



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การพัฒนาวิธีการตรวจวัดปริมาณสารหอมในข้าว

โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุกัญญา วงศ์พรชัย และคณะ

กันยายน 2547

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การพัฒนาวิธีการตรวจวัดปริมาณสารหอมในข้าว

Development of Methods for Quantification of an Aroma Compound in Rice

คณะผู้วิจัย

ผศ.ดร. สุกัญญา วงศ์พรชัย	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ผศ.ดร. ศักดิ์ดา จงแก้ววัฒนา	ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
นายพิสิทธิ์ กิจสวัสดิ์ไพบูลย์	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
นายสุรพันธ์ กาญจนวงศ์	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ชุดโครงการวิจัยคุณภาพข้าวขาวดอกมะลิ 105

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ในอันดับแรกนี้ ผู้เขียน (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุกัญญา วงศ์พรชัย) ขอส่งความระลึกถึงและคำขอบพระคุณอย่างสูงแก่ รองศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ อรรถธรรม อาจารย์ประจำภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ผู้จุดความคิดริเริ่มเกี่ยวกับงานวิจัยทางการประยุกต์วิธีการทางเคมีเพื่อศึกษาความหอมของข้าวแก่ผู้เขียน และให้การช่วยเหลือสนับสนุนเป็นอย่างดี ในระยะเริ่มต้นของการศึกษาวิจัยด้านความหอมของข้าว จนได้องค์ความรู้พื้นฐานที่สามารถนำมาพัฒนาการวิจัยต่อมาในโครงการวิจัยนี้

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ของโครงการการพัฒนาวิธีการตรวจวัดปริมาณสารหอมในข้าวนี้ สามารถดำเนินการจนสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีเนื่องจากได้รับความร่วมมืออย่างดีจากคณะวิจัยทั้งผู้ร่วมทำวิจัยในโครงการนี้ และผู้ร่วมทำวิจัยในชุดโครงการวิจัยคุณภาพข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) จึงขอขอบพระคุณอย่างสูงแก่ อาจารย์ อำนาจ คอวนิช รองศาสตราจารย์ ดร. อนันต์ พลธานี รองศาสตราจารย์ ดร. วรรณตูลยธัญ คุณอนันต์ ผลวัฒน์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สวัสดิ์ รมย์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศักดิ์ดา จงแก้ววัฒนา และทีมวิจัย ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ ให้การปรึกษาและแลกเปลี่ยนประสบการณ์ความรู้แก่กันด้วยดีมาโดยตลอด

งานวิจัยนี้คงไม่สามารถดำเนินการสำเร็จได้ โดยปราศจากการสนับสนุนของภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในด้านห้องปฏิบัติการและเครื่องมือวิเคราะห์ ความช่วยเหลือของเจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้อง และนักศึกษาทุกท่านในโครงการทั้งที่ศึกษาในภาควิชาเคมี และคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

คณะผู้วิจัยขอแสดงความขอบคุณอย่างสูงแก่ สกว. ที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยอย่างต่อเนื่อง รวมทั้งการประสานงานดูแลเอาใจใส่ด้วยดีมาโดยตลอด ทำให้งานวิจัยสามารถดำเนินการไปได้อย่างราบรื่น ขอขอบพระคุณอย่างยิ่งแก่ผู้อำนวยการและทีมงาน สกว. ฝ่าย 2 ผู้ประสานงานสำนักประสานงานวิจัยและพัฒนา “ผลผลิตพืชไร่” รวมถึงท่านผู้ทรงคุณวุฒิที่ได้มาให้คำแนะนำที่มีประโยชน์เมื่อมีการนำเสนอผลความก้าวหน้าโครงการวิจัย

บทสรุปผู้บริหาร

รหัสโครงการ : RDG4520006
 ชื่อโครงการ : การพัฒนาวิธีการตรวจวัดปริมาณสารหอมในข้าว
 ชื่อหัวหน้าโครงการ : ผศ.ดร.สุกัญญา วงศ์พรชัย
 Email address : scismhth@chiangmai.ac.th
 ระยะเวลาโครงการ : 1 ตุลาคม 2544 ถึง 30 กันยายน 2547

สืบเนื่องมาจากพฤติกรรมและค่านิยมในการบริโภคข้าวของทั้งชาวไทย และชาวต่างประเทศ โดยให้ความสนใจเป็นพิเศษกับข้าวคุณภาพดีและมีกลิ่นหอม จึงส่งผลให้ข้าวหอมหลายพันธุ์เป็นที่ต้องการของตลาดข้าวแม้จะมีราคาที่สูงกว่าข้าวธรรมดาก็ตาม ข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวหอมคุณภาพดีที่นิยมปลูกในประเทศไทยจึงมีแนวโน้มเป็นที่ต้องการของตลาดต่างประเทศมากขึ้นทุกปี ส่งผลดีแก่เกษตรกรชาวนาที่เพาะปลูกข้าวหอมพันธุ์ดังกล่าว แต่อย่างไรก็ตามปัญหาที่เป็นที่ทราบกันดีทั้งในกลุ่มเกษตรกรและนักวิชาการข้าวคือ ข้าวหอมพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 นั้นให้ผลผลิตต่อไร่ต่ำ ซึ่งอาจเนื่องมาจากสาเหตุหลายประการด้วยกัน จากสาเหตุดังกล่าวประกอบกับนโยบายการเกษตรแผนใหม่ ที่มีวัตถุประสงค์หลักเพื่อปลูกพืชที่ตลาดต้องการให้ได้ผลผลิตสูงและทำรายได้ที่คุ้มค่าให้กับเกษตรกรผู้เพาะปลูก จึงได้มีการระดมแนวทางการศึกษาวิจัย เพื่อปรับปรุงพันธุ์ข้าวหอมพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 หรือผลิตพันธุ์ข้าวหอมใหม่ให้มีลักษณะที่ดีในด้านการเพาะปลูก โดยคงคุณภาพการหุงต้มและความหอมไว้

การศึกษาวิจัยเพื่อปรับปรุงพันธุ์ข้าวในปัจจุบัน จึงได้มีการประยุกต์เทคโนโลยีจากหลากหลายสาขาวิชา เช่น การนำเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพมาประยุกต์ในกระบวนการผลิตหรือปรับปรุงพันธุ์ข้าว การผสมพันธุ์และคัดเลือกพันธุ์ในแปลงทดลองซึ่งก็ยังคงเป็นกระบวนการที่มีประสิทธิภาพและเป็นที่ยอมรับอยู่ในแวดวงนักปรับปรุงพันธุ์ อย่างไรก็ตามกระบวนการในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวหอมที่สมบูรณ์นั้น นอกจากการตรวจสอบคุณภาพหุงต้มของเมล็ดข้าวสายพันธุ์ใหม่ที่ได้แล้ว ยังต้องมีขั้นตอนและวิธีการในการตรวจสอบคุณภาพความหอมที่เป็นที่ยอมรับในแวดวงวิชาการระดับสากลด้วย วิธีตรวจวัดความหอมของเมล็ดข้าวจึงนับเป็นกระบวนการที่มีความสำคัญอย่างยิ่งขั้นตอนหนึ่งในการศึกษาวิจัยเพื่อเพิ่มผลผลิตหรือปรับปรุงพันธุ์และคัดเลือกพันธุ์ข้าวหอม ให้ได้ข้าวหอมสายพันธุ์ที่มีคุณภาพดีและคงกลิ่นหอมอันเป็นคุณสมบัติเด่นที่ตรงกับความต้องการของตลาดไว้

โครงการวิจัยนี้จึงได้วางแนวทางการวิจัยไว้ในส่วนของการพัฒนาเทคนิคทางเคมี เพื่อวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารที่มีบทบาทสำคัญในการให้ความหอมของข้าว โดยมุ่งให้เทคนิคที่พัฒนาขึ้นนั้นมีความถูกต้องและแม่นยำเป็นที่ยอมรับในระดับสากล ในขณะเดียวกันเทคนิคการวิเคราะห์เชิงปริมาณควรมีการพัฒนาไปเพื่อให้ได้วิธีที่สามารถลดขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง เวลา และแรงงาน ตลอดจนลดความผิดพลาด (error) ของผลการวิเคราะห์ และเพื่อให้สอดคล้องกับการประยุกต์ใช้กับตัวอย่างข้าวจำนวนมากที่ได้จากการผสมพันธุ์ข้าวเพื่อปรับปรุงพันธุ์ นอกจากนี้การ

พัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์ควรครอบคลุมไปถึงการศึกษาความเป็นไปได้ ในการสร้างชุดตรวจหาปริมาณสารหอมอย่างง่ายที่ไม่ต้องพึ่งพาเครื่องมือวิเคราะห์ระดับสูง อย่างไรก็ตามเทคนิคของการวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารที่สนใจในตัวอย่างชนิดหนึ่งๆ เช่น การวิเคราะห์ปริมาณสารหอมในตัวอย่างเมล็ดข้าว อาจมีได้หลายวิธีโดยที่แต่ละวิธีนั้นมีข้อดีและข้อเสียต่างกันไป ทั้งนี้จึงควรได้มีการรายงานสรุปเปรียบเทียบคุณสมบัติและประสิทธิภาพของเทคนิคการตรวจวัดปริมาณสารหอมในข้าวแต่ละวิธี เพื่อให้การนำไปประยุกต์ใช้โดยนักวิชาการนั้นเกิดประโยชน์และประสิทธิภาพสูงสุด

เนื่องจากได้มีรายงานการวิจัยหลายรายงาน พบว่าสารที่มีบทบาทที่สุดในการให้กลิ่นหอมในข้าวหอมนั้นคือ 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณสารหอมในข้าว จึงเน้นเฉพาะการตรวจวัดปริมาณ 2AP เท่านั้น โดยผลจากการวิจัยพบว่า แนวทางการพัฒนาวิธีการตรวจวัดปริมาณสารหอมในข้าว แบ่งออกเป็น 2 แนวทาง คือ การวิเคราะห์ทางเคมีอย่างแม่นยำโดยอาศัยเครื่องมือวิเคราะห์ระดับสูง และการวิเคราะห์โดยออกแบบให้เป็นวิธีการอย่างง่ายโดยไม่ต้องอาศัยเครื่องมือวิเคราะห์เพื่อการประยุกต์ใช้ในห้องปฏิบัติการระดับกลางได้ วิธีการที่อาศัยเครื่องมือระดับสูงในการวิเคราะห์นั้นเน้นเฉพาะเทคนิค gas chromatography (GC) ที่ใช้ตัวตรวจวัดแบบง่ายคือ flame ionization detector (FID) ได้พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้ 3 วิธี โดยเน้นการหาสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิคการสกัดและเทคนิคโครมาโทกราฟีเพื่อประยุกต์ได้ดีกับการวิเคราะห์ตัวอย่างข้าว วิธีการที่พัฒนาขึ้นมีทั้งหมด 4 วิธีดังนี้

1. วิธีการหาปริมาณ 2AP โดยการสกัดด้วยตัวทำละลายและวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-FID
2. วิธีการหาปริมาณ 2AP โดยใช้เทคนิค Headspace Gas chromatography (HS-GC) แบบ automated static HS-GC
3. วิธีการหาปริมาณ 2AP โดยใช้เทคนิค Headspace Gas chromatography (HS-GC) แบบ solid phase microextraction (SPME)-GC
4. วิธีการหาปริมาณ 2AP โดยใช้เทคนิค colorimetry

วิธีวิเคราะห์ปริมาณ 2AP ในตัวอย่างข้าว วิธีแรกที่ได้รับการพัฒนาขึ้นประกอบด้วยเทคนิคการสกัดด้วยตัวทำละลายก่อนการวิเคราะห์สารสกัดด้วยเทคนิค GC-FID วิธีนี้พบว่ามีข้อดีเหนือกว่าวิธีที่ใช้อยู่เดิมที่เน้นการสกัดสารระเหยด้วยการกลั่นไอน้ำ ก่อนนำสารสกัดไปวิเคราะห์ด้วย GC ดังที่ได้มีรายงานการประยุกต์กับตัวอย่างข้าวและอาหารอื่นๆ มาแล้วเป็นจำนวนมาก ตรงที่วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ ไม่ใช้ความร้อนในขั้นตอนการสกัดจึงไม่มีปัญหาเกี่ยวกับการสลายตัวของสาร สารสกัดที่ได้ไม่ซับซ้อนง่ายต่อการแยกวิเคราะห์ด้วย GC ปริมาณตัวอย่างข้าวและเวลาในการวิเคราะห์ก็น้อยกว่า นอกจากนี้ยังสามารถประยุกต์กับตัวอย่างใบและดอกข้าว และตัวอย่างจากพืชอื่นๆ เช่น ใบเตยหรือดอกขมนาด จากการประสิทธิภาพของการวิเคราะห์ พบว่าโดยรวมจัดอยู่ในระดับดี วิธีการนี้ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ ที่จัดอยู่ในฐานข้อมูล Science citation index ในการประยุกต์เพื่อวิเคราะห์ตัวอย่างเมล็ดข้าว ใบเตยและดอกขมนาด และได้นำมาประยุกต์กับการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับคุณภาพความหอมของข้าวหลังการเก็บรักษาแล้วในระยะเวลาที่ทำวิจัยนี้

ในวิธีที่สองและสามได้มีการประยุกต์การสกัดในสภาวะก๊าซ (headspace sampling) เพื่อใช้วิเคราะห์ตัวอย่างเมล็ดข้าวโดยตรง คือ วิธีการหาปริมาณ 2AP โดยใช้เทคนิค HS-GC แบบ automated static HS-GC ซึ่งจัดเป็นเทคนิคแบบอัตโนมัติ เครื่อง GC ที่ใช้ต้องมีส่วนของ auto-sampler ด้วย วิธีนี้จึงใช้เครื่องมือที่มีราคาแพงขึ้น แต่ให้ข้อดีตรงที่ขั้นตอนการสกัดและการเตรียมตัวอย่างก่อนวิเคราะห์ถูกตัดออกไป การเตรียมตัวอย่างจึงง่ายขึ้น และไม่ใช้ตัวทำละลายหรือสารเคมี จัดเป็นวิธีที่สะอาดและปลอดภัยต่อสภาพแวดล้อม การเป็นระบบอัตโนมัติช่วยให้ความผิดพลาดจากการวิเคราะห์ลดลง ใช้แรงงานน้อย และเวลาในการวิเคราะห์ทั้งหมดน้อยที่สุดเพียง 1 ชั่วโมงต่อตัวอย่าง ประสิทธิภาพของการวิเคราะห์จัดอยู่ในระดับดีเช่นกัน วิธีนี้จึงจัดเป็นทางเลือกใหม่ที่น่าสนใจที่สุดในการวิเคราะห์ตัวอย่างเมล็ดข้าว วิธีการหาปริมาณ 2AP โดยใช้เทคนิค HS-GC แบบ SPME-GC ใช้หลักการวิเคราะห์คล้ายกับที่วิธีก่อนหน้านี้ หากแต่ไม่มีระบบอัตโนมัติ เวลาและแรงงานที่ต้องการจึงมากกว่า และความผิดพลาดของข้อมูลสูงกว่า วิธีนี้ใช้เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในกรณีที่ไม่มี headspace auto-sampler ข้อจำกัดของทั้งสองวิธีหลังนี้อยู่ที่ชนิดของตัวอย่างที่จะนำมาวิเคราะห์ต้องมีความเข้มข้นต่ำในระดับที่กำหนด

วิธีการหาปริมาณ 2AP โดยใช้เทคนิค colorimetry นั้น เนื่องจากเป็นวิธีที่อาศัยการเกิดปฏิกิริยาเคมีของ 2AP กับรีเอเจนต์ให้ผลิตภัณฑ์ที่มีสี จึงนับเป็นวิธีที่มีสภาพไวต่ำ ซึ่งไม่เหมาะกับการวิเคราะห์สารที่มีความเข้มข้นในระดับ part per million (ppm) อย่างไรก็ตามสภาพไวดังกล่าวอาจพัฒนาให้ดีขึ้นได้โดยการเลือกใช้รีเอเจนต์ที่เหมาะสม และเพิ่มขั้นตอนการทำสารให้เข้มข้น ซึ่งหมายถึงปริมาณตัวอย่างข้าวที่ต้องการเพื่อการวิเคราะห์นั้นต้องมากขึ้นด้วย อย่างไรก็ตามเป็นวิธีที่มีข้อดีตรงที่ไม่ต้องอาศัยเครื่องมือระดับสูง แต่มีข้อเสียที่ประสิทธิภาพของการวิเคราะห์จัดอยู่ในระดับปานกลาง และเนื่องจากเป็นวิธีที่ใช้แรงงานคนแทนเครื่องมือจึงอาจให้ความคลาดเคลื่อนของข้อมูลได้มากที่สุดเทียบกับวิธีอื่นๆ เมื่อนำไปประยุกต์ตามห้องปฏิบัติการต่างสถานที่กันไป

การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารหอมในตัวอย่างข้าว ที่ได้ดำเนินการในโครงการวิจัยนี้ นับได้ว่าครอบคลุมการประยุกต์เทคนิคที่มีประสิทธิภาพต่างกับหลายระดับ ตั้งแต่เทคนิคแบบอัตโนมัติจนถึงเทคนิคที่ไม่ต้องการการใช้เครื่องมือในการวิเคราะห์ วิธีที่ได้พัฒนาขึ้นแต่ละวิธีนั้นได้กล่าวถึงขั้นตอนการวิเคราะห์อย่างละเอียด และได้ระบุลักษณะของตัวอย่างข้าวรวมทั้งพืชอื่นที่สามารถประยุกต์เทคนิคได้ รวมถึงได้แจกแจงข้อมูลเกี่ยวกับประสิทธิภาพของการวิเคราะห์ทั้งในรายละเอียดของแต่ละวิธีและในเชิงเปรียบเทียบ จึงคาดหวังว่าวิธีการดังกล่าวจะให้ประโยชน์แก่นักวิจัยทั้งภาครัฐและเอกชนที่จะได้การทำวิจัยเกี่ยวกับคุณภาพความหอมของข้าวต่อไป อย่างไรก็ตามเนื่องจากเทคนิคการวิเคราะห์ทางเคมีนั้นได้มีการพัฒนาขึ้นมาอยู่เสมอในปัจจุบัน งานวิจัยด้านการพัฒนาวิธีการตรวจวัดปริมาณสารหอมในข้าว จึงควรที่จะได้มีการวิจัยอย่างต่อเนื่องโดยการสืบหาและพัฒนาเทคนิคใหม่ เพื่อนำมาประยุกต์กับการตรวจวัดปริมาณสารหอมให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นต่อไป

บทคัดย่อ

สารสำคัญในการให้กลิ่นหอมของข้าวหอมคือ 2-อะซิทิล-1-ฟีโรลีน (2AP) นั้น ได้มีรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้หลายรายงาน พบว่ามีปรากฏอยู่ในเมล็ดข้าวและอาหารที่ผ่านกรรมวิธีอื่นๆ หลายชนิด ที่ความเข้มข้นต่ำมากในช่วง 0.01- 3.00 พีพีเอ็ม เนื่องจากสารนี้เป็นดัชนีสำคัญในการบ่งบอกถึงคุณภาพความหอมของข้าว วิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารนี้ที่รวดเร็วและถูกต้องสำหรับตัวอย่างข้าวโดยเฉพาะเมื่อมีตัวอย่างจำนวนมากนั้นมีความจำเป็นอย่างยิ่ง ในงานวิจัยนี้ได้ทำการสืบค้นและพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณ 2AP ในตัวอย่างข้าว ได้แก่ เมล็ด ใบ และดอกข้าว โดยวิธีการที่พัฒนาขึ้นทั้งหมดนี้ยังไม่ได้มีรายงานการนำมาใช้ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณของ 2AP ซึ่งแบ่งออกเป็นสี่วิธี สามในสี่วิธีนั้นประยุกต์เทคนิคการสกัดสารที่มีใช้อยู่แล้วในปัจจุบันควบคู่กับการวิเคราะห์สารสกัดด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีซึ่งใช้เครื่องมือในการวิเคราะห์ ส่วนวิธีสุดท้ายใช้เทคนิคการวัดสีและเพื่อลดปัญหาในด้านเครื่องมือวิเคราะห์ที่ราคาแพง

วิธีวิเคราะห์ปริมาณ 2AP ในตัวอย่างข้าว วิธีแรกที่ได้พัฒนาขึ้นประกอบด้วยเทคนิคการสกัดด้วยตัวทำละลาย ใช้สารละลายกรดอ่อนและสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ไดคลอโรมีเทน จากนั้นวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี (GC) ที่มีตัวตรวจวัดชนิดเฟลมไอออไนเซชัน (FID) วิธีนี้พบว่ามีข้อดีเหนือกว่าวิธีที่ใช้อยู่เดิม ที่เน้นการสกัดสารระเหยด้วยการกลั่นไอน้ำก่อนนำสารสกัดไปวิเคราะห์ด้วย GC ตรงที่ไม่ใช้ความร้อนในขั้นตอนการสกัด สารสกัดที่ได้ไม่ซับซ้อน ใช้ปริมาณตัวอย่างและเวลาน้อยกว่า ในวิธีที่สองและสามได้มีการประยุกต์การสกัดในสถานะก๊าซ หรือที่เรียกว่า การเก็บไอระเหยในที่ว่างเหนือตัวอย่าง สองแบบด้วยกันคือ การเก็บไอระเหยในที่ว่างเหนือตัวอย่างแบบคงที่และส่งไปวิเคราะห์แบบอัตโนมัติด้วย GC-FID ส่วนอีกวิธีใช้เทคนิคการสกัดระดับจุลภาคด้วยวัสดุของแข็ง (SPME) จากนั้นนำไปวิเคราะห์ต่อด้วย GC-FID พบว่าวิธีการเก็บไอระเหยในที่ว่างเหนือตัวอย่างแบบคงที่และส่งไปวิเคราะห์แบบอัตโนมัติด้วย GC-FID นั้นมีความรวดเร็วและเหมาะกับการวิเคราะห์จำนวนมากอย่างต่อเนื่อง นอกจากนี้ขั้นตอนการสกัดและการเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์รวมทั้งความต้องการใช้สารเคมีถูกลดลง จึงนับเป็นวิธีที่สะอาดและปลอดภัยต่อสภาพแวดล้อม วิธีวิเคราะห์ปริมาณ 2AP วิธีที่สี่อาศัยการเกิดปฏิกิริยาที่จำเพาะของ 2AP กับรีเอเจนต์ให้ผลิตภัณฑ์ที่มีสี ปริมาณ 2AP ในตัวอย่างหาได้จากการวัดความเข้มของสีที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิคยูวีวิชิเบิลสเปกโตรโฟโตเมตรี

ในแต่ละวิธีการวิเคราะห์ปริมาณ 2AP ในตัวอย่างข้าวที่พัฒนาขึ้นนี้ ได้ทำการหาค่าของพารามิเตอร์ต่างๆ ที่มีผลต่อประสิทธิภาพของวิธีการ การนำวิธีการมาประยุกต์กับตัวอย่างข้าวหอมและข้าวไม่หอม และการประเมินประสิทธิภาพการประยุกต์ในเชิงเปรียบเทียบ

Abstract

The key aroma compound of scented rice identified as 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) has been reported by many researchers that it was present in rice grain and some processed food products at a very low concentration level, 0.01-3.0 ppm. As a key index for evaluation of aroma quality of rice, a fast and accurate quantitative method for determination of 2AP in a large numbers of rice samples is essential. In this research, methods for quantification of 2AP in rice samples including grain, leaf and spikelet were investigated and developed. These developed methods which have not been reported for their uses in 2AP quantitative approach divided into four analytical procedures. Three of them employed currently available techniques for extraction and subsequent chromatographic analysis utilizing analytical instruments. Whereas in the last simplified method, colorimetric technique was employed in order to minimize instrument cost.

The first quantitative method for 2AP in rice samples developed in this study comprised solvent extraction using acidic solution followed by re-extraction into organic solvent, dichloromethane, before subjected to analysis by gas chromatography (GC) with flamed ionization detection (FID). It has advantages over the conventional method which emphasized on the use of steam distillation for extraction of the rice volatiles prior to GC analysis that heat associated in extraction step was eliminated, less complexity of the extract obtained, less amount of rice sample required as well as less analysis time. In the second and third methods, two techniques of gas extraction, so called headspace sampling, for extraction of the rice volatiles were employed; static headspace sampling automated with GC-FID and solid phase microextraction (SPME) prior to GC-FID. The automated static headspace GC-FID was proved as rapid and suitable for routine analysis. These methods reduced sample extraction and preparation steps and the chemicals as used in the wet extraction were excluded thus considered environmental friendly. The fourth method for quantitative analysis of 2AP utilized a specific chemical reaction between 2AP and a reagent producing a color product. Amount of 2AP in the sample was determined by measurement of the color intensity using a UV-Visible spectrophotometry.

Each developed method was validated and their applications to quantification of 2AP in some aromatic and non-aromatic rice samples were performed. Analytical efficiency and applicability of these developed methods were comparatively evaluated.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทสรุปผู้บริหาร	ii
บทคัดย่อภาษาไทย	v
Abstract	vi
สารบัญ	vii
สารบัญรูป	x
สารบัญตาราง	xv
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
1.3 ระเบียบวิธีและขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 การเชื่อมโยงกับนักวิจัยที่เป็นผู้เชี่ยวชาญในสาขาวิชาที่ทำการวิจัย	3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
บทที่ 3 หลักการของเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography)	13
บทที่ 4 การหาปริมาณ 2AP โดยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายและวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-FID	22
4.1 หลักการของการสกัด	22
4.2 วิธีการสกัด 2AP จากตัวอย่างเมล็ด ดอก และใบข้าว	23
4.3 การวิเคราะห์เชิงคุณภาพของ 2AP ในสารสกัดจากเมล็ด ดอก และใบข้าว	27
4.4 การวิเคราะห์ปริมาณ 2AP ในสารสกัดจากเมล็ด ดอก และใบข้าวด้วยเทคนิค GC	31
4.5.1 การสังเคราะห์ 2AP และการทำให้บริสุทธิ์เพื่อใช้เป็นสารมาตรฐาน	31
4.5.2 การสร้างกราฟมาตรฐาน 2AP	31
4.5 การประยุกต์วิธีการวิเคราะห์ปริมาณ 2AP ที่พัฒนาขึ้นกับตัวอย่างข้าว	34
4.5.1 การประยุกต์วิธีการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณ 2AP ในตัวอย่างเมล็ดข้าว	34
4.5.2 การประยุกต์วิธีการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณ 2AP ในตัวอย่างดอกและใบข้าว	36
4.6 การประเมินประสิทธิภาพของวิธีการ (Method validation)	40
บทที่ 5 วิธีการหาปริมาณ 2AP โดยใช้เทคนิค Headspace Gas chromatography (HS-GC)	41
5.1 หลักการของ headspace GC	42
5.2 วิธีการหาปริมาณ 2AP โดยใช้เทคนิค Automated Static Headspace GC	42

5.2.1 เครื่อง HS-GC	43
5.2.2 ขั้นตอนการทำงานของ Headspace auto-sampler (รุ่น HP7694)	46
5.2.3 ปัจจัยที่สำคัญของการวิเคราะห์ด้วย Static HS-GC	49
5.2.4 วิธีการเตรียมตัวอย่างเมล็ดข้าว	50
5.2.5 การวิเคราะห์ปริมาณ 2AP ในเมล็ดข้าวด้วยเทคนิค Static HS-GC	51
- การหาสภาวะที่เหมาะสมของระบบ GC	51
- การหาปริมาณที่เหมาะสมของตัวอย่างข้าวเพื่อใช้ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณของ 2AP	53
5.2.6 การหาสภาวะที่เหมาะสมของ headspace auto-sampler	55
- อุณหภูมิของตู้อบ เวลาการเข้าสู่สมดุลของขวดตัวอย่าง	55
- เวลาในการเติมลูป (loop fill time)	64
- เวลาในการเพิ่มความดันภายในขวดตัวอย่าง (pressurizing time)	69
- เวลาสมดุลของลูปตัวอย่าง (loop equilibration time)	69
- เวลาในการฉีดตัวอย่างเข้า GC (injection time)	71
5.2.7 การสร้างกราฟมาตรฐาน	73
- การหาค่าร้อยละของการสกัด	74
5.2.8 การประยุกต์วิธีการวิเคราะห์ปริมาณ 2AP ที่พัฒนาขึ้นกับตัวอย่างเมล็ดข้าว	77
5.2.9 การประเมินประสิทธิภาพของวิธีการ (Method validation)	78
5.3 วิธีการหาปริมาณ 2AP โดยใช้เทคนิค Solid phase microextraction (SPME)-GC	80
5.3.1 หลักการของ SPME	80
5.3.2 วิธีการเตรียมตัวอย่างเมล็ดข้าว การสกัดด้วย SPME และการวิเคราะห์ด้วย GC	82
5.3.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมของระบบ GC	84
5.3.4 อิทธิพลของความร้อนที่ให้แก่ขวดตัวอย่างและเวลายามนการดูดซับสารของ SPME fiber	87
5.3.5 การวิเคราะห์ปริมาณ 2AP ในเมล็ดข้าวด้วยเทคนิค SPME-GC	88
- กราฟของสารมาตรฐาน 2AP	88
5.3.6 การประยุกต์วิธีการวิเคราะห์ปริมาณ 2AP ที่พัฒนาขึ้นกับตัวอย่างเมล็ดข้าว	89
5.3.7 การประเมินประสิทธิภาพของวิธีการ (Method validation)	90
บทที่ 6 วิธีการหาปริมาณ 2AP โดยใช้เทคนิค colorimetry	91
6.1 หลักการของการวิเคราะห์ปริมาณด้วยเทคนิค colorimetry	91

6.2 การหาปริมาณที่สามารทำปฏิกิริยากับ 2AP เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีสี	91
6.3 ปฏิกิริยาระหว่าง 2AP กับรีเอเจนต์ $\text{Cr}(\text{CO})_6$	95
6.3.1 ปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยาและความเข้มข้นของ ผลิตภัณฑ์สีเขียว	95
6.3.2 ความจำเพาะในการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง 2AP และ $\text{Cr}(\text{CO})_6$	95
6.4 การสกัด 2AP จากตัวอย่างเมล็ดข้าวเพื่อทำปฏิกิริยากับรีเอเจนต์ $\text{Cr}(\text{CO})_6$	97
6.5 การวิเคราะห์ปริมาณ 2AP ในสารสกัดจากเมล็ดข้าวด้วยเทคนิค colorimetry	102
5.5.1 การสร้างกราฟมาตรฐาน 2AP	102
6.6 การประยุกต์วิธีการวิเคราะห์ปริมาณ 2AP ด้วยเทคนิค colorimetry กับตัวอย่างเมล็ดข้าว	104
6.7 การประเมินประสิทธิภาพของวิธีการ (Method validation)	104
บทที่ 7 บทสรุป	105
เอกสารอ้างอิง	108
ผลที่ได้รับในด้านการตีพิมพ์ การนำเสนอ และประยุกต์ใช้ผลการวิจัย	111
ภาคผนวก ก	
ภาคผนวก ข	
ภาคผนวก ค	
ภาคผนวก ง	
ภาคผนวก จ	
ภาคผนวก ฉ	

