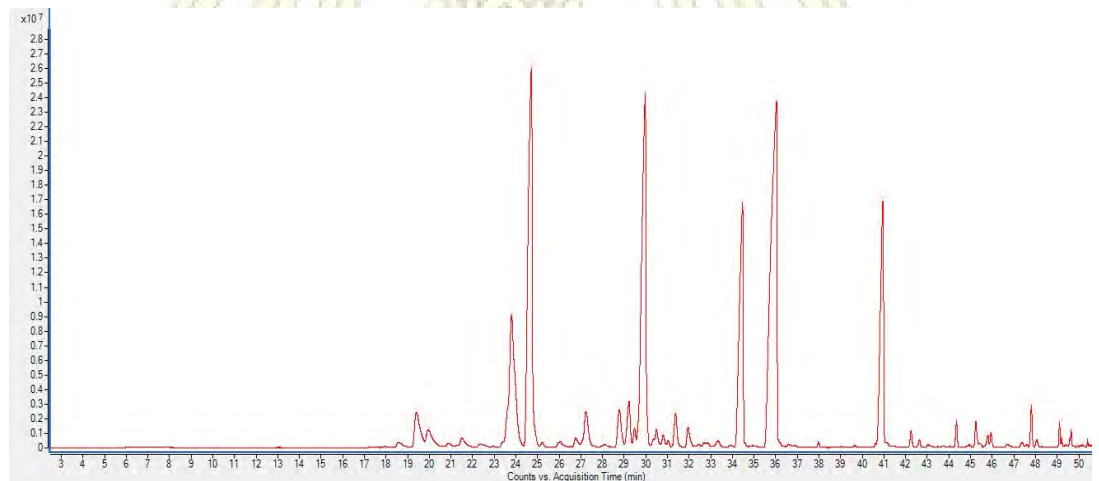
### บทที่ 3

#### ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

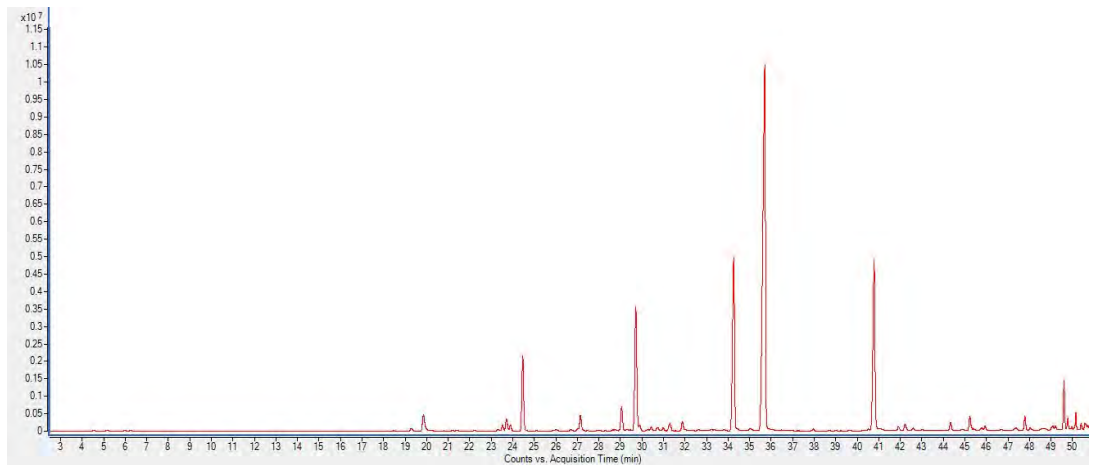
##### 3.1 การหาอัตราส่วนของสารที่เข้าคอลัมน์

วิเคราะห์ตัวอย่างกระชายน้ำหนัก  $1.000 \pm 0.001$  กรัม โดยเตรียมตัวอย่างกระชายด้วยเทคนิค HS-SPME ตามการทดลองที่ 2.1 และสถานะของ HS-SPME ดังนี้ อุณหภูมิเฮดสเปซ 60 องศาเซลเซียส เวลาที่ใช้ในการดูดซับ 60 นาที และเวลาที่ใช้ในการปลดปล่อยสารระเหยง่ายในเครื่อง GC-MS 5 นาที โดยเปลี่ยนอัตราส่วนของสารที่เข้าคอลัมน์ด้วยสถานะ splitless และ split ratio อัตราส่วน 10:1 20:1 และ 50:1

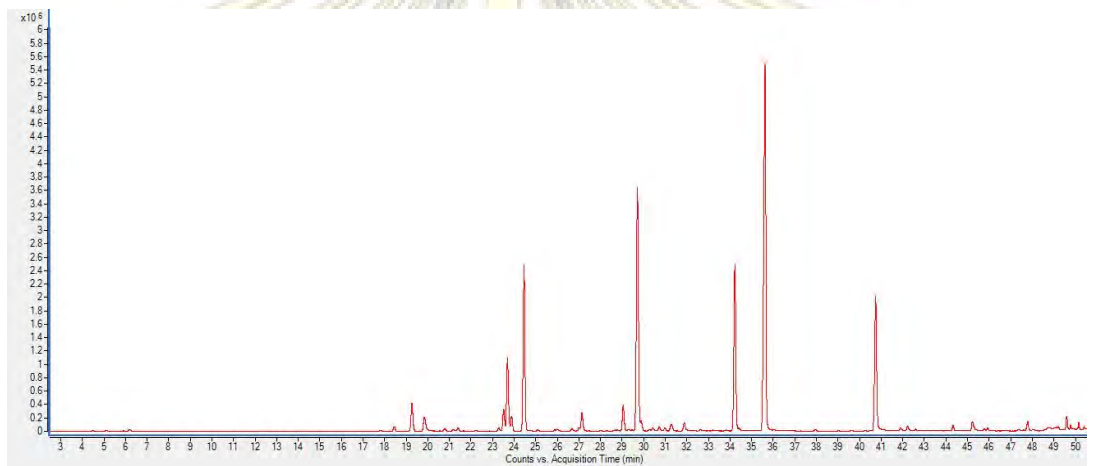
จากโครมาโทแกรมที่วิเคราะห์ด้วยสถานะ splitless ซึ่งเป็นสถานะที่สารระเหยง่ายทั้งหมดจะถูกพาเข้าสู่คอลัมน์ พบว่าโครมาโทแกรมของสารไม่สามารถแยกออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์ เนื่องจากมีปริมาณของสารระเหยง่ายที่ถูกพาเข้าสู่คอลัมน์มากแสดงดังรูปที่ 3-1 ก)



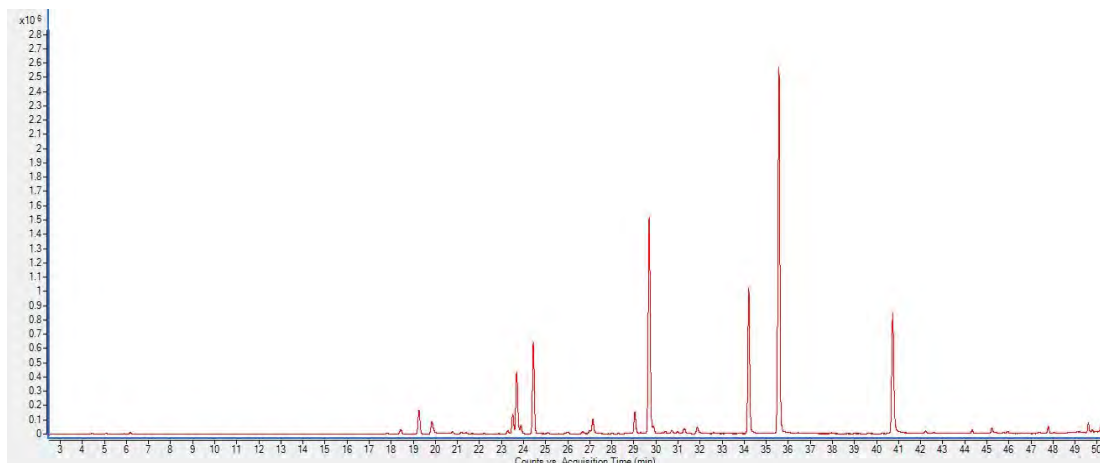
รูปที่ 3-1 ก) โครมาโทแกรมของตัวอย่างกระชายด้วยสถานะ splitless



รูปที่ 3-1 ข) โครมาโทแกรมของตัวอย่างกระชายด้วยสภาวะ split ratio 10:1



รูปที่ 3-1 ค) โครมาโทแกรมของตัวอย่างกระชายด้วยสภาวะ split ratio 20:1



รูปที่ 3-1 ง) โครมาโทแกรมของตัวอย่างกระชายด้วยสภาวะ split ratio 50:1

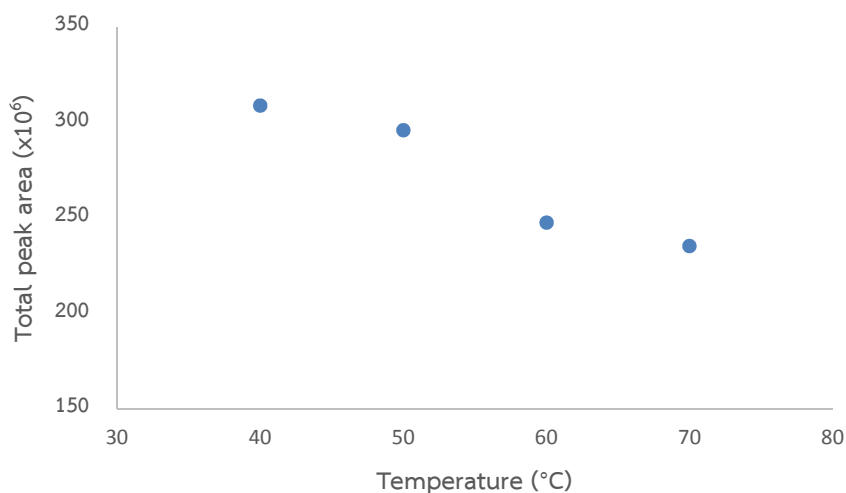
จากโครมาโทแกรมที่วิเคราะห์ด้วยสภาวะ split ratio พบว่า อัตราส่วนที่ทำให้สารแยกออกจากกันได้ดีที่สุด คือ อัตราส่วน 10:1 ดังแสดงในรูปที่ 3-1 ข) หมายความว่าถ้าฉีดสารเข้าเครื่อง GC-MS 10 ส่วน จะมีสารที่เข้าคอลัมน์ 1 ส่วน ซึ่งการที่สารเข้าสู่คอลัมน์มากเกินไปจะทำให้แยกสารออกจากกันได้ไม่สมบูรณ์ และถ้าหากมีสารเข้าสู่คอลัมน์น้อยเกินไปจะทำให้ตรวจวัดสารได้ไม่ถูกต้องครบถ้วน

### 3.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างกระชายด้วยเทคนิคเฮดสเปซ โดยการวิเคราะห์ทีละตัวแปร (single factor optimization)

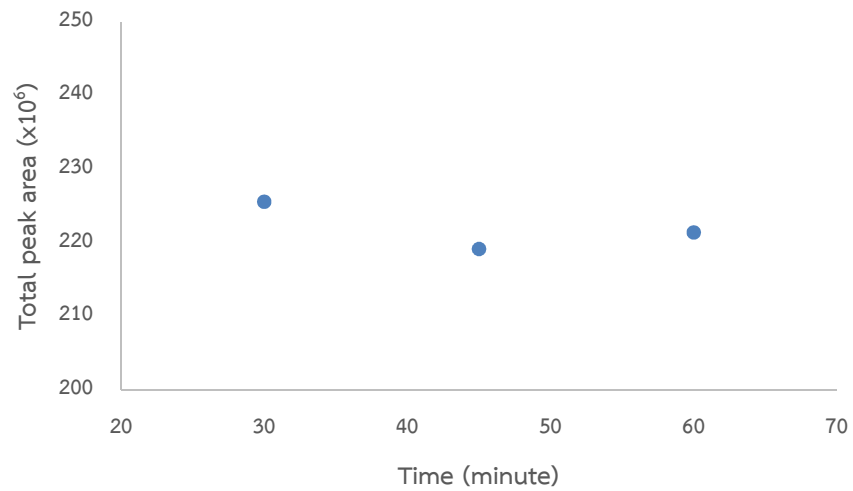
จากการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างกระชายแต่ละส่วนด้วยเทคนิคเฮดสเปซ โดยการวิเคราะห์ทีละตัวแปร (single factor optimization) ซึ่งเริ่มจากการหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัดสารระเหยง่ายในตัวอย่างกระชายส่วนราก (rootlet) โดยเริ่มสกัดที่อุณหภูมิ 40 50 60 และ 70 องศาเซลเซียส กำหนดเวลาในการสกัดไว้ที่ 60 นาที แต่ละอุณหภูมิทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำพื้นที่ใต้พีกรวมของสารในโครมาโทแกรมมาเฉลี่ยพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัดสารระเหยง่ายในตัวอย่างกระชายส่วนราก คือ 40 องศาเซลเซียส เนื่องจากให้พื้นที่ใต้พีกรวมของสารในโครมาโทแกรมเฉลี่ยมากที่สุดแสดงดังรูปที่ 3-2 ก) จากนั้นหาเวลาที่เหมาะสมในการสกัดสารระเหยง่ายในตัวอย่างกระชายส่วนราก โดยเริ่มสกัดที่เวลา 30 45 และ 60 นาที ซึ่งจะกำหนดอุณหภูมิในการสกัดไว้ที่ 40 องศาเซลเซียส แต่ละเวลาทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำพื้นที่ใต้พีกรวมของสารในโครมาโทแกรมมาเฉลี่ยพบว่าเวลาที่เหมาะสมในการสกัดสารระเหยง่ายในตัวอย่างกระชายส่วนราก คือ 30 นาที



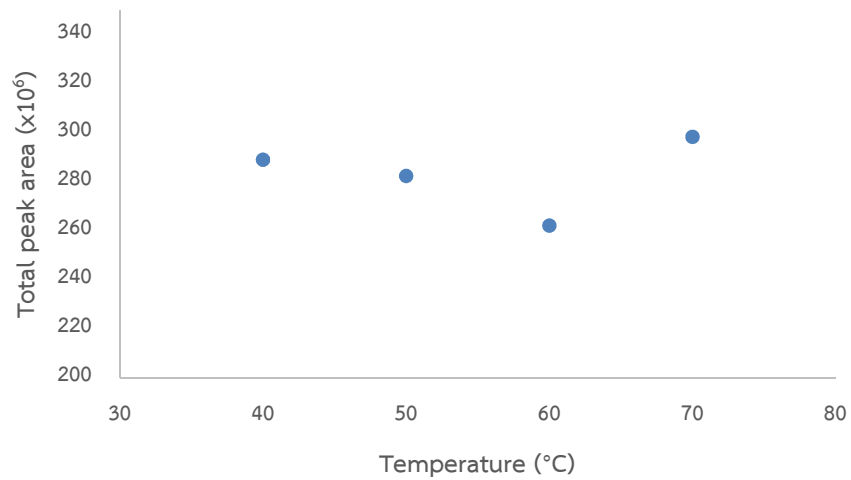
เนื่องจากให้พื้นที่ใต้พีกรวมของสารในโครมาโทแกรมเฉลี่ยมากที่สุดแสดงดังรูปที่ 3-2 ข) ในขณะที่ตัวอย่างกระชายส่วนเหง้า (rhizome) ซึ่งเริ่มสกัดที่อุณหภูมิ 40 50 60 และ 70 องศาเซลเซียส โดยกำหนดเวลาในการสกัดไว้ที่ 60 นาที แต่ละอุณหภูมิทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำพื้นที่ใต้พีกรวมของสารในโครมาโทแกรมมาเฉลี่ย พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัดสารระเหยง่ายในตัวอย่างกระชายส่วนเหง้า คือ 70 องศาเซลเซียส เนื่องจากให้พื้นที่ใต้พีกรวมของสารในโครมาโทแกรมเฉลี่ยมากที่สุดแสดงดังรูปที่ 3-2 ค) จากนั้นหาเวลาที่เหมาะสมในการสกัดสารระเหยง่ายในตัวอย่างกระชายส่วนเหง้า โดยเริ่มสกัดที่เวลา 30 45 และ 60 นาที ซึ่งจะกำหนดอุณหภูมิในการสกัดไว้ที่ 70 องศาเซลเซียส แต่ละเวลาทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำพื้นที่ใต้พีกรวมของสารในโครมาโทแกรมมาเฉลี่ย พบว่าเวลาที่เหมาะสมในการสกัดสารระเหยง่ายในตัวอย่างกระชายส่วนเหง้า คือ 60 นาที เนื่องจากให้พื้นที่ใต้พีกรวมของสารในโครมาโทแกรมเฉลี่ยมากที่สุดแสดงดังรูปที่ 3-2 ง)



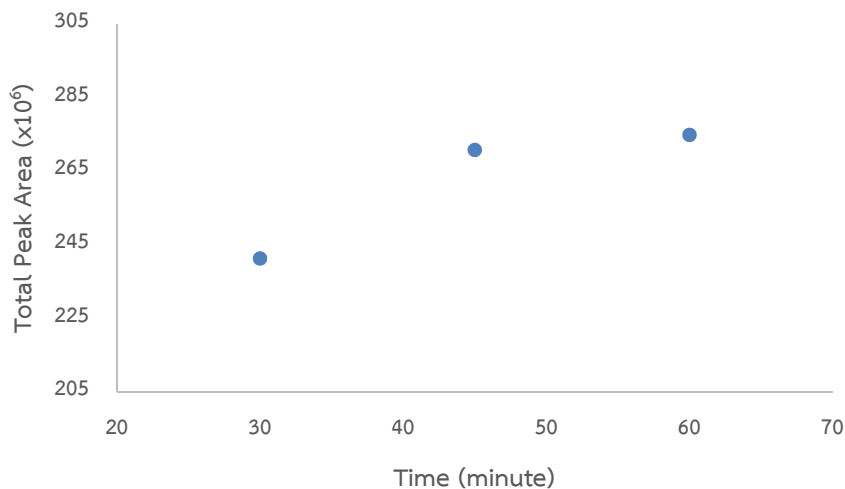
รูปที่ 3-2 ก) กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดสารระเหยง่ายในตัวอย่างกระชายส่วนราก (rootlet) กับ พื้นที่ใต้พีกรวมของสารในโครมาโทแกรมเฉลี่ย



รูปที่ 3-2 ข) กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ใช้ในการสกัดสารระเหยง่ายในตัวอย่าง กระจายส่วนราก (rootlet) กับ พื้นที่ใต้พีกรวมของสารในโครมาโทแกรมเฉลี่ย



รูปที่ 3-2 ค) กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดสารระเหยง่ายใน ตัวอย่างกระจายส่วนเหง้า (rhizome) กับ พื้นที่ใต้พีกรวมของสารในโครมาโทแกรมเฉลี่ย



รูปที่ 3-2 ง) กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ใช้ในการสกัดสารระเหยง่ายในตัวอย่าง กระจายส่วนเหง้า (rhizome) กับ พื้นที่ใต้พีกรวมของสารในโครมาโทแกรมเฉลี่ย

### 3.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างกระจายด้วยเทคนิคเฮดสเปซ โดยใช้การออกแบบการทดลองชนิด central composite design (CCD)

จากการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างกระจายด้วยเทคนิคเฮดสเปซโดยใช้การออกแบบการทดลองชนิด central composite design (CCD) สร้างกราฟพื้นที่ตอบสนองของพื้นที่ใต้พีกรวมของสารในโครมาโทแกรม โดยเมื่อพิจารณากราฟพื้นที่ตอบสนองระหว่างตัวแปรอิสระอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด (extraction temperature) และเวลาที่ใช้ในการสกัด (extraction time) สารระเหยง่ายในตัวอย่างกระจายทั้งส่วนราก (rootlet) และส่วนเหง้า (rhizome) ดังรูปที่ 3-3 ก)-ข) โดยค่า coded value ของอุณหภูมิ และเวลาที่ใช้ในการสกัดที่แสดงในกราฟสามารถดูเปรียบเทียบได้จากตารางที่ 2-1

เมื่อพิจารณาสมการเชิงเส้นที่ใช้ในการคำนวณพื้นที่ตอบสนอง เพื่อพิจารณาความสัมพันธ์ของตัวแปรอิสระแต่ละตัวจะได้ว่า

3.3.1 ความสัมพันธ์ของตัวแปรอิสระอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด ( $x_1$ ) และระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด ( $x_2$ ) สารระเหยง่ายในตัวอย่างกระจายส่วนราก (Rootlet) จะมีความสัมพันธ์ดังสมการ

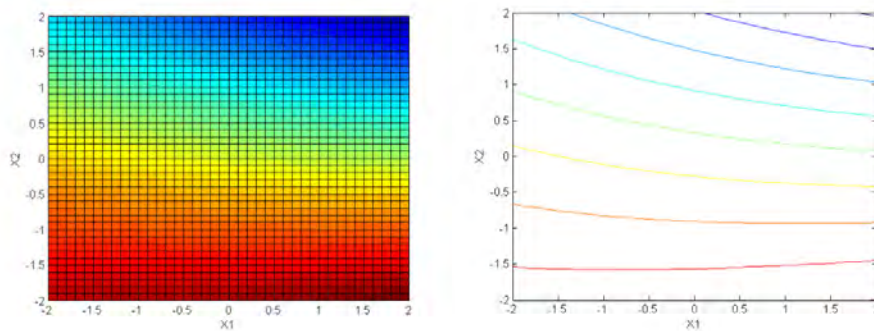
$$y = 29.1000 + (-3.2881)x_1 + (-0.5136)x_2 + (-0.3875)x_1x_2 + (-0.1013)x_1^2 + (0.0612)x_2^2$$

จากสมการสามารถอธิบายได้ว่า ถ้าพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์ของ  $x_1$  และ  $x_2$  จะพบว่า เมื่อค่าของตัวแปรอิสระ  $x_1$  และ  $x_2$  เพิ่มขึ้นจะทำให้ค่าตอบสนอง ( $y$ ) มีค่าลดลง โดยตัวแปรอิสระ  $x_1$  จะส่งผลต่อค่าตอบสนอง ( $y$ ) มากกว่า ตัวแปรอิสระ  $x_2$  เนื่องจากค่าสัมประสิทธิ์ของ  $x_1$  มีค่ามากกว่า  $x_2$  มาก แต่ตัวแปรอิสระ  $x_1$  และ  $x_2$  มีความสัมพันธ์ต่อกันน้อยมากเนื่องจากค่าสัมประสิทธิ์ของ  $x_1x_2$  มีค่าน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับค่าสัมประสิทธิ์ของ  $x_1$  และ  $x_2$  และพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์ของ  $x_1^2$  และ  $x_2^2$  เมื่อนำสมการไปสร้างกราฟพื้นที่ตอบสนองจะได้กราฟพื้นที่ตอบสนองที่ให้ค่าเป็นจุดสูงสุด

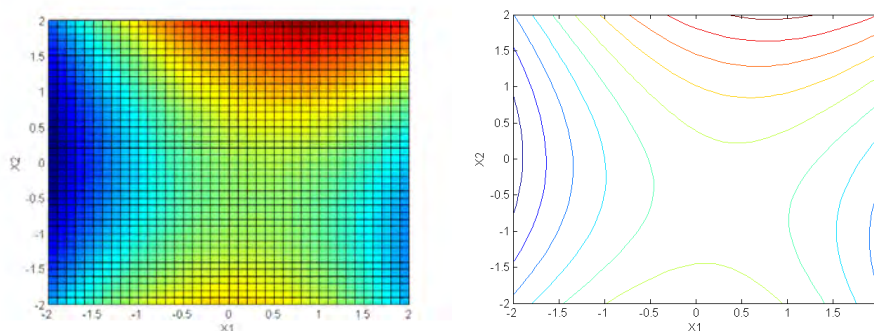
3.3.2 ความสัมพันธ์ของตัวแปรอิสระอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด ( $x_1$ ) และระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด ( $x_2$ ) สารระเหยง่ายในตัวอย่างกระชายส่วนเหง้า (Rhizome) จะมีความสัมพันธ์ดังสมการ

$$y = 31.2651 + (1.3754)x_1 + (1.4714)x_2 + (0.7725)x_1x_2 + (1.2928)x_1^2 + (-1.8056)x_2^2$$

จากสมการสามารถอธิบายได้ว่า ถ้าพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์ของ  $x_1$  และ  $x_2$  จะพบว่า เมื่อค่าของตัวแปรอิสระ  $x_1$  และ  $x_2$  เพิ่มขึ้นจะทำให้ค่าตอบสนอง ( $y$ ) มีค่าเพิ่มขึ้นด้วยแต่ตัวแปรอิสระ  $x_1$  และ  $x_2$  ความสัมพันธ์ต่อกันน้อยมากเนื่องจากค่าสัมประสิทธิ์ของ  $x_1x_2$  มีค่าน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับค่าสัมประสิทธิ์ของ  $x_1$  และ  $x_2$  และพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์ของ  $x_1^2$  และ  $x_2^2$  เมื่อนำสมการไปสร้างกราฟพื้นที่ตอบสนองจะได้กราฟพื้นที่ตอบสนองที่ให้ค่าเป็นจุดสูงสุด



รูปที่ 3-3 ก) กราฟพื้นที่ตอบสนอง (ซ้าย) และ contour plot (ขวา) ของพื้นที่ได้พิกรวมของสารในโครมาโทแกรมระหว่างตัวแปรอิสระอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด ( $x_1$ ) และระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด ( $x_2$ ) สารระเหยง่ายในตัวอย่างกระชายส่วนราก (rootlet)



รูปที่ 3-3 ข) กราฟพื้นที่ตอบสนอง (ซ้าย) และ contour plot (ขวา) ของพื้นที่ได้พิกรวมของสารในโครมาโทแกรมระหว่างตัวแปรอิสระอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด ( $x_1$ ) และระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด ( $x_2$ ) สารระเหยง่ายในตัวอย่างกระชายส่วนเหง้า (rhizome)

จากกราฟพื้นที่ตอบสนองของพื้นที่ได้พิกรวมของสารในโครมาโทแกรมในตัวอย่างกระชายทั้ง 2 ส่วน เมื่อพิจารณากราฟพื้นที่ตอบสนองส่วนสีแดงซึ่งแสดงถึงอุณหภูมิ และเวลาที่ใช้ในการสกัดสารระเหยง่ายในตัวอย่างกระชายที่ให้พื้นที่ได้พิกรวมของสารในโครมาโทแกรมมากที่สุด จะเห็นว่าในตัวอย่างกระชายส่วนราก (rootlet) ในส่วนของอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดนั้นพื้นที่ตอบสนองสีแดงจะอยู่ในช่วงค่า coded value -2 ถึง 2 ส่วนเวลาที่ใช้ในการสกัดนั้นพื้นที่ตอบสนองสีแดงจะอยู่ในช่วงค่า coded value -2 ถึง -1 ในตัวอย่างกระชายส่วนเหง้า (rhizome) อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดนั้นพื้นที่ตอบสนองสีแดงจะอยู่ในช่วงค่า coded value 0 ถึง 2 ส่วนเวลาที่ใช้ในการสกัดนั้นพื้นที่ตอบสนองสีแดงจะอยู่ในช่วงค่า coded value 1 ถึง 2 จากผลการทดลองที่ 3.2 ซึ่งได้รายงานไปก่อนหน้านี้ว่าอุณหภูมิ และเวลาที่เหมาะสมในการสกัดสารระเหยง่ายในตัวอย่างกระชายส่วนราก คือ 40 องศาเซลเซียส 30 นาที ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองนี้ เนื่องจากอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อยู่ในช่วงค่า coded value -2 ถึง 2

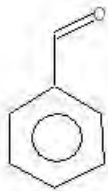
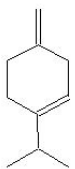

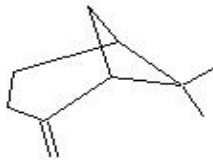
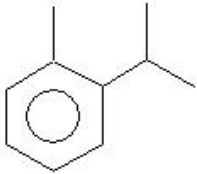
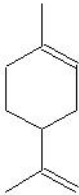
และเวลา 30 นาที อยู่ในช่วงค่า coded value -2 ถึง -1 ในขณะที่ตัวอย่างกระชายส่วนเหง้า มีอุณหภูมิ และเวลาที่เหมาะสมในการสกัดสารระเหยง่ายคือ 70 องศาเซลเซียส 60 นาที ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองนี้ เนื่องจากอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส อยู่ในช่วงค่า coded value 0 ถึง 2 และเวลา 30 นาที อยู่ในช่วงค่า coded value 1 ถึง 2 จะเห็นผลการทดลอง ทั้งสองนั้นสอดคล้องกัน

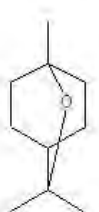

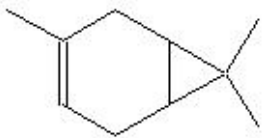
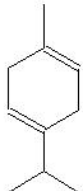

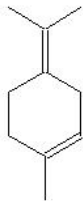
### 3.4 การระบุชนิดสารระเหยง่ายที่สำคัญซึ่งจะใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างกระชายจาก แหล่งเพาะปลูกต่าง ๆ

เมื่อนำโครมาโทแกรมของสารระเหยง่ายในตัวอย่างกระชายที่ได้จากการสกัดใน สภาวะที่เหมาะสม โดยตัวอย่างกระชายส่วนราก (rootlet) ใช้อุณหภูมิในการสกัด 40 องศาเซลเซียส และเวลาในการสกัด 30 นาที ตัวอย่างกระชายส่วนเหง้า (rhizome) ใช้อุณหภูมิในการสกัด 70 องศาเซลเซียส และเวลาในการสกัด 60 นาที ทั้ง 2 ส่วนใช้เวลาในการปลดปล่อย สารในเครื่อง GC-MS เป็นเวลา 5 นาที เมื่อนำโครมาโทแกรมของสารระเหยง่ายในตัวอย่าง กระชายทั้ง 2 ส่วน มาพิจารณาเลือกพิกของสารระเหยง่ายที่สำคัญ พบว่ามีสารระเหยง่ายที่ สำคัญทั้งหมด 30 สาร ดังตารางที่ 3-1 และมีลักษณะโครมาโทแกรมของสารระเหยทั้งหมดดัง รูปที่ 3-4 ก)-ข)

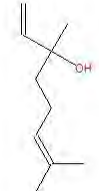
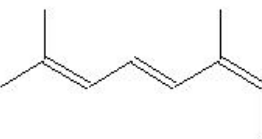
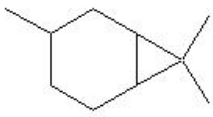
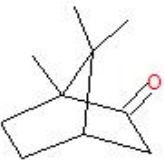
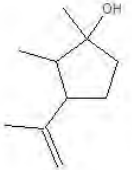
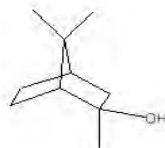
ตารางที่ 3-1 สารระเหยง่ายที่สำคัญ 30 สาร ในตัวอย่างกระชาย, ค่า retention time (RT), ค่า linear retention index (LRI) และโครงสร้าง

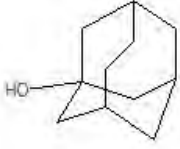
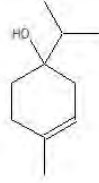
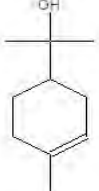
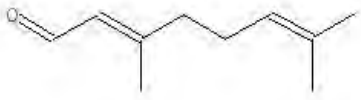
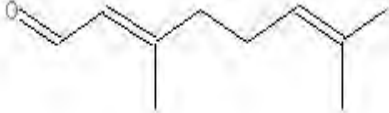
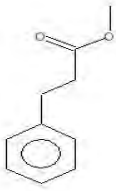
ชื่อสาร	RT	LRI	โครงสร้าง
1) bicyclo[3.1.1]hept-2-ene, 3,6,6-trimethyl-	14.28	937	
2) camphene	14.99	953	

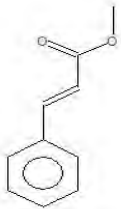
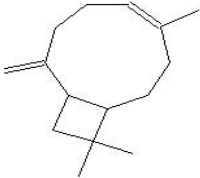
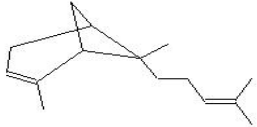
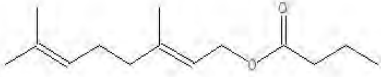
ชื่อสาร	RT	LRI	โครงสร้าง
3) benzaldehyde	15.45	963	
4) cyclohexene, 4-methylene-1-(1-methylethyl)-	16.23	981	
5) 5-hepten-2-one, 6-methyl-	16.51	987	
6) bicyclo[3.1.1]heptane, 6,6-dimethyl-2-methylene-, (1S)-	16.70	992	
7) benzene, 1-methyl-2-(1-methylethyl)-	18.40	1028	
8) limonene	18.61	1032	