สารบัญรูป

	หน้า
รูป 2.1 โครงสร้างทางเคมีของ 2-acetyl-1-pyrroline	5
รูป 2.2 แผนภาพแสดงปฏิกิริยา Maillard ที่ให้ผลิตภัณฑ์เป็นสารกลิ่นหอม	7
รูป 2.3 (ก) Strecker degradation ของ ornithine ได้ 1-pyrroline (ข) การเกิด 2AP จากปฏิกิริยาของ 1-pyrroline และ 2-oxopropanal	8
รูป 2.4 แนวทางของปฏิกิริยาการเกิด 2AP จาก proline ที่แสดงให้เห็นว่า N จาก 2AP นั้นมาจาก N ในโมเลกุลของ proline	9
รูป 3.1 การแยกของสารผสม A และ B ในระบบโครมาโทกราฟี	13
รูป 3.2 ส่วนประกอบหลักของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ	14
รูป 3.3 รายละเอียดขององค์ประกอบของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ	15
รูป 3.4 ระบบฉีดสารของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ	17
รูป 3.5 ตัวตรวจวัดสัญญาณแบบ FID	19
รูป 3.6 GC Chromatogram	20
รูป 4.1 แผนภาพแสดงขั้นตอนการสกัดเมล็ดข้าวด้วยสารละลาย	25
รูป 4.2 แผนภาพแสดงขั้นตอนการสกัดดอกและใบข้าวด้วยสารละลายที่อุณหภูมิห้อง	26
รูป 4.3 Total ion chromatogram (TIC) ที่ได้จากการแยกวิเคราะห์องค์ประกอบในสารสกัดจากเมล็ดข้าวสารตัวอย่างพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ด้วยเทคนิค GC-MS	28
รูป 4.4 Mass spectrum ของ 2AP ในสารสกัดจากเมล็ดข้าวสารตัวอย่างพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ที่วิเคราะห์ด้วยด้วยเทคนิค GC-MS	28
รูป 4.5 Total ion chromatogram (TIC) ที่ได้จากการแยกวิเคราะห์องค์ประกอบในสารสกัดจากใบข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ในระยะแทงช่อดอกด้วยเทคนิค GC-MS	30
รูป 4.6 Total ion chromatogram (TIC) ที่ได้จากการแยกวิเคราะห์องค์ประกอบในสารสกัดจากดอกข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ในระยะแทงช่อดอกด้วยเทคนิค GC-MS	30
รูป 4.7 กราฟสารละลายมาตรฐาน 2AP	33
รูป 4.8 GC-FID chromatogram ของสารสกัดจากเมล็ดข้าวกล้องของข้าวเปลือกตัวอย่างที่ผ่านการลดความชื้นด้วยลมแห้งที่อุณหภูมิ 40 °C และเก็บรักษาในท้องไม่ควบคุมสภาพแวดล้อมเป็นเวลา 4 เดือน	35
รูป 4.9 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารหอม 2AP ในเมล็ดข้าวกล้องที่ผ่านการลดความชื้นด้วยวิธีต่างๆ และเก็บรักษาในท้องไม่ควบคุมสภาพแวดล้อมเป็นเวลา 10 เดือน	35
รูป 4.10 ความเข้มข้นของสารหอม 2AP ในใบข้าวเก็บรวมที่แต่ละระยะการเจริญเติบโต	38

รูป 4.11	ความเข้มข้นของสารหอม 2AP ในใบข้าวแต่ละลำดับที่แต่ละระยะการเจริญเติบโต	39
รูป 4.12	ความเข้มข้นของสารหอม 2AP ในดอกและเมล็ดข้าวที่แต่ละระยะการเจริญเติบโต	39
รูป 5.1	แผนภาพแสดงองค์ประกอบอย่างง่ายของ HS-GC	43
รูป 5.2	เครื่อง HS-GC ของบริษัท Agilent Technologies	43
รูป 5.3	ของเครื่อง HS ซึ่งจะมีถาดรองรับตัวอย่างซึ่งสามารถหมุนได้อยู่ภายใน	44
รูป 5.4	ส่วนนำไอระเหยของสารตัวอย่างซึ่งประกอบด้วย needle, six-port valve และ sample loop	45
รูป 5.5	ท่อนำตัวอย่างของระบบ HS ซึ่งปลายท่อจะเป็นเข็มที่แทงผ่าน septum ของส่วนฉีดสารของระบบ GC เพื่อนำตัวอย่างเข้าไปวิเคราะห์โดยอัตโนมัติ	45
รูป 5.6	สภาวะการทำงานของเครื่อง HS ในสภาวะเตรียมพร้อม	46
รูป 5.7	สภาวะการทำงานของเครื่อง HS เพื่อทำการเพิ่มความดันให้แก่ขวดตัวอย่าง	47
รูป 5.8	สภาวะการทำงานของเครื่อง HS เพื่อให้สารตัวอย่างมีการเคลื่อนที่เข้าสู่ sample loop	48
รูป 5.9	สภาวะการทำงานของเครื่อง HS เพื่อทำการฉีดสารเข้าสู่ระบบ GC	48
รูป 5.10	แผนผังวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HS-GC	50
รูป 5.11	พื้นที่ใต้พีคของ (ก) 2AP (ข) สารมาตรฐานภายใน DMP และ (ค) อัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของสาร 2AP ต่อ DMP ซึ่งเป็นผลจากการวิเคราะห์ข้าวกล้องในปริมาณต่าง ๆ กันด้วยเทคนิค HS-GC	54
รูป 5.12	ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิของตู้อบที่กับเวลาในการเข้าสู่สมดุลของตัวอย่าง	56
รูป 5.13	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิของตู้อบที่กับเวลาในการเข้าสู่สมดุลของตัวอย่างที่มีผลต่อพื้นที่ใต้พีคของ DMP ที่ใช้อุณหภูมิของตู้อบเท่ากับ 120, 140, 160 และ 180 °C ดังกราฟรูป (ก) และเปรียบเทียบกับอุณหภูมิของตู้อบเท่ากับ 100 °C ดังกราฟรูป (ข)	57
รูป 5.14	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิของตู้อบที่กับเวลาในการเข้าสู่สมดุลของตัวอย่างที่มีผลต่ออัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของ 2AP ต่อ DMP ที่ใช้อุณหภูมิของตู้อบเท่ากับ 120, 140, 160 และ 180 °C ดังกราฟรูป (ก) และเปรียบเทียบกับอุณหภูมิของตู้อบเท่ากับ 100 °C ดังกราฟรูป (ข)	58
รูป 5.15	พื้นที่ใต้พีคของ (ก) 2AP (ข) DMP และ (ค) อัตราส่วนพื้นที่ใต้พีค 2AP/DMP ที่ได้จากการวิเคราะห์ข้าวกล้องด้วยเทคนิค HS-GC ที่แต่ละเวลาในการเข้าสู่สมดุลของตัวอย่าง โดยใช้อุณหภูมิของตู้อบ 100 °C	59

รูป 5.16	พื้นที่ใต้พีคของ (ก) 2AP (ข) DMP และ (ค) อัตราส่วนพื้นที่ใต้พีค 2AP/DMP ที่ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำวกล้างด้วยเทคนิค HS-GC ที่แต่ละเวลาในการเข้าสู่สมดุลของตัวอย่าง โดยใช้อุณหภูมิของตู้อบ 120 °C	60
รูป 5.17	พื้นที่ใต้พีคของ (ก) 2AP (ข) DMP และ (ค) อัตราส่วนพื้นที่ใต้พีค 2AP/DMP ที่ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำวกล้างด้วยเทคนิค HS-GC ที่แต่ละเวลาในการเข้าสู่สมดุลของตัวอย่าง โดยใช้อุณหภูมิของตู้อบ 140 °C	61
รูป 5.18	พื้นที่ใต้พีคของ (ก) 2AP (ข) DMP และ (ค) อัตราส่วนพื้นที่ใต้พีค 2AP/DMP ที่ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำวกล้างด้วยเทคนิค HS-GC ที่แต่ละเวลาในการเข้าสู่สมดุลของตัวอย่าง โดยใช้อุณหภูมิของตู้อบ 160 °C	62
รูป 5.19	พื้นที่ใต้พีคของ (ก) 2AP (ข) DMP และ (ค) อัตราส่วนพื้นที่ใต้พีค 2AP/DMP ที่ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำวกล้างด้วยเทคนิค HS-GC ที่แต่ละเวลาในการเข้าสู่สมดุลของตัวอย่าง โดยใช้อุณหภูมิของตู้อบ 180 °C	63
รูป 5.20	พื้นที่ใต้พีคของ (ก) 2AP (ข) DMP และ (ค) อัตราส่วนพื้นที่ใต้พีค 2AP/DMP ที่ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำวกล้างด้วยเทคนิค HS-GC ที่แต่ละเวลาในการเติมลูป (loop filling time) โดยให้เวลาของการเพิ่มความดันที่ 0.5 นาที	66
รูป 5.21	พื้นที่ใต้พีคของ (ก) 2AP (ข) DMP และ (ค) อัตราส่วนพื้นที่ใต้พีค 2AP/DMP ที่ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำวกล้างด้วยเทคนิค HS-GC ที่แต่ละเวลาในการเติมลูป (loop filling time) โดยให้เวลาของการเพิ่มความดันที่ 1.0 นาที	67
รูป 5.22	กราฟเปรียบเทียบพื้นที่ใต้พีคของ (ก) 2AP (ข) DMP และ (ค) อัตราส่วนพื้นที่ใต้พีค 2AP/DMP ที่ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำวกล้างด้วยเทคนิค HS-GC ที่แต่ละเวลาในการเติมลูป (loop filling time) โดยให้เวลาของการเพิ่มความดันที่ ก) 0.5 นาที และ (ข) 1.0 นาที	68
รูป 5.23	กราฟเปรียบเทียบพื้นที่ใต้พีคของ (ก) 2AP (ข) DMP และ (ค) อัตราส่วนพื้นที่ใต้พีค 2AP/DMP ที่ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำวกล้างด้วยเทคนิค HS-GC ที่แต่ละเวลาในการเพิ่มความดัน (pressurizing time) โดยให้เวลาของการเติมลูปเท่ากับ 0.1 นาที	70
รูป 5.24	กราฟเปรียบเทียบพื้นที่ใต้พีคของ (ก) 2AP (ข) DMP และ (ค) อัตราส่วนพื้นที่ใต้พีค 2AP/DMP ที่ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำวกล้างด้วยเทคนิค HS-GC ที่แต่ละเวลาการฉีดตัวอย่าง (injection time)	72
รูป 5.25	กราฟมาตรฐาน 2AP ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณในเมล็ดข้าวด้วยเทคนิค static HS-GC และวิธีสารมาตรฐานภายใน	74

รูป 5.26	แสดงพื้นที่ใต้พีคของ 2AP จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง (ก) ข้าวกล้อง และ (ข) ข้าวขาวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเทคนิค HS-GC ซ้ำ 7 ครั้ง	76
รูป 5.27	กราฟความสัมพันธ์ของปริมาณ 2AP ในเมล็ดข้าวกล้องและข้าวสารขาวดอกมะลิ 105 ที่เก็บรักษาในถุงต่างชนิดกัน 5 แบบ วิเคราะห์ด้วยเทคนิค static HS-GC	78
รูป 5.28	แผนภาพแสดงส่วนประกอบและหลักการทำงานของอุปกรณ์ SPME	81
รูป 5.29	แผนภาพวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HS-GC	82
รูป 5.30	ผลการวิเคราะห์ 2AP ในเมล็ดข้าวด้วยเทคนิค SPME-GC ที่มีอัตราการไหลของการไหลของแก๊สตัวพาเท่ากับ 3, 5, 7 และ 9 mL/min	85
รูป 5.31	ผลการวิเคราะห์ 2AP ในเมล็ดข้าวด้วยเทคนิค SPME-GC ที่มีอัตราการไหลของแก๊สตัวพาเท่ากับ 5 และ 7 ใช้โปรแกรมอุณหภูมิของ Oven แบบที่ 1 และ 2	86
รูป 5.32	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ 2AP ที่ตรวจวัดได้ด้วยเทคนิค SPME-GC ที่มีอัตราการไหลของแก๊สตัวพาเท่ากับ 5 และ 7 ใช้โปรแกรมอุณหภูมิของ Oven แบบที่ 1 และ 2	87
รูป 5.33	ผลของอุณหภูมิและเวลาในการดูดซับของ SPME fiber ต่อการตรวจวัดปริมาณ 2AP	88
รูป 5.34	กราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์ 2AP โดยตรงในเมล็ดข้าวโดยใช้วิธีสารมาตรฐานภายในและเทคนิค SPME-GC	89
รูป 5.35	ปริมาณ 2AP ในเมล็ดข้าวกล้องและข้าวสารขาวดอกมะลิ 105 ที่ได้จากการ วิเคราะห์ด้วยเทคนิค SPME-GC	90
รูป 6.1	UV-VIS spectra ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาของ 2AP และ $\text{Cr}(\text{CO})_6$ แสดงผลของความเข้มข้นของ 2AP ต่อการเกิดปฏิกิริยาและการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์สีเขียวที่เกิดขึ้น a. 10 ppm b. 20 ppm c. 30 ppm และ d. 40 ppm	96
รูป 6.2	ผลของเวลาต่อความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์สีเขียวที่เกิดขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ 2AP ในสารละลายเท่ากับ 20 ppm a. 5, b. 10, c. 15, d. 20, e. 25 และ f. 30 นาที	96
รูป 6.3	UV-VIS spectra ของปฏิกิริยาระหว่าง $\text{Cr}(\text{CO})_6$ กับ สารประกอบไนโตรเจน a. pyrrolidine, b. 2-acetylpyrrole, c. 2-acetylpyridine, d. 2-acetylthiosol และ e. proline	97
รูป 6.4	แผนภาพแสดงขั้นตอนวิธีการสกัดและวิเคราะห์ 2AP โดยวิธี colorimetry การ วิเคราะห์ด้วยเทคนิค SPME-GC	98
รูป 6.5	UV-VIS spectra ของสารผลิตภัณฑ์สีเขียวที่เกิดจากปฏิกิริยาของ $\text{Cr}(\text{CO})_6$ สกัดจากตัวอย่างข้าวปริมาณ a 25, b 50, c 100, d 150 และ e 200 g	100

รูป 6.6	UV-VIS spectra ของสารผลิตภัณฑ์สีเขียวที่เกิดจากปฏิกิริยาของ $\text{Cr}(\text{CO})_6$ กับสารสกัดจากตัวอย่างข้าวที่ใช้เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 5, 10 และ 15 นาที	100
รูป 6.7	HS-GC โครมาโทแกรมของไอระเหยจากข้าว A. พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และ B. ข้าวพันธุ์เหลืองฟิเจอร์	101
รูป 6.8	UV-VIS spectra ของสารผลิตภัณฑ์สีเขียวที่เกิดจากปฏิกิริยาของรีเอเจนต์กับสารสกัดจากตัวอย่างข้าว (a) พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และ (b) พันธุ์เหลืองฟิเจอร์	102
รูป 6.9	กราฟสารละลายมาตรฐาน 2AP	103

สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 4.1 อัตราส่วนของพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐาน 2AP/TMP ที่แต่ละปริมาณของ 2AP	33
ตาราง 4.2 การเก็บตัวอย่างใบข้าวที่แต่ละระยะของการเจริญเติบโตของต้นข้าว	37
ตาราง 5.1 ปริมาตรของสารมาตรฐาน 2AP ที่มีความเข้มข้น 1000 ppm ในตัวทำละลาย ไดคลอโรมีเทนที่เติมลงในตัวอย่างข้าวพันธุ์เหลืองฟิจิตร (พันธุ์ไม่หอม) เพื่อใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐาน	73
ตาราง 5.2 ข้อมูลจากผลการวิเคราะห์ปริมาณ 2AP ในข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่เก็บรักษาในถุงต่างชนิดกัน	77
ตาราง 6.1 รีเอเจนต์ที่ใช้ศึกษาปฏิกิริยาการเกิดผลิตภัณฑ์ที่มีสีกับสาร 2AP	93
ตาราง 7.1 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพในของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณ 2AP ในตัวอย่างข้าวในแง่ความน่าเชื่อถือของวิธีการและการประยุกต์	107

บทที่ 1

บทนำ

โครงการการพัฒนาวิธีการตรวจวัดปริมาณสารหอมในข้าว เป็นโครงการวิจัยหนึ่งในชุดโครงการวิจัยคุณภาพข้าวชาวดอกมะลิ 105 ที่ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ฝ่ายเกษตร ในส่วนของงานวิจัยเพื่อการประยุกต์และพัฒนา ได้ดำเนินโครงการโดยใช้ระยะเวลาทั้งสิ้น 3 ปี โดยมีคณะผู้วิจัยประกอบด้วย

- | | |
|--|-------------------------------|
| 1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุกัญญา วงศ์พรชัย | หัวหน้าโครงการ |
| 2. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศักดิ์ดา จงแก้ววัฒนา | นักวิจัย |
| 3. นายพิสิทธิ์ กิจสวัสดิ์ไพบุลย์ | นักวิจัย |
| 4. นายสุรพันธ์ กาญจนวงศ์ | นักวิจัย |
| 5. นายทินกร สีเสียดคำ | ผู้ช่วยวิจัย (นักศึกษา) |
| 6. นายพรเทพ สุขสราญจิต | ผู้ช่วยวิจัย (นักศึกษา) |
| 7. นายสุรเชษฐ์ ฟองอินทร์ | ผู้ช่วยวิจัย (ลูกจ้างโครงการ) |

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

สืบเนื่องมาจากพฤติกรรมและค่านิยมในการบริโภคข้าวของทั้งชาวไทย และชาวต่างประเทศ โดยให้ความสนใจเป็นพิเศษกับข้าวคุณภาพดีและมีกลิ่นหอม จึงส่งผลให้ข้าวหอมหลายพันธุ์เป็นที่ต้องการของตลาดข้าวแม้จะมีราคาที่สูงกว่าข้าวธรรมดาก็ตาม ข้าวพันธุ์ชาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวหอมคุณภาพดีที่นิยมปลูกในประเทศไทยจึงมีแนวโน้มเป็นที่ต้องการของตลาดต่างประเทศมากขึ้นทุกปี ส่งผลดีแก่เกษตรกรชาวนาที่เพาะปลูกข้าวหอมพันธุ์ดังกล่าว แต่อย่างไรก็ตามปัญหาที่เป็นที่ทราบกันดีทั้งในกลุ่มเกษตรกรและนักวิชาการข้าวคือ ข้าวหอมพันธุ์ชาวดอกมะลิ 105 นั้นให้ผลผลิตต่อไร่ต่ำ อันเป็นอุปสรรคสำคัญของการเพาะปลูก การที่ข้าวพันธุ์ชาวดอกมะลิ 105 ให้ผลผลิตต่อไร่ต่ำอาจเนื่องมาจากสาเหตุหลายประการด้วยกัน แต่สาเหตุที่สำคัญประการหนึ่งนั้นมาจากลักษณะด้อยของข้าวพันธุ์ชาวดอกมะลิ 105 เอง อันได้แก่ความไวต่อช่วงแสง ทรงต้นที่ค่อนข้างสูง การไม่ตอบสนองต่อปุ๋ย และความอ่อนแอต่อโรคและแมลงหลายชนิด

จากสาเหตุดังกล่าวประกอบกับนโยบายการเกษตรแผนใหม่ ที่มีวัตถุประสงค์หลักเพื่อปลูกพืชที่ตลาดต้องการให้ได้ผลผลิตสูงและทำรายได้ที่คุ้มค่าให้กับเกษตรกรผู้เพาะปลูก จึงได้มีการระดมแนวทางการศึกษาวิจัย โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อปรับปรุงพันธุ์ข้าวหอมพันธุ์ชาวดอกมะลิ 105 หรือผลิตพันธุ์ข้าวหอมใหม่ให้มีลักษณะที่ดีตรงกับความต้องการ เช่น ไม่ไวต่อช่วงแสง ต้นเตี้ย และมีความต้านทานต่อโรคและแมลง โดยคงลักษณะที่ดีเกี่ยวกับคุณภาพการหุงต้มและความหอมไว้

การศึกษาวิจัยเพื่อปรับปรุงพันธุ์ข้าวในปัจจุบัน จึงได้มีการประยุกต์เทคโนโลยีจากหลากหลายสาขาวิชา เช่น การนำเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพมาประยุกต์ในกระบวนการผลิตหรือปรับปรุงพันธุ์ข้าว การผสมพันธุ์และคัดเลือกพันธุ์ในแปลงทดลองซึ่งก็ยังคง

เป็นกระบวนการที่มีประสิทธิภาพและเป็นที่ยอมรับอยู่ในแวดวงนักปรับปรุงพันธุ์ อย่างไรก็ตามกระบวนการในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวหอมที่สมบูรณ์นั้น นอกจากการตรวจสอบคุณภาพหุ้ด้มของเมล็ดข้าวสายพันธุ์ใหม่ที่ได้แล้ว ยังต้องมีขั้นตอนและวิธีการในการตรวจสอบคุณภาพความหอมที่เป็นที่ยอมรับในแวดวงวิชาการระดับสากลด้วย วิธีตรวจวัดความหอมของเมล็ดข้าวจึงนับเป็นกระบวนการที่มีความสำคัญอย่างยิ่งขั้นตอนหนึ่งในการศึกษาวิจัยเพื่อเพิ่มผลผลิตหรือปรับปรุงพันธุ์และคัดเลือกพันธุ์ข้าวหอม ให้ได้ข้าวหอมสายพันธุ์ที่มีคุณภาพดีและคงกลิ่นหอมอันเป็นคุณสมบัติเด่นที่ตรงกับความต้องการของตลาดไว้

นอกจากนี้การวิจัยพื้นฐานทางเคมีของข้าว เพื่อรวบรวมข้อมูลองค์ความรู้ทางเคมีเกี่ยวกับสารหอมในข้าว น่าจะเป็นการวิจัยที่สามารถให้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์เพื่อสนับสนุนหรือเป็นแนวทางให้กับกรวิจัยเพื่อพัฒนาการเพิ่มผลผลิตข้าวได้เป็นอย่างดี

ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงได้วางแผนทางการวิจัยไว้ในส่วนของการพัฒนาเทคนิคทางเคมีเพื่อวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารที่มีบทบาทสำคัญในการให้ความหอมของข้าว โดยมุ่งให้เทคนิคที่พัฒนาขึ้นนั้นมีความถูกต้องและแม่นยำเป็นที่ยอมรับในระดับสากล ในขณะเดียวกันเทคนิคการวิเคราะห์เชิงปริมาณควรมีการพัฒนาไปเพื่อให้ได้วิธีที่สามารถลดขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง เวลา และแรงงาน ตลอดจนลดความผิดพลาด (error) ของผลการวิเคราะห์ และเพื่อให้สอดคล้องกับการประยุกต์ใช้กับตัวอย่างข้าวจำนวนมากที่ได้จากการผสมพันธุ์ข้าวในแปลงทดลอง นอกจากนี้การพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์ควรครอบคลุมไปถึงการศึกษาความเป็นไปได้ ในการสร้างชุดตรวจหาปริมาณสารหอมอย่างง่ายที่ไม่ต้องพึ่งพาเครื่องมือวิเคราะห์ระดับสูง

อย่างไรก็ตามเทคนิคของการวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารที่สนใจในตัวอย่างชนิดหนึ่ง ๆ เช่น การวิเคราะห์ปริมาณสารหอมในตัวอย่างเมล็ดข้าวนี้ อาจมีได้หลายวิธีโดยที่แต่ละวิธีนั้นมีข้อดีและข้อเสียต่างกันไป ทั้งนี้จึงควรได้มีการรายงานสรุปเปรียบเทียบคุณสมบัติและประสิทธิภาพของเทคนิคการตรวจวัดปริมาณสารหอมในข้าวแต่ละวิธี เพื่อให้การนำไปประยุกต์ใช้โดยนักวิชาการนั้นเกิดประโยชน์และประสิทธิภาพสูงสุด

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 1.2.1 พัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์ทางเคมีในการวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารให้ความหอมในข้าว ให้ได้เทคนิคที่ลดขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง ลดเวลา และแรงงาน เพื่อประยุกต์ใช้ได้ดีกับการวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวนมาก
- 1.2.2 ออกแบบ และพัฒนาวิธีการวิเคราะห์และศึกษาสารหอมและสารระเหยอื่น ๆ ในต้นข้าวในเชิงคุณภาพ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานทางเคมี และเป็นแนวทางในการวิจัยต่อไป

1.3 ระเบียบวิธีและขอบเขตของการวิจัย

- 1.3.1 การพัฒนาวิธีการสกัดสารหอมในข้าวตัวอย่างโดยเน้นการสกัดด้วยตัวทำละลาย เช่น สารละลายกรดหรือตัวทำละลายอินทรีย์ การสกัดด้วย supercritical carbon dioxide (SFE) และการสกัดด้วยตัวดูดซับ (solid phase extraction)

- 1.3.2 การหาปริมาณสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ในสารสกัดจากตัวอย่างข้าวที่ได้ด้วยเทคนิค gas chromatography (GC) ใช้วิธี internal standard และเทียบหาปริมาณ 2-acetyl-1-pyrroline จากสารสกัดโดยเทียบจากกราฟมาตรฐาน (calibration curve)
- 1.3.3 การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ในสารสกัดด้วยเทคนิค liquid chromatography (LC) liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS)
- 1.3.4 การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ในสารสกัดด้วยเทคนิค colorimetry โดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยากับสารรีเอเจนต์ที่ค้นพบใหม่ และได้ผลผลิตเป็นสารที่มีสี วัดปริมาณสารหอมในสารสกัดจากตัวอย่างเมล็ดข้าวจากสีที่เกิดขึ้น จากนั้นพัฒนาเป็นชุดตรวจวัดปริมาณสารหอมอย่างง่าย
- 1.3.5 การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline จากตัวอย่างเมล็ดข้าวโดยตรง โดยใช้เทคนิค headspace gas chromatography (HS-GC)
- 1.3.6 การประเมินผลการประยุกต์เทคนิคที่พัฒนาขึ้นในการวิเคราะห์หาปริมาณสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ในตัวอย่างข้าว พร้อมทั้งประเมินศักยภาพของเทคนิคใหม่ในแง่ประสิทธิภาพการวิเคราะห์ ชัดจำกัดของการตรวจวัด ปริมาณตัวอย่างข้าวที่ต้องการ ต้นทุน และเวลาในการวิเคราะห์

1.4 การเชื่อมโยงกับนักวิจัยที่เป็นผู้เชี่ยวชาญในสาขาวิชาที่ทำการวิจัย

โครงการวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของ “ชุดโครงการวิจัยคุณภาพข้าวขาวดอกมะลิ 105” โดยความร่วมมือกับนักวิชาการจากศูนย์วิจัยเพื่อเพิ่มผลผลิตทางเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และนักวิชาการข้าวและนักวิชาการในแขนงวิชาที่เกี่ยวข้องจากหลายหน่วยงาน อาทิ ศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลก จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น และสถาบันเทคโนโลยีราชมงคล

นอกจากนี้ได้มีการแลกเปลี่ยนความรู้และเทคนิคการวิจัย และความร่วมมือทางด้านวิชาการและการทำวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการประยุกต์เทคนิค chromatography-mass spectrometry กับ Prof. D.E. Games ที่ Mass Spectrometry Research Unit และ EPSRC National Mass Spectrometry Service Centre, Department of Chemistry, University of Wales Swansea, UK ภายใต้โครงการหลักสูตรดุสิตบัณฑิตยร่วมกับมหาวิทยาลัยต่างประเทศ ของภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

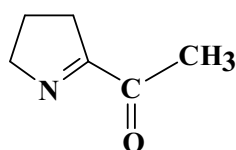
เมื่องานวิจัยได้ผลสำเร็จเป็นไปตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ ผู้ที่จะได้รับประโยชน์จากโครงการโดยตรง ได้แก่ นักวิชาการในหน่วยงานทั้งภาครัฐและเอกชนที่มีการทำวิจัยในด้านการปรับปรุงพันธุ์ข้าว ซึ่งสามารถประยุกต์ใช้วิธีทางเคมีที่ได้ทำการพัฒนาขึ้นในโครงการนี้ตรวจวัดหาปริมาณสารหอมในเมล็ดข้าวพันธุ์ลูกผสม และประเมินคุณภาพของข้าวหอมพันธุ์ใหม่ที่ได้ ในหน่วยงานวิจัยหรือภาคเอกชนที่กำลังมีการพัฒนาห้องปฏิบัติการวิจัยทางเคมี เพื่อรองรับเกี่ยวกับมาตรฐานคุณภาพข้าว สามารถนำวิธีการตรวจวัดปริมาณสารหอมในเมล็ดข้าวที่ได้พัฒนาขึ้นนี้ไป

ประยุกต์ใช้เพื่อตรวจสอบคุณภาพของผลิตภัณฑ์ข้าว ข้อมูลต่างๆ ที่ได้จากงานวิจัยที่เกี่ยวกับองค์ความรู้ทางเคมีของข้าว สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการวิจัยเพื่อการศึกษาเกี่ยวกับปัจจัยต่างๆ อาทิเช่น สภาพแวดล้อม พื้นที่เพาะปลูก ตลอดจนการจัดการก่อนและหลังการเก็บเกี่ยวข้าว ที่อาจมีอิทธิพลและผลกระทบต่อการสร้างและสะสมของปริมาณสารหอมในข้าว ส่งผลให้เกิดแนวทางการปฏิบัติเพื่อการเพาะปลูกข้าวที่สามารถปรับปรุงคุณภาพความหอมของผลผลิตข้าวให้ดีขึ้นได้

บทที่ 2

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

วิธีการตรวจสอบความหอมของเมล็ดข้าวในประเทศไทยได้มีการพัฒนาเรื่อยมา เริ่มตั้งแต่การประเมินกลิ่นหอมด้วยวิธีการดมโดยผู้เชี่ยวชาญ และให้ระดับความหอมของข้าวเป็นระดับต่างๆ ตั้งแต่ ‘ไม่หอม’ จนถึง ‘หอม’ และ ‘หอมมาก’ การตรวจสอบความหอมของเมล็ดข้าวพันธุ์ผสมของสถาบันวิจัยข้าว ทำโดยเคี้ยวเมล็ดข้าวครึ่งเมล็ดในส่วนที่ไม่มีคัพพะ ถ้าหอมก็นำอีกครั้งเมล็ดที่มีคัพพะไปปลูก ซึ่งระดับความหอมที่ประเมินได้ขึ้นอยู่กับการวินิจฉัยของผู้เชี่ยวชาญเท่านั้น ต่อมาเมื่อได้มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับสารให้ความหอมในเมล็ดข้าวมากขึ้น โดยได้มีการประยุกต์วิธีการทางเคมีเพื่อสกัดสารระเหยที่ให้กลิ่นหอมจากข้าวหอมพันธุ์ต่างๆ และตรวจพิสูจน์จนสามารถระบุโครงสร้างทางเคมีของสารอินทรีย์ที่มีบทบาทมากที่สุดต่อความหอมของข้าวได้แล้ว จึงได้มีการนำเทคนิคทางเคมีนั้นมาประยุกต์เพื่อตรวจวัดความหอมของเมล็ดพันธุ์ข้าว โดยวัดจากปริมาณของสารหอมดังกล่าว ทำให้การประเมินคุณภาพความหอมของพันธุ์ข้าวลูกผสมในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์ข้าวมีความน่าเชื่อถือและมีความถูกต้องมากยิ่งขึ้น



รูป 2.1 โครงสร้างทางเคมีของ 2-acetyl-1-pyrroline

ในปี ค.ศ 1982 Buttery และคณะ^[1] ได้รายงานการค้นพบสารระเหยหลักที่ให้กลิ่นหอมในข้าวหุงสุกเป็นครั้งแรก พร้อมกับสามารถพิสูจน์กลิ่นและระบุโครงสร้างทางเคมีได้ว่าเป็นสาร 2-acetyl-1-pyrroline (รูป 2.1) คณะผู้วิจัยดังกล่าวยังได้รายงานว่าสารหอมนี้พบทั้งในพันธุ์ข้าวหอมและพันธุ์ข้าวไม่หอมบางพันธุ์^[2] ตลอดจนพบในพืชอื่นๆ เช่น ใบเตย^[3] สำหรับในเมล็ดข้าว พบว่าสารดังกล่าวจะมีปรากฏอยู่ในพันธุ์ข้าวหอมในปริมาณที่มากกว่าพันธุ์ข้าวที่ไม่หอม ซึ่งข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 จากประเทศไทยก็เป็นพันธุ์หนึ่งที่คณะวิจัยนี้ใช้ทดลอง และพบว่าปริมาณสาร 2-acetyl-1-pyrroline ในปริมาณที่มากพอๆ กับพันธุ์ข้าวหอมอื่นๆ เช่นพันธุ์มิลาโกรซา (Milagrosa) และบาสมาติ 370 (Basmati 370)^[1,2] ภายหลังได้มีการรายงานการศึกษาและยืนยันว่า 2-acetyl-1-pyrroline เป็นองค์ประกอบหนึ่งในสารสกัดจากข้าวสารพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยวิธีการกลั่นไอน้ำและวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS นอกจากนี้ยังได้พิสูจน์ว่า 2-acetyl-1-pyrroline เป็นสารหลักที่รับผิดชอบต่อกลิ่นหอมของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 จริง โดยคณะผู้วิจัยได้ทำการสังเคราะห์สาร