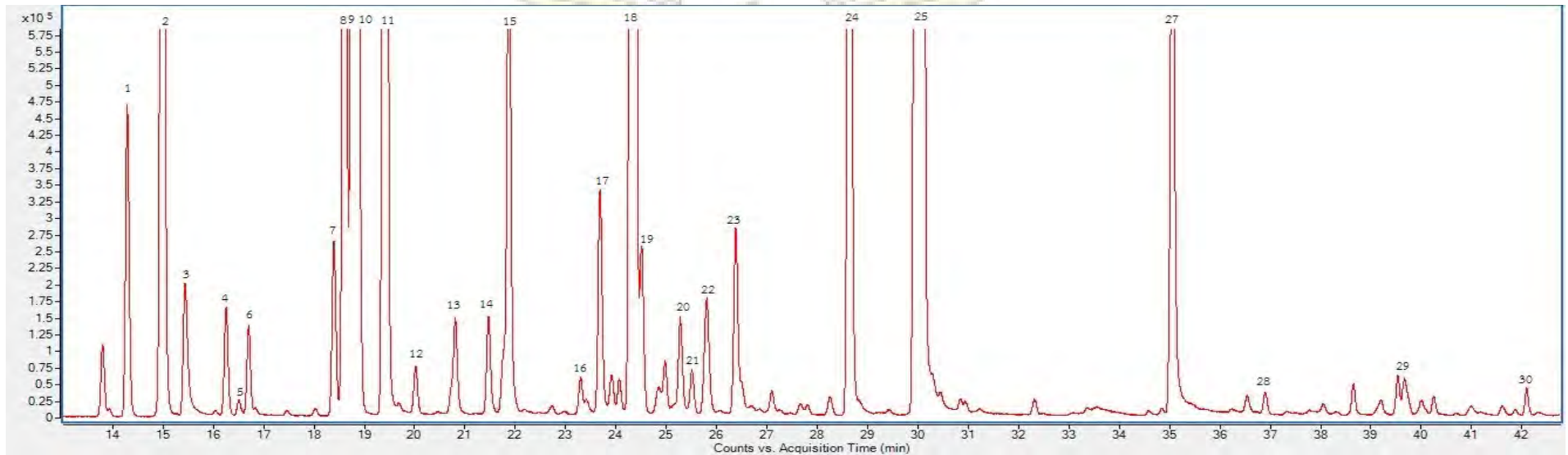
ชื่อสาร	RT	LRI	โครงสร้าง
9) eucalyptol	18.78	1036	
10) 1,3,6-octatriene, 3,7-dimethyl-, (E)-	18.90	1038	
11) 3-carene	19.48	1051	
12) 1,4-cyclohexadiene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-	20.03	1062	
13) 2,6-octadienal, 3,7-dimethyl-	20.81	1079	
14) cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethylidene)-	21.48	1093	



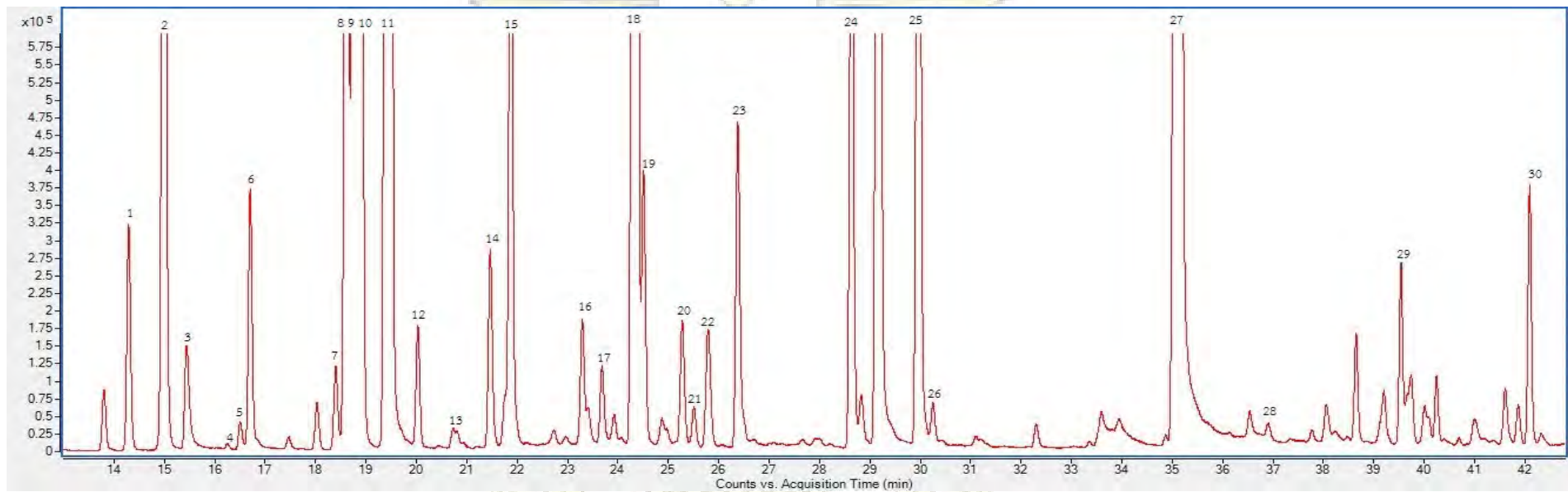
ชื่อสาร	RT	LRI	โครงสร้าง
15) 1,6-octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-	21.87	1101	
16) 2,4,6-octatriene, 2,6-dimethyl-, (E,Z)-	23.29	1131	
17) bicyclo[4.1.0]heptane, 3,7,7-trimethyl-, [1S-(1 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,6 $\alpha$ )]-	23.69	1139	
18) bicyclo[2.2.1]heptan-2-one, 1,7,7-trimethyl-, (1R)-	24.34	1153	
19) cyclopentanol, 1,2-dimethyl-3-(1-methylethenyl)-, [1R-(1 $\alpha$ ,2 $\alpha$ ,3 $\beta$ )]-	24.51	1156	
20) borneol	25.28	1173	

ชื่อสาร	RT	LRI	โครงสร้าง
21) tricyclo[4.3.1.1(3,8)]-undecan-1-ol	25.50	1177	
22) 3-cyclohexen-1-ol, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-	25.80	1184	
23) 3-cyclohexene-1-methanol, alpha.,alpha.4-trimethyl-	26.39	1196	
24) 2,6-octadienal, 3,7-dimethyl-, (Z)-	28.64	1245	
25) 2,6-octadienal, 3,7-dimethyl-, (E)-	30.08	1277	
26) benzenepropanoic acid, methyl ester	30.25	1280	

ชื่อสาร	RT	LRI	โครงสร้าง
27) 2-propenoic acid, 3-phenyl-, methyl ester, (E)-	35.06	1389	
28) caryophyllene	36.92	1434	
29) bicyclo[3.1.1]hept-2-ene, 2,6-dimethyl-6-(4-methyl-3-pentenyl)-	39.55	1497	
30) butanoic acid, 3,7-dimethyl-2,6-octadienyl ester, (E)-	42.11	1563	



รูปที่ 3-4 ก) โครมาโทแกรมของสารระเหยง่ายที่สำคัญทั้งหมดที่สกัดได้จากตัวอย่างกระชายส่วนราก (rootlet)

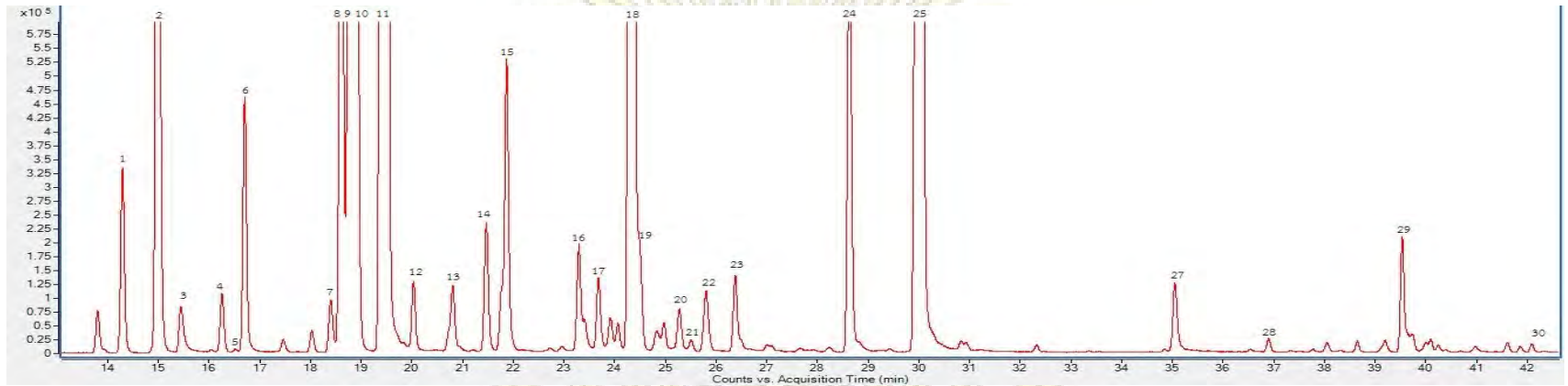


รูปที่ 3-4 ข) โครมาโทแกรมของสารระเหยง่ายที่สำคัญทั้งหมดที่สกัดได้จากตัวอย่างกระชายส่วนเหง้า (rhizome)

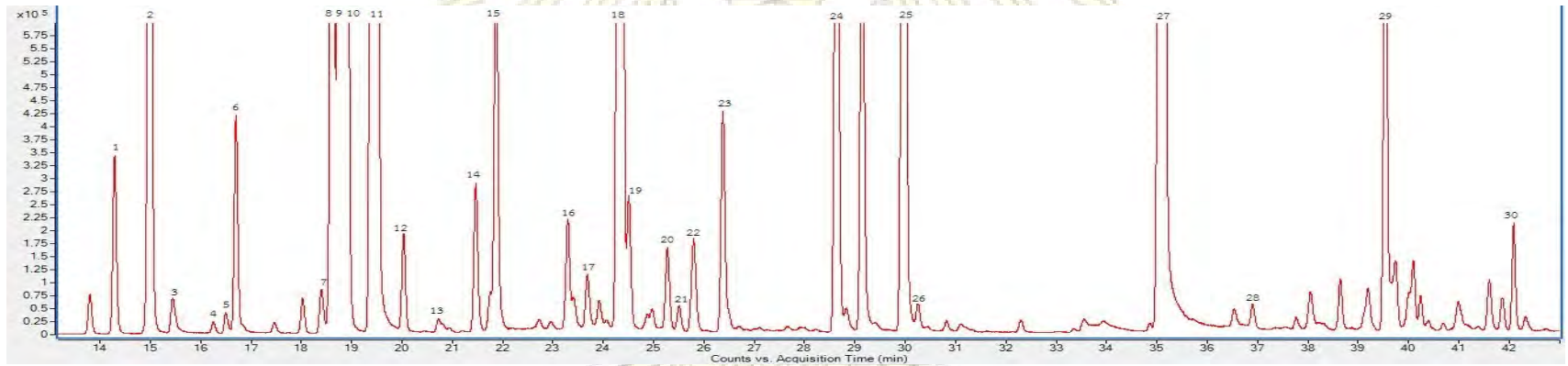
### 3.5 การวิเคราะห์ตัวอย่างกระชายจาก 4 แหล่งเพาะปลูก

เมื่อนำสารระเหยง่ายทั้งหมดที่ได้จากการสกัดตัวอย่างกระชายทั้ง 2 ส่วนจาก 4 แหล่งเพาะปลูก คือ นครปฐม พิชณุโลก เพชรบูรณ์ และระนอง ในสภาวะที่เหมาะสม โดยตัวอย่างกระชายส่วนราก (rootlet) ใช้อุณหภูมิในการสกัด 40 องศาเซลเซียส และเวลาในการสกัด 30 นาที ตัวอย่างกระชายส่วนเหง้า (rhizome) ใช้อุณหภูมิในการสกัด 70 องศาเซลเซียส และเวลาในการสกัด 60 นาที ทั้ง 2 ส่วนใช้เวลาในการปลดปล่อยสารในเครื่อง GC-MS เป็นเวลา 5 นาที โดยจะทำการสุ่มตัวอย่าง (sampling) กระชายแต่ละส่วนเป็นจำนวน 3 ครั้ง และวิเคราะห์แต่ละครั้งของการสุ่มตัวอย่างซ้ำเป็นจำนวน 3 ครั้ง เพราะฉะนั้นตัวอย่างกระชายแต่ละส่วนที่มาจากแต่ละแหล่งเพาะปลูกจะถูกวิเคราะห์ทั้งหมด 9 ครั้ง พบว่าได้โครมาโทแกรมของสารระเหยง่ายที่สำคัญทั้งหมดดังรูปที่ 3-5 ก-ข) โดยจะแสดงแค่ 1 ครั้งเท่านั้น

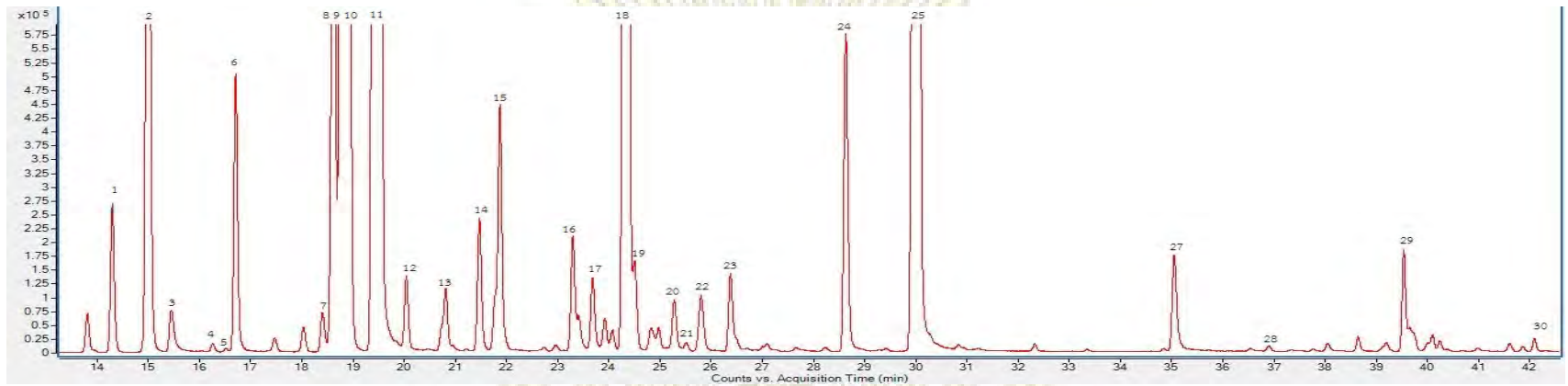




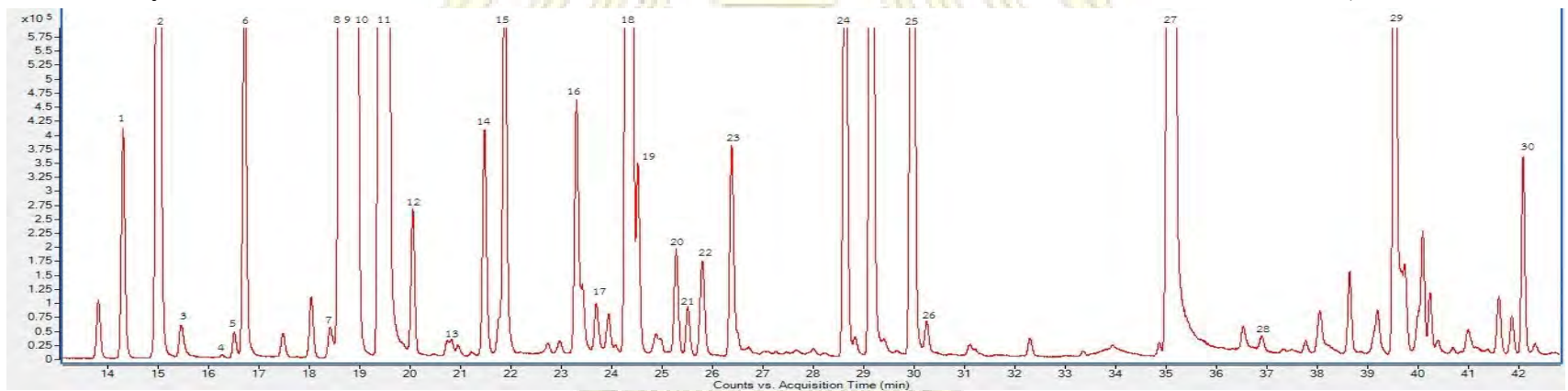
รูปที่ 3-5 ก) โครมาโทแกรมของสารระเหยง่ายที่สำคัญทั้งหมดที่สกัดได้จากตัวอย่างกระชายส่วนราก (rootlet) จากจังหวัดนครปฐม



รูปที่ 3-5 ข) โครมาโทแกรมของสารระเหยง่ายที่สำคัญทั้งหมดที่สกัดได้จากตัวอย่างกระชายส่วนเหง้า (rhizome) จากจังหวัดนครปฐม

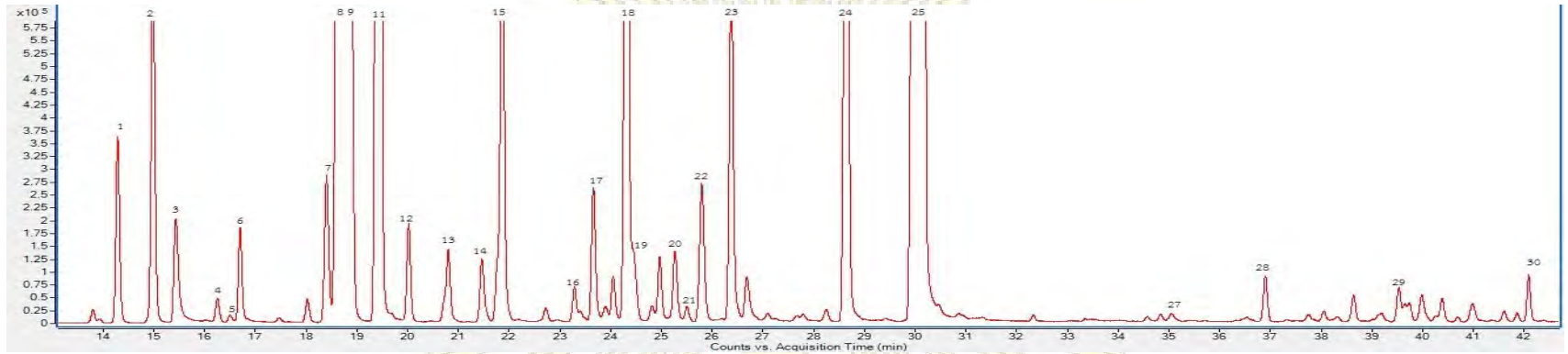


รูปที่ 3-5 ค) โครมาโทแกรมของสารระเหยง่ายที่สำคัญทั้งหมดที่สกัดได้จากตัวอย่างกระชายส่วนราก (rootlet) จากจังหวัดพิษณุโลก

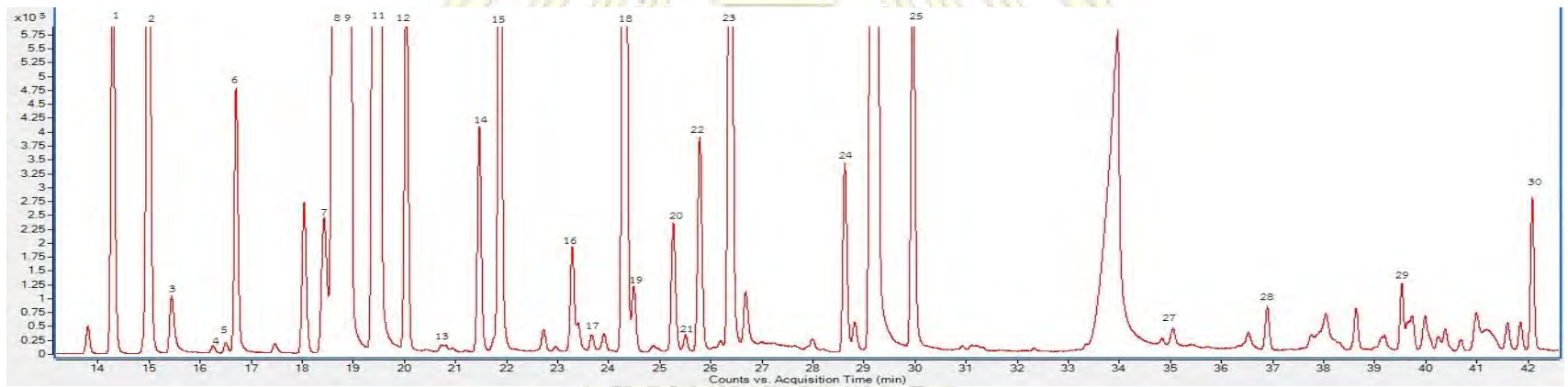


รูปที่ 3-5 ง) โครมาโทแกรมของสารระเหยง่ายที่สำคัญทั้งหมดที่สกัดได้จากตัวอย่างกระชายส่วนเหง้า (rhizome) จากจังหวัดพิษณุโลก

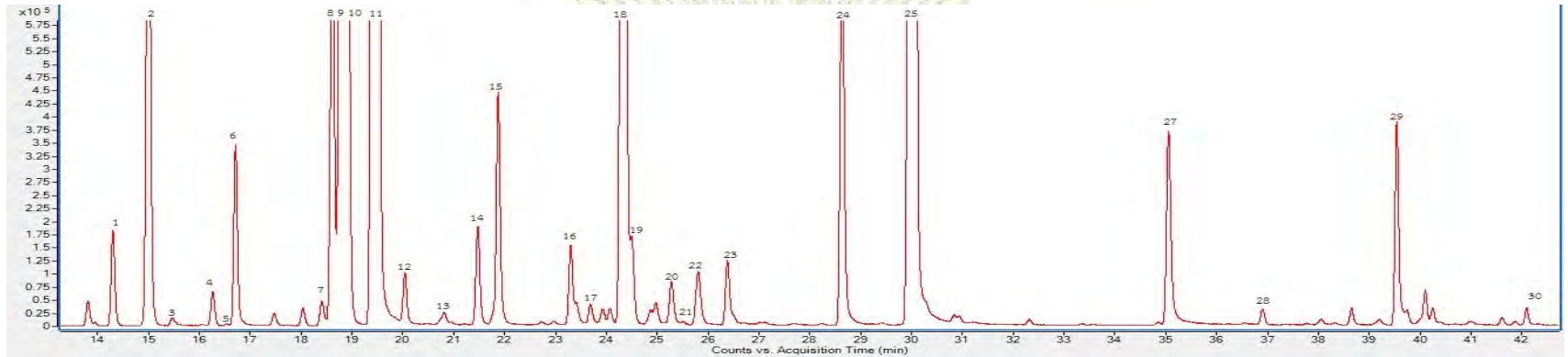




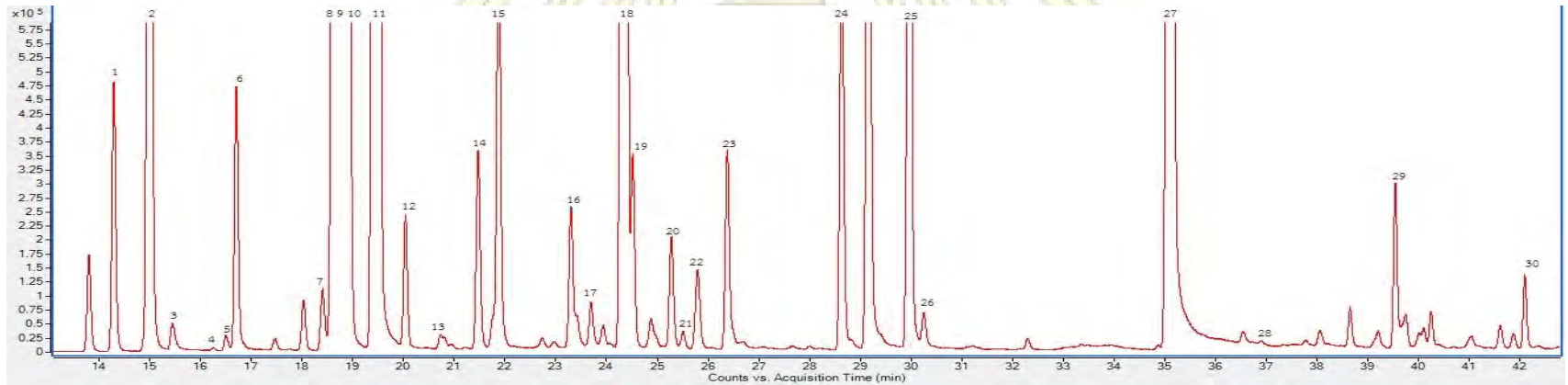
รูปที่ 3-5 จ) โครมาโทแกรมของสารระเหยง่ายที่สำคัญทั้งหมดที่สกัดได้จากตัวอย่างกระชายส่วนราก (rootlet) จากจังหวัดเพชรบูรณ์



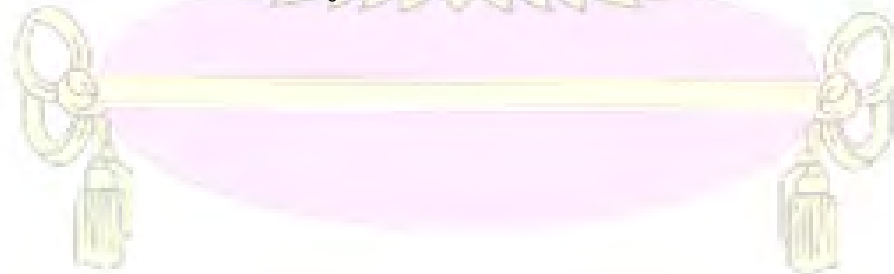
รูปที่ 3-5 ฉ) โครมาโทแกรมของสารระเหยง่ายที่สำคัญทั้งหมดที่สกัดได้จากตัวอย่างกระชายส่วนเหง้า (rhizome) จากจังหวัดเพชรบูรณ์



รูปที่ 3-5 ข) โครมาโทแกรมของสารระเหยง่ายที่สำคัญทั้งหมดที่สกัดได้จากตัวอย่างกระชายส่วนราก (rootlet) จากจังหวัดระนอง

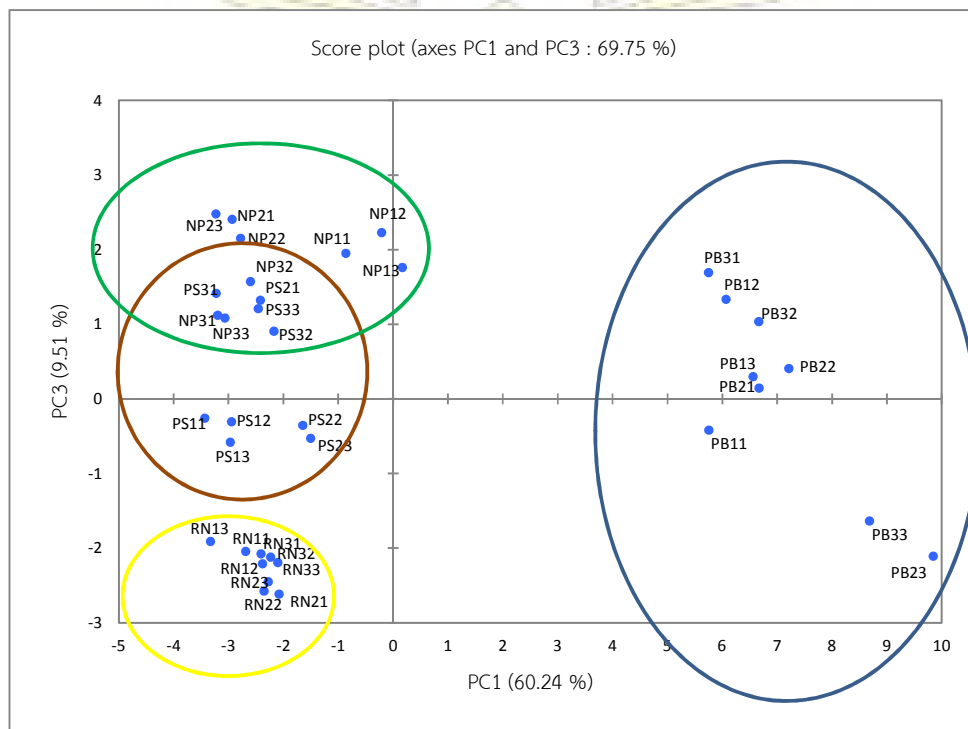


รูปที่ 3-5 ช) โครมาโทแกรมของสารระเหยง่ายที่สำคัญทั้งหมดที่สกัดได้จากตัวอย่างกระชายส่วนเหง้า (rhizome) จากจังหวัดระนอง



### 3.6 การประมวลผลโดยวิธีเคโมเมทริกซ์

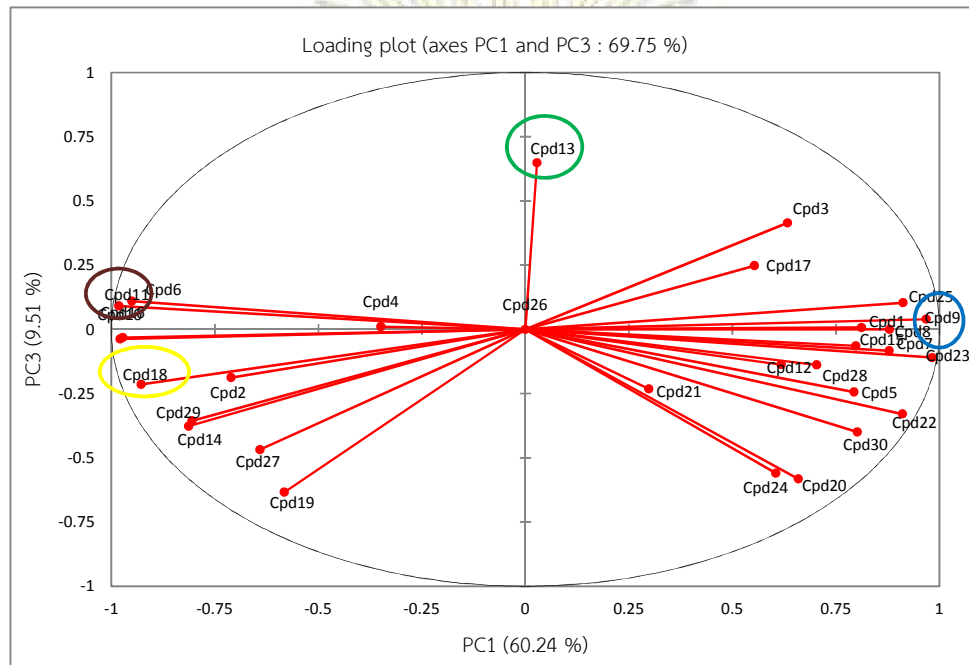
จากการวิเคราะห์โครมาโทแกรมของตัวอย่างกระชายส่วนราก (rootlet) จากทั้ง 4 แหล่งเพาะปลูก โดยนำพื้นที่ใต้พีกของโครมาโทแกรมทั้งหมดที่ได้มาคำนวณ %Normalization และนำไปประมวลผลด้วยวิธีเคโมเมทริกซ์ชนิด PCA ด้วยโปรแกรม XLSTAT 2017 จะสามารถแบ่งตัวอย่างกระชายส่วนรากได้ทั้งหมด 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่มาจากจังหวัดนครปฐม พิษณุโลก เพชรบูรณ์ และระนอง แสดงดังรูปที่ 3-6 ก)



รูปที่ 3-6 ก) กราฟแสดงผล PCA ในการจัดกลุ่มตัวอย่างกระชายส่วนราก (rootlet) จากทั้ง 4 แหล่งเพาะปลูก

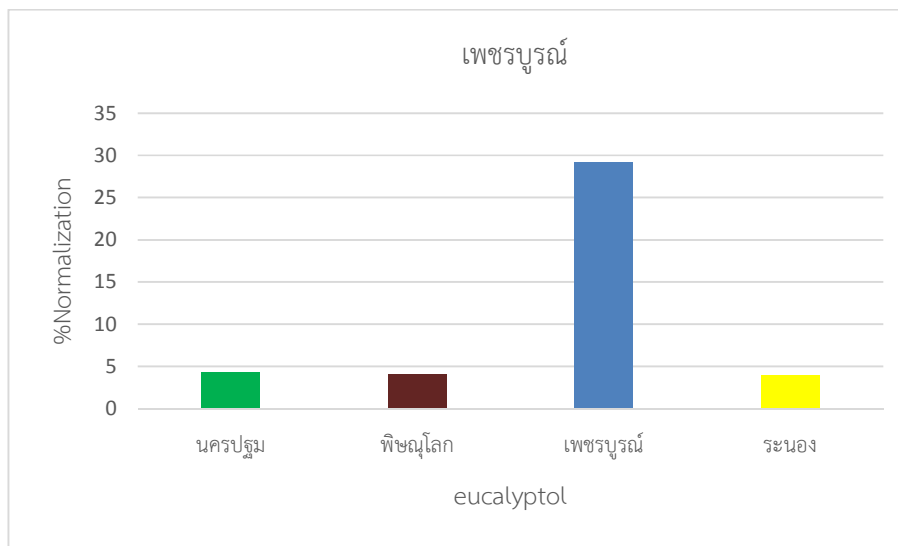
เมื่อพิจารณา รูปที่ 3-6 ข) พบว่าสารระเหยง่ายในวงกลมสีน้ำเงินซึ่งอยู่ในตำแหน่งเดียวกับตัวอย่างกระชายส่วนราก (rootlet) ที่มาจากจังหวัดเพชรบูรณ์ โดยมีสารระเหยง่ายที่เป็นสารระเหยหลัก คือ สารระเหยง่ายตัวที่ 9 (eucalyptol) สารระเหยง่ายในวงกลมสีเหลืองซึ่งอยู่ในตำแหน่งเดียวกับตัวอย่างกระชายส่วนรากที่มาจากจังหวัดระนอง โดยมีสารระเหยง่ายที่เป็นสารระเหยหลัก คือ สารระเหยง่ายตัวที่ 18 (bicyclo[2.2.1]-heptan-2-one, 1,7,7-trimethyl-, (1R)-) สารระเหยง่ายในวงกลมสีน้ำตาลซึ่งอยู่ในตำแหน่งเดียวกับตัวอย่างกระชาย

ส่วนรากที่มาจากจังหวัดพิษณุโลก โดยมีสารระเหยง่ายที่เป็นสารระเหยหลัก คือ สารระเหยง่ายตัวที่ 11 (3-carene) สารระเหยง่ายในวงกลมสีเขียวซึ่งอยู่ในตำแหน่งเดียวกับตัวอย่างกระชายส่วนรากที่มาจากจังหวัดนครปฐม โดยมีสารระเหยง่ายที่เป็นสารระเหยหลัก คือ สารระเหยง่ายตัวที่ 13 (2,6-octadienal, 3,7-dimethyl-)