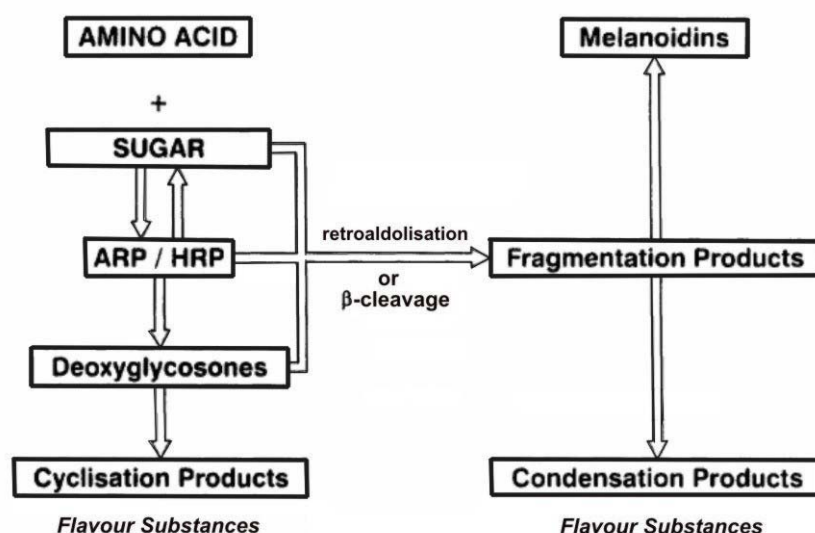
2-acetyl-1-pyrroline และนำสารละลายในน้ำของสารดังกล่าวที่ความเข้มข้นระดับเดียวกับที่ได้มีรายงานไปแล้วเติมลงในข้าวสารหุงสุกพันธุ์ไม่หอม จากนั้นนำตัวอย่างข้าวดังกล่าวไปทดสอบกลิ่นตามวิธีมาตรฐาน (sensory evaluation by panel analysis) พร้อมกับทดสอบกลิ่นของสารละลาย 2-acetyl-1-pyrroline ในน้ำบริสุทธิ์ พบว่าผู้ทดสอบกว่า 80% บอกว่ากลิ่นของตัวอย่างข้าวที่เติมสารละลาย 2-acetyl-1-pyrroline เป็นกลิ่นของข้าวหอมดอกมะลิ ในขณะที่ผู้ทดสอบประมาณ 60% บอกว่ากลิ่นของสารละลาย 2-acetyl-1-pyrroline มีกลิ่นเหมือนข้าวหอมดอกมะลิ^[4] ซึ่งแสดงให้เห็นว่า 2-acetyl-1-pyrroline เป็นสารหอมที่มีความสำคัญต่อกลิ่นหอมของข้าวขาวดอกมะลิ 105 จริงสาเหตุที่ผู้ทดสอบจำนวนน้อยกว่าที่ยืนยันว่าสารละลาย 2-acetyl-1-pyrroline มีกลิ่นเหมือนกลิ่นของข้าวหอมกลั่นนั้น เนื่องจากกลิ่นของข้าวสุกเป็นกลิ่นรวมของกลิ่นจากองค์ประกอบเคมีอื่นๆ ในข้าวด้วย เช่น กลิ่นของแป้งสุก ซึ่งจากการศึกษาโดยคณะผู้วิจัยนี้ยังได้รายงานว่าสารระเหยที่เกิดขึ้นหรือมีอยู่เดิมในเมล็ดข้าวและระเหยออกมานั้นมีมากกว่า 140 สาร อย่างไรก็ตามในจำนวนสารระเหยทั้งหมดนี้มีบางสารเท่านั้นที่มีกลิ่น และในจำนวนสารที่มีกลิ่นทั้งหมดนั้น ก็มีเพียงส่วนน้อยที่มีความเข้มข้นมากพอหรือกลิ่นของสารนั้นมีความแรง (aroma value) พอที่จะมีอิทธิพลต่อกลิ่นโดยรวมของตัวอย่างชนิดนั้น

การที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจะมีส่วนทำให้ 2-acetyl-1-pyrroline เป็นสารที่สามารถระเหยได้ง่ายที่สภาวะอุณหภูมิปกติ จากการศึกษาเกี่ยวกับระดับความแรงของกลิ่นของสารนี้พบว่าค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถได้รับกลิ่นเมื่อสารนี้ละลายในน้ำนั้นเท่ากับ 0.1 nL/L ^[5] สารนี้จึงถูกจัดอยู่ในกลุ่มสารที่มีบทบาทสำคัญมาก (aroma impact compound) อย่างไรก็ตามการที่มีธาตุไนโตรเจนอยู่ในโมเลกุลทำให้ 2-acetyl-1-pyrroline เป็นสารที่มีสมบัติมีขั้ว (polarity) และค่อนข้างไปทางสภาพเบส ซึ่งคุณสมบัตินี้เองที่ทำให้สารนี้สามารถยึดเกาะอยู่ในเนื้ออาหารหรือตัวอย่างพืชได้โดยพันธะอยู่กับองค์ประกอบทางเคมีอื่นๆ เช่น แป้ง หรือกรดไขมัน และไม่ระเหยออกมามากนักในสภาวะอุณหภูมิปกติหรืออุณหภูมิต่ำ

นับตั้งแต่การค้นพบสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ในข้าวหุงสุกเป็นต้นมา ความสนใจของนักวิชาการด้านอาหารเกี่ยวกับการศึกษาที่มาที่ไป ตลอดจนคุณสมบัติของสารนี้ได้ทวีขึ้นเป็นลำดับ จนได้มีรายงานการวิจัยเผยแพร่ออกมาอย่างกว้างขวางเกี่ยวกับการค้นพบ 2-acetyl-1-pyrroline ในตัวอย่างอาหารอื่นๆ มากมายหลายชนิด โดยทั้งหมดเป็นอาหารที่ผ่านกระบวนการแปรรูปโดยการให้ความร้อน อาหารที่มีรายงานพบ 2-acetyl-1-pyrroline เป็นองค์ประกอบในส่วนระเหยแต่ไม่ได้มีบทบาทสำคัญต่อกลิ่นของอาหาร ตัวอย่างเช่น ข้าวโพดหวานบรรจุกระป๋อง^[6] ขนมปังข้าวสาลีอบ^[7] งามอบ^[8] ขนมปังกรอบ^[9] เนื้อหางุ้งต้มสุก^[10] มันฝรั่งต้มสุก^[11] เมล็ดมะม่วงอบ^[12] น้ำมันหอยนางรม^[13] สาเลามีและปราคมาแฮมอิตาลี^[14] เนื้อหางุ้งทะเลใหญ่ต้มสุก^[15] และนมผงพร่องมันเนย^[16] เป็นต้น ส่วนอาหารที่พบ 2-acetyl-1-pyrroline เป็นองค์ประกอบหลักที่มีบทบาทสำคัญต่อกลิ่นโดยรวมของอาหารนั้น ได้แก่ เนื้อก้ามปูสุก^[17] แป้งข้าวโพดสุก^[18] เผือกต้มสุก^[19] และแฮมจากไอบีเรียน^[20]

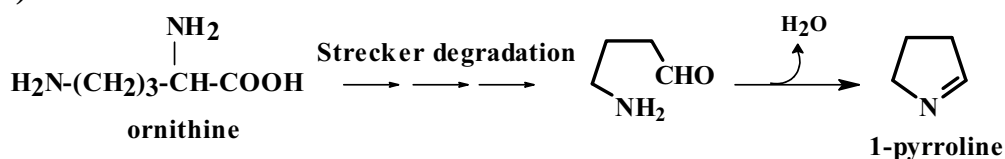
ในแง่ของเคมีด้านอาหารนั้น 2-acetyl-1-pyrroline ไม่ได้ถูกจัดอยู่ในกลุ่มสารที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติในอาหาร เนื่องจากอาหารดิบที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการให้ความร้อนส่วนใหญ่ตรวจไม่พบสารนี้ ในขณะที่เมื่อผ่านการให้ความร้อน เช่น เมื่อนำขนมปังไปอบหรือปิ้ง จะมีกลิ่นหอมและพบว่า มี 2-acetyl-1-pyrroline เกิดขึ้นในปริมาณที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ นักวิชาการด้านอาหารได้รายงานว่า 2-acetyl-1-pyrroline เกิดขึ้นในอาหารจากกระบวนการที่เรียกว่า Maillard Reaction (รูป 2.2)^[21] ซึ่งเป็นปฏิกิริยาระหว่างกรดอะมิโนและน้ำตาลในระหว่างที่อาหารได้รับความร้อน ผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก Maillard Reaction มีหลายประเภทและที่สำคัญได้แก่ สารสีน้ำตาล (brown pigments) หรือสารกลุ่ม Melanoidins และสารให้กลิ่น (flavour substances) ชนิดต่างๆ

ที่จริงแล้วสารผลิตภัณฑ์ประเภทสารให้กลิ่นที่เกิดจากปฏิกิริยาประเภท Maillard นี้มีหลายชนิดแตกต่างกันไปตามชนิดของกรดอะมิโนและน้ำตาลที่เป็นสารตั้งต้น สำหรับ 2-acetyl-1-pyrroline ได้มีรายงานทางเคมีอาหารเสนอว่าเกิดจากปฏิกิริยาของ glucose และ proline (หรือ ornithine) ที่อยู่ในอาหาร เมื่ออาหารนั้นได้รับความร้อนในเวลาที่เหมาะสม ซึ่งทำให้เกิดการสลายของ glucose ได้เป็นสารตัวกลาง (intermediate) ที่สำคัญคือ 2-oxopropanal ในขณะที่เดียวกันกรดอะมิโนเกิดการสลายตัวเช่นกันโดยปฏิกิริยาที่เรียกว่า Strecker Degradation ได้ผลผลิตเป็น 1-pyrroline ดังในรูป 2.3 (ก) จากนั้น 2-oxopropanal เข้าทำปฏิกิริยากับ 1-pyrroline ซึ่งรายละเอียดขั้นตอนหรือกลไกของปฏิกิริยานั้นยังไม่แน่ชัดและได้มีรายงานเสนอไว้มากกว่าหนึ่งกลไก กลไกหนึ่งที่ได้รายงานไว้แสดงในรูป 2.3 (ข)^[22]

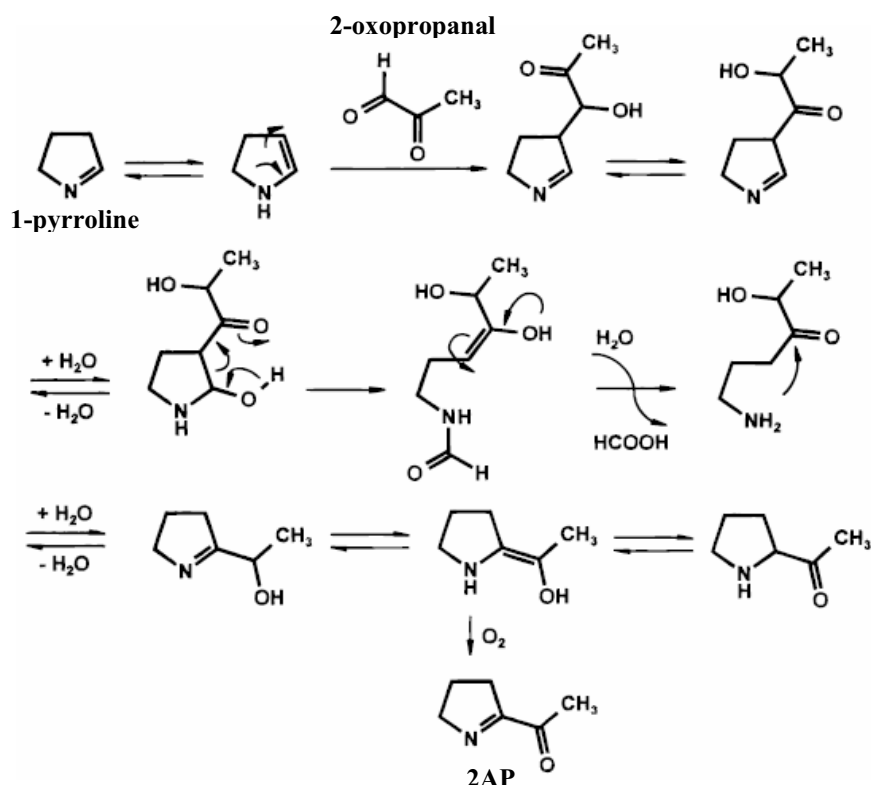


รูป 2.2 แผนภาพแสดงปฏิกิริยา Maillard ที่ให้ผลิตภัณฑ์เป็นสารให้กลิ่น (flavour substances)

ก)



ข)



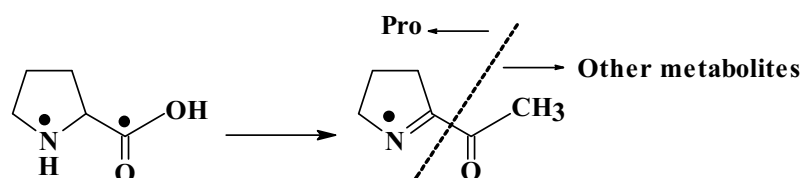
รูป 2.3 (ก) Strecker degradation ของ ornithine ได้ 1-pyrroline

(ข) การเกิด 2AP จากปฏิกิริยาของ 1-pyrroline และ 2-oxopropanal

อย่างไรก็ตามคณะนักวิจัยบางกลุ่มที่เน้นศึกษาเกี่ยวกับแหล่งที่มาของสารให้ความหอมในข้าว ไม่เห็นด้วยกับข้อเสนอแนะที่ว่า 2-acetyl-1-pyrroline เกิดขึ้นในข้าวจาก Maillard Reaction ในปี ค.ศ. 1996 Lorieux และคณะ^[23] ได้รายงานเชิงวิจารณ์ว่า มีการค้นพบยีนที่เป็นตัวควบคุมความหอมในพันธุ์ข้าวหอม และได้มีการศึกษาเกี่ยวกับยีนความหอมในข้าวหอมพันธุ์ต่างๆ อย่างแพร่หลาย นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่า 2-acetyl-1-pyrroline เกิดขึ้นและสะสมอยู่ได้ในทุกส่วนของต้นข้าวยกเว้นที่ราก^[23] จากรายงานดังกล่าวเหล่านี้ประกอบกับการที่ Maillard Reaction เป็นปฏิกิริยาที่ต้องมีความร้อนมาเกี่ยวข้องเสมอ ดังนั้นข้อสรุปเกี่ยวกับการเกิดขึ้นของ 2-acetyl-1-pyrroline ในต้นข้าวที่ไม่เกี่ยวข้องโดยตรงกับ Maillard Reaction จึงมีความเป็นไปได้สูงมาก

รายงานการศึกษานี้แม้ไม่ได้ศึกษาเกี่ยวกับแหล่งที่มาของ 2-acetyl-1-pyrroline ในข้าวโดยตรง แต่ผลที่ได้สนับสนุนข้อเท็จจริงเกี่ยวกับการเกิดขึ้นโดยธรรมชาติในต้นข้าวของสารนี้

เช่น การวิเคราะห์ปริมาณ 2-acetyl-1-pyrroline ในเมล็ดข้าวดิบ (raw rice) ที่ใช้วิธีการสกัดสารด้วยสารละลายกรดอ่อนและตัวทำละลายอินทรีย์ที่อุณหภูมิห้อง^[4,24] พบว่าความเข้มข้นของ 2-acetyl-1-pyrroline ในเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 โดยเฉลี่ยมีค่ามากกว่าที่เคยมีรายงานมา ทั้งนี้ คณะผู้วิจัยให้เหตุผลหนึ่งว่า วิธีการสกัดแบบเดิมที่ใช้ความร้อน เช่น การกลั่นด้วยไอน้ำ หรือการหุงข้าวแล้วเก็บเอาไอระเหยมาวิเคราะห์นั้น อาจก่อให้เกิดการสลายตัว (degradation) ของ 2-acetyl-1-pyrroline ได้ รายงานเมื่อไม่นานมานี้ก็รายงานหนึ่ง^[25] พบว่าต้นกล้าข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 สามารถสร้าง 2-acetyl-1-pyrroline เพิ่มขึ้นได้จากการเติมกรดอะมิโนบางชนิดลงในแหล่งอาหาร ซึ่งได้แก่ proline, ornithine และ glutamate (จากกรดอะมิโน 7 ชนิดที่ใช้ทดลอง) และพบว่าการได้รับ proline ทำให้ต้นกล้าข้าวสร้าง 2-acetyl-1-pyrroline เพิ่มขึ้นได้มากที่สุด คือประมาณ 3 เท่าของความเข้มข้นที่มีอยู่เดิมในต้นควบคุมที่ไม่ได้เติมกรดอะมิโนลงในแหล่งอาหาร คณะผู้วิจัยนี้จึงได้สรุปว่า proline เป็น precursor ที่สำคัญของกระบวนการสังเคราะห์ 2-acetyl-1-pyrroline ในต้นข้าว และจากการศึกษาถึงกลไกการสังเคราะห์ 2-acetyl-1-pyrroline ในต้นข้าวของคณะผู้วิจัยกลุ่มนี้ ยังได้พบอีกว่า N ในวง pyrroline ของ 2-acetyl-1-pyrroline นั้นมาจาก N ของกรดอะมิโน proline (Pro) แต่ C ในส่วนของ acetyl group นั้นไม่ใช่ C ใน carbonyl group ของ proline ดังแสดงในรูป 2.4 นอกจากนี้การพบ 2-acetyl-1-pyrroline ในพืชอื่นๆ เช่น ในใบของเตยพันธุ์หอม (*Pandanus amaryllifolius* Roxb)^[3,26] และในใบและดอกชมนาด (*Vallaris glabra* Ktze)^[26] ก็นับเป็นอีกแหล่งข้อมูลที่สามารถสนับสนุนการเกิดขึ้นตามธรรมชาติในพืชของ 2-acetyl-1-pyrroline ได้เป็นอย่างดี



รูป 2.4 แนวทางของปฏิกิริยาการเกิด 2AP จาก proline ที่แสดงให้เห็นว่า N จาก 2AP นั้นมาจาก N ในโมเลกุลของ proline

การศึกษารสหอมในข้าวในระยะแรกนั้น^[27-30] เน้นการศึกษาในข้าวที่หุงสุก วิธีการทางเคมีที่ประยุกต์ใช้สำหรับเทคนิคการสกัดสารระเหยจากเมล็ดข้าว จึงจำกัดอยู่ที่เทคนิคการกลั่นด้วยไอน้ำ พบว่าข้าวพันธุ์ต่างๆ ที่ได้นำมาศึกษานั้นมีปริมาณ 2-acetyl-1-pyrroline ที่แตกต่างกันไป แม้แต่ข้าวพันธุ์เดียวกันที่ศึกษาโดยนักวิจัยคนละกลุ่ม พบว่ามีปริมาณความเข้มข้นของ 2-acetyl-1-pyrroline ในเมล็ดข้าวไม่เท่ากัน ซึ่งสาเหตุหนึ่งน่าจะเกิดจากความคลาดเคลื่อนของขั้นตอนและวิธีการในการวิเคราะห์ในแต่ละห้องปฏิบัติการ แต่อย่างไรก็ตามยังมีสาเหตุที่สำคัญอีกหลายประการ เช่น ลักษณะเมล็ด อายุ และวิธีการเก็บบรรจุที่แตกต่างกัน ซึ่งเป็นปัจจัยที่พบต่อมาภายหลังว่ามีบทบาทสำคัญที่ทำให้ความเข้มข้นของสารหอมหรือสารระเหยอื่นๆ ในเมล็ดข้าวพันธุ์เดียวกันจาก

แหล่งที่ปลูกเดียวกันนั้นมีความแตกต่างกันออกไปได้^[31,32] นอกจากนี้สภาวะของการเพาะปลูก เช่น ลักษณะพื้นที่ สภาพดิน น้ำ อุณหภูมิ ความชื้น และความเข้มแสง ก็น่าจะเป็นปัจจัยที่มีผลกระทบต่อปริมาณสารหอมในข้าวเช่นกัน

เทคนิคการตรวจวัดปริมาณความหอมในข้าว เพื่อประเมินคุณภาพความหอมของเมล็ดข้าวเท่าที่ได้มีรายงานมาจนถึงปัจจุบันนั้น เน้นการวิเคราะห์ปริมาณของ 2-acetyl-1-pyrroline เป็นหลัก ขั้นตอนการวิเคราะห์สารนี้ที่เป็นที่ยอมรับในแวดวงวิชาการนั้นใช้วิธีทางเคมี โดยส่วนใหญ่เริ่มจากการสกัดสารหอมจากเมล็ดข้าว จากนั้นวิเคราะห์สารสกัดด้วยเครื่องมือทางเคมีวิเคราะห์เครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณสารหอมที่ได้รับความนิยมเป็นส่วนใหญ่คือ gas chromatograph (GC) เนื่องจาก GC เป็นเทคนิคที่เน้นการวิเคราะห์สารระเหยโดยเฉพาะ อย่างไรก็ตามความสำคัญของวิธีการในการวิเคราะห์ทางเคมีมักจะอยู่ที่ขั้นตอนในการสกัดสารจากตัวอย่าง และการเตรียมสารสกัดก่อนการวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือเป็นส่วนใหญ่

การพัฒนาวิธีการทางเคมีวิเคราะห์สำหรับหาปริมาณ 2-acetyl-1-pyrroline ในเมล็ดข้าวในช่วงยี่สิบปีที่ผ่านมา นั้น จึงมีการเปลี่ยนแปลงโดยเน้นในส่วนของการสกัด 2-acetyl-1-pyrroline จากตัวอย่างข้าวเป็นส่วนใหญ่ เริ่มจากรายงานการวิจัยของ Yajima และคณะ^[33] ซึ่งได้รายงานการศึกษาสารระเหยในข้าวพันธุ์ Koshihikari โดยวิธีการหุงต้มกับน้ำและเก็บไอน้ำที่มีสารระเหยปนออกมามาสกัดต่อไป การทดลองนี้ใช้ภาชนะขนาดใหญ่ 50 ลิตร และใช้ตัวอย่างข้าวครั้งละ 6 กิโลกรัม ทำการทดลองซ้ำ 8 ครั้ง รวมแล้วใช้ข้าวทั้งหมด 48 กิโลกรัม จึงได้สารสกัดที่สามารถนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) และพบว่ามีสารระเหยกว่าร้อยละหนึ่งที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดของข้าวพันธุ์ดังกล่าว คณะนักวิจัยเดิมนี้นี้ต่อมาได้ทำการศึกษาสารระเหยในข้าวหอมพันธุ์ Kaorimai^[34] โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับพันธุ์ Koshihikari ใช้ตัวอย่างข้าว 60 กิโลกรัม จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS พบว่ามีสารระเหยกว่าร้อยละหนึ่งที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดเช่นเดียวกัน และเมื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบในสารสกัดจากข้าวหอมพันธุ์ Kaorimai จะมีองค์ประกอบมากกว่าพันธุ์ Koshihikari แต่ในการศึกษาสารระเหยในข้าวทั้งสองพันธุ์นี้ ยังไม่มีรายงานการค้นพบสารที่มีบทบาทสำคัญต่อความหอมของข้าว

ต่อมาการวิเคราะห์ความเข้มข้นของสาร 2-acetyl-1-pyrroline ในสารสกัดจากเมล็ดข้าว ได้พัฒนามาถึงการใช้เทคนิคการแยกสารแบบการสกัดด้วยไอน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์แบบต่อเนื่อง (steam distillation and continuous extraction) โดยอาจใช้ชุดสกัดสารแบบ Likens-Nickerson^[35] ตามที่ Buttery และคณะ^[2] ได้ทำการศึกษามาแล้ว วิธีนี้ปริมาณข้าวตัวอย่างเมล็ดข้าวที่ใช้ในการสกัดแต่ละครั้งลดลงเหลือ 500 กรัม

การหาปริมาณสาร 2-acetyl-1-pyrroline ในตัวอย่างข้าวหอมต่าง ๆ ได้มีการทดลองขึ้นอีกโดยคณะผู้วิจัยกลุ่มเดียวกัน ใช้วิธีการสกัดสารและเทคนิคการวิเคราะห์แบบเดิม^[36,5] แต่ในการทดลองครั้งหลังนี้ได้มีการเพิ่มประสิทธิภาพการวิเคราะห์ด้วย GC-MS ที่ใช้ capillary column ทำให้ผลการวิเคราะห์ด้วย GC-MS มีประสิทธิภาพและให้สภาพไว (sensitivity) ที่ดีขึ้น จึงสามารถลดปริมาณข้าวตัวอย่างเหลือเพียง 200 กรัม และได้รายงานการวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารหอมใน

พันธุ์ข้าวหอมและพันธุ์ข้าวไม่หอม โดยใช้วิธีสารมาตรฐานภายในที่มี collidine (2,4,6-trimethyl pyridine) เป็นสารมาตรฐานภายใน พบว่าข้าวหอมที่ยังไม่ได้ขัดสี จะมีปริมาณ 2-acetyl-1-pyrroline อยู่ในช่วง 0.1–0.2 ppm และข้าวที่ขัดสีแล้ว อยู่ในช่วง 0.04–0.09 ppm แต่ข้าวที่ไม่หอมจะมีปริมาณ น้อยมาก คือในช่วง 0.006–0.008 ppm อย่างไรก็ตามปริมาณตัวอย่างข้าวจำนวน 200 กรัม นั้น นับเป็นปริมาณที่มาก และเป็นอุปสรรคสำหรับนักปรับปรุงพันธุ์ในการผลิตข้าวเพื่อทดสอบความ หอม

Tanchotikul และ Hsieh^[37] ได้ปรับปรุงอุปกรณ์การสกัดสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline จากในเมล็ดข้าว โดยใช้เทคนิคเดิมคือการสกัดด้วยไอน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์แบบต่อเนื่อง แต่ ได้ดัดแปลงชุดสกัดสารแบบ Likens–Nickerson ให้มีขนาดเล็กลงพอเหมาะกับการสกัดสารตัวอย่าง ข้าวในปริมาณ 1 กรัมเท่านั้น เพื่อให้สะดวกแก่นักปรับปรุงพันธุ์ แต่อย่างไรก็ตามสารสกัดที่ได้มี ปริมาณของสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ที่ความเข้มข้นต่ำมาก จึงต้องอาศัยเทคนิควิเคราะห์ที่มี ประสิทธิภาพและความไวสูงขึ้น ได้แก่ เทคนิค selected ion monitoring/high resolution gas chromatography/mass spectrometry (SIM/GC/MS)

วิธีการวิเคราะห์ 2-acetyl-1-pyrroline ในเมล็ดข้าวที่ใช้เทคนิคการสกัดแบบไม่ใช้ความร้อน ได้ถูกพัฒนาขึ้นเป็นครั้งแรกโดย Mahatheeranont และคณะ^[24] เพื่อวิเคราะห์ปริมาณ 2-acetyl-1-pyrroline ในข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ที่เป็นตัวอย่างข้าวสารดิบ (raw rice) จากแหล่งต่างๆ ใน ประเทศไทย การสกัด 2-acetyl-1-pyrroline ใช้หลักของการสกัดด้วยตัวทำละลาย โดยเริ่มจากการ ใช้สารละลายกรดอ่อนสกัดข้าวตัวอย่าง จากนั้นสกัดต่อมาในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น dichloromethane ก่อนการวิเคราะห์ด้วย GC ที่มีตัวตรวจวัดเป็น flame ionization detector (FID) ซึ่งพบว่าเป็นวิธีการที่ให้ประสิทธิภาพการวิเคราะห์ที่ดี สามารถพัฒนาให้สามารถตรวจวัดปริมาณ 2-acetyl-1-pyrroline ในตัวอย่างข้าวสารที่เป็นประเภทข้าวหอมได้โดยใช้ปริมาณตัวอย่างน้อยที่สุด เพียง 0.1 กรัม หากใช้คอลัมน์ชนิดที่มีความจำเพาะกับการวิเคราะห์สารในกลุ่มเอมีน (CP-WAX 51 for amine) แต่โดยทั่วไปแล้วปริมาณตัวอย่างข้าวที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 1-10 กรัม การศึกษานี้ พบว่าตัวอย่างข้าวกล้องข้าวกล้องพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ที่ใช้ทดลองมีปริมาณความเข้มข้นของสาร หอม 2-acetyl-1-pyrroline ประมาณ 0.3 ppm นอกจากนี้ผลการวิจัยยังได้ชี้ให้เห็นว่า 2-acetyl-1-pyrroline ในเมล็ดข้าวไม่ได้เกิดจาก Maillard Reaction หรือปฏิกิริยาออกซิเดชันในระหว่าง ขั้นตอนการสกัดตามที่มีกลุ่มนักวิจัยก่อตั้งข้อสังเกตไว้ เพราะการสกัดด้วยสารละลายทำให้อุณหภูมิ ห้อย และวิธีการสกัดด้วยสารละลายกรดยังเป็นวิธีที่ได้พัฒนาขึ้นเพื่อให้การเตรียมตัวอย่างมีความ สะดวก รวดเร็วกว่าวิธีการกลั่นด้วยไอน้ำซึ่งเป็นวิธีที่เคยได้รับความนิยมมาก่อน ทั้งที่มีข้อเสียในแง่ การสลายตัวของสารเมื่อได้รับความร้อนและมักใช้เวลาในขั้นตอนการกลั่นด้วยไอน้ำนานกว่า 3 ชั่วโมง

อย่างไรก็ตามวิธีการทางเคมีในการตรวจวัดและหาปริมาณ 2-acetyl-1-pyrroline ใน ตัวอย่างเมล็ดข้าว นั้น น่าจะได้มีการพัฒนาไปอีกจนได้วิธีการที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น และสามารถ นำมาประยุกต์ใช้ได้ดีกับความต้องการในการวิเคราะห์ตัวอย่างข้าวจำนวนมาก เช่น ในพันธุ์ข้าว

ลูกผสมที่ได้จากกระบวนการปรับปรุงพันธุ์ข้าว โครงการวิจัยนี้จึงได้วางแนวทางการวิจัยเพื่อพัฒนาวิธีการตรวจวัดและหาปริมาณสารหอมในข้าว วิธีการทางเคมีที่ได้มีการพัฒนาขึ้นแบ่งเป็น 3 วิธีดังนี้:

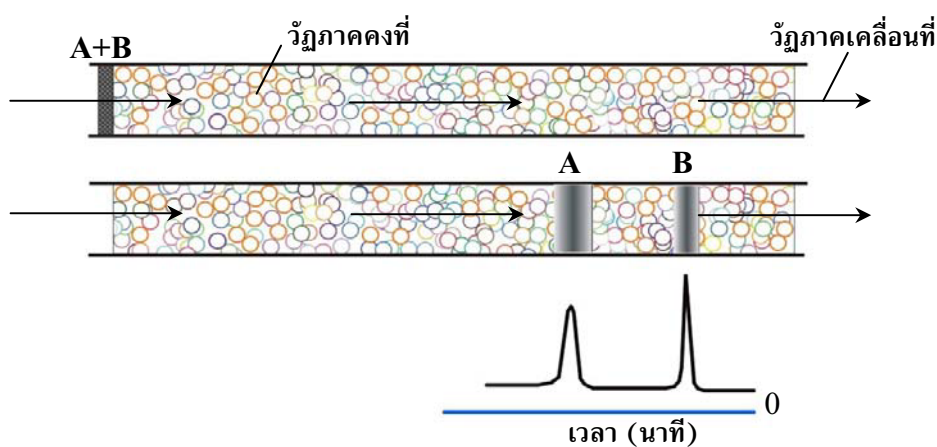
1. การพัฒนาวิธีการที่มีอยู่เดิมให้มีประสิทธิภาพในการตรวจวัดและหาปริมาณ 2-acetyl-1-pyrroline ในตัวอย่างข้าวได้ดีขึ้น โดยเน้นวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายและวิเคราะห์ด้วย GC ที่มีตัวตรวจวัดเป็น FID (รายละเอียดในบทที่ 4)
2. การพัฒนาวิธีการใหม่ที่ประยุกต์เทคนิคการสกัดควบคู่กับการวิเคราะห์ที่มีศักยภาพ และยังไม่ได้มีรายงานการนำมาประยุกต์ใช้กับการตรวจวัดและหาปริมาณ 2-acetyl-1-pyrroline ในตัวอย่างข้าว ได้แก่ การวิเคราะห์สารระเหยในสภาวะก๊าซเหนือตัวอย่าง (headspace) โดยตรงด้วยเทคนิค headspace sampling ที่ต่อควบกับ GC (Headsapce Gas Chromatography : HS-GC) แบ่งเป็น 2 วิธีการย่อย
 - 2.1 Automated static headspace GC-FID
 - 2.2 Solid-phase microextraction (dynamic headspace) และ GC-FID
 (รายละเอียดในบทที่ 5)
3. การพัฒนาวิธีการทางเคมีอย่างง่ายในการตรวจวัดและหาปริมาณ 2-acetyl-1-pyrroline ในตัวอย่างข้าว โดยใช้หลักการของ colorimetry ที่อาศัยการเกิดปฏิกิริยาของสารที่สนใจ (2-acetyl-1-pyrroline) กับรีเอเจนต์ที่เติมเข้าไป เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีสี จากนั้นวัดความเข้มของสีที่เกิดขึ้นและเทียบมาเป็นปริมาณของ 2-acetyl-1-pyrroline ในตัวอย่างได้ (รายละเอียดในบทที่ 6)

บทที่ 3

หลักการของเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี (gas chromatography)

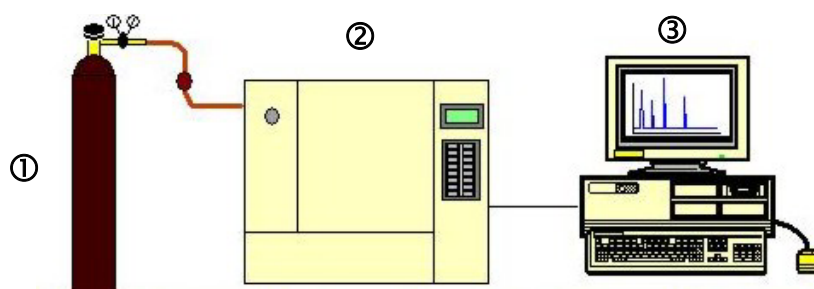
แก๊สโครมาโทกราฟี (GC) นับเป็นเทคนิคที่มีความเหมาะสมที่สุดในการใช้แยกและวิเคราะห์องค์ประกอบสารที่มีคุณสมบัติเป็นระเหยในสารสกัด และเนื่องจากสารให้กลิ่นส่วนใหญ่จัดเป็นสารระเหย เทคนิค GC จึงถูกเลือกใช้เพื่อศึกษาเกี่ยวกับสารหอมในข้าวมาจนถึงปัจจุบัน จากที่ได้กล่าวมาแล้วว่าสารสกัดที่ได้จากการสกัด 2AP จากตัวอย่างข้าวนั้น ไม่ได้มี 2AP เป็นองค์ประกอบเดียวในสารสกัดนั้น องค์ประกอบอินทรีย์อื่นๆ ในเมล็ดข้าวก็นำมาถูกสกัดออกมาได้เช่นกัน ดังนั้นสารสกัดดังกล่าวจะต้องผ่านขั้นตอนการแยกองค์ประกอบก่อนที่จะสามารถวิเคราะห์หาโครงสร้างและปริมาณของสารที่สนใจได้

GC เป็นรูปแบบหนึ่งของกระบวนการแยกสารทางโครมาโทกราฟี โดยที่โครมาโทกราฟีทุกรูปแบบเกี่ยวข้องกับการแพร่กระจาย (distribution) หรือการแบ่งส่วน (partition) ของโมเลกุลของสารประกอบใดๆ ในวัฏภาค (phase) ที่แตกต่างกันสองวัฏภาค วัฏภาคหนึ่งเป็นวัฏภาคคงที่ (stationary phase) และอีกวัฏภาคหนึ่งเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) การแพร่กระจายหรือการแบ่งส่วนของโมเลกุลของสารประกอบใดๆ ระหว่างวัฏภาคทั้งสองจะแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับแรงกระทำหรือการละลายสัมพัทธ์ (relative solubility) ของสารนั้นในแต่ละวัฏภาค เมื่อสารประกอบในของผสมที่ต้องการแยกองค์ประกอบเคลื่อนที่ผ่านวัฏภาคคงที่ โดยมีวัฏภาคเคลื่อนที่นำพาไป สารประกอบแต่ละตัวจะถูกเหนี่ยวนำด้วยแต่ละวัฏภาคมากน้อยแตกต่างกันไป และเนื่องจากสารประกอบแต่ละตัวนั้นมีแรงกระทำต่อวัฏภาคทั้งสองวัฏภาคแตกต่างกัน จึงทำให้สารประกอบแต่ละตัวนั้นเคลื่อนที่ไปตามวัฏภาคเคลื่อนที่ในอัตราเร็วที่ต่างกัน เช่นจากรูป 3.1 สาร A สามารถเกิดแรงกระทำกับวัฏภาคคงที่ได้ดีกว่าสาร B สาร A จึงเคลื่อนที่ไปตามวัฏภาคเคลื่อนที่ในอัตราเร็วที่ต่ำกว่าสาร B การที่สาร A และ B มีการเคลื่อนที่ที่ต่างกันนี้ จึงทำให้สาร A และ B แยกออกจากกันได้



รูป 3.1 การแยกของสารผสม A และ B ในระบบโครมาโทกราฟี

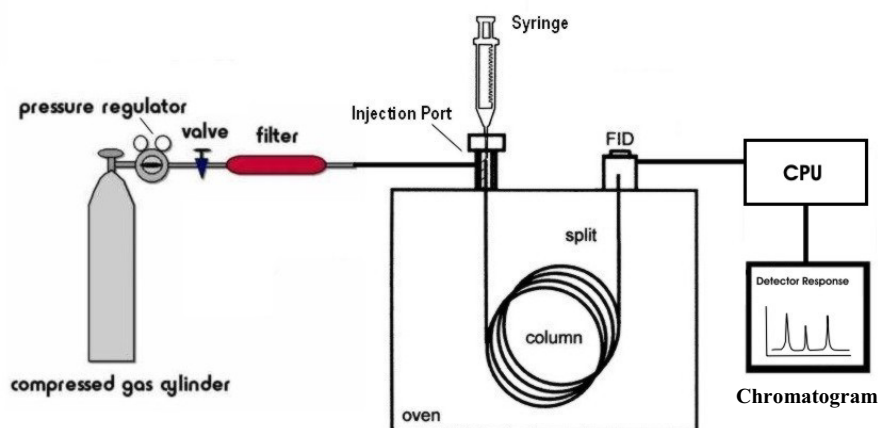
เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ มีองค์ประกอบพื้นฐานแบ่งเป็น 3 ส่วน ส่วนแรกเป็นถังบรรจุแก๊สพา (carrier gas) ที่ทำหน้าที่เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ส่วนที่สองเป็นห้องควบคุมอุณหภูมิ (oven) ที่มีช่องฉีดสาร (injection port) คอลัมน์ และตัวตรวจวัด (detector) ติดตั้งอยู่ภายในพร้อมตัวควบคุมอุณหภูมิ และส่วนสุดท้ายเป็นระบบเก็บและประมวลผลข้อมูล (data processing and storage) ดังแสดงในรูป 3.2



รูป 3.2 ส่วนประกอบหลักของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ

แผนภาพในรูป 3.3 แสดงรายละเอียดของระบบ GC ที่ชัดเจนขึ้น การแยกองค์ประกอบด้วยเครื่อง GC เริ่มจากแก๊สพา (carrier gas) ซึ่งทำหน้าที่เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ไหลออกจากถังบรรจุแก๊ส (compressed gas cylinder) ความดันของแก๊สที่ออกจากถังถูกควบคุมด้วยตัวปรับความดัน (pressure regulator) เมื่อเปิดวาล์ว (valve) แก๊สจะไหลผ่านตัวกรอง (filter) เพื่อกำจัดความชื้นและสิ่งเจือปนอื่นๆ ก่อนที่จะเข้าสู่ห้องควบคุมอุณหภูมิ (oven) ทางช่องฉีดสาร (injection port)

เมื่อสารตัวอย่างถูกฉีดเข้าไปในช่องฉีดสาร (injection port) โดยใช้กระบอกฉีด (syringe) ชนิดที่มีเข็มฉีดปลายแหลม สารตัวอย่างที่สามารถระเหยได้ในอุณหภูมิที่กำหนดจะถูกทำให้อยู่ในสถานะแก๊สในช่องฉีดสารซึ่งตั้งอุณหภูมิไว้สูงกว่าจุดเดือดของสารทุกตัวที่ต้องการวิเคราะห์ จากนั้นสารตัวอย่างในสถานะก๊าซรวมถึงตัวทำละลายหรือสิ่งเจือปนที่ระเหยได้ จะถูกพาให้ไหลเข้าไปในคอลัมน์ (column) ด้วยแก๊สพาที่ไหลเข้ามาอยู่ตลอดเวลา โมเลกุลของสารในสถานะก๊าซจะผ่านเข้าไปในคอลัมน์และเกิดการแยกชั้น เนื่องจากเวลาในการเคลื่อนที่บนคอลัมน์ของสารแต่ละตัวนั้นไม่เท่ากันดังที่กล่าวมา เมื่อออกจากคอลัมน์สารแต่ละตัวจะถูกพาเข้าสู่ตัวตรวจวัด (detector: FID) หากเครื่อง GC ที่ใช้มีตัวตรวจวัด 2 ชนิด แก๊สพาและสารที่ออกจากคอลัมน์จะถูกทำให้แยกเป็น 2 ทางด้วยตัวแยก (split) ไปยังตัวตรวจวัดแต่ละตัวพร้อมๆ กัน สัญญาณที่ผลิตจากตัวตรวจวัดจะถูกส่งต่อไปยังเครื่องประมวลผลและเก็บข้อมูล (CPU) และแสดงผลออกมาในเป็นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลา บนแกน X กับปริมาณสัญญาณ (signal) ที่ได้จากตัวตรวจวัดที่แต่ละเวลาบนแกน Y กราฟดังกล่าวเรียกว่า “โครมาโทแกรม” (chromatogram)



รูป 3.3 รายละเอียดขององค์ประกอบของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

การประยุกต์เทคนิค GC เพื่อการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและปริมาณของสารใด ๆ อย่างมีประสิทธิภาพนั้น สภาวะของส่วนประกอบต่างๆ ของเครื่องจะต้องถูกตั้งไว้อย่างเหมาะสม ซึ่งจำเป็นต้องมีความเข้าใจถึงหน้าที่ของส่วนประกอบที่สำคัญของเครื่อง GC ดังต่อไปนี้

- ♦ แก๊สพา (carrier gas)

แก๊สพาทำหน้าที่เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่พาสารตัวอย่างที่ถูกทำให้เป็นไอหรืออยู่ในสถานะแก๊สเคลื่อนที่จากส่วนฉีดสาร (injection port) เข้าสู่คอลัมน์ ในระบบ GC นั้นจะต้องมีการควบคุมอัตราการไหลของแก๊สพาให้คงที่เสมอ เครื่อง GC ปัจจุบันมักมีระบบควบคุมอัตราการไหลของแก๊สแต่ละชนิดแบบอัตโนมัติ (flow controller) แก๊สพาที่ใช้กันโดยทั่วไป ได้แก่ ไนโตรเจน ฮีเลียม อาร์กอน หรือ ไฮโดรเจน โดยแก๊สเหล่านี้มีสมบัติที่เหมาะสมคือ เป็นแก๊สเฉื่อย ไม่เกิดปฏิกิริยากับสารตัวอย่างหรือตัวทำละลายหรือเฟสคงที่ เป็นแก๊สที่มีการแพร่ต่ำและมีมวลโมเลกุลต่ำ ราคาไม่แพง สามารถจัดหาได้ง่ายและมีความบริสุทธิ์สูง และที่สำคัญที่สุดคือ ต้องเป็นแก๊สที่เหมาะสมสำหรับใช้กับตัวตรวจวัด (detector) ที่ต้องการได้

- ♦ คอลัมน์ (column)

คอลัมน์เป็นส่วนที่สำคัญที่สุดในการแยกสารด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี ภายในคอลัมน์มีวัฏภาคคงที่บรรจุอยู่ โดยวัฏภาคคงที่ที่มีสถานะเป็นได้ทั้งของแข็งและของเหลว การบรรจุวัฏภาคคงที่ไว้ในคอลัมน์มีหลายลักษณะด้วยกัน อย่างไรก็ตามเมื่อไอของสารผสมของสารตัวอย่างถูกพาเข้ามาในคอลัมน์ที่ปลายด้านหนึ่งซึ่งต่ออยู่กับช่องฉีดสาร (injection port) การแยกจะเกิดขึ้นในคอลัมน์เนื่องจากอัตราการเคลื่อนที่ตามการไหลของแก๊สพาที่แตกต่างกันของสารแต่ละชนิด ส่วนปลายอีกด้านหนึ่งของคอลัมน์ต่ออยู่กับตัวตรวจวัด คอลัมน์ที่ใช้กันอยู่ทั่วไปใน GC นั้นมี 2 ประเภทคือ

- คอลัมน์แบบแพ็ค (packed column)

แบ่งเป็น 2 ชนิด ตามกลไกการแยกสารหรือสถานะของวัฏภาคคงที่คือคอลัมน์แบบพาร์ทิชัน (partition column) และ คอลัมน์แบบดูดซับ (adsorption column) สำหรับคอลัมน์แบบพาร์ทิชันเป็นคอลัมน์ที่บรรจุด้วยอนุภาคของแข็ง ซึ่งมีสมบัติเฉื่อย (inert solid particle) และฉาบผิวด้วยสารอินทรีย์บางชนิดที่เรียกว่าวัฏภาคของเหลว (liquid phase) ส่วนคอลัมน์แบบดูดซับอีกชนิดหนึ่งเป็นคอลัมน์ที่บรรจุด้วยอนุภาคของสารดูดซับ เช่น อะลูมินา และซิลิกาเจล เป็นต้น

- คอลัมน์แบบคาปิลลารี (capillary column)

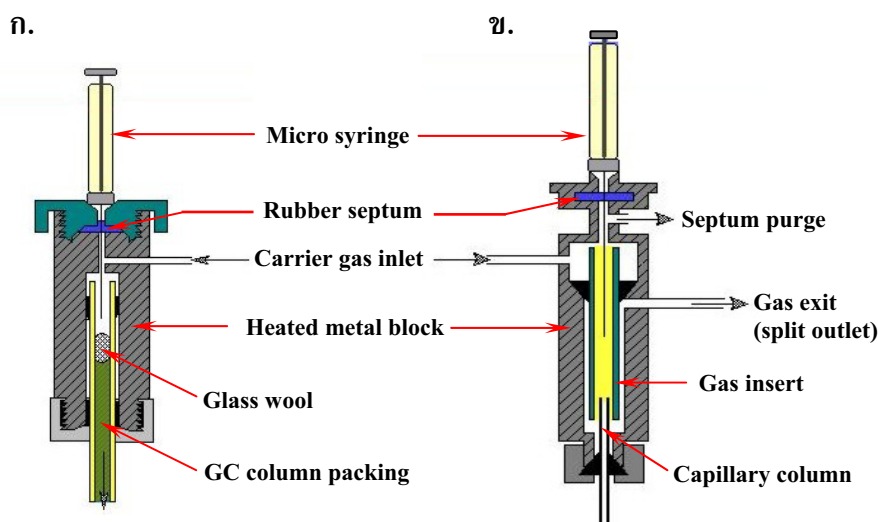
คอลัมน์ชนิดนี้โดยทั่วไปเป็นท่อกลวง ขนาดเล็ก ทำด้วยเหล็กกล้าหรือเหล็กไร้สนิม แก้ว หรือ ควอร์ทซ์ (fused silica) มีเส้นผ่าศูนย์กลางภายในระหว่าง 0.2 - 0.6 มิลลิเมตร ภายในฉาบผิวด้วยวัฏภาคของเหลว (liquid phase) เป็นลักษณะฟิล์มบาง ๆ คอลัมน์ชนิดนี้อาจมีความยาว 15-100 เมตร เพราะมีลักษณะกลวงทำให้การลดทอนของความดันภายในคอลัมน์ ซึ่งจะมีผลต่อประสิทธิภาพการแยกสารนั้นเกิดขึ้นเพียงเล็กน้อย การใช้คอลัมน์ยาวจึงทำให้ประสิทธิภาพในการแยกดีขึ้นด้วย เมื่อใช้สภาวะที่เหมาะสมแล้วคอลัมน์แบบคาปิลลารีจึงเป็นคอลัมน์ที่ให้ประสิทธิภาพในการแยกที่ดีที่สุด

♦ ช่องฉีดสาร (injection port)

การนำสารตัวอย่างเข้าไปในช่องฉีดสารของเครื่อง GC นั้น มีวิธีที่แตกต่างกันไปขึ้นกับสถานะของสารตัวอย่าง เช่น สารตัวอย่างที่เป็นแก๊สจะถูกนำเข้าไปยังช่องฉีดสารด้วยกระบอกฉีดพิเศษสำหรับแก๊ส (gas-tight syringe) ส่วนของแข็งและของเหลวซึ่งต้องทำให้อยู่ในรูปสารละลายก่อน ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีจุดเดือดต่ำและไม่ทำลายคอลัมน์ เช่น dichloromethane, chloroform, propanol และ ethyl acetate เป็นต้น จากนั้นใช้กระบอกฉีดขนาดปริมาตรต่ำ (micro syringe) ที่มีเข็มปลายแหลมนำสารละลายตัวอย่างที่มีปริมาตรแน่นอนเข้าไปในช่องฉีดสาร

ภายในช่องฉีดสารสารตัวอย่างจะถูกทำให้ระเหยกลายเป็นไอด้วยความร้อน จากนั้นแก๊สพาที่ไหลเข้ามาบริเวณส่วนบนของช่องฉีดสาร จะพาเอาไอระเหยของสารตัวอย่างเข้าไปในคอลัมน์ นอกจากหน้าที่หลักนี้แล้วช่องฉีดสารยังสามารถทำหน้าที่กำกับปริมาณสารที่จะถูกพาเข้าไปคอลัมน์ได้ในขณะเดียวกัน ดังนั้นจึงได้มีการออกแบบช่องฉีดสารไว้หลายแบบเพื่อให้เหมาะสมกับปริมาณสารที่คอลัมน์แต่ละแบบสามารถรับได้ ซึ่งหากปริมาณตัวอย่างมากหรือน้อยเกินไป จะทำให้ประสิทธิภาพในการแยกสารของคอลัมน์ลดลงได้ ปริมาณสารตัวอย่างจึงแตกต่างกันไปตามชนิดของคอลัมน์ เช่น คอลัมน์แบบแพ็ค (packed column) มักมีขนาดใหญ่กว่าคอลัมน์แบบคาปิลลารี (capillary column) ช่องฉีดสารที่เหมาะสมกับคอลัมน์ชนิดแพ็คจึงเป็นแบบที่เรียกว่า “On-column injection” (รูป 3.4) โดยที่ปลายด้านหนึ่งของคอลัมน์สอดเข้าไปในปล่องโลหะที่มีตัวให้ความร้อน (heated metal block) ปลายคอลัมน์จึงมีอุณหภูมิสูง ซึ่งอุณหภูมินี้ควรสูงกว่าจุดเดือดของสารที่ต้องการวิเคราะห์ทุกตัว วัฏภาคคงที่ที่มีลักษณะเป็นเม็ดเล็กๆ บรรจุอยู่ในคอลัมน์ (GC column packing) จะถูกปิดกั้นไว้ด้วยเส้นใยแก้ว (glass wool) เพื่อไม่ให้เกิดการฟุ้งกระจายของวัฏภาคคงที่ด้วยแก๊สพาที่ไหลเข้ามาทางช่องด้านบน (carrier gas inlet) เมื่อสารตัวอย่างถูกนำเข้ามาโดย

กระบอกฉีดยาขนาดเล็ก (micro syringe) เข็มของกระบอกฉีดยาเสียบเข้ามาทางด้านบนผ่านแผ่นยาง (rubber septum) และเข้ามาถึงภายในส่วนบนของคอลัมน์ แผ่นยางจะทำหน้าที่กั้นไม่ให้เกิดการรั่วไหลของแก๊สพาและไอของสารตัวอย่าง ออกจากช่องฉีดสาร ทำให้แก๊สพาและไอของสารตัวอย่าง ไหลลงเข้าไปในคอลัมน์ทั้งหมด



รูป 3.4 ระบบฉีดสารของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

ก. On-column injection ข. Split-splitless injection

ในกรณีของคอลัมน์แบบคาปิลลารี ซึ่งเป็นที่นิยมใช้กันมากในปัจจุบันนี้ ปริมาณสารที่สามารถเข้าไปถูกแยกในคอลัมน์ชนิดนี้ได้ บางครั้งมีปริมาณน้อยกว่าระดับไมโครลิตร เนื่องจากคอลัมน์ชนิดนี้มีขนาดเล็ก ความจุน้อย และเส้นผ่าศูนย์กลางของคอลัมน์เล็กกว่าปลายเข็มของกระบอกฉีดยา จึงไม่สามารถนำเข็มฉีดพาสารเข้าไปถึงในส่วนปลายคอลัมน์อย่างเช่นในกรณีของคอลัมน์แบบแพ็คเกจได้ ช่องฉีดสารที่เหมาะสมกับคอลัมน์แบบคาปิลลารีจึงถูกออกแบบให้เป็นชนิดที่เรียกว่า “Split-splitless injection” โดยปลายเข็มของกระบอกฉีดยา (micro syringe) จะถูกเสียบเข้าไปจนถึงส่วนบนของท่อแก้วกลวง (glass insert) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายนอกประมาณ 0.7 เซนติเมตร ความยาวประมาณ 8.0 เซนติเมตร วางไว้ภายในบล็อกโลหะร้อน (heated metal block) ปลายด้านล่างของท่อแก้วกลวงมีปลายของคอลัมน์แบบคาปิลลารีต่ออยู่ โดยปลายของคอลัมน์สูงพ้นปลายของท่อแก้วกลวงขึ้นมาประมาณ 0.5 เซนติเมตร เมื่อสารตัวอย่างถูกนำเข้าไปในช่องฉีดสารด้วยกระบอกฉีดยาขนาดเล็กโดยการเสียบเข็มฉีดผ่านแผ่นยางเข้าไป สารละลายของสารตัวอย่างนั้นจะถูกเปลี่ยนเป็นไอในท่อแก้วกลวงนี้ จากนั้นไอของสารจะถูกแก๊สพาพาให้ไหลลงไปยังปลายด้านล่างของท่อแก้ว เนื่องจากขนาดของคอลัมน์เล็กกว่าขนาดของท่อแก้วกลวงมาก ที่จุดนี้จึงมีช่องว่างให้ไอ

สารตัวอย่างส่วนใหญ่ไหลออกไปผ่านทางช่องทางออก (gas exit) โดยจะมีเพียงไอของสารตัวอย่างปริมาณน้อยเท่านั้นที่ถูกพาเข้าไปในคอลัมน์ อย่างไรก็ตามอัตราส่วนปริมาณของตัวอย่างที่ออกไปนอกระบบและที่เข้าไปในคอลัมน์ สามารถกำกับได้โดยการตั้งค่า สัดส่วนการสปลิต (split ratio) ซึ่งเครื่อง GC ที่ทันสมัยในปัจจุบันมักจะมีการตั้งค่านี้ได้โดยอัตโนมัติผ่านทางโปรแกรมควบคุมเครื่อง ค่าสัดส่วนการสปลิตควรจะมีค่ามากหรือน้อยขึ้นนั้นขึ้นกับความเข้มข้นของสารละลายของสารตัวอย่าง

นอกจากนี้ในช่องฉีดสารแบบ “Split-splitless injection” ก่อนที่แก๊สพาจะไหลเข้าไปในท่อแก้วลงเพื่อนำสารส่วนที่ต้องการเข้าสู่คอลัมน์นั้น แก๊สพาส่วนหนึ่งจะไหลไปทางท่อล้างแผ่นยาง (septum purge) โดยแก๊สพาส่วนนี้จะกวาดเอาไอของสารเจือปนที่ติดมากับแผ่นยางและระเหยออกมาเมื่อแผ่นยางได้รับความร้อนออกไปด้วย

- ♦ ตัวควบคุมอุณหภูมิ (temperature controller)

ในระบบการทำงานของเครื่อง GC จำเป็นที่จะต้องมีการควบคุมอุณหภูมิของส่วนประกอบที่สำคัญ 3 ส่วนด้วยกันคือ

1. อุณหภูมิของช่องฉีดสาร

โดยต้องเลือกหรือกำหนดอุณหภูมิที่สูงกว่าจุดเดือดของสารที่ต้องการจะวิเคราะห์และอาจจะต้องคำนึงถึงการสลายตัวของสารด้วย

2. อุณหภูมิของคอลัมน์

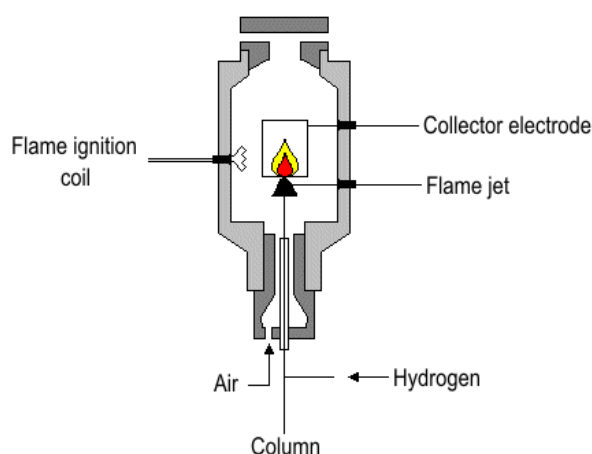
อุณหภูมิของคอลัมน์จะถูกควบคุมโดย oven อุณหภูมิของคอลัมน์มีส่วนสำคัญอย่างมากต่อการแยกสารตัวอย่างหรือ และค่า partition coefficient นั่นคือ ถ้าเพิ่มอุณหภูมิของคอลัมน์ขึ้น จะทำให้องค์ประกอบของสารมีการเคลื่อนที่เร็วขึ้น ช่วยให้เวลาของการวิเคราะห์เร็วขึ้นด้วย ในขณะเดียวกันการทำให้อุณหภูมิของคอลัมน์ลดลงจะช่วยให้การแยกขององค์ประกอบต่าง ๆ ดีขึ้น ดังนั้นจึงควรเลือกใช้อุณหภูมิของคอลัมน์ให้เหมาะสมคือให้การแยกที่ดีและเวลารีเทนชัน (retention time) ไม่นานเกินไป

3. อุณหภูมิของตัวตรวจวัด

โดยทั่วไปอุณหภูมิของ detector ขึ้นอยู่กับชนิดของ detector ที่เลือกใช้ อย่างไรก็ตามอุณหภูมิของ detector จำเป็นที่จะต้องสูงกว่าอุณหภูมิของ injection port และคอลัมน์เพื่อป้องกันการเกิดปัญหาการควบแน่นของตัวอย่างภายใน detector เช่น ตัวตรวจวัดชนิด flame ionization detector (FID) เมื่อมีการเผาไหม้จะมีไอน้ำเกิดขึ้น เพื่อป้องกันการเกิดการกลั่นตัวของไอน้ำควรจะต้องตั้งอุณหภูมิของ detector ให้สูงกว่า 100 °C เสมอ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อสารตัวอย่างเป็นพวกสารประกอบของคลอรีน ผลจากการเผาไหม้จะก่อให้เกิดการผุกร่อนได้ง่าย สภาพผิวของ detector จะเสียไปด้วย บางครั้งสารประกอบพวกที่มีโมเลกุลใหญ่ ๆ การเผาไหม้ไม่ค่อยสมบูรณ์ ทำให้เกิดเขม่าอุดตันภายในเฟลมเจต (flame jet) ได้ จึงต้องใช้อุณหภูมิของ detector ให้สูงขึ้นเพื่อให้เกิดการเผาไหม้เกิดสมบูรณ์

- ♦ ตัวตรวจวัด (detector)

เป็นส่วนที่ใช้สำหรับตรวจวัดสารแต่ละชนิดที่ถูกแยกออกจากคอลัมน์ detector มีอยู่หลายชนิด ดังนั้นจึงสามารถประยุกต์ใช้ให้เหมาะสมกับกลุ่มสารที่สนใจได้ ในงานวิจัยนี้ได้ใช้ detector แบบเฟลมไอออไนเซชัน (flame ionization detector, FID) ซึ่งเป็น detector ที่ใช้กันกว้างขวางในการตรวจหาพวกสารประกอบอินทรีย์ทั่วไป ตัวตรวจวัดแบบ FID มีแก๊สไฮโดรเจนเป็นเชื้อเพลิง ส่วนประกอบของ FID แสดงในรูป 3.5 จากรูปแก๊สไฮโดรเจนและแก๊สพาจากคอลัมน์จะไหลมารวมกันและไหลเข้าไปในตัวตรวจวัดโดยผ่านขึ้นไปทางเฟลมเจต (flame jet) และจะถูกจุดติดไฟด้วยขดลวดไฟฟ้า (flame ignition coil) ซึ่งอยู่ใกล้ ๆ กับเฟลมเจต ส่วนอากาศที่ผ่านเข้าไปทำหน้าที่สองอย่าง คือ ช่วยการเผาไหม้ของไฮโดรเจนและช่วยพาให้แก๊สที่เผาไหม้แล้วไหลออกไปกับแก๊สพา เมื่อสารตัวอย่างที่ออกมาจากคอลัมน์เข้าสู่เปลวไฟจะทำให้สารเหล่านั้นเกิดไอออนไนเซชัน (ionization) ได้เป็นอิเล็กตรอนและไอออนบวก อิเล็กตรอนจะวิ่งไปยังเฟลมเจต ส่วนไอออนบวกจะเคลื่อนที่ไปยังอิเล็กโทรด (collector electrode) เกิดเป็นสัญญาณขึ้น และถูกส่งต่อไปยังอิเล็กโทรมิเตอร์ที่ทำหน้าที่บันทึกสัญญาณ จากนั้นระบบจะทำการประมวลผลด้วยคอมพิวเตอร์ต่อไป



รูป 3.5 ตัวตรวจวัดสัญญาณแบบ FID

- ♦ ระบบสั่งการ เก็บข้อมูล และประมวลผล

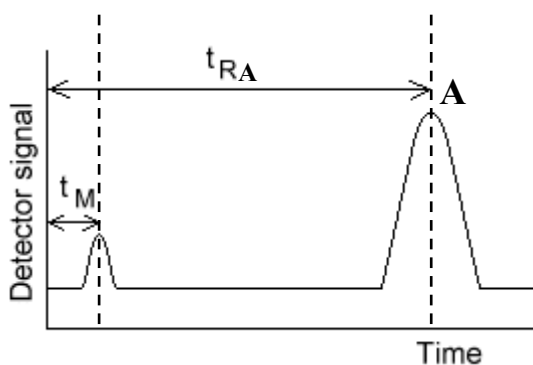
ปัจจุบันระบบคอมพิวเตอร์ถูกนำมาใช้เพื่อการควบคุมการทำงาน เก็บบันทึกสัญญาณและประมวลผลในเวลาเดียวกัน โดยมีโปรแกรมเฉพาะเพื่อควบคุมการทำงานทั้งหมด ดังนั้นในการวิเคราะห์สารตัวอย่างโดยใช้เทคนิค GC จึงสามารถตั้งสภาวะต่าง ๆ ของการวิเคราะห์ผ่านโปรแกรมดังกล่าว เมื่อสภาวะของเครื่อง GC พร้อมต่อการทำงานแล้วจึงนำสารตัวอย่างไปฉีดเข้าที่ injection port หรือบางครั้งอาจใช้ระบบการฉีดสารแบบอัตโนมัติ ซึ่งควบคุมการทำงานผ่านโปรแกรมคอมพิวเตอร์ได้เช่นกัน ซึ่งการฉีดสารแบบอัตโนมัตินี้จะช่วยลดข้อผิดพลาดที่อาจเกิดจากความไม่