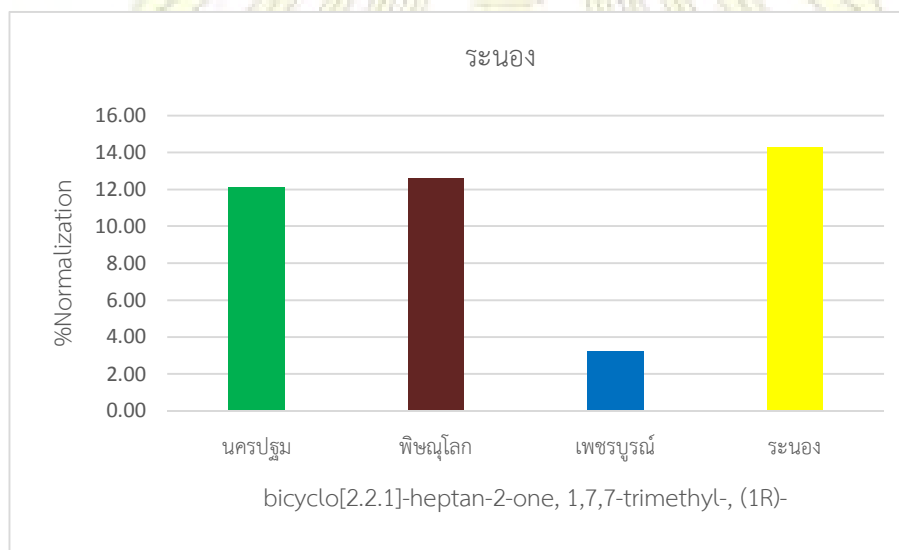


รูปที่ 3-6 ข) กราฟแสดงผล PCA ของสารระเหยง่ายที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะของตัวอย่างกระชายส่วนราก (rootlet) จากแต่ละแหล่งเพาะปลูก

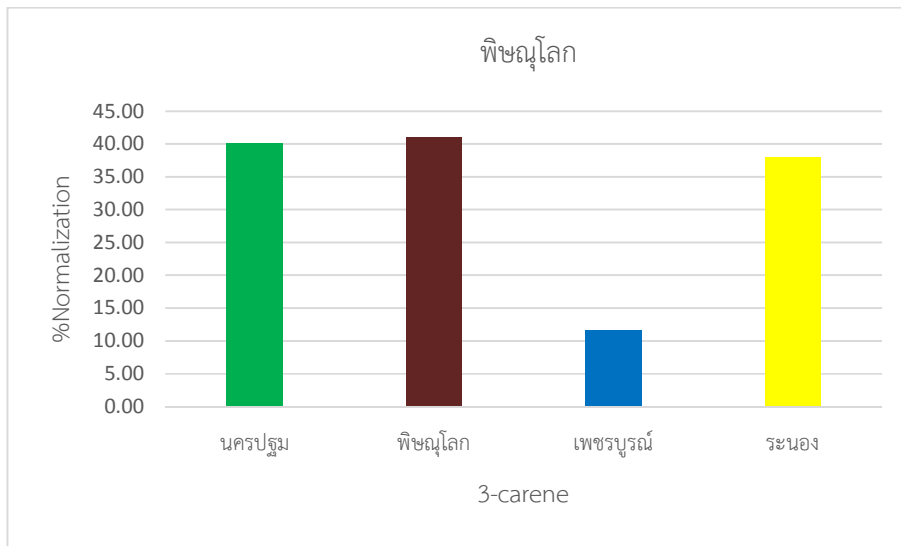
โดยเมื่อพิจารณาจากแผนภูมิเปรียบเทียบปริมาณของสารระเหยง่ายที่เป็นสารระเหยหลักในแต่ละจังหวัดพบว่าข้อมูลที่ได้วิธีเคโมเมทริกซ์ชนิด PCA ในรูปที่ 3-6 ก) และ 3-6 ข) สามารถแสดงให้เห็นว่าข้อมูลสารระเหยง่ายที่เป็นสารระเหยหลักของแต่ละแหล่งเพาะปลูกมีปริมาณที่มากกว่าแหล่งเพาะปลูกอื่นอย่างชัดเจน ดังรูปที่ 3-6 ค)-ฉ) ยกเว้นรูปที่ 3-6 จ) จะเห็นว่าปริมาณสารระเหย 3-carene ในจังหวัดพิษณุโลก และนครปฐม มีความใกล้เคียงกันมาก ทำให้การจัดกลุ่มของ 2 จังหวัดนี้ไม่สมบูรณ์ ดังรูปที่ 3-6 ก) จะเห็นว่า 2 จังหวัดนี้มีความเหลื่อมซ้อนกันอยู่



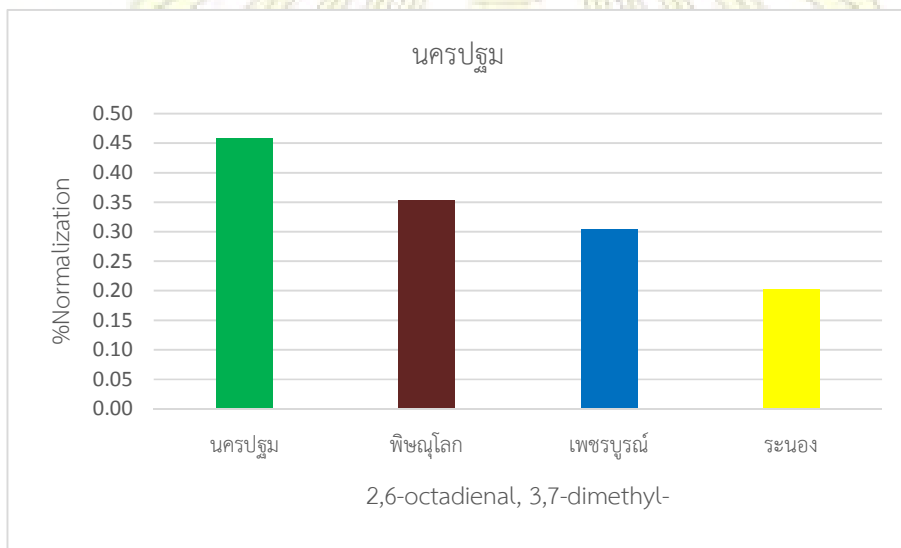
รูปที่ 3-6 ค) แผนภูมิเปรียบเทียบสารระเหยง่ายที่เป็นสารระเหยหลัก (ตัวแทน) ของตัวอย่าง กระจายส่วนราก (rootlet) จากจังหวัดเพชรบูรณ์กับจังหวัดอื่น ๆ



รูปที่ 3-6 ง) แผนภูมิเปรียบเทียบสารระเหยง่ายที่เป็นสารระเหยหลัก (ตัวแทน) ของตัวอย่าง กระจายส่วนราก (rootlet) จากจังหวัดระนองกับจังหวัดอื่น ๆ

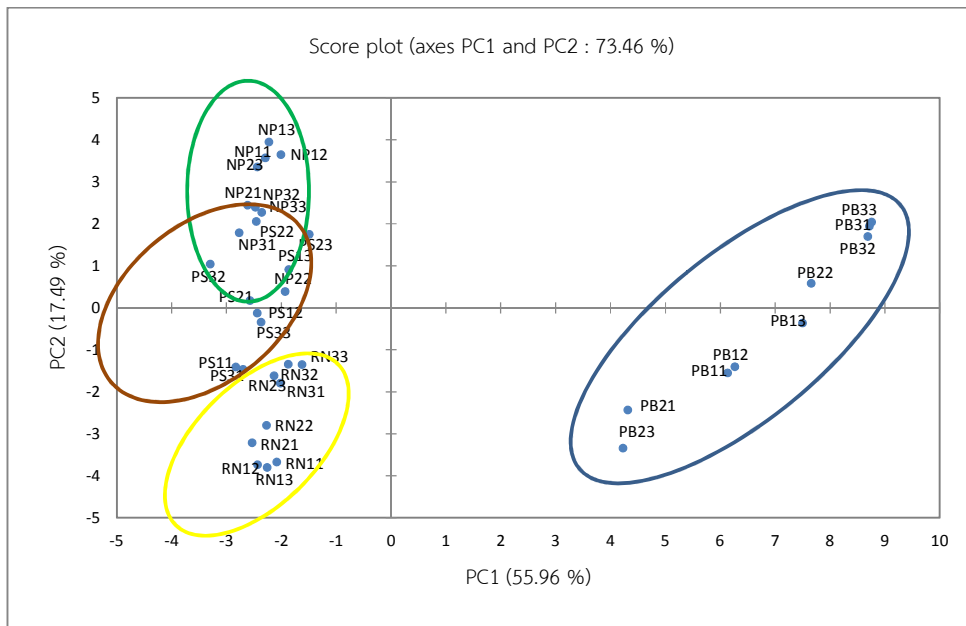


รูปที่ 3-6 จ) แผนภูมิเปรียบเทียบสารระเหยง่ายที่เป็นสารระเหยหลัก (ตัวแทน) ของตัวอย่าง กระจายส่วนราก (rootlet) จากจังหวัดพิษณุโลกกับจังหวัดอื่น ๆ



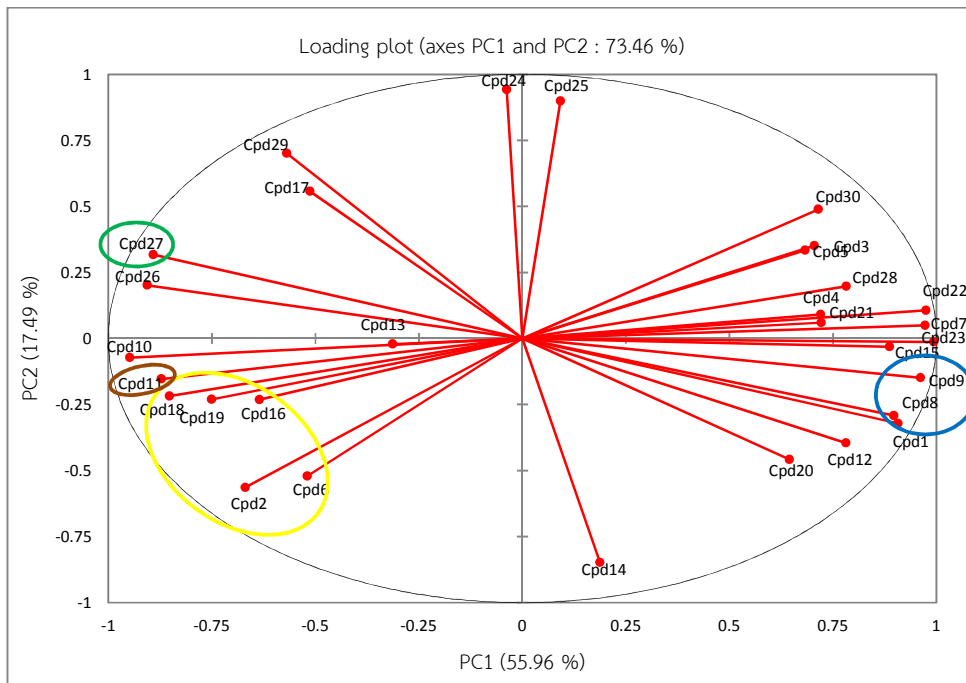
รูปที่ 3-6 ฉ) แผนภูมิเปรียบเทียบสารระเหยง่ายที่เป็นสารระเหยหลัก (ตัวแทน) ของตัวอย่าง กระจายส่วนราก (rootlet) จากจังหวัดนครปฐมกับจังหวัดอื่น ๆ

และจากการวิเคราะห์โครมาโทแกรมของตัวอย่างกระจายส่วนเหง้า (rhizome) จาก ทั้ง 4 แหล่งเพาะปลูก โดยนำพื้นที่ใต้พีกของโครมาโทแกรมทั้งหมดที่ได้มาคำนวณ %Normalization และนำไปประมวลผลด้วยวิธีเคโมเมตริกซ์ชนิด PCA ด้วยโปรแกรม XLSTAT 2017 จะสามารถแบ่งตัวอย่างกระจายส่วนเหง้าได้ทั้งหมด 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่มาจากจังหวัดนครปฐม พิษณุโลก เพชรบูรณ์ และระนอง แสดงดังรูปที่ 3-6 ซ)



รูปที่ 3-6 ข) กราฟแสดงผล PCA ในการจัดกลุ่มตัวอย่างกระชายส่วนเหง้า (rhizome) จากทั้ง 4 แหล่งเพาะปลูก

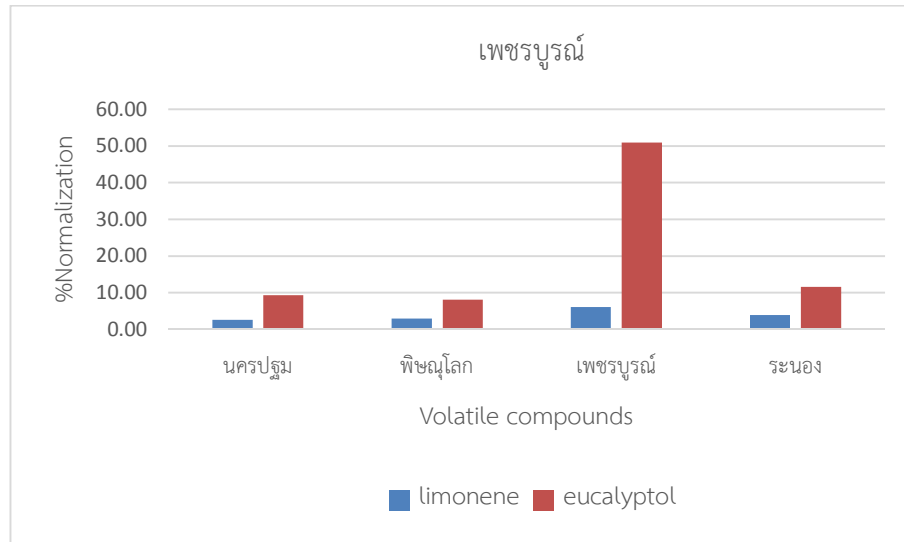
เมื่อพิจารณา รูปที่ 3-6 ข) พบว่าสารระเหยง่ายในวงกลมสีน้ำเงินซึ่งอยู่ในตำแหน่งเดียวกับตัวอย่างกระชายส่วนเหง้า (rhizome) ที่มาจากจังหวัดเพชรบูรณ์ โดยมีสารระเหยง่ายที่เป็นสารระเหยหลัก คือ สารระเหยง่ายตัวที่ 8 (limonene) และ 9 (eucalyptol) สารระเหยง่ายในวงกลมสีเหลืองซึ่งอยู่ในตำแหน่งเดียวกับตัวอย่างกระชายส่วนเหง้าที่มาจากจังหวัดระนอง โดยมีสารระเหยง่ายที่เป็นสารระเหยหลัก คือ สารระเหยง่ายตัวที่ 2 (camphene) และ 18 (bicyclo[2.2.1]-heptan-2-one, 1,7,7-trimethyl-, (1R)-) สารระเหยง่ายในวงกลมสีน้ำตาลซึ่งอยู่ในตำแหน่งเดียวกับตัวอย่างกระชายส่วนเหง้าที่มาจากจังหวัดพิษณุโลก โดยมีสารระเหยง่ายที่เป็นสารระเหยหลัก คือ สารระเหยง่ายตัวที่ 11 (3-carene) สารระเหยง่ายในวงกลมสีเขียวซึ่งอยู่ในตำแหน่งเดียวกับตัวอย่างกระชายส่วนเหง้า ที่มาจากจังหวัดนครปฐม โดยมีสารระเหยง่ายที่เป็นสารระเหยหลัก คือ สารระเหยง่ายตัวที่ 27 (2-propenoic acid, 3-phenyl-, methyl ester, (E)-) โดยสารระเหยง่ายให้ดูเทียบจากตารางที่ 3-1



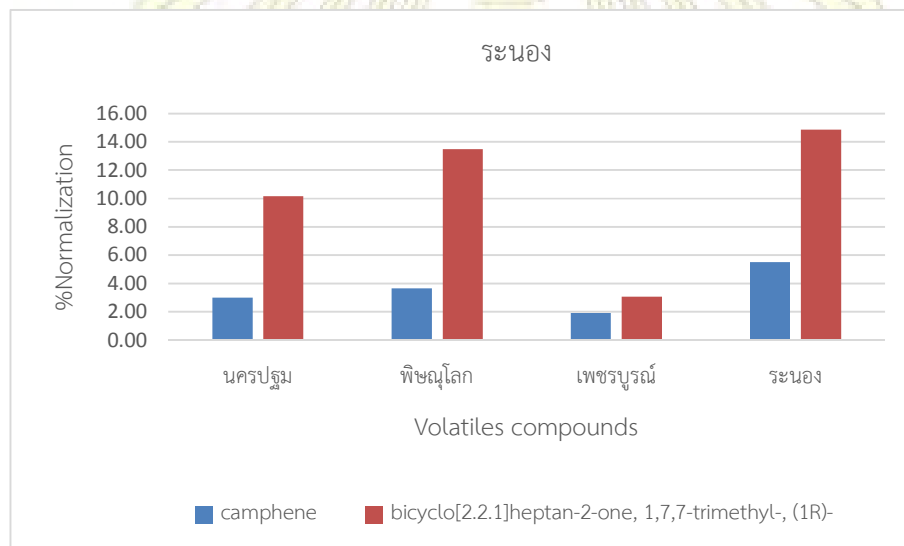
รูปที่ 3-6 ซ) กราฟแสดงผล PCA ของสารระเหยง่ายที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะของตัวอย่างกระชายส่วนเหง้า (rhizome) จากแต่ละแหล่งเพาะปลูก