แม่นยำในการวัดปริมาตรสารหรือการเริ่มจับเวลาของการวิเคราะห์ตัวอย่างของผู้ใช้ลงได้ นอกจากนี้เมื่อการแยกและวิเคราะห์สารตัวอย่างหนึ่งๆ เสร็จสิ้นลง ระบบคอมพิวเตอร์สามารถปรับสถานะของเครื่อง GC ให้พร้อมสำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างถัดไปได้ในทันที ในขณะที่สัญญาณจากตัวตรวจจับได้ถูกบันทึกไว้ พร้อมสำหรับการสั่งให้ประมวลผลได้ทันที

โครมาโทแกรม (Chromatogram)

เวลาที่สารแต่ละชนิดใช้ไปในการเคลื่อนที่จากจุดเริ่มต้นถึงจุดสุดท้าย บนวัฏภาคคกะนั้นนั้น แตกต่างกันไปตามลักษณะโครงสร้างทางเคมีของสารแต่ละชนิด และเป็นค่าเฉพาะของสารแต่ละตัว เรียกเวลานี้ว่าเวลาริเทนชัน (retention time: t_R) ซึ่งมักมีหน่วยเป็นนาที ค่า t_R นี้จึงเป็นค่าที่ใช้ในการระบุโครงสร้างทางเคมีของสารที่สนใจได้ โดยการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลหรือกับเวลาริเทนชันของสารมาตรฐาน ทำให้เราสามารถบอกได้ว่าองค์ประกอบที่ถูกแยกออกมาชิ้นตัวไหนเป็นสารอะไร

ผลที่ได้จากการแยกองค์ประกอบด้วยเทคนิค GC หรือที่เรียกว่า “GC chromatogram” มีลักษณะเป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลา (t) ของการเคลื่อนที่ของสารบนแกน X และปริมาณของสัญญาณที่ได้จากตัวตรวจจับ ณ เวลาหนึ่งๆ บนแกน Y จากตัวอย่าง GC chromatogram ที่แสดงในรูป 3.6 เวลาริเทนชันของสาร A (t_{RA}) คือ เวลาที่สาร A ใช้ไปในการเคลื่อนที่จากจุดเริ่มต้นถึงจุดสุดท้ายบนวัฏภาคคกะนั้นหรือคอลัมน์นั่นเอง ส่วน t_M หรือ เวลาริเทนชันของแก๊สพา คือเวลาที่แก๊สพาใช้ในการเคลื่อนที่ดังกล่าว เนื่องจากระหว่างที่สารเคลื่อนที่ผ่านวัฏภาคคกะนั้น จะเกิดการแพร่กระจายของโมเลกุลของสารเสมอ ทำให้ขนาดของพื้นที่ของกลุ่มโมเลกุลของสารขยายออกตามแนวของคอลัมน์ โดยมีความหนาแน่นของโมเลกุลที่ศูนย์กลางมากที่สุดดังแสดงในรูป 3.1 เมื่อโมเลกุลของสารนี้ออกจากส่วนปลายของคอลัมน์เข้าสู่ตัวตรวจจับ จะทำให้ปรากฏสัญญาณออกมาเป็นช่วงเวลา และกราฟที่ได้มีลักษณะที่เรียกว่า “พีค” (peak) ค่าเฉลี่ยของเวลาจากจุดเริ่มต้นที่เห็นสัญญาณของสาร กับเวลาสุดท้ายที่เห็นสัญญาณจะเป็นค่าประมาณกึ่งกลางของพีค และเป็นจุดที่เห็นสัญญาณบนแกน Y มากที่สุด จึงเป็นจุดที่ใช้อ่านค่าเวลาริเทนชันของสาร



รูป 3.6 GC Chromatogram

ปริมาณของสัญญาณที่ได้จากตัวตรวจวัดบนแกน Y มีค่ามากหรือน้อยขึ้นอยู่กับปริมาณหรือความเข้มข้นของสารที่ถูกตรวจวัดในขณะนั้นๆ ทำให้เราสามารถเทียบหาปริมาณหรือความเข้มข้นของสารใดๆ จากความสูงของสัญญาณบนแกน Y ที่จุดกึ่งกลางของพีคของสารนั้นได้ อย่างไรก็ตามเนื่องจากสัญญาณของตำแหน่งสารนั้นแสดงออกมาเป็นลักษณะพีค ที่บางครั้งอาจมีความสูงแตกต่างกันไปได้ในแต่ละการทดลองทั้งที่เป็นสารชนิดเดียวกันและมีปริมาณเท่ากัน ทั้งนี้เนื่องจากโมเลกุลของสารมีการแพร่กระจายในคอลัมน์มากน้อยไม่เท่ากัน ดังนั้นที่สภาวะการทดลองหนึ่ง เวลาที่เราริเทนชันแสดงออกมาเป็นช่วงกว้าง (การแพร่กระจายของโมเลกุลสารมีมาก) ความสูงของพีคของสารก็จะลดลงไปด้วย ในขณะที่อีกสภาวะการทดลองหนึ่งให้เวลาเราริเทนชันของสารเดียวกันนี้เป็นช่วงแคบ ความสูงของพีคของสารก็จะเพิ่มขึ้นเนื่องจากจำนวนโมเลกุลของสารมีค่าเท่าเดิม การวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารจึงมักนิยมใช้ค่าพื้นที่ใต้พีค (area under peak หรือ peak area) ของสารนั้นแทนความสูงของพีค

ในการระบุแต่ละองค์ประกอบที่แยกได้จากเทคนิค chromatography เป็นสารใดนั้นส่วนใหญ่ต้องมีสารมาตรฐานชนิดเดียวกันนั้นมาวิเคราะห์เปรียบเทียบ โดยอาศัยหลักที่ว่าสารชนิดเดียวกันจะให้ค่า t_R เท่ากันเสมอเมื่อใช้สภาวะของระบบ GC เดียวกัน ดังนั้นหากทราบค่า t_R ของสารประกอบแต่ละชนิด ก็สามารถนำมาระบุโครงสร้างทางเคมีขององค์ประกอบได้ แต่เนื่องจากบางครั้งพีคของสารบน chromatogram นั้นมีขนาดกว้าง (broad) ซึ่งจะทำให้ความแม่นยำของค่า t_R ลดลงได้ เทคนิค GC ที่มีเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ (Mass Spectrometer: MS) เป็นตัวตรวจวัดจึงเป็นเทคนิคที่นิยมใช้ เนื่องจากการระบุโครงสร้างขององค์ประกอบใช้เทียบจากข้อมูล mass spectrum ที่มีความแม่นยำกว่าการใช้ค่า t_R อย่างเดียว การระบุโครงสร้างทางเคมีขององค์ประกอบใดๆ โดยมีข้อมูลทั้งค่า t_R และ mass spectrum จะทำให้การยืนยันโครงสร้างขององค์ประกอบนั้นๆ แน่แน่นอนขึ้น

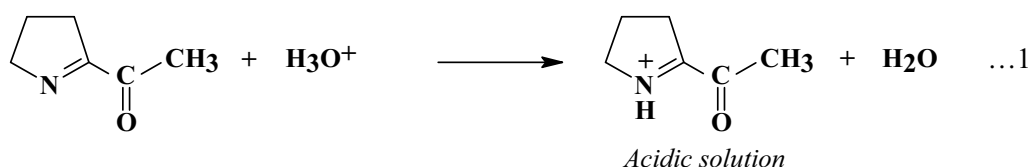
อย่างไรก็ตามวิธีการวิเคราะห์เชิงปริมาณของสาร 2AP ในตัวอย่างข้าวที่จะกล่าวในรายละเอียดต่อไปนั้น ไม่ได้ใช้ MS ตัวตรวจวัดของเทคนิค GC เนื่องจากเครื่อง GC-MS ส่วนใหญ่มีราคาแพงกว่าเครื่อง GC ที่มีตัวตรวจวัดแบบอื่น และที่สำคัญ MS เป็นตัวตรวจวัดที่บางครั้งให้สภาพไวต่ำกว่าตัวตรวจวัดของ GC บางตัว หลักการและรายละเอียดเกี่ยวกับเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์จึงจะไม่กล่าวถึงในที่นี้ วิธีการวิเคราะห์ 2AP ในตัวอย่างข้าวในเชิงปริมาณของงานวิจัยนี้ จึงเลือกใช้ flame ionization detector (FID) เป็นตัวตรวจวัดสำหรับเทคนิค GC เนื่องจากเป็นตัวตรวจวัดชนิดทั่วไป (general detector) เหมาะสำหรับการวิเคราะห์สารอินทรีย์ทุกประเภท (non-selective detector) นอกจากนี้ FID ยังให้ขีดจำกัดของการตรวจวัดสารได้ต่ำถึง 100 pg

บทที่ 4

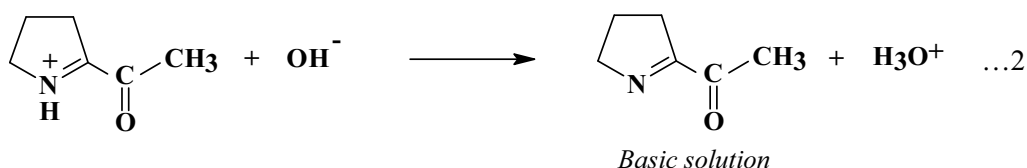
การหาปริมาณ 2AP โดยวิธีการสกัด ด้วยตัวทำละลายและวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-FID

หลักการของการสกัด

สาร 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) มีคุณสมบัติเป็นสารประเภทมีขั้ว (polar compound) และเนื่องจากมีหมู่ฟังก์ชัน $-N=$ อยู่ในโมเลกุล จึงแสดงฤทธิ์เป็นเบสอ่อน ดังนั้น 2AP จึงสามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายชนิดมีขั้วและมีสมบัติเป็นกรดอ่อน ซึ่งในสารละลายกรดอ่อนนี้ 2AP อยู่ในสารละลายในรูปของไอออนบวก ดังสมการ



ในระหว่างการสกัดเมล็ดข้าว 2AP ที่พันธะอยู่กับองค์ประกอบเคมีอื่นๆ ในเมล็ดข้าวจะถูกดึงออกมาให้ละลายอยู่ในสารละลายกรดอ่อนในสภาพไอออนบวก และจะถูกทำให้คงสภาพอยู่ในสารละลายได้เป็นเวลานานพอสมควรโดยไม่สลายไปเป็นสารอื่น เมื่อการสกัดดำเนินไปจนคาดว่า 2AP ส่วนใหญ่ถูกดึงออกจากตัวอย่างมาอยู่ในสารละลายแล้ว นำสารละลายกรดที่ได้มาสกัดต่อด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ก่อนการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC เนื่องจากน้ำเป็นตัวทำละลายที่ไม่เหมาะสมกับคอลัมน์ของ GC นอกจากนี้ความเข้มข้นของ 2AP ในสารละลายที่สกัดได้ในขั้นนี้จะต่ำมากและไม่เพียงพอต่อการตรวจวัดด้วยเครื่อง GC จึงต้องระเหยตัวทำละลายออกไปจนได้ความเข้มข้นของ 2AP ในสารสกัดที่เหมาะสมต่อการตรวจวิเคราะห์ ในกรณีนี้จึงต้องเลือกตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมและสามารถละลาย 2AP ได้ดี รวมทั้งต้องมีจุดเดือดต่ำต่อการกำจัดด้วยวิธีระเหย อย่างไรก็ตามก่อนนำตัวทำละลายอินทรีย์มาสกัด 2AP จากสารละลายกรด ต้องทำสารละลายให้มีฤทธิ์เป็นกลางหรือเป็นเบสเล็กน้อย เพื่อดึงโปรตอน (H^+) ออกจากไอออนของ 2AP ทำให้โมเลกุลของ 2AP กลับมาอยู่ในสภาพโมเลกุลปกติที่ไม่มีขั้ว (สมการ 2) ดังนั้นความสามารถในการละลายของ 2AP ในสารละลายนี้ (aqueous solution) จึงต่ำลง ทำให้ 2AP ละลายเข้ามาในตัวทำละลายอินทรีย์ได้ดียิ่งขึ้น



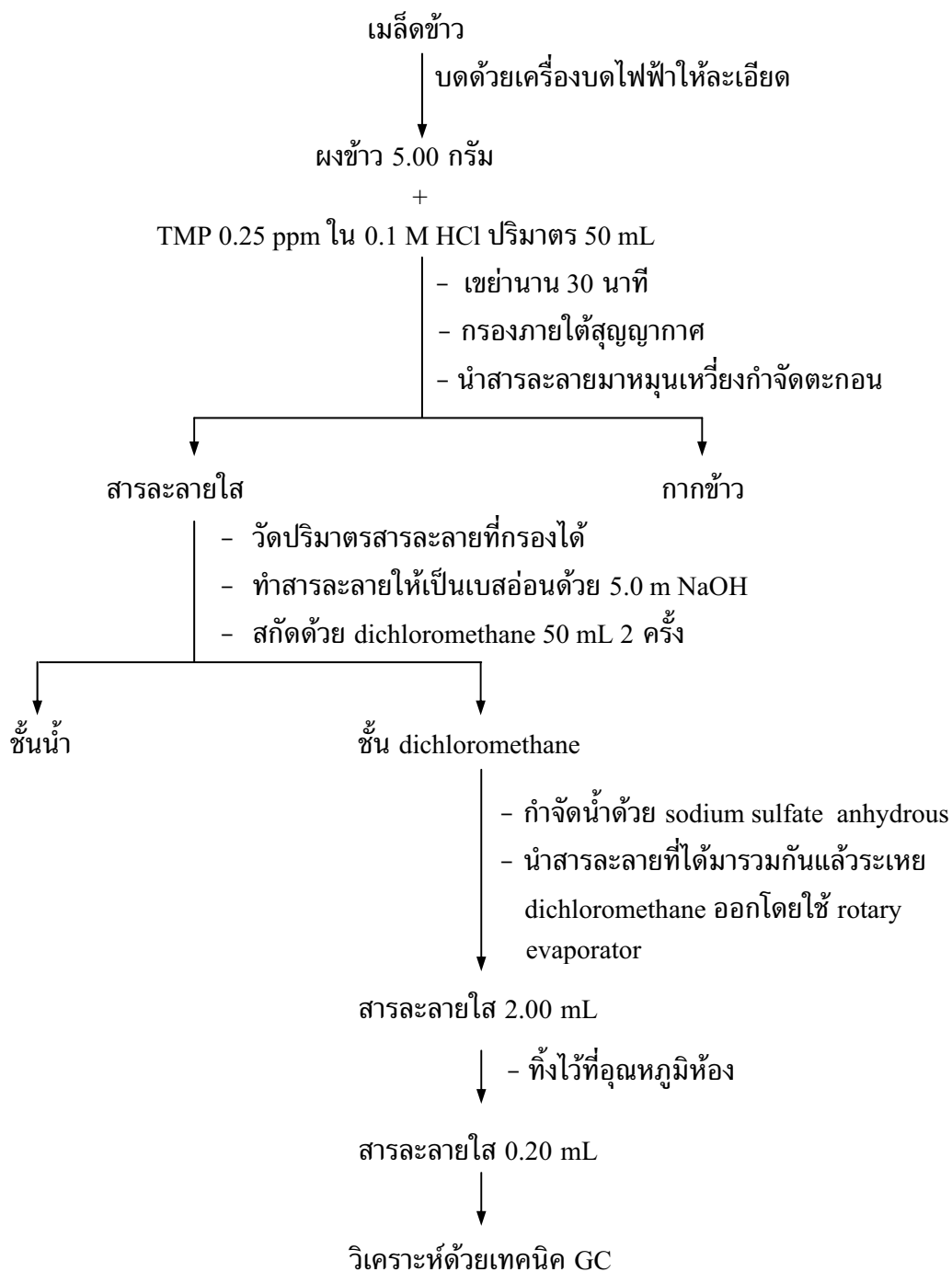
จากหลักการโดยทั่วไปของการสกัดของแข็ง (extraction of solid) ด้วยตัวทำละลาย เช่น การสกัดสารหอมจากตัวอย่างเมล็ดข้าว ด้วยสารละลายกรดอ่อน การสกัดจะทำได้มีประสิทธิภาพหรือไม่ ขึ้นอยู่กับการละลายของตัวถูกละลายในตัวทำละลาย และปัจจัยอื่น เช่น เวลาที่ใช้ในการสกัด เวลาที่ใช้จะสั้นหรือนานขึ้นอยู่กับลักษณะของตัวถูกละลายที่อยู่ในสารตัวอย่างของแข็ง ถ้าตัวถูกละลายเพียงดูดซับ ที่ผิวของของแข็ง การสกัดก็จะใช้เวลาไม่นาน แต่ถ้าตัวถูกละลายอยู่ในสารตัวอย่าง ก็จะต้องใช้เวลายาวนานขึ้น และถ้าปรากฏว่าการกระจายของตัวทำละลาย เข้าไปภายในตัวอย่างของแข็งเกิดได้ช้ามาก ก็จำเป็นต้องทำให้ของแข็งมีลักษณะเป็นชิ้นเล็กลง ก่อนทำการสกัด ดังนั้นขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเมล็ดข้าวก่อนการสกัด ชนิดของตัวทำละลาย ปริมาตรของตัวทำละลาย และเวลาที่ใช้ในการสกัด ตลอดจนวิธีการในการระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ออกเพื่อทำสารสกัดให้เข้มข้นก่อนการวิเคราะห์ เป็นพารามิเตอร์ที่จะต้องได้มีการศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับสารสกัดที่สนใจจากตัวอย่างพืชชนิดหนึ่งๆ ในการวิจัยนี้ได้ทำการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของพารามิเตอร์ต่างๆ สำหรับการสกัด 2AP จากตัวอย่างเมล็ดข้าวแล้ว และสภาวะที่เหมาะสมเหล่านั้นได้ระบุไว้ในรายละเอียดในส่วนของวิธีการ

วิธีการสกัด 2AP จากตัวอย่างเมล็ด ดอก และใบข้าว

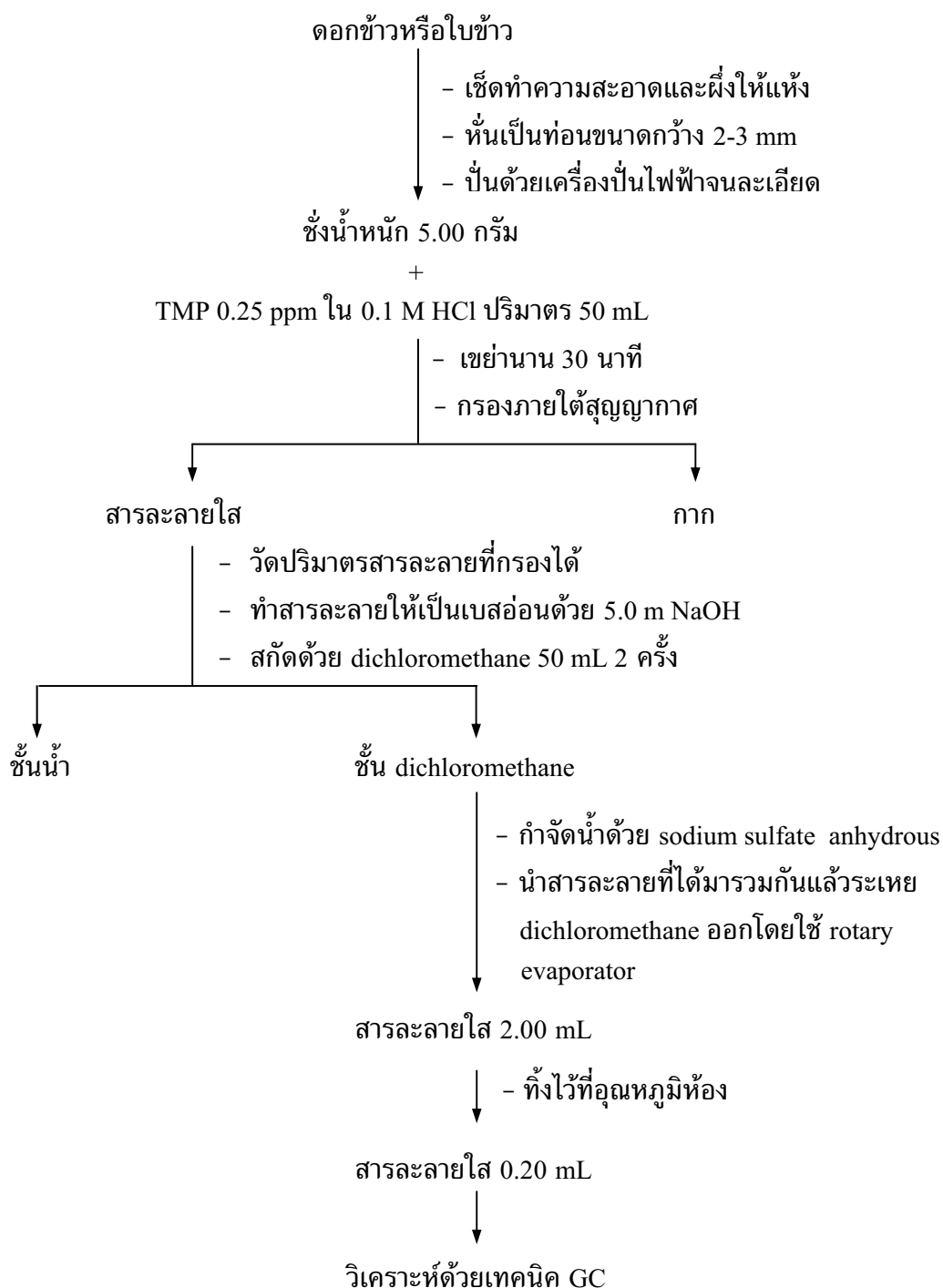
การสกัด 2AP จากเมล็ดข้าวด้วยสารละลายแสดงขั้นตอนในแผนภาพรูป 4.1 เริ่มจากนำเมล็ดข้าวตัวอย่างมาบดให้ละเอียดเป็นผงด้วยเครื่องบดไฟฟ้า เพื่อยืนยันว่าผงข้าวมีขนาดเล็กสม่ำเสมอ ผงข้าวที่ได้จะต้องร่อนผ่านตะแกรกร่อนขนาด 35 mesh ได้หมด จากนั้นชั่งผงข้าวน้ำหนัก 5 g ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 mL เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.10 M ที่มีสารมาตรฐานภายใน trimethylpyridine (TMP) ละลายอยู่ที่ความเข้มข้น 0.25 ppm (วิธีเตรียมในภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 mL และเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบประมาณ 90 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที กรองผงข้าวทิ้งไปด้วยกระดาษกรอง จากนั้นนำสารละลายซึ่งมีลักษณะขาวขุ่น เพราะมีอนุภาคแป้งข้าวที่ยังกำจัดไปไม่หมดจากการกรองในขั้นแรก มาหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงขนาดเล็ก ที่ความเร็วรอบประมาณ 2000 รอบต่อนาที จนได้สารละลายใส โดยอนุภาคแป้งข้าวตกตะกอนอยู่ข้างล่าง

จากนั้นนำสารละลายใสที่ได้ปริมาตร 40 mL มาทำให้เป็นเบสด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 5.0 M และสกัดต่อทันทีด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ไดคลอโรมีเทน ปริมาตร 50 mL สองครั้ง แยกเก็บชั้นของตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนมารวมกัน เติมผง sodium sulfate anhydrous แล้วเขย่าเพื่อกำจัดน้ำ จากนั้นกรองสารละลายผ่านกระดาษกรองเพื่อกำจัด sodium sulfate anhydrous นำสารละลายมาระเหยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนออกโดยใช้เครื่องหมุนระเหยความดันต่ำที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จนเหลือปริมาตรประมาณ 2.0 mL จากนั้นนำสารละลายบรรจุในขวดเก็บสารตัวอย่างโดยไม่ปิดฝา และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ในตู้ดูดควัน) จนเหลือปริมาตรประมาณ 0.2 mL จึงนำไปวิเคราะห์ห้องค์ประกอบในสารสกัดด้วยเทคนิค GC-FID ต่อไป สารสกัดที่เหลือของตัวอย่างข้าวอาจนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS เพื่อยืนยันพีคของ 2AP ในสารสกัด แต่ไม่จำเป็นต้องวิเคราะห์ด้วย GC-MS ทุกตัวอย่าง

ส่วนวิธีการสกัด 2AP จากตัวอย่างดอกและใบข้าวด้วยสารละลาย มีขั้นตอนคล้ายคลึงกันแสดงในแผนภาพรูป 4.2 ซึ่งในขั้นตอนการสกัดด้วยสารละลายกรดโดยเขย่านาน 30 นาทีสำหรับดอกและใบข้าว เมื่อกรองกากออก สารละลายที่ได้มักจะใสต่างจากตัวอย่างเมล็ดข้าว ดังนั้นจึงลดขั้นตอนการหมุนเหวี่ยงเพื่อกำจัดตะกอน แต่สำหรับใบข้าวจะพบว่าสารสกัดในตัวทำละลายอินทรีย์ dichloromethane อาจมีสีเขียวเข้มได้ เนื่องจากมี chlorophyll ถูกสกัดออกมาละลายรวมอยู่ด้วย เมื่อทำสารสกัดให้เข้มข้นขึ้นสีของสารสกัดจะยิ่งเขียวเข้มมาก อย่างไรก็ตามสารสกัดสามารถนำมาวิเคราะห์ด้วย GC ได้โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการ clean up เพื่อกำจัด chlorophyll เนื่องจากอาจมีผลทำให้ปริมาณ 2AP ที่สกัดได้สูญเสียไปด้วย



รูป 4.1 แผนภาพแสดงขั้นตอนการสกัดเมล็ดข้าวด้วยสารละลาย



รูป 4.2 แผนภาพแสดงขั้นตอนการสกัดดอกและใบข้าวด้วยสารละลายที่อุณหภูมิห้อง

การวิเคราะห์เชิงคุณภาพของ 2AP ในสารสกัดจากเมล็ด ดอก และใบข้าว

สารสกัดที่ได้จากการสกัดตัวอย่างข้าวด้วยตัวทำละลายนำมาวิเคราะห์ห้องค์ประกอบด้วยเทคนิค GC-MS ที่มีคอลัมน์แบบ capillary ชนิด HP-5MS ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.25 mm ยาว 60 m เคลือบด้วยวัสดุภาคคงที่ คือ 5% Biphenyl 95% dimethyl polysiloxane หนา 0.25 μm สภาวะของ GC-MS ในการแยกและวิเคราะห์สารสกัดจากเมล็ดข้าวมีดังนี้

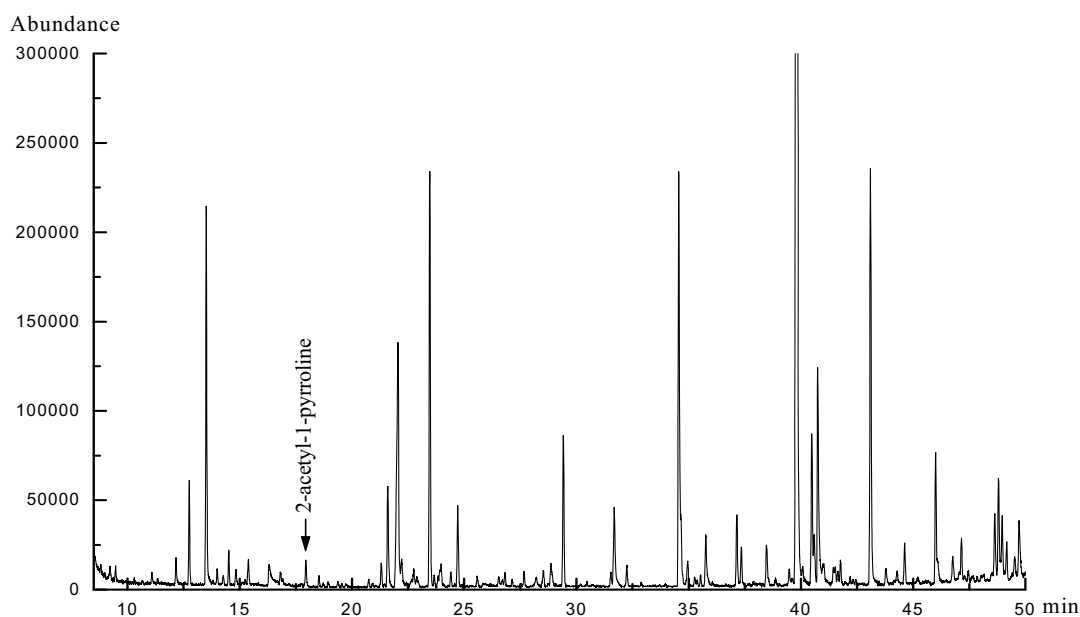
เครื่อง GC : รุ่น 6890 series ผลิตโดยบริษัท Agilent

- อุณหภูมิของตัวนำสารเข้า 250 °C
- โปรแกรมอุณหภูมิของคอลัมน์ :
 - อุณหภูมิเริ่มต้น 50 °C
 - อุณหภูมิที่สอง 70 °C
 - อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 1 °C/min
 - อุณหภูมิสุดท้าย 200 °C
 - อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 2 °C/min
- อัตราการไหลของก๊าซฮีเลียม 1 mL/min
- ปริมาตรสารที่ฉีด 1.0 μL
- Split ratio 20 : 1

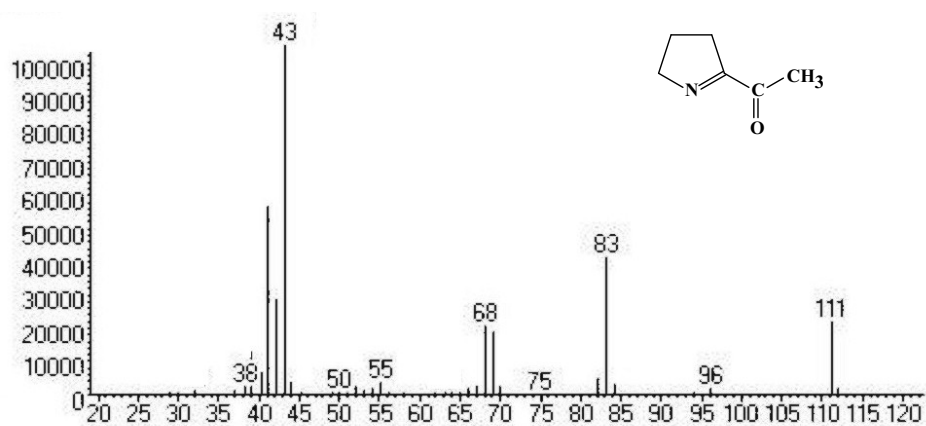
เครื่อง GC-MS : เครื่องก๊าซโครมาโทกราฟี รุ่น 6890 series ผลิตโดยบริษัท Agilent, เครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ รุ่น 5973 ผลิตโดยบริษัท Hewlett Packard และเครื่องฉีดสารอัตโนมัติ รุ่น 7683 series ผลิตโดยบริษัท Agilent

- อุณหภูมิของส่วนเชื่อมต่อ 230 °C
- พลังงานเฉื่อยของอิเล็กตรอน 70 eV
- อุณหภูมิของแหล่งผลิตไอออน 230 °C
- ช่วงมวลต่อประจุ 29-550 amu

Total ion chromatogram (TIC) ที่ได้จากการแยกวิเคราะห์ห้องค์ประกอบในสารสกัดจากเมล็ดข้าวสารตัวอย่างพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 แสดงในรูป 4.3 ซึ่งพบ 2AP เป็นองค์ประกอบในสารสกัด และ mass spectrum ของ 2AP ในสารสกัดที่ได้ (รูป 4.4) เทียบได้ดีกับ mass spectrum ของ 2AP ในฐานข้อมูล Wiley 275 Mass Spectral Library โดย mass spectrum ของ 2AP ดังกล่าวให้ molecular ion ที่ m/z 111 เท่ากับน้ำหนักโมเลกุลของ 2AP และให้ fragment ions อื่นๆ ที่ m/z 96, 83, 69, 68, 55 และ 43(100) ตามลำดับ