โดยเมื่อพิจารณาจากแผนภูมิเปรียบเทียบปริมาณของสารระเหยง่ายที่เป็นสารระเหยหลักในแต่ละจังหวัดพบว่าข้อมูลที่ได้วิเคราะห์เคโมเมตริกซ์ชนิด PCA ในรูปที่ 3-6 ซ) และ 3-6 ซ) สามารถแสดงให้เห็นว่าข้อมูลสารระเหยง่ายที่เป็นสารระเหยหลักของแต่ละแหล่งเพาะปลูกมีปริมาณที่มากกว่าแหล่งเพาะปลูกอื่น ดังรูปที่ 3-6 ฉ)-ฎ)

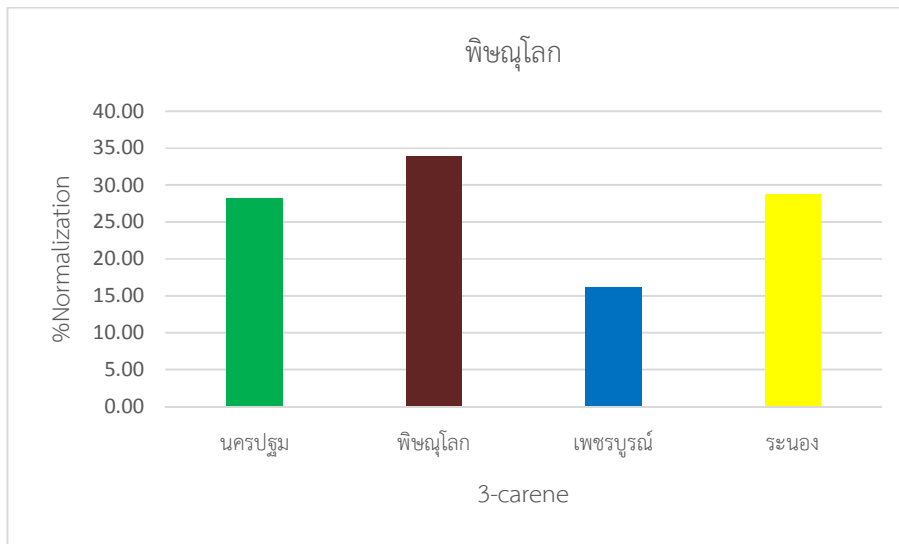




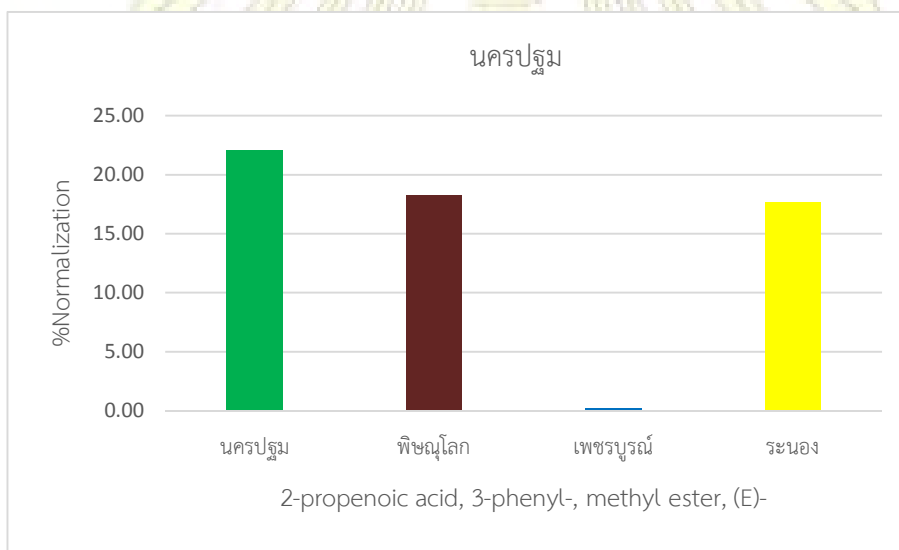
รูปที่ 3-6 ฉ) แผนภูมิเปรียบเทียบสารระเหยง่ายที่เป็นสารระเหยหลัก (ตัวแทน) ของตัวอย่างกระชายส่วนเหง้า (rhizome) จากจังหวัดเพชรบูรณ์กับจังหวัดอื่น ๆ



รูปที่ 3-6 จ) แผนภูมิเปรียบเทียบสารระเหยง่ายที่เป็นสารระเหยหลัก (ตัวแทน) ของตัวอย่างกระชายส่วนเหง้า (rhizome) จากจังหวัดระนองกับจังหวัดอื่น ๆ



รูปที่ 3-6 ฎ) แผนภูมิเปรียบเทียบสารระเหยง่ายที่เป็นสารระเหยหลัก (ตัวแทน) ของตัวอย่างกระชายส่วนเหง้า (rhizome) จากจังหวัดพิชณูโลกกับจังหวัดอื่น ๆ



รูปที่ 3-6 ฎ) แผนภูมิเปรียบเทียบสารระเหยง่ายที่เป็นสารระเหยหลัก (ตัวแทน) ของตัวอย่างกระชายส่วนเหง้า (rhizome) จากจังหวัดนครปฐมกับจังหวัดอื่น ๆ

## บทที่ 4

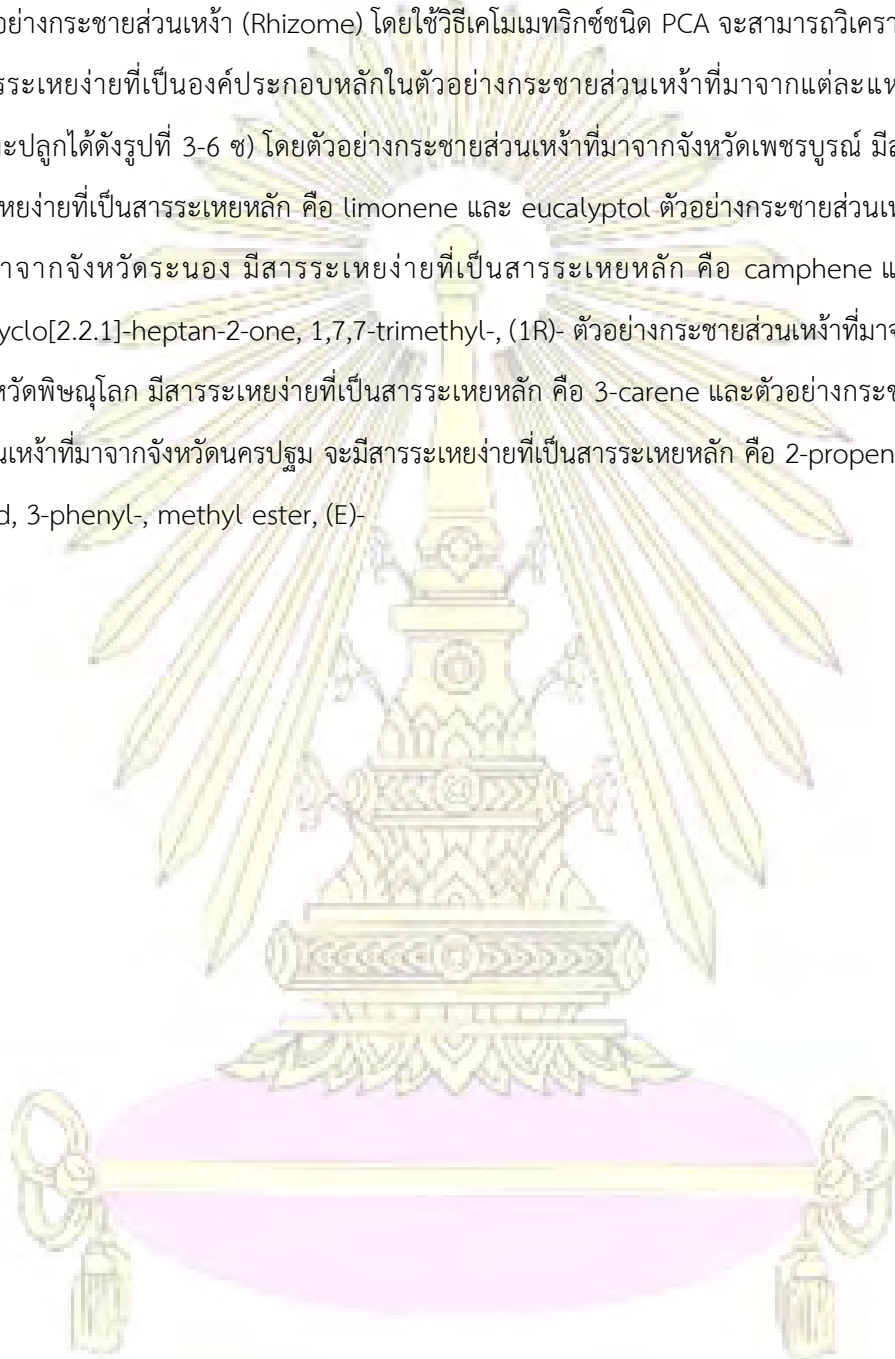
### สรุปผลการทดลอง

จากการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างกระชายทั้งส่วนราก (rootlet) และส่วนเหง้า (rhizome) ด้วยเทคนิคเฮดสเปซโดยการวิเคราะห์ที่ละตัวแปร (single factor optimization) และการออกแบบการทดลองชนิด central composite design (CCD) ได้เลือกผลการทดลอง และกราฟพื้นที่ตอบสนองตอบสนองของพื้นที่ใต้พีกของสารรวมในโครมาโทแกรม พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัดตัวอย่างกระชายส่วนราก และส่วนเหง้า คือ 40 และ 70 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ส่วนเวลาที่เหมาะสมในการสกัดตัวอย่างกระชายส่วนราก และส่วนเหง้า คือ 30 และ 60 นาที ตามลำดับ

เมื่อนำโครมาโทแกรมของสารระเหยง่ายในตัวอย่างกระชายทั้ง 2 ส่วน มาพิจารณาเลือกพีกของสารระเหยง่ายที่สำคัญ พบว่ามีสารระเหยง่ายที่สำคัญทั้งหมด 30 สาร ดังตารางที่ 3-1 ซึ่งสามารถใช้สารระเหยง่ายที่สำคัญทั้ง 30 สาร บอกความแตกต่างของตัวอย่างกระชายจาก 4 จังหวัด คือ นครปฐม พิษณุโลก เพชรบูรณ์ และระนอง

เมื่อนำพื้นที่ใต้พีกของโครมาโทแกรมทั้งหมดที่ได้มาคำนวณ %Normalization และนำไปประมวลผลด้วยวิธีเคโมเมตริกซ์ชนิด PCA สามารถจัดกลุ่มตัวอย่างกระชายทั้ง 2 ส่วนที่มาจากแหล่งเพาะปลูกที่แตกต่างกันได้เป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ ตัวอย่างกระชายกลุ่มที่มาจากจังหวัดนครปฐม พิษณุโลก เพชรบูรณ์ และระนอง ดังรูปที่ 3-6 ก) และ 3-6 ข) โดยตัวอย่างกระชายที่มาจากแหล่งเพาะปลูกต่างกันจะมีโครมาโทแกรมของสารระเหยง่ายบางชนิดที่แตกต่างกัน เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของสารระเหยง่ายในตัวอย่างกระชายส่วนราก (Rootlet) โดยใช้วิธีเคโมเม-ตริกซ์ชนิด PCA จะสามารถวิเคราะห์สารระเหยง่ายที่เป็นองค์ประกอบหลักในตัวอย่างกระชายส่วนรากที่มาจากแต่ละแหล่งเพาะปลูกได้ดังรูปที่ 3-6 ข) โดยตัวอย่างกระชายส่วนรากที่มาจากจังหวัดเพชรบูรณ์ มีสารระเหยง่ายที่เป็นสารระเหยหลัก คือ eucalyptol ตัวอย่างกระชายส่วนรากที่มาจากจังหวัดระนอง มีสารระเหยง่ายที่เป็นสารระเหยหลัก คือ bicyclo[2.2.1]-heptan-2-one, 1,7,7-trimethyl-, (1R)- ตัวอย่างกระชาย

ส่วนรากที่มาจากจังหวัดพิษณุโลก มีสารระเหยง่ายที่เป็นสารระเหยหลัก คือ 3-carene และ ตัวอย่างกระชายส่วนรากที่มาจากจังหวัดนครปฐม จะมีสารระเหยง่ายที่เป็นสารระเหยหลัก คือ 2,6-octadienal, 3,7-dimethyl- และเมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของสารระเหยง่ายใน ตัวอย่างกระชายส่วนเหง้า (Rhizome) โดยใช้วิธีเคโมเมทริกซ์ชนิด PCA จะสามารถวิเคราะห์ สารระเหยง่ายที่เป็นองค์ประกอบหลักในตัวอย่างกระชายส่วนเหง้าที่มาจากแต่ละแหล่ง เพาะปลูกได้ดังรูปที่ 3-6 ซ) โดยตัวอย่างกระชายส่วนเหง้าที่มาจากจังหวัดเพชรบูรณ์ มีสาร ระเหยง่ายที่เป็นสารระเหยหลัก คือ limonene และ eucalyptol ตัวอย่างกระชายส่วนเหง้า ที่มาจากจังหวัดระนอง มีสารระเหยง่ายที่เป็นสารระเหยหลัก คือ camphene และ bicyclo[2.2.1]-heptan-2-one, 1,7,7-trimethyl-, (1R)- ตัวอย่างกระชายส่วนเหง้าที่มาจาก จังหวัดพิษณุโลก มีสารระเหยง่ายที่เป็นสารระเหยหลัก คือ 3-carene และตัวอย่างกระชาย ส่วนเหง้าที่มาจากจังหวัดนครปฐม จะมีสารระเหยง่ายที่เป็นสารระเหยหลัก คือ 2-propenoic acid, 3-phenyl-, methyl ester, (E)-



## เอกสารอ้างอิง

1. Isa, N.M.; Abdelwahab, S.I.; Mohan, S.; Abdul, A.B.; Sukari, M.A.; Taha, M.M.E.; Syam, S.; Narrima, P.; Cheah, S.Ch.; Ahmad, S.; Mustafa, M.R. *In Vitro* Anti-Inflammatory, Cytotoxic and Antioxidant Activities of Boesenbergin A, a Chalcone isolated from Boesenbergia Rotunda (L.) (Fingerroot). *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2012**, *45*, 524-530.
2. Arthur, C.L. and Pawliszyn, J. Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers. *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 2145-2148.
3. Mark, O. Analysis of Laminated Documents Using Solid-Phase Microextraction. *J. Am. Inst. Consev.* **2005**, *44*, 13-26.
4. Yang, X. and Peppard, T. Solid-Phase Microextraction for Flavor Analysis. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 1925-1930.
5. Lu, X.; Jihyun, L.; Gong, Z.; Ebeler, S.E.; Wickramasinghe, N.; Seiber, J.; Mitchell, A.E. HS-SPME GC/MS Characterization of Volatiles in Raw and Dry-roasted Almonds (*Prunus dulcis*). *Food. Chem.* **2014**, *151*, 31-39.
6. Riu-Aumatell, M.; Miró, P.; Serra-Cayuela, A.; Buxaderas, S.; López-Tamames, E. Assessment of the Aroma Profiles of Low-alcohol Beers using HS-SPME-GC-MS. *Food. Res. Int.* **2014**, *57*, 196-202.
7. Ruiz, J.; Cava, R.; Ventanas, J.; Jensen, M.T. Headspace Solid Phase Microextraction for the Analysis of Volatiles in a Meat Products: Dry-Cured Iberian Ham. *J. Agric. Food. Chem.* **1998**, *46*, 4688-4694.

8. Huang, C.; Jianle, C.; Xin, L.; Junxian, P.; Sophia, J.X.; Donghong, L.; Xingqian, Y. Differentiation of the Volatile Profiles of Chinese Bayberry Cultivars during Storage by HS-SPME–GC/MS Combined with Principal Component Analysis. *Postharvest. Biol. Tec* **2015**, *100*, 59-72.
9. Pillonel, L.; Ampuero, S.; Tabacchi, R.; Bosset, J.O. Analytical Methods for the Determination of the Geographic Origin of Emmental Cheese: Volatile Compounds by GC/MS-FID and Electronic Nose. *Eur. Food. Res. Technol.* **2003**, *216*, 179-183.
10. Freitas, A.M.C. and Moscab, A.I. Coffee Geographic Origin - an Aid to Coffee Differentiation. *Food. Res. Int.* **1999**, *32*, 565-573.
11. Baharudin, M.K.A.; Hamid, S.A.; Susanti, D. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils from Three Aromatic Plants of the Zingiberaceae Family in Malaysia. *J. Phys. Sci.* **2015**, *26*, 71-81.
12. Zhouyao, Z.; Janusz, P. Headspace Solid-Phase Microextraction. *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 1843-1852.
13. Mark, O. Analysis of Laminated Documents Using Solid-Phase Microextraction. *J. Am. Inst. Consev.* **2005**, *44*, 13-26.
14. Zhouyao, Z.; Janusz, P. Solid-Phase Microextraction. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 844-853.
15. Vas, G.; K, Vekey. (2004). *Solid-phase Microextraction: a Powerful Sample Preparation Tool Prior to Mass Spectrometric Analysis.*
16. Mark, O. (2005). *Analysis of Laminated Documents Using Solid-Phase Microextraction.*
17. แม่น อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสม. Principles and techniques of instrumental analysis. *ชวนพิมพ์*, 2539, 921-928.