รูป 4.3 Total ion chromatogram (TIC) ที่ได้จากการแยกวิเคราะห์องค์ประกอบในสารสกัดจากเมล็ดข้าวสารตัวอย่างพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ด้วยเทคนิค GC-MS



รูป 4.4 Mass spectrum ของ 2AP ในสารสกัดจากเมล็ดข้าวสารตัวอย่างพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ที่วิเคราะห์ด้วยด้วยเทคนิค GC-MS

สารสกัดที่ได้จากการสกัดตัวอย่างดอกและใบข้าว นำมาวิเคราะห์องค์ประกอบด้วยเทคนิค GC-MS ที่มีคอลัมน์แบบ capillary ชนิด HP-5MS ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.25 mm ยาว 60 m เคลือบด้วยวัสดุภาคคงที่ คือ 5% Biphenyl 95% dimethyl polysiloxane ทน 0.25 μm สภาวะของ GC-MS ในการแยกและวิเคราะห์สารสกัดจากดอกและใบข้าวมีดังนี้

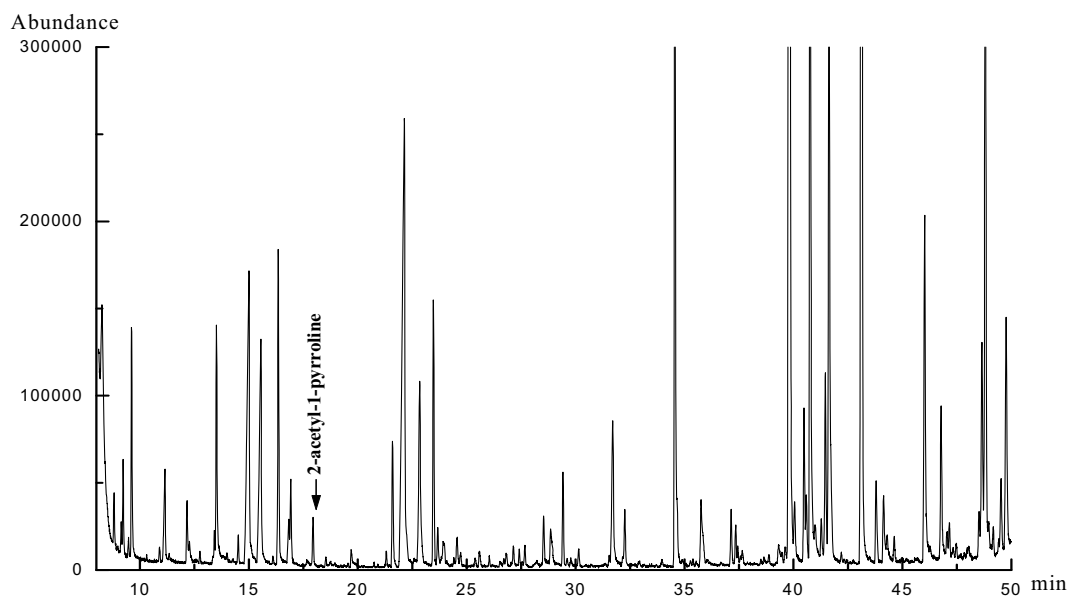
เครื่อง GC : รุ่น 6890 series ผลิตโดยบริษัท Agilent

- อุณหภูมิของตัวนำสารเข้า	250	°C
- โปรแกรมอุณหภูมิของคอลัมน์		
อุณหภูมิเริ่มต้น	50	°C
อุณหภูมิที่สอง	70	°C
อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ	1	°C/min
อุณหภูมิสุดท้าย	200	°C
อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ	2	°C/min
- อัตราการไหลของก๊าซฮีเลียม	1	mL/min
- ปริมาตรสารที่ฉีด	1.0	μL
- Split ratio	20 : 1	

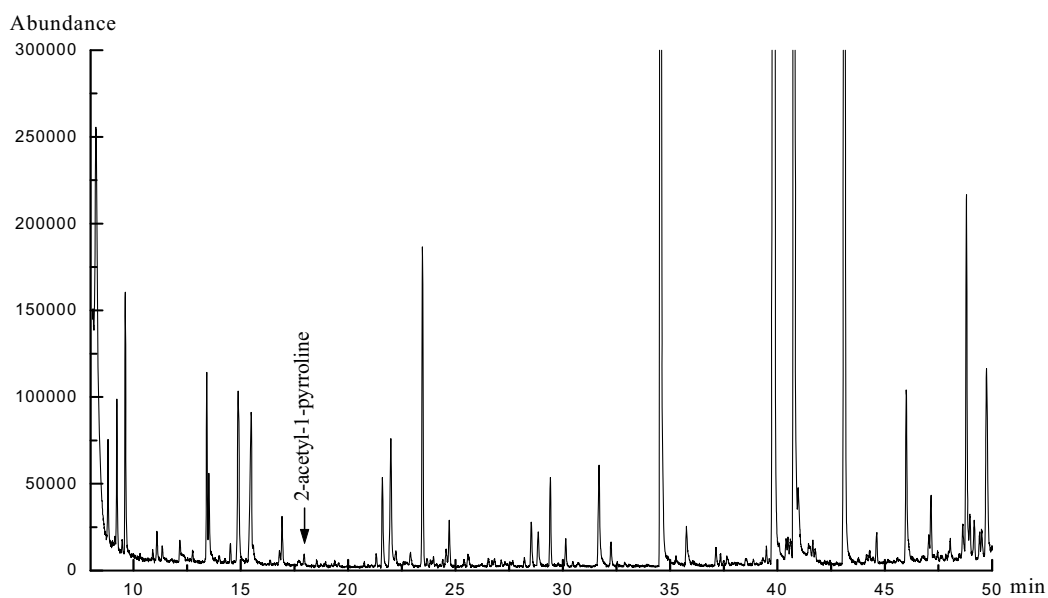
เครื่อง GC-MS : เครื่องก๊าซโครมาโทกราฟ รุ่น 6890 series ผลิตโดยบริษัท Agilent, เครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ รุ่น 5973 ผลิตโดยบริษัท Hewlett Packard และเครื่องฉีดสารอัตโนมัติ รุ่น 7683 series ผลิตโดยบริษัท Agilent

- อุณหภูมิของส่วนเชื่อมต่อ	230	°C
- พลังงานเฉลี่ยของอิเล็กตรอน	70	eV
- อุณหภูมิของแหล่งผลิตไอออน	230	°C
- ช่วงมวลต่อประจุ	29-550	amu

Total ion chromatogram (TIC) ที่ได้จากการแยกวิเคราะห์องค์ประกอบในสารสกัดจากดอกและใบในระยะทางข้อดอกของข้าวตัวอย่างพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 แสดงในรูป 4.5 และ 4.6 ตามลำดับ ซึ่งพบ 2AP เป็นองค์ประกอบทั้งในสารสกัดจากดอกข้าวและใบข้าว และให้ mass spectrum เทียบได้ดีกับ mass spectrum ของ 2AP ใน ฐานข้อมูล Wiley 275 Mass Spectral Library เช่นกัน



รูป 4.5 Total ion chromatogram (TIC) ที่ได้จากการแยกวิเคราะห์องค์ประกอบ
ในสารสกัดจากใบข้าว (leaves) พันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ในระยะแทงช่อดอกด้วยเทคนิค GC-MS



รูป 4.6 Total ion chromatogram (TIC) ที่ได้จากการแยกวิเคราะห์องค์ประกอบ
ในสารสกัดจากดอกข้าว (spikelet) พันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ในระยะแทงช่อดอกด้วยเทคนิค GC-MS

การวิเคราะห์ปริมาณ 2AP ในสารสกัดจากเมล็ด ดอก และใบข้าวด้วยเทคนิค GC

การสังเคราะห์ 2AP และการทำให้บริสุทธิ์เพื่อใช้เป็นสารมาตรฐาน

การสังเคราะห์ 2AP เพื่อใช้เป็นสารมาตรฐานในการวิเคราะห์เชิงปริมาณใช้หลักการสังเคราะห์เช่นเดียวกับวิธีของ Buttery และคณะ^[2] แต่ได้มีการปรับปรุงรายละเอียดของขั้นตอนการสังเคราะห์ซึ่งจะแตกต่างจากวิธีของ Buttery และคณะบางส่วน ขั้นตอนการสังเคราะห์แสดงในภาคผนวก ข

การสังเคราะห์เริ่มจาก catalytic hydrogenation ของสารตั้งต้น 2-acetylpyrrole โดยใช้ 5% rhodium on activated alumina เป็นคะตะลิสต์ ได้ผลผลิตเป็นสารแอลกอฮอล์ 2-(1-hydroxyethyl) pyrrolidine ให้ mass spectrum ที่มีค่า m/z 115, 100, 96, 82, 71, 70, 55, 43 และ 41 คำนวณเปอร์เซ็นต์ผลผลิตได้ในช่วง 95-99% สารผลิตภัณฑ์แอลกอฮอล์ที่ได้ในขั้นแรกนี้นำมาทำปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) กับ silver carbonate on celite (วิธีเตรียมในภาคผนวก ค) ในตัวทำละลาย toluene วิเคราะห์สารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วย GC-MS ได้ผลผลิตมากกว่าหนึ่งองค์ประกอบ และมีสาร 2AP เป็นผลิตภัณฑ์หนึ่ง สารละลายของปฏิกิริยาที่ได้นี้อัตราส่วนโดยปริมาณของ 2AP อยู่ในช่วง 40-55 % ของน้ำหนักสารตั้งต้น 2-acetylpyrrole ที่ใช้ทำปฏิกิริยา จากนั้นนำสารละลายของผลิตภัณฑ์ไปทำการกลั่นแยกตัวทำละลาย toluene ออกจนเข้มข้นและนำมาทำการแยก 2AP ออกจากสารละลายให้บริสุทธิ์ด้วย preparative gas chromatography ที่ใช้คอลัมน์แบบ packed column ซึ่งมี stationary phase หรือ packing materials คือ OV-1 ความบริสุทธิ์ของสารสังเคราะห์ที่ได้ทดสอบด้วยเทคนิค GC-MS และ spectrum จากเทคนิคทาง spectroscopy แสดงในภาคผนวก ง โดยสาร 2AP สังเคราะห์ให้ mass spectrum ที่มีรายละเอียดดังนี้ m/z 111, 96, 83, 69, 68, 55, 43 และ 41 ซึ่งเทียบได้ตรงกับ mass spectrum ของสารมาตรฐาน 2AP ใน Wiley 275 Mass Spectral Library และสารสังเคราะห์ดังกล่าวให้ retention time และ mass spectrum เทียบได้ดีกับองค์ประกอบที่พบในสารสกัดจากเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เช่นกัน

หากมีข้อจำกัดในการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วย preparative GC การนำสารสังเคราะห์ 2AP จากสารละลายของผลิตภัณฑ์มาเพื่อสร้างกราฟสารละลายมาตรฐานนั้น อาจทำได้โดยใช้ผลิตภัณฑ์ที่ยังไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์ โดยคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ผลผลิตของสาร 2AP จาก GC chromatogram ได้

การสร้างกราฟมาตรฐาน 2AP

สารมาตรฐาน 2AP ที่แยกให้บริสุทธิ์จากวิธีการข้างต้น นำมาเตรียมที่ปริมาณหรือความเข้มข้นต่างๆ และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC ผลการวิเคราะห์เชิงปริมาณที่ได้นำมาสร้างกราฟมาตรฐานของ 2AP เพื่อใช้เทียบหาปริมาณ 2AP ในสารสกัดจากตัวอย่างข้าว ขั้นตอนการสร้างกราฟมาตรฐาน มีดังนี้

- เตรียมสารละลายมาตรฐาน 2AP ใน toluene ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.61 – 8.00 ppm ปริมาตร 10 mL

- เตรียมสารละลายมาตรฐานภายใน 2,4,6-trimethylpyridine (TMP) 0.25 ppm ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.1 M
- สกัดสารละลายมาตรฐาน 2AP แต่ละความเข้มข้นด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.1 M ที่มีสารมาตรฐานภายใน TMP เข้มข้น 0.25 ppm ที่เตรียมไว้ โดยใช้ปริมาตรสารละลายกรด 50.0 mL และสกัดเป็นเวลานาน 30 นาที
- แยกชั้นสารละลายกรดมาสกัดต่อด้วย dichloromethane ปริมาตร 50.0 mL 2 ครั้ง จากนั้นนำสารละลาย dichloromethane ที่สกัดได้มารวมกัน
- ตวงสารละลาย dichloromethane 80.0 mL จากที่สกัดได้รวมกันนั้น นำมาทำให้เข้มข้นโดยการระเหยตัวทำละลาย dichloromethane ออกด้วยเครื่องระเหยความดันต่ำ ที่ควบคุมอุณหภูมิไม่เกิน 35 °C จนเหลือปริมาตรสารสกัด 2.0 mL
- ตั้งสารสกัดทิ้งไว้ให้ตัวทำละลายระเหยไปที่อุณหภูมิห้องจนเหลือปริมาตร 0.2 mL
- นำไปวิเคราะห์ด้วย GC ที่มีสภาวะการทดลองเป็นดังนี้

เครื่อง GC : รุ่น 6890 series ผลิตโดยบริษัท Agilent

- คอลัมน์แบบ capillary : Quadrex 007-5MS: 30 m x 0.25 mm, 0.25 μ m film (5% biphenyl 95% dimethyl polysiloxane)
- อุณหภูมิของตัวนำสารเข้า 250 °C
- โปรแกรมอุณหภูมิของคอลัมน์ :

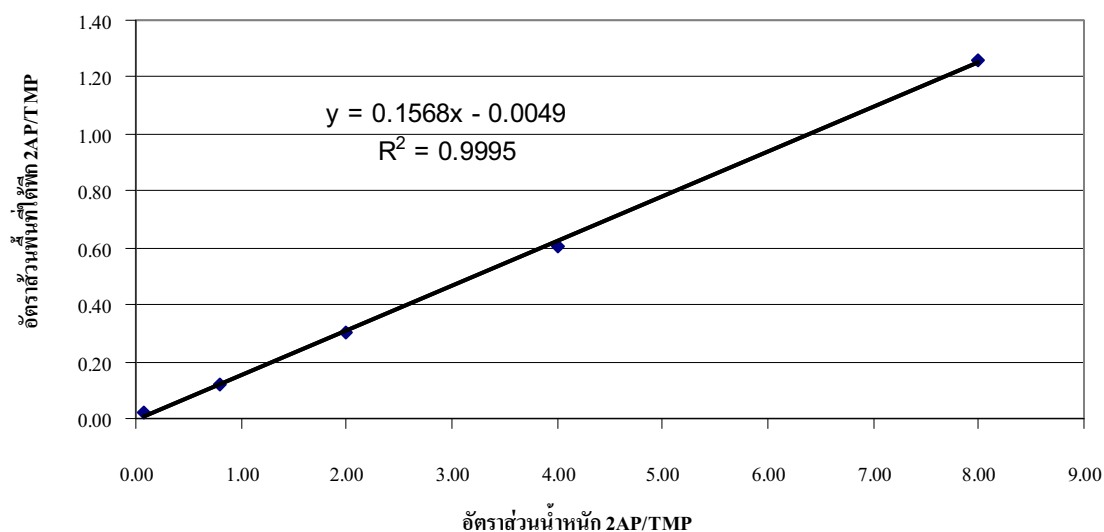
อุณหภูมิเริ่มต้น	45 °C
อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ	5 °C/min
อุณหภูมิที่สอง	120 °C
- อัตราการไหลของก๊าซฮีเลียม 1 mL/min
- ปริมาตรสารที่ฉีด 1.0 μ L
- Split ratio 20 : 1
- อุณหภูมิของ FID 250 °C

จาก GC Chromatograms ที่ได้ของแต่ละความเข้มข้นของสารละลายของสารมาตรฐาน 2AP หาอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐาน 2AP ต่อพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐานภายใน TMP ได้ค่าแสดงในตาราง 4.1 รายละเอียดวิธีการคำนวณความเข้มข้นของสารสังเคราะห์ 2AP และการเตรียมสารละลายมาตรฐาน 2AP เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานแสดงในภาคผนวก จ

ตาราง 4.1 อัตราส่วนของพื้นที่ที่ได้ฟีดของสารมาตรฐาน 2AP/TMP ที่แต่ละปริมาณของ 2AP

อัตราส่วนน้ำหนัก 2AP/TMP	อัตราส่วนพื้นที่ที่ได้ฟีด 2AP/TMP				
	ครั้งที่	Area 2AP	Area TMP	Area 2AP/TMP	Area 2AP/TMP เฉลี่ย
0.08	1	1.98057	98.01943	0.0200	0.0201
	2	1.98900	98.01100	0.0203	
0.80	1	10.43105	89.56895	0.1165	0.1180
	2	10.67313	89.32687	0.1195	
2.00	1	24.68901	75.31099	0.3278	0.3052
	2	22.03735	77.96265	0.2827	
4.00	1	35.85022	64.14978	0.5589	0.6059
	2	39.50050	60.49950	0.6529	
8.00	1	56.18810	43.81190	1.2825	1.2579
	2	55.22438	44.77562	1.2334	

เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ที่ได้ฟีดของ 2AP/TMP กับอัตราส่วนน้ำหนัก 2AP/TMP จะได้กราฟสารละลายมาตรฐาน ดังรูป 4.7



รูป 4.7 กราฟสารละลายมาตรฐาน 2AP

การประยุกต์วิธีการวิเคราะห์ปริมาณ 2AP ที่พัฒนาขึ้นกับตัวอย่างข้าว

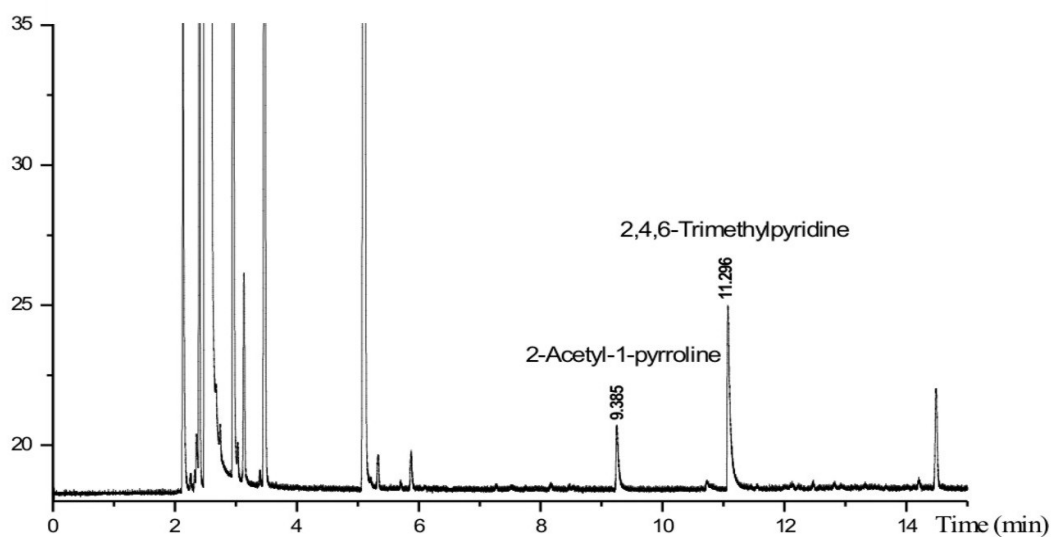
การประยุกต์วิธีการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณ 2AP ในตัวอย่างเมล็ดข้าว *

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณ 2AP ในตัวอย่างข้าวโดยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายและวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC ที่พัฒนาขึ้นนี้ ได้ถูกนำมาประยุกต์กับการวิเคราะห์ตัวอย่างข้าวพันธุ์เดียวกัน คือข้าวหอมพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 โดยข้าวตัวอย่างนี้เก็บเกี่ยวจากแหล่งเพาะปลูกเดียวกัน แต่แตกต่างกันในแง่ของวิธีการลดความชื้นและระยะเวลาการเก็บรักษา ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

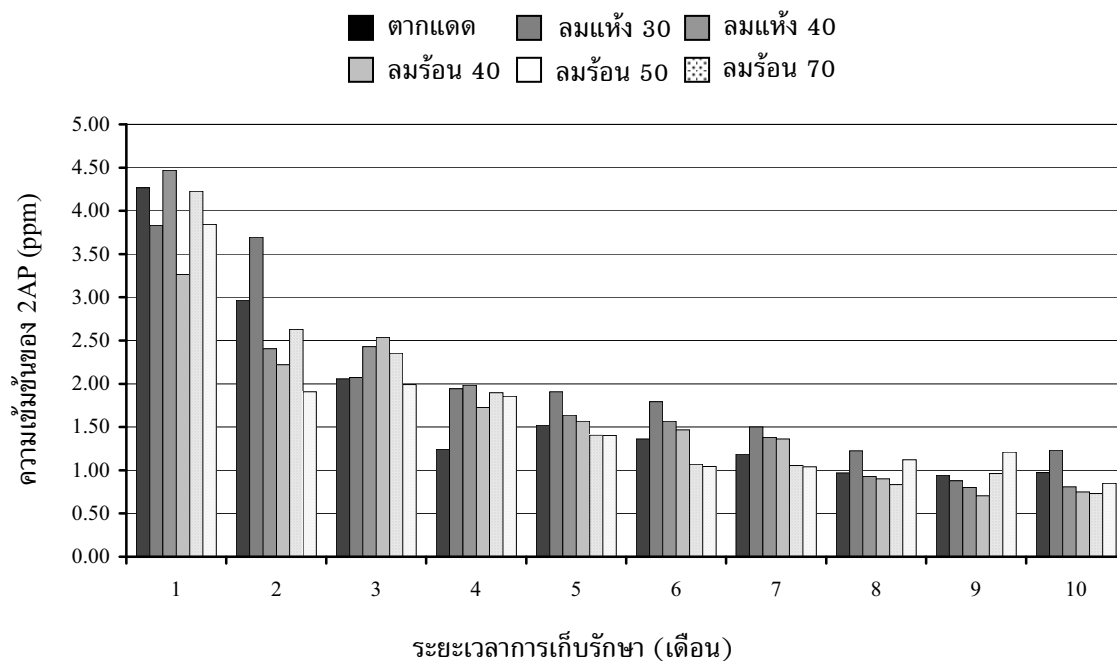
ข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ปลูกที่บ้านโนนเขว ต.ท่าตูม อ.ท่าตูม จ.สุรินทร์ เก็บเกี่ยวในระยะสุกแก่แล้วปลีมีความชื้น 27 % MC (wet basis) ชื้อจากเกษตรกรที่อำเภอท่าตูม จังหวัดสุรินทร์ เมื่อเดือนพฤศจิกายน 2544 นำมาแบ่งเป็น 6 ส่วน แต่ละส่วนลดความชื้นด้วยวิธีที่ต่างกันจนความชื้นลดเหลือไม่เกิน 14% คือ วิธีที่หนึ่งลดความชื้นด้วยวิธีการตากแดด 3-5 แดด จนความชื้น ลดเหลือประมาณ 12-13.5% วิธีที่สองลดความชื้นโดยใช้เครื่องลดความชื้นชนิดลมร้อน อุณหภูมิ 40, 50, และ 70 °C จนความชื้น ลดเหลือประมาณ 12-13.5 % และวิธีที่สามลดความชื้นโดยใช้เครื่องลดความชื้นชนิดลมแห้ง อุณหภูมิ 30 และ 40 °C จนความชื้น ลดเหลือประมาณ 12-13.5 %

ข้าวเปลือกที่ผ่านกระบวนการลดความชื้นแล้วทั้ง 6 ตัวอย่าง นำมาบรรจุในกระสอบข้าว และเก็บไว้ในห้องที่ไม่ควบคุมสภาพแวดล้อมเป็นเวลา 10 เดือน โดยในแต่ละเดือนสุ่มตัวอย่างข้าวจากตำแหน่งกลางกระสอบออกมา กะเทาะเป็นข้าวกลิ้งก่อนนำมาวิเคราะห์ปริมาณสารหอม 2AP ตามขั้นตอนการสกัดในหัวข้อ วิธีการสกัด 2AP จากตัวอย่างเมล็ด ดอก และใบข้าว ในหน้า 25-26 ซึ่งตัวอย่าง GC chromatogram ของสารสกัดจากเมล็ดข้าวกลิ้งที่ผ่านการลดความชื้นด้วยลมแห้งที่อุณหภูมิ 40 °C และเก็บรักษานาน 4 เดือน แสดงในรูป 4.8 พบว่า 2AP และสารมาตรฐาน TMP รวมทั้งองค์ประกอบอื่นๆ แยกออกจากกันอย่างชัดเจน ทำให้การวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยเทคนิคนี้สามารถทำได้อย่างมีประสิทธิภาพ ผลของปริมาณสารหอม 2AP ในตัวอย่างเมล็ดข้าวชนิดต่างๆ ที่ระยะเวลา 10 เดือน แสดงเปรียบเทียบในกราฟรูป 4.9

* ตัวอย่างข้าวและการหาปริมาณ 2AP นี้ เป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยเรื่อง ผลของการลดความชื้นด้วยอุณหภูมิและระยะเวลา การเก็บรักษาต่อคุณภาพความหอม องค์ประกอบเคมี และสมบัติทางกายภาพ ของข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ที่ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการพัฒนาระบบบัณฑิตศึกษา และเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว (ADB-PHT)



รูป 4.8 GC-FID chromatogram ของสารสกัดจากเมล็ดข้าวกล้องของข้าวเปลือกตัวอย่างที่ผ่านการลดความชื้นด้วยลมแห้งที่อุณหภูมิ 40 °C และเก็บรักษาในสภาพข้าวเปลือกในห้องไม่ควบคุมสภาพแวดล้อมเป็นเวลา 4 เดือน



รูป 4.9 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารหอม 2AP ในเมล็ดข้าวกล้องที่ผ่านการลดความชื้นด้วยวิธีต่างๆ และเก็บรักษาในสภาพข้าวเปลือกในห้องไม่ควบคุมสภาพแวดล้อมเป็นเวลา 10 เดือน

การประยุกต์วิธีการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณ 2AP ในตัวอย่างดอกและใบข้าว

นอกจากตัวอย่างเมล็ดข้าว วิธีการวิเคราะห์ปริมาณ 2AP โดยการสกัดด้วยตัวทำละลาย และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC ที่พัฒนาขึ้นนี้ ยังสามารถประยุกต์ได้ดีกับการวิเคราะห์ตัวอย่างในส่วน ดอก และใบข้าว การทราบปริมาณสารหอมในใบของข้าวแต่ละพันธุ์ อาจนำมาใช้ในการคาดคะเน สารหอมในเมล็ดได้ แต่ปริมาณสารหอมในเมล็ดข้าวที่ได้จากการประเมินนี้ มีความถูกต้องและแม่นยำต่ำ โดยเฉพาะเมื่อประยุกต์กับการหาปริมาณสารหอมในเมล็ดของข้าวลูกผสมที่ได้จาก เทคนิคการปรับปรุงพันธุ์ ทั้งนี้เนื่องจากอัตราส่วนของปริมาณสารหอมในใบข้าวต่อปริมาณในเมล็ด ของข้าวแต่ละพันธุ์แตกต่างกันไป นอกจากนี้การสะสมของสารหอมในเมล็ดข้าวยังอาจขึ้นกับปัจจัย ภายนอกหลายประการ เช่น สภาพดิน น้ำ อากาศ ความชื้น และอุณหภูมิ เป็นต้น

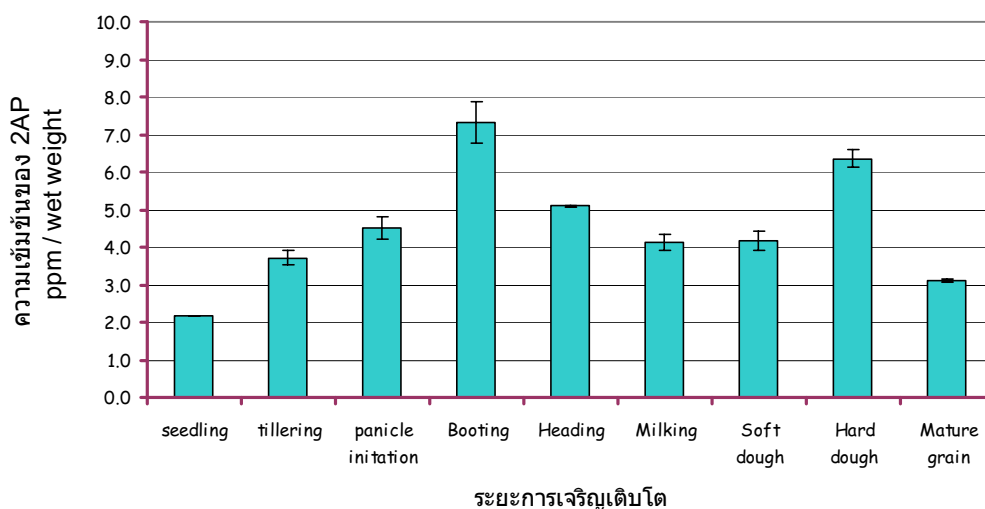
อย่างไรก็ตาม การหาปริมาณ 2AP ในส่วนต่างๆ ของต้น และเมล็ดข้าวพันธุ์ที่สนใจ จะ ทำให้ได้ข้อมูลความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารหอมที่เกิดขึ้นและสะสมอยู่ในส่วนต่างๆ ของต้นและ เมล็ดข้าวที่แต่ละระยะการเจริญเติบโตของต้นข้าว ซึ่งข้อมูลดังกล่าวนี้น่าจะเป็นประโยชน์และเป็น พื้นฐานสำคัญต่อการพัฒนากรรมวิธีการปลูก และการเก็บเกี่ยวข้าว เพื่อให้ได้ข้าวที่มีคุณภาพความ หอมสูงและให้ผลผลิตที่เพิ่มมากขึ้นในขณะเดียวกัน

พันธุ์ข้าวที่ใช้ทดลองเป็นข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ปลูกที่คณะเกษตรศาสตร์ มหา วิทยาลัยเชียงใหม่ ระหว่างเดือนสิงหาคม-พฤศจิกายน 2546 โดยเก็บตัวอย่างใบข้าวที่แต่ละระยะ ของการเจริญเติบโตของต้นข้าวดังแสดงในตาราง 4.2 และนำมาวิเคราะห์ปริมาณสารหอม 2AP ตาม ขั้นตอนการสกัดในหัวข้อ วิธีการสกัด 2AP จากตัวอย่างเมล็ด ดอก และใบข้าว หน้า 25-26

ตาราง 4.2 การเก็บตัวอย่างใบข้าวที่แต่ละระยะของการเจริญเติบโตของต้นข้าว

ระยะการเจริญเติบโต	ลักษณะการเก็บตัวอย่าง	
	ใบข้าว	ดอกและเมล็ดข้าว
1. Seedling	ทุกใบรวมกัน (Total leaves)	-
2. Tillering	ทุกใบรวมกัน (Total leaves)	-
3. Panicle Initiation (PI)	ทุกใบรวมกัน (Total leaves)	-
4. Booting	- ทุกใบรวมกัน (Total leaves) - ใบธง (Flag leaf) - ใบที่ 1 ถัดจากใบธง (2 nd leaf) - ใบที่ 2 ถัดจากใบธง (3 rd leaf)	-
5. Heading	- ทุกใบรวมกัน (Total leaves) - ใบธง (Flag leaf) - ใบที่ 1 ถัดจากใบธง (2 nd leaf) - ใบที่ 2 ถัดจากใบธง (3 rd leaf)	ทุกดอกรวมกัน
6. Milk Grain	- ทุกใบรวมกัน (Total leaves) - ใบธง (Flag leaf) - ใบที่ 1 ถัดจากใบธง (2 nd leaf) - ใบที่ 2 ถัดจากใบธง (3 rd leaf)	เปลือกหุ้มและน้ำนม
7. Dough Grain (soft)	- ทุกใบรวมกัน (Total leaves) - ใบธง (Flag leaf) - ใบที่ 1 ถัดจากใบธง (2 nd leaf) - ใบที่ 2 ถัดจากใบธง (3 rd leaf)	เฉพาะแป้งอ่อนไม่รวมเปลือก
8. Dough Grain (hard)	- ทุกใบรวมกัน (Total leaves) - ใบธง (Flag leaf) - ใบที่ 1 ถัดจากใบธง (2 nd leaf) - ใบที่ 2 ถัดจากใบธง (3 rd leaf)	เฉพาะแป้งแข็งไม่รวมเปลือก
9. Mature Grain	- ทุกใบรวมกัน (Total leaves) - ใบธง (Flag leaf) - ใบที่ 1 ถัดจากใบธง (2 nd leaf) - ใบที่ 2 ถัดจากใบธง (3 rd leaf)	เฉพาะเมล็ดข้าวกล้องไม่รวมเปลือก

ปริมาณสารหอม 2AP ในสารสกัดจากตัวอย่างใบ ดอก และเมล็ดข้าวหาโดยวิธีเทียบอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของ 2AP กับสารมาตรฐาน TMP ที่ได้จากแต่ละตัวอย่าง กับกราฟมาตรฐานของ 2AP ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนแล้ว พบว่าตัวอย่างใบข้าวสดที่เก็บรวมกัน (total leaves) ที่ระยะต่างๆ นั้นมีความเข้มข้นของ 2AP แตกต่างกัน โดยความเข้มข้นของ 2AP ในใบข้าวมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจากระยะ seedling จนถึงมากที่สุดที่ระยะ heading และลดลงอีก จากนั้นเพิ่มขึ้นมากที่สุดอีกที่ระยะ hard dough grain ดังกราฟความสัมพันธ์ในรูป 4.10

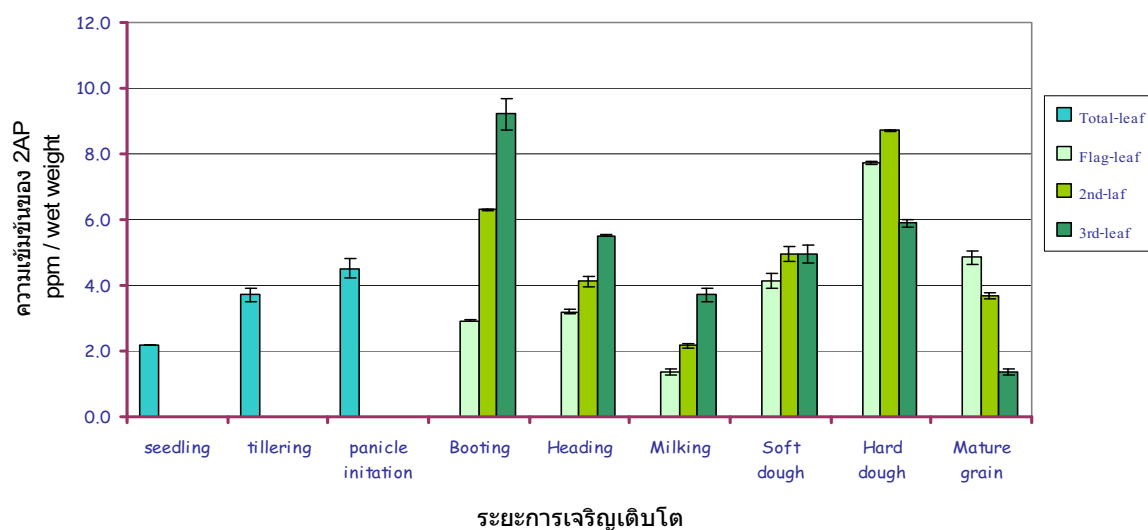


รูป 4.10 ความเข้มข้นของสารหอม 2AP ในใบข้าวเก็บรวมที่แต่ละระยะการเจริญเติบโต

ผลการทดลองดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าสารหอม 2AP ถูกสร้างขึ้นในใบข้าวตั้งแต่ระยะ seedling หรือก่อนหน้านี้ และถูกสร้างขึ้นในสัดส่วนที่สูงขึ้นจนถึงระยะ booting กล่าวคือตลอดช่วงที่ต้นข้าวมีการเจริญเติบโตทางลำต้น (vegetative phase) นั้นเอง ความเข้มข้นของ 2AP ในใบข้าวเริ่มลดลงในช่วง heading ต่อไปในระยะที่ต้นข้าวเริ่มมีการสร้างเมล็ด ความเข้มข้นของ 2AP ในใบข้าวสูงขึ้นอีกที่ระยะ hard dough grain ซึ่งเหตุผลหนึ่งอาจเกิดจากการที่ใบข้าวในระยะจากนี้ไปเริ่มแห้งและมีเปอร์เซ็นต์น้ำลดลง ส่วนความเข้มข้นของ 2AP ในใบข้าวที่ลดต่ำลงอีกในระยะ mature seed ซึ่งเป็นระยะที่ใบข้าวเกือบทุกใบเปลี่ยนเป็นสีเหลือง อาจเนื่องมาจากปริมาณ 2AP ที่สะสมอยู่ในใบนั้นสลายหรือระเหยไปพร้อมกับการแห้งลงของใบข้าวโดยไม่มีการสร้างขึ้นเพิ่มเติม

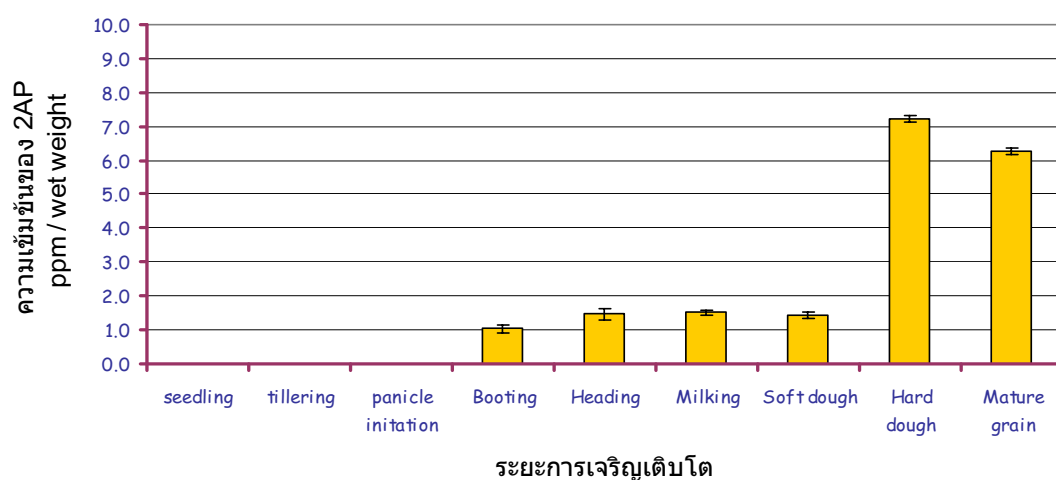
การทดลองอย่างละเอียดโดยแยกเก็บตัวอย่างใบข้าวเป็นชนิด ใบธง (Flag leaf), ใบที่ 1 ถัดจากใบธง (2nd leaf) และใบที่ 2 ถัดจากใบธง (3rd leaf) ตั้งแต่ระยะ booting เป็นต้นไป ได้ผลความเข้มข้นของ 2AP ในใบข้าวแสดงดังกราฟรูป 4.11 พบว่าในระยะ booting, heading และ milk grain ความเข้มข้นของ 2AP ในใบที่ 2 ถัดจากใบธงมีมากกว่าใบที่ 1 ถัดจากใบธง และมากกว่าในใบธงตามลำดับ (3rd leaf > 2nd leaf > flag leaf) ซึ่งอาจสันนิษฐานได้ว่า ปริมาณ 2AP อาจเกี่ยวข้องกับปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบหรือความเข้มแสงที่ใบได้รับจึงทำให้ใบที่ 2 ถัดจากใบธงมีปริมาณ 2AP มากที่สุดใน 3 ระยะนี้

ปริมาณ 2AP ในใบที่ 2 ถัดจากใบธง เริ่มมีความเข้มข้นสัมพันธ์ลดลงเปรียบเทียบกับใบที่ 1 ถัดจากใบธง และในใบธง ในระยะ soft dough grain เป็นต้นไป จนมีค่าต่ำที่สุดที่ระยะ mature grain ในทางตรงกันข้ามปริมาณ 2AP ในใบธง เปรียบเทียบกับใบที่ 1 และ ใบที่ 2 ถัดจากใบธง เริ่มมีปริมาณสัมพันธ์มากขึ้น และที่ระยะ mature grain ปริมาณ 2AP ในใบธงสูงกว่าในใบอื่นๆ ตามลำดับ (flag leaf > 2nd leaf > 3rd leaf) ซึ่งกลับในทางตรงกันข้ามกับในระยะ booting ซึ่งเป็นที่น่าสังเกตว่าในระยะหลังนี้ใบข้าวในลำดับนอกของต้นข้าวเริ่มแห้งและเปลี่ยนเป็นสีเหลือง



รูป 4.11 ความเข้มข้นของสารหอม 2AP ในใบข้าวแต่ละลำดับที่แต่ละระยะการเจริญเติบโต

พบสารหอม 2AP ในดอกข้าวเช่นกัน ในระยะ booting และ heading โดยมีความเข้มข้นพอๆ กันคือ 1.0 และ 1.4 ppm ตามลำดับดังกราฟรูป 4.12 ส่วนปริมาณ 2AP ในเมล็ดข้าวระยะแรกคือ milk grain และ soft dough grain มีค่าใกล้เคียงกันกับความเข้มข้นในดอกข้าว แต่ปริมาณ 2AP เพิ่มขึ้นมากถึง 7.2 และ 6.3 ppm ในระยะ hard dough grain และ mature grain ตามลำดับ ซึ่งสาเหตุอาจเนื่องมาจากเมล็ดข้าวที่ระยะ hard dough grain มีการสะสมของ 2AP สูงที่สุดในขณะที่เปอร์เซ็นต์ความชื้นในเมล็ดข้าวเริ่มลดลง ส่วนในระยะ mature grain อัตราการสลายหรือระเหยหายไปของ 2AP มีมากกว่าอัตราการสะสม ซึ่งทำให้เมล็ดข้าวในระยะนี้มีปริมาณ 2AP ลดลงจากระยะ hard dough grain ซึ่งพบปริมาณ 2AP สูงที่สุด



รูป 4.12 ความเข้มข้นของสารหอม 2AP ในดอกและเมล็ดข้าวที่แต่ละระยะการเจริญเติบโต

การประเมินประสิทธิภาพของวิธีการ (Method validation)

วิธีการทดลองเพื่อประเมินประสิทธิภาพของเทคนิคการหาปริมาณ 2AP โดยการสกัดด้วยตัวทำละลายและวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-FID ได้ผลสรุปของพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพของวิธีการดังนี้

สภาพไวของเทคนิค

(ก) ปริมาณที่น้อยที่สุดของ 2AP ที่สามารถตรวจวัดได้ด้วยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายและวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-FID เท่ากับ 0.5 μg และกราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรงในช่วงปริมาณของ 2AP ระหว่าง 0.96-96 μg

(ข) ปริมาณของตัวอย่างข้าวที่น้อยที่สุดที่วิเคราะห์ด้วยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายและวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-FID เมื่อใช้ข้าวหอมขาวดอกมะลิ 105 เป็นตัวอย่างทดลอง เท่ากับ 1.0 g และปริมาณของตัวอย่างข้าวที่น้อยที่สุดที่ให้ผลการวิเคราะห์เชิงปริมาณเป็นที่ยอมรับเท่ากับ 5.0 g

ความแม่นยำของเทคนิค

(ก) การหาความแม่นยำของการวิเคราะห์ตัวอย่างในเวลาเดียวกัน

ทำโดยวิเคราะห์ตัวอย่างข้าวกล้องพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ตัวอย่างเดียวกันจำนวน 7 ซ้ำภายใน 1 วัน พบว่าการวิเคราะห์ตัวอย่างมีความแม่นยำอยู่ในเกณฑ์ดี โดยมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของความแม่นยำของการวิเคราะห์ตัวอย่างข้าวกล้อง 7 ซ้ำภายใน 1 วัน คือร้อยละ 4.32

(ข) การหาความแม่นยำของการวิเคราะห์ตัวอย่างในเวลาต่างกัน

ทำโดยวิเคราะห์ตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ตัวอย่างเดียวกันจำนวน 5 ซ้ำ ภายใน 1 วัน เป็นเวลา 5 วัน พบว่าการวิเคราะห์ตัวอย่างในแต่ละวัน และระหว่างวันจะให้ผลที่มีความแม่นยำที่ดี โดยมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของความแม่นยำของการวิเคราะห์ตัวอย่างข้าวกล้อง 5 วัน ๆ ละ 5 ซ้ำ คือร้อยละ 5.18

บทที่ 5

วิธีการหาปริมาณ 2AP โดยใช้เทคนิค Headspace Gas chromatography (HS-GC)

เทคนิค HS-GC เป็นเทคนิคที่เหมาะสมกับการวิเคราะห์สารระเหยในตัวอย่างต่าง ๆ ไม่ว่าจะเป็นตัวอย่างนั้นจะเป็นของเหลว เช่น สารสกัดในตัวอย่างที่ละลาย หรือของแข็งในสภาพเดิมของตัวอย่าง โดยอาศัยหลักการที่ว่า สารระเหยที่อยู่ในตัวอย่างและบรรจุในขวดปิดสนิทถูกทำให้ระเหยออกมาอยู่ในที่ว่างเหนือตัวอย่างหรือเฮดสเปซ (HS) จนเกิดสมดุลกับตัวอย่าง จากนั้นไอของตัวอย่างจะถูกนำไปวิเคราะห์อย่างต่อเนื่องและอัตโนมัติด้วยเครื่อง GC ต่อไป

เทคนิค HS-GC จึงเกิดมาจากการรวมเอาเทคนิคที่เรียกว่าการวิเคราะห์แบบเฮดสเปซ (headspace analysis) กับเทคนิคที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารระเหย คือ GC เข้าด้วยกัน การประยุกต์ใช้เทคนิคดังกล่าวมีรายงานครั้งแรกปี 1958-1959 ในการวิเคราะห์สารอินทรีย์ที่ระเหยได้ง่าย (volatile organic compounds หรือ VOC) ในผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น ไวน์ และมันฝรั่งทอด เป็นต้น การนำสารระเหยเหนือตัวอย่างไปวิเคราะห์ทำได้โดยการใช้เข็มสำหรับดูดตัวอย่างที่เป็นแก๊สภายในบรรจุภัณฑ์ของผลิตภัณฑ์อาหารเหล่านั้น แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง GC ในปี 1961-1962 มีการประยุกต์ใช้เทคนิค Static HS-GC โดยใช้วิธีวิเคราะห์ด้วย HS เพื่อวิเคราะห์สารอินทรีย์ภายในตัวอย่างประเภทผลไม้ น้ำผึ้ง อาหาร และตัวอย่างที่เป็นประเภทสารละลาย และเป็นที่ยอมรับมากขึ้นเนื่องจากความสะดวก รวดเร็ว ในการทำงาน อีกทั้งผลการวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องและแม่นยำ เครื่อง HS-GC แบบอัตโนมัติเครื่องแรกคือของบริษัท Perkin-Elmer รุ่น เอฟ-40 ซึ่งผลิตออกมาในปี 1967

ปัจจุบันการประยุกต์ HS-GC พบได้ในหลากหลายสาขาวิชา เช่น ทางด้านสิ่งแวดล้อม ด้านการแพทย์ ด้านผลิตภัณฑ์อาหาร เป็นต้น ซึ่งครอบคลุมตัวอย่างทั้งที่เป็นของเหลว ของแข็ง และแก๊ส เช่น ในการวิเคราะห์ด้านสิ่งแวดล้อม ได้มีรายงานการประยุกต์ HS-GC ในการวิเคราะห์เมทิลเมอร์คิวรี (methylmercury) ในตัวอย่างทั้งที่เป็นโคลน ตัวอย่างทางชีววิทยาและน้ำ ทางด้านการแพทย์มีการประยุกต์ HS-GC ทั้งเพื่อตรวจสอบความผิดปกติของผู้ป่วยและตรวจสอบคุณภาพเวชภัณฑ์ เช่น วิธีสำหรับตรวจวัดปริมาณเบนซินได้ในระดับ 42 นาโนกรัมต่อลิตร ในปัสสาวะของผู้ที่สูบบุหรี่และไม่สูบบุหรี่ ในการควบคุมคุณภาพของเวชภัณฑ์ มีการประยุกต์ใช้เทคนิค STATIC HS-GC ทั้งด้านคุณภาพและปริมาณวิเคราะห์กับตัวอย่างที่เป็นผลิตภัณฑ์อาหาร

การพัฒนาเทคนิค HS-GC เพื่อนำมาวิเคราะห์สารหอมในตัวอย่างข้าว จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของการพัฒนาวิธีการตรวจวัดปริมาณสารหอมในข้าวที่ได้ทำการศึกษาในโครงการวิจัยนี้ พบว่าสามารถพัฒนาเทคนิค HS-GC ให้วิเคราะห์ตัวอย่างเมล็ดข้าวได้โดยตรง โดยไม่ต้องสกัดสารหอมให้อยู่ในตัวทำละลาย จึงเป็นวิธีที่มีข้อได้เปรียบคือ ลดขั้นตอนในการสกัดสาร 2AP จากตัวอย่างข้าวและประหยัดทั้งเวลาและสารเคมี แต่ต้องอาศัยส่วนที่ต่อเพิ่มเติมเข้ากับเครื่อง GC คือ เครื่องดูดไอระเหยของตัวอย่างแบบอัตโนมัติ headspace auto-sampler ทำหน้าที่ในการสกัดและนำ

สารระเหยจากตัวอย่างเข้ามาวิเคราะห์ด้วย GC อย่างไรก็ตามการประยุกต์เทคนิค HS-GC เพื่อวิเคราะห์สารหอม 2AP ในตัวอย่างเมล็ดข้าวโดยตรง ควรมีการศึกษาถึงสภาวะและพารามิเตอร์ต่างๆ ของเทคนิค และพัฒนาให้ประสิทธิภาพสูงสุดในการวิเคราะห์ จนให้ได้เทคนิคที่มีความถูกต้อง และสามารถประยุกต์กับการวิเคราะห์ตัวอย่างข้าวจำนวนมากได้ดี

หลักการของ headspace GC

เทคนิค HS-GC เป็นการวิเคราะห์ไอระเหยของสารตัวอย่างใด ๆ ที่อยู่ในสมดุลกับตัวอย่างในขวดปิดสนิท ซึ่งตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์เดิมอาจอยู่ในสถานะของแข็งหรือสารละลายก็ได้ เมื่อนำมาบรรจุอยู่ในขวดปิดสนิทและปล่อยทิ้งไว้ในช่วงเวลาและสภาวะที่เหมาะสม จะทำให้เกิดการระเหยของสารระเหยจากตัวอย่างเข้าไปในที่ว่างเหนือตัวอย่างนั้น (headspace gas) และเกิดสมดุลของสารระเหยในเวลาต่อมา

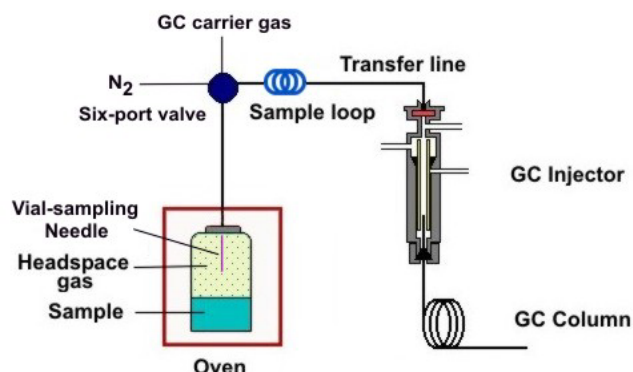
การนำไอระเหยของสารตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วย GC นั้น แต่ดั้งเดิมนั้นใช้วิธีดูดไอระเหยด้วยเข็มฉีดยาพิเศษสำหรับดูดตัวอย่างที่เป็นแก๊สโดยเฉพาะ (gas-tight syringe) ซึ่งพบต่อมาว่าวิธีนี้ทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนของผลการวิเคราะห์สูง และที่สำคัญสารระเหยที่ถูกพาเข้าไปใน GC มีปริมาณต่ำ ต่อมาจึงได้มีการพัฒนาวิธีที่มีประสิทธิภาพดีขึ้นในการนำสารระเหยเข้าไปวิเคราะห์ด้วย GC และมีหลายรูปแบบด้วยกัน อย่างไรก็ตามสามารถแบ่งตามหลักการได้ 2 ประเภทใหญ่ ๆ คือ

- **Static Headspace sampling** : คือการวิเคราะห์ในสภาวะที่ไอระเหยของสารที่ต้องการจะวิเคราะห์กระจายตัวอย่างระหว่างชั้นที่เป็นแก๊สและชั้นของตัวอย่าง ภายในขวดตัวอย่างที่เป็นระบบปิด ณ สภาวะหนึ่ง ๆ สารระเหยที่อยู่ภายใต้สมดุลจะถูกนำไปวิเคราะห์ต่อไป
- **Dynamic Headspace sampling** : คือการวิเคราะห์ที่สารที่ต้องการจะวิเคราะห์จะระเหยออกมาจากตัวอย่างตามสภาวะที่กำหนด โดยมีแก๊สตัวพาทำหน้าที่นำสารระเหยดังกล่าวไปผ่านสารตัวกลางที่มีหน้าที่ในการดูดซับ โดยตัวดูดซับที่นิยมใช้เช่น Tenax หรือ silica เป็นต้น จากนั้นตัวดูดซับจะถูกนำไปทำการคายการดูดซับเพื่อวิเคราะห์สารที่ดูดซับไว้ด้วยเทคนิคที่เหมาะสมต่อไป

วิธีการหาปริมาณ 2AP โดยใช้เทคนิค Automated Static Headspace GC

เมื่อกล่าวถึง Static HS-GC วิธีการนำไอระเหยของสารตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วย GC นั้น มักใช้เครื่องดูดไอระเหยของตัวอย่างแบบอัตโนมัติ (headspace auto-sampler) ซึ่งติดตั้งเข้ากับระบบ GC โดยมีโปรแกรมควบคุมการทำงานของทั้ง headspace auto-sampler และ GC อย่างต่อเนื่องกัน ตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์จะถูกบรรจุในขวดปิดสนิทด้วยแผ่นยางซิลิโคน (septum) และถูกนำไปให้ความร้อนใน oven ดังรูป 5.1 เมื่อปล่อยไว้ใน oven ในเวลาที่เหมาะสมสารระเหยในตัวอย่างจะระเหยขึ้นมาใน headspace จนมีความเข้มข้นคงที่ที่จุดสมดุล จากนั้น headspace gas จะถูกพาออกไปยัง GC โดยการอัดแก๊ส N_2 เข้าไปในขวดตัวอย่างผ่านทางเข็ม (vial-sampling needle) จนขวดมีความดันที่มากพอ เมื่อหยุดให้ความดันโดยการควบคุมที่วาล์ว (six-port valve) headspace gas ในขวดตัวอย่างจะไหลมาสะสมในลูปตัวอย่าง (sample loop) ก่อนที่จะถูกแก๊สพาของ GC พา

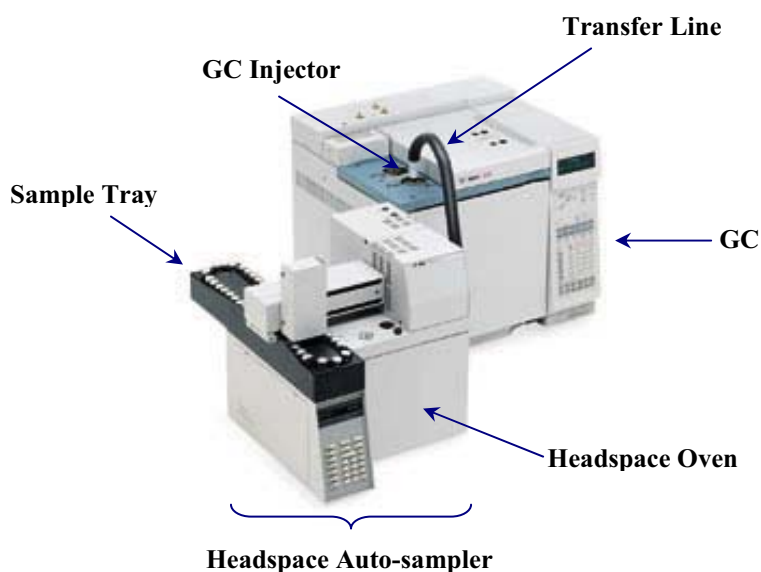
ผ่าน transfer line เข้าไปวิเคราะห์ด้วย GC ต่อไป เทคนิค Static HS-GC นี้ได้นำมาประยุกต์เพื่อ
การวิเคราะห์เชิงปริมาณ 2AP ในตัวอย่างเมล็ดข้าวเป็นครั้งแรกในงานวิจัยนี้



รูป 5.1 แผนภาพแสดงองค์ประกอบอย่างง่ายของ HS-GC

เครื่อง HS-GC

ในการทดลองใช้เครื่อง HS-GC ของบริษัท Agilent Technologies ที่มีรูปแบบการทำงานเป็นแบบ Static HS มีส่วนประกอบที่สำคัญ คือ headspace auto-sampler รุ่น HP 7694 และเครื่อง GC รุ่น HP 5890 Series II ซึ่งการทำงานสามารถนำไอระเหยของสารตัวอย่างเข้าสู่การวิเคราะห์ด้วยระบบ GC ได้โดยตรง โดยเริ่มจากการนำขวดบรรจุตัวอย่างใส่ไว้ใน sample tray ตามตำแหน่งที่ตั้งไว้ในโปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่ใช้ควบคุมการทำงานของทั้งระบบ จากนั้นขวดตัวอย่างจะถูกแขนจับหยิบและนำเข้าไปใน oven ที่มีการเขย่าขวดตัวอย่างในขณะที่มีการให้ความร้อนตามที่ตั้งไว้ หลังจากนั้นไอระเหยจะถูกนำผ่านขั้นตอนย่อยๆ มาจนถึง GC injector โดยผ่าน transfer line ส่วนประกอบของเครื่อง static HS-GC แสดงในรูป 5.2

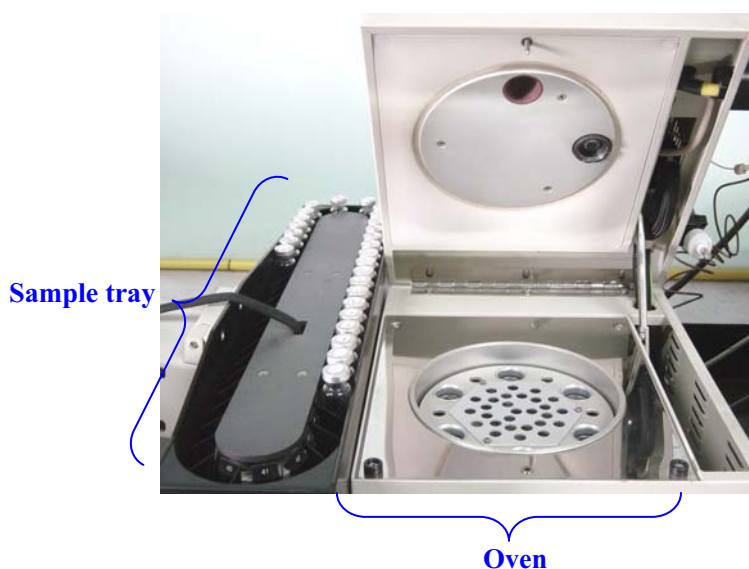


รูป 5.2 เครื่อง HS-GC ของบริษัท Agilent Technologies

Headspace auto-sampler มีส่วนประกอบที่สำคัญคือ

(1) ตู้อบ (Oven)

ทำหน้าที่ให้ความร้อนและควบคุมอุณหภูมิของขวดตัวอย่าง โดยภายใน oven จะมีถาดหมุนซึ่งทำหน้าที่รองรับขวดตัวอย่างและเขย่าขวดตัวอย่าง แสดงดังรูป 5.3 ถาดหมุนดังกล่าวจะมีช่องใส่ขวดตัวอย่างจำนวน 6 ช่อง เพื่อรองรับตัวอย่างในกรณีที่เวลาที่ใช้ในการสกัดด้วยเทคนิค HS นานกว่าเวลาในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC โดย oven สามารถให้ความร้อนและควบคุมอุณหภูมิได้ในช่วง 40 – 200 °C



รูป 5.3 ตู้อบของเครื่อง HS ซึ่งจะมีถาดรองรับตัวอย่างซึ่งสามารถหมุนได้อยู่ภายใน

(2) ถาดใส่ขวดตัวอย่าง (Sample tray)

ถาดใส่ขวดตัวอย่าง ของเครื่อง HP 7694 สามารถวางขวดตัวอย่างได้ถึง 44 ขวด โดยการหมุนหรือการเคลื่อนที่ของถาดดังกล่าว จะสอดคล้องกับตำแหน่งของขวดตัวอย่างที่เราต้องการจะวิเคราะห์ โดยมีมือจับแบบอัตโนมัติทำหน้าที่นำขวดตัวอย่างไปใส่ในช่องใส่ขวดตัวอย่างของ oven ต่อไป โดยระบบทั้งหมดผู้ใช้สามารถตั้งค่าการทำงานให้เป็นไปแบบอัตโนมัติได้ แสดงดังรูป 5.3

(3) ระบบการนำสารตัวอย่าง

ส่วนประกอบหรืออุปกรณ์ที่สำคัญที่ทำหน้าที่ในการนำเอาไอระเหยของตัวอย่างภายในขวดตัวอย่างที่ปิดสนิทไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC ต่อไป ประกอบด้วย เข็ม (vial-sampling needle) ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 0.5 มิลลิเมตร โดยเข็มจะแทงผ่านแผ่นยาง (septum) ของขวดตัวอย่างเพื่ออัดแก๊ส N_2 เข้าไปทำให้ความดันภายในขวดตัวอย่างเพิ่มมากขึ้น จากนั้นไอระเหยที่มีความดันสูงจะไหลผ่านเข็มเข้าสู่ sample loop ซึ่งมีสองขนาดให้เลือกใช้ ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมในการวิเคราะห์คือขนาด 1.0 และ 3.0 มิลลิลิตร ระบบการนำไอระเหยดังกล่าวจะมีวาล์วแบบหกช่องทาง

(six-port valve) เป็นตัวควบคุม (รูป 5.4) ส่วนประกอบเหล่านี้จะอยู่ในส่วนเดียวกันซึ่งสามารถควบคุมอุณหภูมิได้ในช่วง $40 - 200\text{ }^{\circ}\text{C}$



รูป 5.4 ส่วนนำไอระเหยของสารตัวอย่างซึ่งประกอบด้วย needle, six-port valve และ sample loop

(4) ท่อนำตัวอย่างเข้า GC (transfer line)

เป็นอุปกรณ์ที่ทำหน้าที่ในการนำไอระเหยของสารตัวอย่างจาก headspace auto-sampler เข้าไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC โดยตรง (รูป 5.5) ท่อนำตัวอย่างประกอบด้วยท่อโลหะนิเกิลขนาดเล็กอยู่ภายในชุดลดนำความร้อน และมีฉนวนหุ้มไว้ในส่วนนอกสุด ดังนั้นในส่วนนี้จึงสามารถควบคุมอุณหภูมิได้เช่นกัน โดยอยู่ในช่วง $40 - 220\text{ }^{\circ}\text{C}$