18. Trygg, J. and Wold, S. (2002). *Homepage of Chemometrics*.
19. Santos, H. T. L. D.; Oliveira, A. M. D.; Melo, P. G. D.; Freitas, W.; and Freitas, A. P. R. D. (2012). *Multivariate Analysis in Management, Engineering and the Sciences*.
20. Brereton, R.G. (2003). *Chemometrics Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant*.



## ภาคผนวก

ตารางที่ A-1 แสดง %Normalization ของสารระเหยง่ายลำดับที่ 1-15 ในตัวอย่างกระชายส่วนราก (Rootlet) และเหง้า (Rhizome) จากจังหวัดนครปฐม

Experiment	%Normalization														
	Cpd1	Cpd2	Cpd3	Cpd4	Cpd5	Cpd6	Cpd7	Cpd8	Cpd9	Cpd10	Cpd11	Cpd12	Cpd13	Cpd14	Cpd15
Nakornpathom_Rootlet_Sampling1_Rep1	0.42	2.59	0.43	0.15	0.03	0.64	0.20	1.94	5.29	3.87	35.33	0.21	0.59	0.34	1.66
Nakornpathom_Rootlet_Sampling1_Rep2	0.51	3.08	0.43	0.18	0.03	0.64	0.26	2.17	5.18	3.74	33.55	0.20	0.70	0.33	1.76
Nakornpathom_Rootlet_Sampling1_Rep3	0.53	3.15	0.41	0.20	0.03	0.59	0.28	2.18	5.29	3.41	30.23	0.19	0.75	0.31	1.87
Nakornpathom_Rootlet_Sampling2_Rep1	0.57	3.80	0.24	0.17	0.02	0.92	0.23	2.48	3.94	4.66	44.44	0.19	0.43	0.45	1.14
Nakornpathom_Rootlet_Sampling2_Rep2	0.61	3.93	0.22	0.16	0.01	0.88	0.21	2.51	3.78	4.78	44.34	0.26	0.38	0.41	1.13
Nakornpathom_Rootlet_Sampling2_Rep3	0.65	4.34	0.25	0.19	0.01	0.92	0.23	2.73	4.40	4.73	43.83	0.19	0.41	0.45	1.39
Nakornpathom_Rootlet_Sampling3_Rep1	0.45	3.04	0.15	0.10	0.01	0.77	0.14	2.09	3.76	4.33	41.72	0.17	0.22	0.41	1.08
Nakornpathom_Rootlet_Sampling3_Rep2	0.67	0.44	0.22	0.20	0.01	0.95	0.21	2.80	4.34	4.76	44.55	0.21	0.34	0.45	1.11
Nakornpathom_Rootlet_Sampling3_Rep3	0.68	4.34	0.19	0.22	0.02	0.87	0.24	2.78	3.23	4.64	43.06	0.28	0.30	0.47	1.19
Nakornpathom_Rhizome_Sampling1_Rep1	0.46	2.74	0.15	0.01	0.07	0.49	0.15	2.35	8.49	3.13	24.33	0.23	0.06	0.40	1.35
Nakornpathom_Rhizome_Sampling1_Rep2	0.44	2.58	0.17	0.02	0.09	0.46	0.14	2.35	8.11	3.20	24.19	0.25	0.07	0.39	1.42
Nakornpathom_Rhizome_Sampling1_Rep3	0.44	2.52	0.13	0.01	0.07	0.43	0.14	2.19	8.74	3.08	22.54	0.22	0.06	0.38	1.50
Nakornpathom_Rhizome_Sampling2_Rep1	0.55	2.96	0.10	0.01	0.06	0.60	0.14	2.66	10.11	3.46	30.29	0.28	0.06	0.47	1.34
Nakornpathom_Rhizome_Sampling2_Rep2	0.54	3.00	0.12	0.03	0.06	0.70	0.16	2.90	11.06	3.98	33.98	0.32	0.08	0.54	1.51
Nakornpathom_Rhizome_Sampling2_Rep3	0.54	3.20	0.16	0.01	0.07	0.47	0.22	2.72	9.62	3.36	25.09	0.23	0.07	0.41	1.51
Nakornpathom_Rhizome_Sampling3_Rep1	0.55	3.39	0.15	0.01	0.06	0.66	0.15	2.84	9.48	4.54	33.55	0.36	0.11	0.52	1.46
Nakornpathom_Rhizome_Sampling3_Rep2	0.52	3.25	0.17	0.01	0.08	0.58	0.17	2.73	9.17	3.72	29.41	0.31	0.10	0.45	1.46
Nakornpathom_Rhizome_Sampling3_Rep3	0.54	3.39	0.17	0.02	0.07	0.60	0.18	2.81	9.20	4.01	30.58	0.35	0.09	0.50	1.56



ตารางที่ A-2 แสดง %Normalization ของสารระเหยง่ายลำดับที่ 16-30 ในตัวอย่างกระชายส่วนราก (Rootlet) และเหง้า (Rhizome) จากจังหวัดนครปฐม

Experiment	%Normalization														
	Cpd16	Cpd17	Cpd18	Cpd19	Cpd20	Cpd21	Cpd22	Cpd23	Cpd24	Cpd25	Cpd26	Cpd27	Cpd28	Cpd29	Cpd30
Nakornpathom_Rootlet_Sampling1_Rep1	0.46	0.51	12.27	0.32	0.22	0.10	0.35	0.36	1.44	28.84	0.00	0.90	0.05	0.44	0.07
Nakornpathom_Rootlet_Sampling1_Rep2	0.33	0.56	12.06	0.30	0.21	0.12	0.36	0.46	1.63	29.74	0.00	0.94	0.05	0.41	0.07
Nakornpathom_Rootlet_Sampling1_Rep3	0.42	0.61	12.85	0.32	0.22	0.14	0.38	0.48	2.15	31.43	0.00	1.05	0.06	0.39	0.08
Nakornpathom_Rootlet_Sampling2_Rep1	0.52	0.34	11.16	0.29	0.12	0.03	0.17	0.22	1.34	21.30	0.00	0.31	0.08	0.37	0.05
Nakornpathom_Rootlet_Sampling2_Rep2	0.50	0.27	11.11	0.25	0.15	0.04	0.24	0.29	1.04	21.53	0.00	0.32	0.09	0.52	0.03
Nakornpathom_Rootlet_Sampling2_Rep3	0.57	0.29	12.72	0.28	0.15	0.02	0.21	0.25	1.00	19.10	0.00	0.29	0.05	0.32	0.04
Nakornpathom_Rootlet_Sampling3_Rep1	0.47	0.23	11.83	0.33	0.13	0.02	0.26	0.31	1.50	25.27	0.00	0.40	0.04	0.71	0.04
Nakornpathom_Rootlet_Sampling3_Rep2	0.52	0.31	13.26	0.43	0.14	0.03	0.29	0.29	1.71	20.98	0.00	0.27	0.04	0.42	0.04
Nakornpathom_Rootlet_Sampling3_Rep3	0.55	0.27	11.53	0.43	0.11	0.03	0.25	0.30	1.76	21.56	0.00	0.28	0.04	0.34	0.03
Nakornpathom_Rhizome_Sampling1_Rep1	0.39	0.17	10.38	0.41	0.20	0.09	0.38	0.62	4.77	8.60	0.19	26.68	0.09	2.07	0.55
Nakornpathom_Rhizome_Sampling1_Rep2	0.38	0.19	10.57	0.46	0.20	0.09	0.36	0.68	4.74	8.64	0.17	27.32	0.09	1.71	0.52
Nakornpathom_Rhizome_Sampling1_Rep3	0.35	0.19	10.88	0.46	0.22	0.10	0.42	0.72	5.03	9.40	0.18	27.11	0.04	1.93	0.52
Nakornpathom_Rhizome_Sampling2_Rep1	0.45	0.22	12.09	0.39	0.25	0.06	0.39	0.72	4.31	8.28	0.15	16.70	0.05	2.43	0.40
Nakornpathom_Rhizome_Sampling2_Rep2	0.47	0.19	12.48	0.43	0.26	0.08	0.35	0.81	3.04	5.64	0.10	15.09	0.11	1.67	0.30
Nakornpathom_Rhizome_Sampling2_Rep3	0.30	0.22	9.41	0.51	0.18	0.08	0.39	0.68	4.25	8.37	0.24	25.22	0.03	1.88	0.59
Nakornpathom_Rhizome_Sampling3_Rep1	0.55	0.28	8.78	0.45	0.22	0.12	0.38	0.56	3.83	8.12	0.15	16.51	0.10	1.75	0.36
Nakornpathom_Rhizome_Sampling3_Rep2	0.48	0.25	8.29	0.44	0.20	0.08	0.32	0.62	3.69	7.41	0.19	23.68	0.10	1.59	0.55
Nakornpathom_Rhizome_Sampling3_Rep3	0.46	0.24	8.58	0.45	0.18	0.08	0.34	0.63	4.13	8.70	0.19	19.89	0.10	1.54	0.43

ตารางที่ A-3 แสดง %Normalization ของสารระเหยง่ายลำดับที่ 1-15 ในตัวอย่างกระชายส่วนราก (Rootlet) และเหง้า (Rhizome) จากจังหวัดพิษณุโลก

Experiment	%Normalization														
	Cpd1	Cpd2	Cpd3	Cpd4	Cpd5	Cpd6	Cpd7	Cpd8	Cpd9	Cpd10	Cpd11	Cpd12	Cpd13	Cpd14	Cpd15
Phitsanulok_Rootlet_Sampling1_Rep1	0.54	4.25	0.21	0.08	0.02	0.87	0.15	2.64	2.84	4.39	42.33	0.25	0.28	0.53	1.10
Phitsanulok_Rootlet_Sampling1_Rep2	0.53	3.88	0.22	0.10	0.01	0.75	0.16	2.39	2.76	3.99	38.06	0.16	0.35	0.48	1.27
Phitsanulok_Rootlet_Sampling1_Rep3	0.60	4.70	0.21	0.11	0.03	0.86	0.20	2.83	2.85	4.22	39.98	0.19	0.35	0.53	1.28
Phitsanulok_Rootlet_Sampling2_Rep1	0.53	3.24	0.27	0.16	0.02	0.79	0.19	2.30	4.78	4.14	41.38	0.24	0.38	0.44	1.13
Phitsanulok_Rootlet_Sampling2_Rep2	0.54	3.33	0.30	0.16	0.01	0.76	0.24	2.37	5.07	3.75	37.73	0.26	0.42	0.40	1.25
Phitsanulok_Rootlet_Sampling2_Rep3	0.56	3.42	0.23	0.18	0.04	0.79	0.22	2.26	4.12	3.92	37.64	0.19	0.34	0.36	1.12
Phitsanulok_Rootlet_Sampling3_Rep1	0.51	3.70	0.15	0.04	0.01	0.94	0.17	2.53	5.02	4.79	47.76	0.29	0.28	0.46	1.01
Phitsanulok_Rootlet_Sampling3_Rep2	0.47	3.41	0.26	0.03	0.02	0.80	0.18	2.31	4.92	4.15	41.55	0.17	0.39	0.37	1.22
Phitsanulok_Rootlet_Sampling3_Rep3	0.63	4.59	0.24	0.05	0.03	0.95	0.24	2.92	4.59	4.49	43.51	0.28	0.40	0.48	1.14
Phitsanulok_Rhizome_Sampling1_Rep1	0.65	4.48	0.19	0.02	0.07	0.83	0.12	3.17	7.41	4.05	36.76	0.31	0.12	0.55	1.32
Phitsanulok_Rhizome_Sampling1_Rep2	0.58	3.88	0.18	0.02	0.10	0.74	0.13	2.84	7.47	3.71	33.59	0.23	0.13	0.54	1.39
Phitsanulok_Rhizome_Sampling1_Rep3	0.63	4.05	0.21	0.03	0.12	0.64	0.17	2.96	7.06	3.45	29.74	0.19	0.12	0.48	1.50
Phitsanulok_Rhizome_Sampling2_Rep1	0.60	3.38	0.15	0.02	0.10	0.80	0.14	3.09	9.18	4.23	36.57	0.36	0.08	0.57	1.20
Phitsanulok_Rhizome_Sampling2_Rep2	0.56	3.13	0.14	0.02	0.11	0.61	0.19	2.89	7.88	3.22	30.45	0.24	0.09	0.44	1.28
Phitsanulok_Rhizome_Sampling2_Rep3	0.58	3.77	0.20	0.02	0.12	0.55	0.20	2.91	7.18	2.81	25.70	0.19	0.11	0.42	1.58
Phitsanulok_Rhizome_Sampling3_Rep1	0.54	3.34	0.07	0.00	0.06	0.94	0.09	2.86	9.31	4.48	41.04	0.30	0.09	0.56	1.12
Phitsanulok_Rhizome_Sampling3_Rep2	0.57	3.37	0.11	0.01	0.08	0.74	0.15	2.87	8.56	3.90	35.38	0.26	0.10	0.47	1.16
Phitsanulok_Rhizome_Sampling3_Rep3	0.56	3.63	0.09	0.02	0.09	0.80	0.14	2.88	8.50	4.03	35.75	0.32	0.08	0.50	1.22

ตารางที่ A-4 แสดง %Normalization ของสารระเหยง่ายลำดับที่ 16-30 ในตัวอย่างกระชายส่วนราก (Rootlet) และเหง้า (Rhizome) จากจังหวัดพิษณุโลก

Experiment	%Normalization														
	Cpd16	Cpd17	Cpd18	Cpd19	Cpd20	Cpd21	Cpd22	Cpd23	Cpd24	Cpd25	Cpd26	Cpd27	Cpd28	Cpd29	Cpd30
Phitsanulok_Rootlet_Sampling1_Rep1	0.52	0.30	13.48	0.35	0.18	0.02	0.23	0.27	2.21	19.63	0.00	1.60	0.06	0.60	0.07
Phitsanulok_Rootlet_Sampling1_Rep2	0.49	0.38	14.28	0.40	0.18	0.04	0.30	0.29	2.67	23.48	0.00	1.55	0.07	0.66	0.07
Phitsanulok_Rootlet_Sampling1_Rep3	0.49	0.35	13.80	0.43	0.18	0.04	0.30	0.33	2.88	20.28	0.00	1.44	0.03	0.45	0.07
Phitsanulok_Rootlet_Sampling2_Rep1	0.48	0.35	11.22	0.28	0.14	0.03	0.25	0.32	2.08	23.02	0.00	1.27	0.06	0.45	0.06
Phitsanulok_Rootlet_Sampling2_Rep2	0.43	0.41	11.66	0.45	0.17	0.09	0.29	0.32	2.97	24.31	0.00	1.46	0.11	0.62	0.11
Phitsanulok_Rootlet_Sampling2_Rep3	0.43	0.38	11.38	0.33	0.22	0.08	0.29	0.36	2.76	25.81	0.00	1.79	0.09	0.59	0.11
Phitsanulok_Rootlet_Sampling3_Rep1	0.53	0.24	12.11	0.29	0.18	0.02	0.24	0.33	1.18	16.41	0.00	0.42	0.02	0.35	0.04
Phitsanulok_Rootlet_Sampling3_Rep2	0.45	0.41	13.19	0.37	0.15	0.04	0.33	0.39	2.38	20.68	0.00	0.65	0.04	0.56	0.10
Phitsanulok_Rootlet_Sampling3_Rep3	0.53	0.38	12.11	0.30	0.17	0.05	0.25	0.35	1.78	18.48	0.00	0.60	0.01	0.38	0.06
Phitsanulok_Rhizome_Sampling1_Rep1	0.51	0.15	13.93	0.47	0.25	0.12	0.23	0.47	2.00	4.04	0.12	16.17	0.05	1.07	0.35
Phitsanulok_Rhizome_Sampling1_Rep2	0.44	0.16	14.48	0.55	0.28	0.15	0.28	0.55	2.34	5.19	0.14	18.04	0.13	1.33	0.41
Phitsanulok_Rhizome_Sampling1_Rep3	0.34	0.18	15.59	0.54	0.27	0.18	0.28	0.57	2.91	5.81	0.14	19.98	0.06	1.29	0.50
Phitsanulok_Rhizome_Sampling2_Rep1	0.53	0.23	11.34	0.39	0.19	0.10	0.26	0.54	2.47	4.64	0.16	16.44	0.09	1.66	0.47
Phitsanulok_Rhizome_Sampling2_Rep2	0.54	0.22	12.46	0.49	0.21	0.11	0.29	0.66	3.35	6.16	0.18	21.47	0.11	1.86	0.64
Phitsanulok_Rhizome_Sampling2_Rep3	0.43	0.20	15.74	0.58	0.29	0.22	0.33	0.63	3.11	5.71	0.14	24.22	0.17	1.31	0.58
Phitsanulok_Rhizome_Sampling3_Rep1	0.07	0.10	12.17	0.42	0.24	0.11	0.25	0.55	1.55	2.89	0.08	14.63	0.07	1.66	0.41
Phitsanulok_Rhizome_Sampling3_Rep2	0.53	0.27	12.18	0.48	0.21	0.14	0.30	0.57	2.81	5.15	0.14	16.89	0.05	2.07	0.50
Phitsanulok_Rhizome_Sampling3_Rep3	0.47	0.12	13.44	0.48	0.28	0.13	0.28	0.63	2.34	4.85	0.12	15.99	0.10	1.58	0.55

ตารางที่ A-5 แสดง %Normalization ของสารระเหยง่ายลำดับที่ 1-15 ในตัวอย่างกระชายส่วนราก (Rootlet) และเหง้า (Rhizome) จากจังหวัดเพชรบูรณ์

Experiment	%Normalization														
	Cpd1	Cpd2	Cpd3	Cpd4	Cpd5	Cpd6	Cpd7	Cpd8	Cpd9	Cpd10	Cpd11	Cpd12	Cpd13	Cpd14	Cpd15
Petchaboon_Rootlet_Sampling1_Rep1	0.67	1.46	0.10	0.02	0.03	0.34	0.68	4.09	32.29	0.00	11.83	0.43	0.22	0.32	3.20
Petchaboon_Rootlet_Sampling1_Rep2	0.94	2.11	0.78	0.02	0.04	0.43	0.09	5.53	32.81	0.00	13.73	0.49	0.27	0.41	3.25
Petchaboon_Rootlet_Sampling1_Rep3	0.89	1.86	0.06	0.02	0.04	0.35	0.96	5.08	31.24	0.00	10.20	0.33	0.35	0.30	3.62
Petchaboon_Rootlet_Sampling2_Rep1	0.70	1.32	0.48	0.06	0.05	0.32	0.59	3.74	28.36	0.00	13.05	0.38	0.22	0.33	1.99
Petchaboon_Rootlet_Sampling2_Rep2	0.86	1.73	0.51	0.07	0.03	0.31	0.78	4.52	26.68	0.00	11.65	0.38	0.38	0.34	2.08
Petchaboon_Rootlet_Sampling2_Rep3	0.96	1.90	0.52	0.12	0.09	0.19	1.13	4.49	29.88	0.00	5.35	0.25	0.27	0.25	2.44
Petchaboon_Rootlet_Sampling3_Rep1	0.64	1.27	0.49	0.09	0.03	0.34	0.58	3.23	26.99	0.00	14.57	0.32	0.30	0.22	1.71
Petchaboon_Rootlet_Sampling3_Rep2	0.96	1.90	0.47	0.11	0.04	0.37	0.91	4.31	25.66	0.00	12.98	0.29	0.36	0.24	1.84
Petchaboon_Rootlet_Sampling3_Rep3	1.10	2.23	0.42	0.16	0.05	0.34	1.24	5.27	28.46	0.00	10.83	0.30	0.36	0.25	2.31
Petchaboon_Rhizome_Sampling1_Rep1	1.01	1.94	0.13	0.02	0.16	0.56	0.56	6.77	49.64	0.00	17.22	1.06	0.06	0.73	2.66
Petchaboon_Rhizome_Sampling1_Rep2	0.98	1.88	0.10	0.02	0.14	0.54	0.68	6.28	50.38	0.00	16.87	1.01	0.08	0.72	2.77
Petchaboon_Rhizome_Sampling1_Rep3	1.15	2.19	0.14	0.02	0.16	0.44	1.09	7.35	49.51	0.00	12.98	0.86	0.09	0.67	3.23
Petchaboon_Rhizome_Sampling2_Rep1	1.29	2.49	0.19	0.03	0.05	0.66	0.55	5.82	51.76	0.00	19.28	1.00	0.06	0.57	1.68
Petchaboon_Rhizome_Sampling2_Rep2	1.09	1.93	0.32	0.03	0.14	0.41	1.01	5.71	53.05	0.00	12.36	0.75	0.08	0.56	2.77
Petchaboon_Rhizome_Sampling2_Rep3	1.12	1.87	0.20	0.03	0.04	0.69	0.48	3.71	56.00	0.00	23.25	0.99	0.05	0.60	1.55
Petchaboon_Rhizome_Sampling3_Rep1	1.16	1.76	0.46	0.05	0.13	0.45	1.05	6.26	50.17	0.00	13.36	0.53	0.08	0.46	2.32
Petchaboon_Rhizome_Sampling3_Rep2	1.04	1.58	0.44	0.04	0.14	0.45	0.97	5.70	50.31	0.00	13.65	0.54	0.06	0.44	2.57
Petchaboon_Rhizome_Sampling3_Rep3	1.12	1.69	0.45	0.05	0.15	0.50	1.01	6.62	47.18	0.00	15.92	0.60	0.09	0.53	2.59

ตารางที่ A-6 แสดง %Normalization ของสารระเหยง่ายลำดับที่ 16-30 ในตัวอย่างกระชายส่วนราก (Rootlet) และเหง้า (Rhizome) จากจังหวัดเพชรบูรณ์

Experiment	%Normalization														
	Cpd16	Cpd17	Cpd18	Cpd19	Cpd20	Cpd21	Cpd22	Cpd23	Cpd24	Cpd25	Cpd26	Cpd27	Cpd28	Cpd29	Cpd30
Petchaboon_Rootlet_Sampling1_Rep1	0.09	0.21	2.94	0.29	0.29	0.02	0.54	1.44	3.32	34.82	0.00	0.07	0.06	0.08	0.13
Petchaboon_Rootlet_Sampling1_Rep2	0.22	0.23	2.98	0.18	0.29	0.03	0.52	1.51	2.70	30.18	0.00	0.06	0.06	0.07	0.09
Petchaboon_Rootlet_Sampling1_Rep3	0.15	0.25	3.02	0.17	0.36	0.04	0.50	1.58	2.87	35.42	0.00	0.11	0.07	0.06	0.10
Petchaboon_Rootlet_Sampling2_Rep1	0.15	0.50	3.13	0.20	0.25	0.04	0.56	1.54	3.99	37.52	0.00	0.07	0.13	0.13	0.19
Petchaboon_Rootlet_Sampling2_Rep2	0.14	0.55	3.20	0.22	0.36	0.09	0.61	1.65	3.37	39.03	0.00	0.10	0.16	0.09	0.12
Petchaboon_Rootlet_Sampling2_Rep3	0.08	0.61	3.91	0.24	0.41	0.14	0.79	1.99	5.25	38.17	0.00	0.09	0.14	0.10	0.24
Petchaboon_Rootlet_Sampling3_Rep1	0.15	0.49	3.03	0.25	0.30	0.07	0.60	1.33	0.40	42.08	0.00	0.06	0.17	0.14	0.14
Petchaboon_Rootlet_Sampling3_Rep2	0.16	0.45	3.09	0.23	0.28	0.06	0.50	1.33	3.23	39.73	0.00	0.07	0.19	0.11	0.15
Petchaboon_Rootlet_Sampling3_Rep3	0.13	0.71	3.81	0.43	0.30	0.08	0.69	1.71	5.04	33.07	0.00	0.10	0.23	0.13	0.25
Petchaboon_Rhizome_Sampling1_Rep1	0.40	0.08	2.93	0.17	0.40	0.28	0.79	2.93	2.78	5.33	0.00	0.12	0.07	0.74	0.45
Petchaboon_Rhizome_Sampling1_Rep2	0.41	0.11	3.06	0.22	0.46	0.25	0.87	3.04	2.54	4.73	0.00	0.23	0.18	0.83	0.62
Petchaboon_Rhizome_Sampling1_Rep3	0.32	0.13	3.23	0.24	0.46	0.30	0.89	3.15	3.18	6.32	0.00	0.33	0.17	0.69	0.69
Petchaboon_Rhizome_Sampling2_Rep1	0.29	0.07	2.54	0.21	0.30	0.03	0.56	2.10	0.66	7.15	0.00	0.10	0.09	0.19	0.29
Petchaboon_Rhizome_Sampling2_Rep2	0.20	0.14	3.53	0.26	0.52	0.27	0.95	3.20	2.97	6.05	0.00	0.19	0.19	0.45	0.86
Petchaboon_Rhizome_Sampling2_Rep3	0.27	0.08	2.83	0.20	0.38	0.08	0.63	2.43	0.53	1.18	0.00	0.11	0.15	0.17	0.38
Petchaboon_Rhizome_Sampling3_Rep1	0.20	0.15	3.85	0.27	0.52	0.24	1.01	3.42	2.95	6.52	0.00	0.33	0.39	0.64	1.25
Petchaboon_Rhizome_Sampling3_Rep2	0.24	0.13	4.01	0.29	0.61	0.30	1.09	3.89	3.04	6.10	0.00	0.29	0.34	0.47	1.27
Petchaboon_Rhizome_Sampling3_Rep3	0.20	0.17	1.59	0.31	0.56	0.20	1.08	3.79	3.45	7.46	0.00	0.18	0.28	0.68	1.55

ตารางที่ A-7 แสดง %Normalization ของสารระเหยง่ายลำดับที่ 1-15 ในตัวอย่างกระชายส่วนราก (Rootlet) และเหง้า (Rhizome) จากจังหวัดระนอง

Experiment	%Normalization														
	Cpd1	Cpd2	Cpd3	Cpd4	Cpd5	Cpd6	Cpd7	Cpd8	Cpd9	Cpd10	Cpd11	Cpd12	Cpd13	Cpd14	Cpd15
Ranong_Rootlet_Sampling1_Rep1	0.42	3.16	0.09	0.08	0.02	0.66	0.13	2.19	4.43	4.75	38.71	0.26	0.19	0.50	1.61
Ranong_Rootlet_Sampling1_Rep2	0.54	2.27	0.11	0.11	0.03	0.81	0.17	2.54	4.07	5.14	40.49	0.29	0.21	0.53	1.54
Ranong_Rootlet_Sampling1_Rep3	0.42	3.11	0.06	0.16	0.02	0.79	0.13	1.98	3.29	4.71	42.81	0.27	0.11	0.49	1.12
Ranong_Rootlet_Sampling2_Rep1	0.48	3.57	0.09	0.09	0.03	0.69	0.18	2.30	4.17	4.51	35.51	0.26	0.22	0.50	1.73
Ranong_Rootlet_Sampling2_Rep2	0.63	4.45	0.08	0.24	0.02	0.80	0.24	2.41	3.84	4.17	36.55	0.26	0.15	0.47	1.32
Ranong_Rootlet_Sampling2_Rep3	0.68	4.58	0.08	0.26	0.02	0.85	0.26	2.54	3.61	4.44	38.80	0.28	0.14	0.49	1.33
Ranong_Rootlet_Sampling3_Rep1	0.52	4.35	0.17	0.10	0.02	0.73	0.18	2.55	3.95	4.22	37.27	0.28	0.25	0.54	1.45
Ranong_Rootlet_Sampling3_Rep2	0.51	4.28	0.17	0.10	0.02	0.73	0.18	2.52	4.31	4.16	36.90	0.27	0.26	0.53	1.56
Ranong_Rootlet_Sampling3_Rep3	0.53	4.38	0.17	0.11	0.02	0.70	0.19	2.54	4.21	3.90	34.52	0.26	0.27	0.51	1.47
Ranong_Rhizome_Sampling1_Rep1	0.67	5.67	0.10	0.01	0.05	0.58	0.22	3.92	13.26	3.34	27.33	0.37	0.07	0.62	1.53
Ranong_Rhizome_Sampling1_Rep2	0.73	6.02	0.10	0.02	0.05	0.71	0.18	3.92	12.35	4.15	29.93	0.38	0.07	0.64	1.43
Ranong_Rhizome_Sampling1_Rep3	0.68	5.62	0.09	0.01	0.05	0.68	0.18	3.94	12.87	4.12	29.53	0.39	0.07	0.66	1.60
Ranong_Rhizome_Sampling2_Rep1	0.75	6.33	0.12	0.02	0.05	0.76	0.20	3.98	12.98	4.55	31.62	0.40	0.10	0.62	1.50
Ranong_Rhizome_Sampling2_Rep2	0.68	5.46	0.10	0.02	0.06	0.73	0.15	3.93	10.71	4.99	31.43	0.44	0.09	0.70	1.56
Ranong_Rhizome_Sampling2_Rep3	0.65	5.14	0.11	0.01	0.07	0.64	0.17	3.73	10.42	4.29	29.03	0.39	0.09	0.66	1.67
Ranong_Rhizome_Sampling3_Rep1	0.66	5.21	0.11	0.02	0.07	0.62	0.19	3.82	10.68	4.25	27.80	0.39	0.10	0.65	1.70
Ranong_Rhizome_Sampling3_Rep2	0.63	4.95	0.10	0.02	0.08	0.60	0.20	3.75	10.54	4.16	27.32	0.38	0.10	0.64	1.78
Ranong_Rhizome_Sampling3_Rep3	0.67	5.20	0.13	0.02	0.08	0.56	0.23	3.86	10.51	3.86	25.26	0.37	0.11	0.64	1.84

ตารางที่ A-8 แสดง %Normalization ของสารระเหยง่ายลำดับที่ 16-30 ในตัวอย่างกระชายส่วนราก (Rootlet) และเหง้า (Rhizome) จากจังหวัดระนอง

Experiment	%Normalization														
	Cpd16	Cpd17	Cpd18	Cpd19	Cpd20	Cpd21	Cpd22	Cpd23	Cpd24	Cpd25	Cpd26	Cpd27	Cpd28	Cpd29	Cpd30
Ranong_Rootlet_Sampling1_Rep1	0.51	0.21	13.56	0.45	0.28	0.05	0.36	0.50	1.94	22.62	0.00	1.33	0.06	0.82	0.08
Ranong_Rootlet_Sampling1_Rep2	0.55	0.23	12.70	0.46	0.27	0.07	0.36	0.52	2.73	21.02	0.00	1.33	0.06	0.76	0.09
Ranong_Rootlet_Sampling1_Rep3	0.49	0.13	12.43	0.43	0.24	0.04	0.34	0.37	1.92	21.99	0.00	1.07	0.10	0.90	0.09
Ranong_Rootlet_Sampling2_Rep1	0.51	0.26	14.32	0.47	0.30	0.07	0.40	0.54	2.72	23.79	0.00	1.41	0.05	0.73	0.10
Ranong_Rootlet_Sampling2_Rep2	0.53	0.21	14.42	0.43	0.27	0.06	0.40	0.38	3.18	22.32	0.00	1.29	0.10	0.67	0.10
Ranong_Rootlet_Sampling2_Rep3	0.55	0.25	14.03	0.45	0.28	0.07	0.42	0.41	3.54	20.00	0.00	0.96	0.09	0.52	0.07
Ranong_Rootlet_Sampling3_Rep1	0.47	0.25	15.17	0.51	0.31	0.07	0.37	0.49	1.95	21.90	0.00	1.26	0.05	0.54	0.09
Ranong_Rootlet_Sampling3_Rep2	0.47	0.26	16.17	0.52	0.32	0.07	0.38	0.49	2.22	20.92	0.00	1.06	0.06	0.46	0.08
Ranong_Rootlet_Sampling3_Rep3	0.47	0.28	15.90	0.49	0.30	0.07	0.38	0.45	2.32	23.39	0.00	1.48	0.05	0.52	0.11
Ranong_Rhizome_Sampling1_Rep1	0.43	0.11	17.77	0.71	0.44	0.08	0.33	0.82	0.67	1.37	0.16	18.91	0.07	0.19	0.22
Ranong_Rhizome_Sampling1_Rep2	0.52	0.11	15.48	0.64	0.40	0.08	0.30	0.72	0.97	1.92	0.16	17.27	0.07	0.43	0.24
Ranong_Rhizome_Sampling1_Rep3	0.50	0.12	16.55	0.71	0.47	0.09	0.33	0.80	1.00	1.98	0.15	16.04	0.08	0.43	0.22
Ranong_Rhizome_Sampling2_Rep1	0.57	0.18	14.03	0.56	0.38	0.08	0.31	0.67	1.29	2.72	0.16	14.29	0.07	0.47	0.22
Ranong_Rhizome_Sampling2_Rep2	0.55	0.15	13.13	0.56	0.43	0.10	0.34	0.77	1.80	3.49	0.14	16.10	0.06	1.01	0.34
Ranong_Rhizome_Sampling2_Rep3	0.55	0.21	13.86	0.63	0.45	0.14	0.37	0.79	2.27	4.31	0.16	17.67	0.08	1.06	0.39
Ranong_Rhizome_Sampling3_Rep1	0.55	0.20	14.01	0.63	0.47	0.14	0.38	0.87	2.06	3.99	0.17	18.83	0.08	0.96	0.39
Ranong_Rhizome_Sampling3_Rep2	0.54	0.23	14.15	0.64	0.48	0.16	0.39	0.88	2.24	4.21	0.17	19.22	0.10	0.93	0.42
Ranong_Rhizome_Sampling3_Rep3	0.49	0.22	14.78	0.68	0.51	0.16	0.41	0.95	2.31	4.40	0.17	20.20	0.08	0.87	0.43

### ประวัติผู้วิจัย

นายพงศ์ภัค ธนวิชนาม เกิดวันที่ 20 มิถุนายน พ.ศ. 2537 ณ กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย สายสามัญ (แผนกวิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์) จากโรงเรียนบดินทรเดชา (สิงห์ สิงหเสนี) ๒ กรุงเทพมหานคร เมื่อปีการศึกษา 2555 เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาตรี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2556 ที่อยู่ปัจจุบัน 8/158 ซอยสวนสยาม 9 ถนนเสรีไทย แขวงคั่นนาวา เขตคั่นนาวา จังหวัดกรุงเทพมหานคร 10230