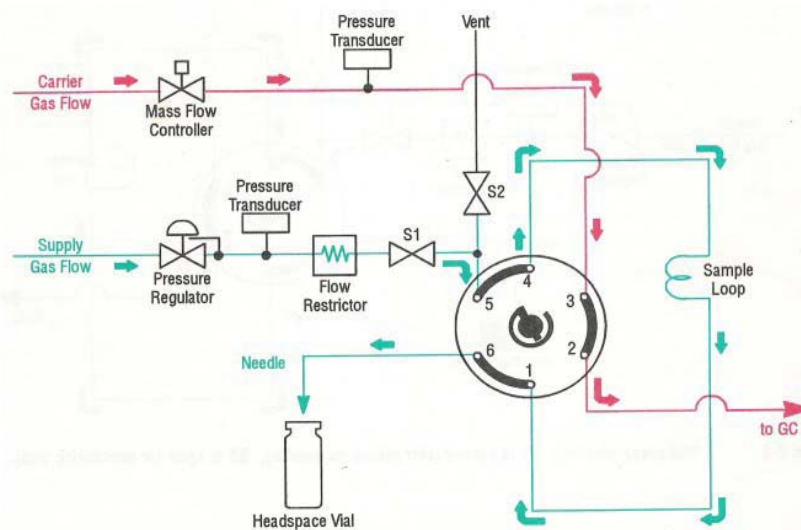
รูป 5.5 ท่อนำตัวอย่างของระบบ HS ซึ่งปลายท่อจะเป็นเข็มที่แทงผ่าน septum ของส่วนฉีดสารของระบบ GC เพื่อนำตัวอย่างเข้าวิเคราะห์โดยอัตโนมัติ

ขั้นตอนการทำงานของ Headspace auto-sampler (รุ่น HP 7694)

ในการใช้งานผู้ใช้จำเป็นต้องเปิดวาล์วแก๊สที่ใช้เป็นตัวพา และเพิ่มความดันภายในขวดตัวอย่างก่อนการทำงาน จากนั้นกดปุ่มเปิด (power) เครื่องจะเริ่มทำงาน โดยจะให้ความร้อนและควบคุมอุณหภูมิของส่วน oven ส่วน sample loop และ transfer line ตามที่ผู้ใช้กำหนด เมื่ออุณหภูมิคงที่ตามที่ต้องการ เครื่องจะแสดงคำว่าพร้อม (ready) ขึ้นที่หน้าจอแสดงผล เมื่อผู้ใช้งานกดปุ่ม เริ่มทำงาน (start) มอเตอร์แบบอัตโนมัติจะนำขวดตัวอย่างจากตำแหน่งที่ต้องการภายในถาดตัวอย่างไปใส่ลงในช่องรับขวดตัวอย่างภายใน oven จากนั้นเครื่องจะทำงานตามขั้นตอนต่าง ๆ เหล่านี้คือ

(1) สภาวะเตรียมพร้อม (Stand-by condition)

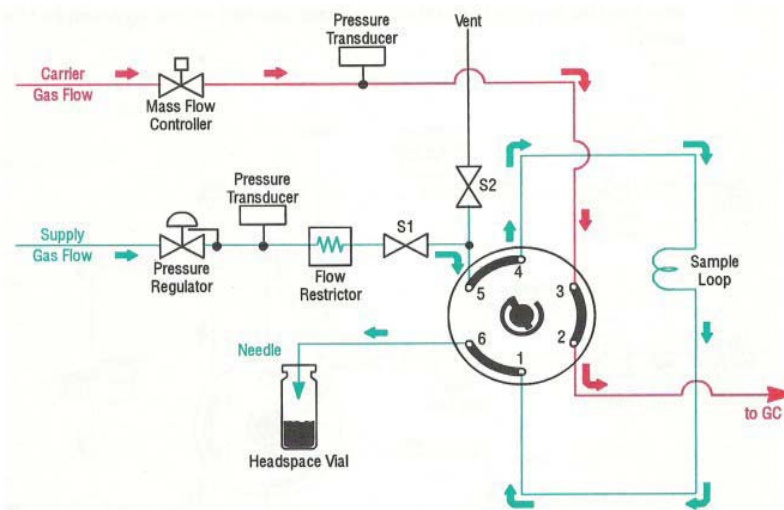
ระบบซึ่งประกอบด้วยวาล์วและอุปกรณ์ควบคุมอัตราการไหลของแก๊ส คือ วาล์ว S_1 และตัวควบคุมความดัน (pressure regulator) สำหรับแก๊สที่ใช้ในการเพิ่มความดัน (N_2) และวาล์ว S_2 และตัวควบคุมอัตราการไหล (flow controller) ของแก๊สตัวพา ซึ่งเส้นทางการไหลของแก๊สทั้งสองจะถูกควบคุมด้วย six port valve โดยในขณะเครื่องพร้อมใช้งาน วาล์วควบคุมแก๊สสำหรับเพิ่มความดัน (S_1) จะเปิดเพื่อให้แก๊สไหลผ่าน six port valve ผ่านช่องหมายเลข 5 ไป 4 เพื่อเข้าสู่ sample loop ออกสู่ช่องหมายเลข 1 และ 6 ผ่านไปสู่เข็มต่อไป แสดงตามเส้นสีเขียวภายในรูป 5.6 ในขณะที่แก๊สตัวพาจะไหลผ่าน six port valve ผ่านช่องหมายเลข 3 ไป 2 และท่อนำสารตัวอย่างและในขณะเดียวกันขวดตัวอย่างที่อยู่ภายใน oven ก็จะได้รับความร้อนตามเวลาและอุณหภูมิที่ผู้ใช้กำหนด โดยในขณะที่กำลังทำการวิเคราะห์ ขวดตัวอย่างจะถูกเขย่าอยู่ตลอดเวลา



รูป 5.6 สภาวะการทำงานของเครื่อง HS ในสภาวะเตรียมพร้อม

(2) การเพิ่มความดันภายในขวดตัวอย่าง (Vial pressurization)

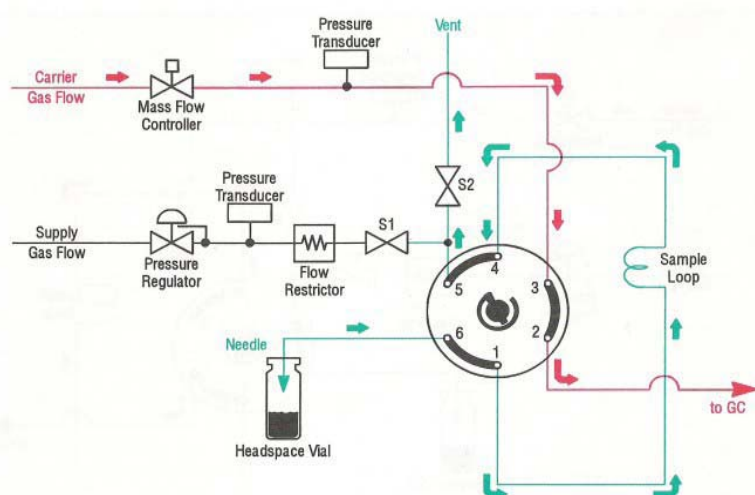
หลังจากขวดตัวอย่างอยู่ในสมดุลภายใต้อุณหภูมิและเวลาที่กำหนด ภาตรองรับตัวอย่างภายใน oven จะหมุนเปลี่ยนตำแหน่งเพื่อให้ขวดตัวอย่างที่ต้องการอยู่ในตำแหน่งที่ตรงกันกับเข็ม จากนั้นแท่งโลหะข้างใต้ขวดตัวอย่างจะเลื่อนสูงขึ้นเพื่อดันขวดตัวอย่างขึ้นไป ทำให้ยางปิดขวดถูกแทงด้วยเข็ม ในขั้นแรกวาล์ว S_1 จะเปิดทำให้แก๊สไหลเข้าสู่ภายในขวดตัวอย่างตามเวลาที่กำหนด ส่งผลให้ความดันภายในขวดเพิ่มขึ้น แสดงการทำงานดังรูป 5.7



รูป 5.7 สภาวะการทำงานของเครื่อง HS เพื่อทำการเพิ่มความดันให้แก่ขวดตัวอย่าง

(3) การเติมลูฟ (Filling the sample loop)

เมื่อผ่านกระบวนการเพิ่มความดันภายในขวดตัวอย่าง ส่งผลให้ความดันภายในขวดตัวอย่างสูงกว่าความดันบรรยากาศ ดังนั้นเมื่อวาล์ว S_1 ปิดในขณะที่วาล์ว S_2 เปิด ไอระเหยของสารตัวอย่างจะเคลื่อนที่ออกจากขวดตัวอย่างซึ่งมีความดันสูงผ่านตามเข็มและเข้าสู่ sample loop ซึ่งมีความดันเท่ากับความดันบรรยากาศ ดังรูป 5.8 โดยการเติม sample loop ของตัวอย่างจะสัมพันธ์กับเวลาในการปิดและเปิดวาล์ว S_2 และความดันทั้งหมดภายในขวดตัวอย่าง ซึ่งประกอบด้วยความดันภายในขวดก่อนการเพิ่มความดันด้วยแก๊ส และความดันที่ได้รับเพิ่มจากขั้นตอนการเพิ่มความดัน ดังนั้นปริมาณของตัวอย่างที่จะเข้าสู่ sample loop จึงมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับทั้งการเพิ่มความดันและระยะเวลาเพื่อให้สารไหลผ่านเข้าสู่ sample loop (loop filling time)



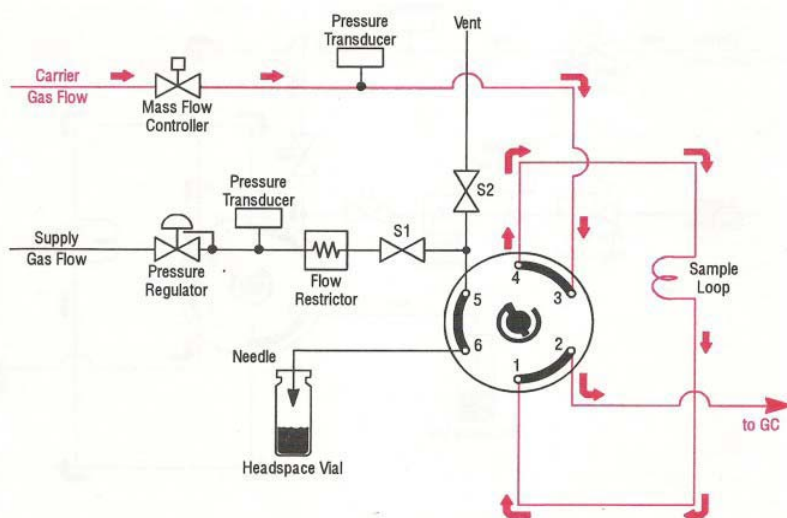
รูป 5.8 สภาวะการทำงานของเครื่อง HS เพื่อให้สารตัวอย่างมีการเคลื่อนที่เข้าสู่ sample loop

(4) การเข้าสู่สมดุลของลูป (Loop equilibration)

เมื่อสารตัวอย่างเต็มเข้า sample loop เรียบร้อยแล้ว ระบบจะปิดทั้งวาล์ว S_1 และ S_2 เพื่อให้สารมีการปรับตัวเข้าสู่สมดุลใหม่ภายใน sample loop ตัวอย่าง ทำให้สารองค์ประกอบทั้งหมดทั้งหมดที่มีอยู่ภายในแก๊สตัวอย่างรวมเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน ก่อนที่จะทำการวิเคราะห์ต่อไปด้วยเทคนิค GC

(5) การฉีดตัวอย่าง (Sample injection)

หลังจากที่สารตัวอย่างอยู่ภายใต้สมดุลภายใน sample loop ระบบ six port valve จะทำการหมุนตำแหน่งทำให้แก๊สตัวพาไหลผ่านช่องทางหมายเลข 3 ไปช่องทางหมายเลข 4 ผ่านเข้าสู่ sample loop เพื่อพาเอาสารตัวอย่างภายใน sample loop ออกไปสู่ช่องทางหมายเลข 1 และ 2 ดังรูป 5.9 จากนั้นสารตัวอย่างจะเข้าสู่ระบบการนำสารเข้าของเครื่อง GC ผ่านท่อ transfer line ของเครื่อง HS



รูป 5.9 สภาวะการทำงานของเครื่อง HS เพื่อทำการฉีดสารเข้าสู่ระบบ GC

(6) เสร็จการวิเคราะห์

เมื่อเสร็จสิ้นการฉีดสารตัวอย่าง ขวดตัวอย่างจะเคลื่อนที่ลงมาจากตำแหน่งการแทงของเข็ม จากนั้นแท่นรองรับขวดตัวอย่างจะหมุนเพื่อนำขวดตัวอย่างมายังตำแหน่งทางออกของขวดตัวอย่างจาก oven โดยจะมีแขนจับอัตโนมัติมารับขวดตัวอย่างที่วิเคราะห์เสร็จสิ้นแล้ว ไปไว้ยังตำแหน่งเดิมใน sample tray ภายนอก ส่วนระบบภายในซึ่งประกอบด้วยวาล์วควบคุมแก๊สต่างๆ และ six port valve จะทำงานโดยปรับเปลี่ยนตำแหน่งตั้งขึ้นตอนที่ 1 เพื่อเตรียมพร้อมในการวิเคราะห์ตัวอย่างขวดต่อไป

ปัจจัยที่สำคัญของการวิเคราะห์ด้วย Static HS-GC

ในการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HS มีตัวแปรหรือปัจจัยต่าง ๆ ที่ต้องทำการควบคุมเพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง แม่นยำ และให้สภาพไวที่ดี ตัวแปรเหล่านี้เปลี่ยนไปตามคุณลักษณะของตัวอย่างและสารที่ต้องการวิเคราะห์ ตัวแปรที่สำคัญได้แก่

(1) อุณหภูมิของตู้อบ (Oven temperature) เป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการวิเคราะห์ทั้งเชิงปริมาณและคุณภาพ โดยส่งผลต่อสมดุลของสารที่ต้องการจะวิเคราะห์ โดยจะอยู่ในสมดุลระหว่างตัวอย่างและ HS ภายในขวดที่ปิดสนิท

(2) อุณหภูมิของ sample loop ต้องสูงกว่าอุณหภูมิของตู้อบเพื่อป้องกันการควบแน่น

(3) อุณหภูมิของท่อนำสาร (Transfer line temperature) ต้องสูงกว่าอุณหภูมิของ sample loop เพื่อป้องกันการควบแน่น

(4) เวลาการเข้าสู่สมดุลของขวดตัวอย่าง (Vial equilibration time) คือ เวลาที่ขวดตัวอย่างใช้ในการรับความร้อนจากตู้อบ โดย ณ เวลาหนึ่งๆ ก็เกิดสมดุลต่างๆ ขึ้นภายในขวดตัวอย่าง ตัวอย่างแต่ละชนิดจะมีเวลาที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับชนิดและสถานะของตัวอย่าง ปัจจัยนี้ส่งผลอย่างมากต่อการทำคุณภาพและปริมาณวิเคราะห์

(5) เวลาในการเพิ่มความดัน (Pressurizing time) คือ เวลาที่แก๊สตัวพา (ในการทดลองใช้แก๊ส N_2) ผ่านเข้าไปภายในขวดตัวอย่างเพื่อทำการเพิ่มความดันภายในขวดตัวอย่าง ซึ่งจะส่งผลต่อสภาพไวของเทคนิค

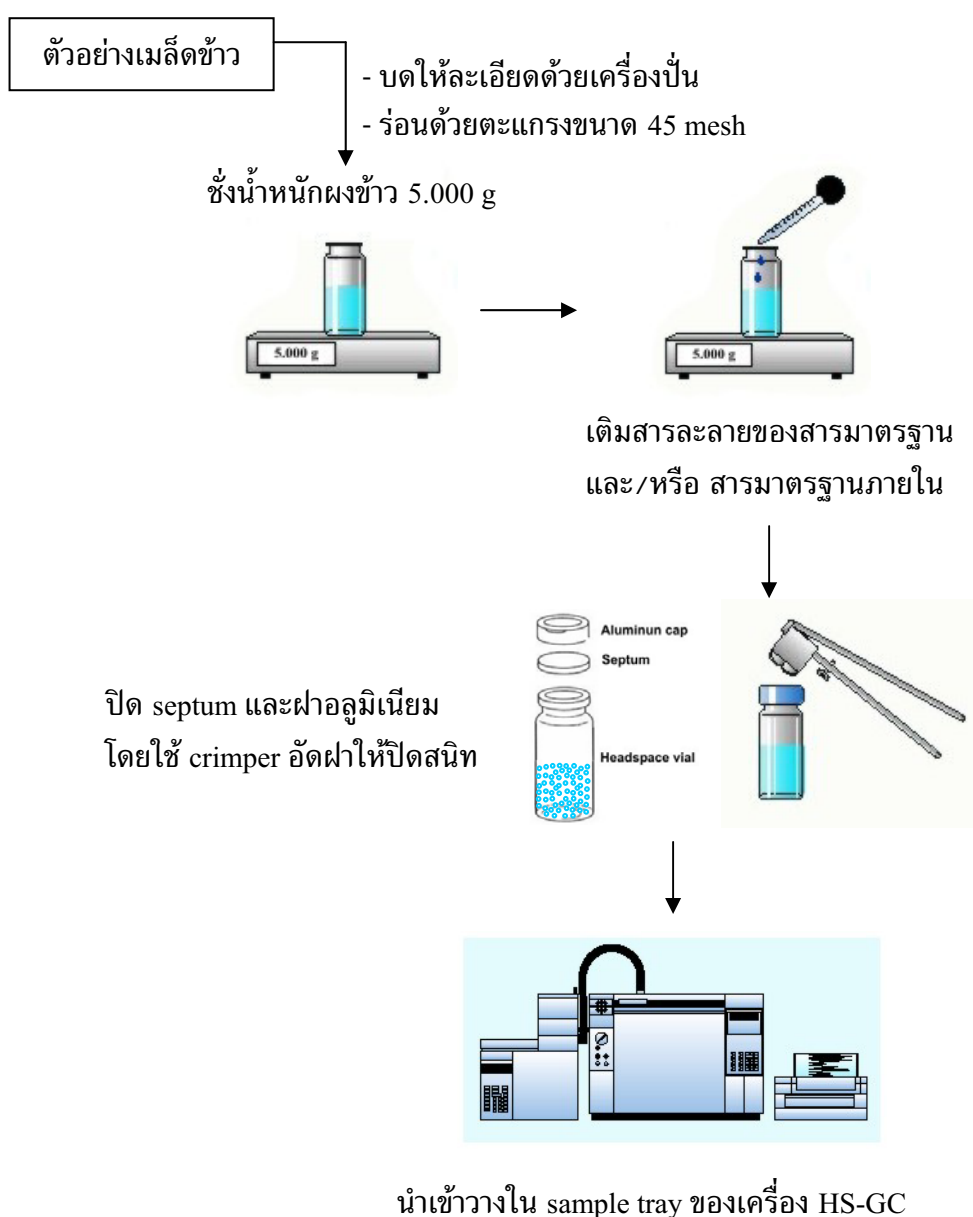
(6) เวลาในการเติม sample loop (Loop filling time) คือ เวลาที่สารตัวอย่างที่อยู่ภายในเฮดสเปซของขวดตัวอย่าง จะผ่านเข้ามาสู่ sample loop ที่มีปริมาตรคงที่ เพื่อให้ปริมาตรของสารก่อนที่จะถูกวิเคราะห์ด้วย GC มีปริมาณที่คงที่เท่ากันทุกครั้ง

(7) เวลาสมดุลของ sample loop (Loop equilibration time) คือ เวลาที่ให้สารตัวอย่างเข้าสู่สมดุลภายใน loop ก่อนที่จะถูกวิเคราะห์ต่อไป ปัจจัยนี้มีผลต่อความแม่นยำของการทดลอง

(8) เวลาที่ใช้ในการฉีดสาร (Injection time) เวลาที่ใช้ในการนำสารตัวอย่างจาก sample loop เข้าสู่ส่วนฉีดสารของ GC โดยอัตโนมัติ ส่วนใหญ่จะตั้งค่าไว้ให้แน่ใจว่าสารทั้งหมดภายใน sample loop ถูกวิเคราะห์ด้วยระบบ GC

วิธีการเตรียมตัวอย่างเมล็ดข้าว

เตรียมขวดบรรจุตัวอย่าง (headspace vial) และ septum ชนิด PTFE/silicone ขนาดเดียวกับขนาดของขวดตัวอย่างพร้อมฝาอลูมิเนียม ก่อนใช้ควรนำไปอบความร้อนเพื่อไล่สิ่งเจือปน ก่อนบรรจุตัวอย่างเมล็ดข้าว เมล็ดข้าวตัวอย่างใช้ข้าวกล้องพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ได้รับจากแปลงเพาะปลูกคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เก็บเกี่ยวในเดือนพฤศจิกายน 2546 เป็นตัวอย่างข้าวเพื่อทดลอง ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างแสดงในแผนภาพรูป 5.10 กรณีการวิเคราะห์ปริมาณซึ่งใช้วิธีสารมาตรฐานภายใน ใช้ 2,4-dimethylpyridine เป็นสารมาตรฐานภายในที่ความเข้มข้น 1000 ในตัวทำละลาย isopropanol



รูป 5.10 แผนผังวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HS-GC

การวิเคราะห์ปริมาณ 2AP ในเมล็ดข้าวด้วยเทคนิค Static HS-GC:

การหาสภาวะที่เหมาะสมของระบบ GC

ในการวิเคราะห์ด้วยระบบ HS-GC นั้น GC เป็นส่วนสำคัญที่จะทำการแยกและวิเคราะห์สารตัวอย่าง ดังนั้นจึงควรหาสภาวะที่เหมาะสมของการแยกสารระเหยจากตัวอย่างข้าวด้วย GC ก่อนเป็นอันดับแรก โดยเฉพาะการหาชนิดของ capillary column ที่เหมาะสม เนื่องจากชนิดของคอลัมน์ที่เลือกใช้จะเป็นตัวกำหนดค่าตัวแปรอื่นๆ ของระบบ GC ด้วย เช่น อัตราการไหลของแก๊สตัวพา รูปแบบการนำสารเข้าของส่วนฉีดสาร เป็นต้น ในการวิจัยนี้จึงได้ทำการประเมินชนิดของ capillary column และสภาวะของ GC โดยชนิดของ capillary column ที่ใช้มีทดลองดังนี้

- DB-1701

Liquid phase คือ 14% cyanopropyl-phenyl 86% dimethylpolysiloxane
ขนาด 15.0 m × 320 µm i.d. ความหนาของ liquid phase 0.15 µm
ผลิตโดยบริษัท J& W Scientific

- DB-35MS

Liquid phase คือ 35% phenyl 65% methyl arylsiloxane
ขนาด 30.0 m × 530 µm i.d. ความหนาของ liquid phase 1.0 µm
ผลิตโดยบริษัท J& W Scientific

- HP-5MS

Liquid phase คือ 5% phenyl 95% dimethylpolysiloxane
ขนาด 30.0 m × 320 µm i.d. ความหนาของ liquid phase 0.5 µm
ผลิตโดยบริษัท Hewlett Packard

- HP-5

Liquid phase คือ 5% phenyl 95% dimethylpolysiloxane
ขนาด 30.0 m × 530 µm i.d. ความหนาของ liquid phase 1.5 µm
ผลิตโดยบริษัท Hewlett Packard

Capillary column ชนิด DB 1701 เมื่อใช้กับการวิเคราะห์ตัวอย่างข้าวที่เก็บรักษามาเป็นเวลานานหรือข้าวเก่า ซึ่งพบ hexanoic acid อยู่ในโอระเหยของข้าวในปริมาณมาก และสารนี้มี retention time เท่ากับ retention time ของ 2AP ทำให้เกิดการซ้อนทับกันของพีคของสารทั้งสอง และส่งผลให้การวิเคราะห์เชิงปริมาณมีความผิดพลาดได้ การใช้คอลัมน์ชนิด DB-35MS ซึ่ง liquid phase มีสภาพขั้วน้อยกว่าคอลัมน์ชนิด DB 1701 เล็กน้อย แต่ขนาดยาวขึ้นจาก 15 เป็น 30 เมตร เมื่อเปรียบเทียบกับคอลัมน์ DB-1701 และความหนาของ liquid phase เพิ่มขึ้นจาก 0.25 µm เป็น 1.0 µm ซึ่งคาดว่าจะช่วยให้ประสิทธิภาพในการแยกดีขึ้น แต่ยังไม่สามารถแยก 2AP ออกจาก hexanoic acid ได้อย่างดีพอ

การใช้คอลัมน์ที่มีสภาพขั้วต่ำ เช่นคอลัมน์ HP-5MS จึงน่าจะส่งผลให้ลำดับในการแยกสารเปลี่ยนไป และน่าจะสามารถแยก 2AP ออกจาก hexanoic acid ได้ ดังนั้นจึงได้มีการทดลอง

นำเอาคอลัมน์ HP-5MS มาใช้ในการแยกไอระเหยจาก headspace ของตัวอย่างเมล็ดข้าว พบว่าสามารถแยกพีค 2AP ออกจาก hexanoic acid ได้ดี อย่างไรก็ตาม พบว่าสภาพโวลของการวิเคราะห์ยังไม่ดีพอ เพื่อเป็นการปรับปรุงการแยกและเพิ่มสภาพโวลของเทคนิคให้สูงขึ้น จึงทดลองใช้คอลัมน์ HP-5 ที่มีความหนาของ liquid phase และเส้นผ่าศูนย์กลางภายในเพิ่มขึ้นเป็น 1.5 ไมโครเมตร และ 0.53 มิลลิเมตร ตามลำดับ พบว่าส่งผลดีต่อประสิทธิภาพในการแยกและสภาพโวลของการตรวจวัด 2AP จึงได้นำคอลัมน์ชนิด HP-5 (5% phenyl 95% methylpolysiloxane) ความยาว 30.0 m เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 530 μm และความหนาของลิควิดเฟส 1.50 μm นี้ไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณของ 2AP ในตัวอย่างข้าวด้วยเทคนิค HS-GC ต่อไป

การทดลองหาสภาวะต่างๆ ของ GC ในการแยกองค์ประกอบสารระเหยจาก headspace ของตัวอย่างเมล็ดข้าวโดยใช้คอลัมน์ HP-5 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมของ GC มีดังนี้

เครื่อง GC : รุ่น 5890 series ผลิตโดยบริษัท Agilent

- อุณหภูมิของตัวนำสารเข้า	250	°C
- โปรแกรมอุณหภูมิของคอลัมน์ :		
อุณหภูมิเริ่มต้น	45	°C
อุณหภูมิที่สอง	65	°C
อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ	0.5	°C/min
อุณหภูมิสุดท้าย	250	°C
อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ	45	°C/min
- อัตราการไหลของก๊าซฮีเลียม	1	mL/min
- ปริมาตรสารที่ฉีด	1.0	μL
- Split ratio	1 : 1	
- อุณหภูมิของ FID	250	°C

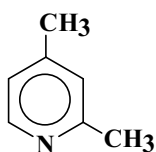
♦ อัตราการไหลของแก๊สตัวพา

ทำการศึกษาโดยใช้สภาวะของ GC ดังกล่าวข้างต้น และปรับเปลี่ยนอัตราการไหลของแก๊สตัวพาของ GC เพื่อหาอัตราการไหลที่เหมาะสม โดยในการทดลองใช้อัตราการไหลของแก๊สตัวพาเป็น 3, 4 และ 5 ml/min พบว่าการใช้อัตราการไหลของแก๊สตัวพาของ GC เท่ากับ 3 ml/min ให้ประสิทธิภาพการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบใน headspace ของเมล็ดข้าวดีกว่าอัตราการไหลเท่ากับ 4 และ 5 ml/min ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อปริมาณของตัวอย่างที่เข้าสู่คอลัมน์มากเกินไปเมื่ออัตราการไหลของแก๊สตัวพาสูงขึ้น จะทำให้ประสิทธิภาพในการแยกลดลง ดังนั้นจึงเลือกใช้อัตราการไหลของแก๊สตัวพาเท่ากับ 3 ml/min

♦ สารมาตรฐานภายใน

เนื่องจากการวิเคราะห์เชิงปริมาณโดยใช้วิธีการสารมาตรฐานภายใน (internal standard method) จะช่วยลดปัญหาความผิดพลาดจากตัวผู้ทดลองและเครื่องมือได้มาก ดังนั้นเพื่อให้การ

วิเคราะห์เชิงปริมาณของ 2AP ซึ่งเป็นสารระเหยที่มีอยู่ในเมล็ดข้าวปริมาณน้อย (trace amount) ให้มีความถูกต้องและแม่นยำขึ้น จึงนำเอาวิธีสารมาตรฐานภายในมาใช้ โดยจากการทดลองพบว่าการใช้ TMP เป็นสารมาตรฐานภายในนั้นประสบปัญหาในการแยก เนื่องจากองค์ประกอบสารระเหยมีจำนวนมาก และซ้อนทับกันกับพีคของ TMP ดังนั้นจึงได้พิจารณาหาสารตัวใหม่ที่จะนำมาใช้เป็นสารมาตรฐานภายใน โดยในเบื้องต้นจะพิจารณานำเอาสารที่มีลักษณะใกล้เคียงกับ TMP เนื่องจากมีจุดเด่นของความเสถียร นอกจากนี้ยังถือว่าเป็นสารประกอบไนโตรเจนเช่นเดียวกับ 2AP อีกด้วย พบว่า 2,4-dimethylpyridine หรือ DMP เป็นสารที่เหมาะสมแก่การนำมาใช้เป็นสารมาตรฐานภายใน



2,4-dimethylpyridine (DMP)

การหาปริมาณที่เหมาะสมของตัวอย่างข้าวเพื่อใช้ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณของ 2AP

เนื่องจากปริมาณข้าวที่อยู่ในขวดตัวอย่างแบบ headspace มีผลต่อพื้นที่ของ headspace ภายในขวด ซึ่งส่งผลโดยตรงต่อสภาพไวของการวิเคราะห์ 2AP ในตัวอย่างข้าวด้วยเทคนิค HS-GC ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาถึงผลของปริมาณตัวอย่างภายในขวดตัวอย่าง โดยทำการวิเคราะห์ตัวอย่างข้าวกล้องพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ในปริมาณที่แตกต่างกัน คือ 0.5, 1.0, 2.0 และ 3.0-8.0 g ผลการวิเคราะห์ที่แสดงโดยกราฟแสดงปริมาณพื้นที่ใต้พีคของสาร 2AP สารมาตรฐานภายใน DMP และอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของสาร 2AP ต่อ DMP จากการวิเคราะห์ข้าวกล้องในปริมาณต่าง ๆ กัน ด้วยเทคนิค HS-GC แสดงดังรูป 5.11

พบว่าเทคนิค HS-GC สามารถประยุกต์ใช้ในวิเคราะห์ปริมาณของ 2AP ในตัวอย่างข้าวปริมาณต่าง ๆ ได้ ตั้งแต่ระดับ 0.1 g ไปถึง 8 g โดยระดับสูงสุดของปริมาณข้าว จะไม่สูงกว่าระดับ 8 g มากนัก เพื่อป้องกันการสัมผัสระหว่างเข็มกับตัวอย่างข้าวโดยตรง ดังนั้นในการทดลองจึงใช้ปริมาณมากที่สุดของตัวอย่างเพียง 8 g ถึงแม้ว่าจากการทดลองที่ได้พบว่าเมื่อปริมาณของตัวอย่างเพิ่มมากขึ้น สภาพไวมีแนวโน้มที่จะเพิ่มมากยิ่งขึ้นก็ตาม ดังนั้นปริมาณของตัวอย่างที่จะเลือกใช้เพื่อทำการเตรียมตัวอย่างในการศึกษาระบบของ static HS-GC ต่อไป จึงจะใช้ข้าวตัวอย่างที่ปริมาณ 5 กรัม ซึ่งเป็นค่าในระดับปานกลางและสัดส่วนของปริมาตรของตัวอย่างและปริมาตรของ headspace ภายในขวดตัวอย่างจะมีประมาณ 1 ต่อ 3 และเพื่อให้ค่าตัวแปรต่าง ๆ ของระบบ HS-GC ที่หาสถานะที่เหมาะสมแล้ว สามารถประยุกต์ใช้ครอบคลุมตัวอย่างในปริมาณต่าง ๆ ได้ ทั้งในช่วงระดับต่ำ คือ 0.1 g ไปจนถึง 8 g เนื่องจากปริมาณตัวอย่างข้าวที่เลือกใช้คือ 5 g อยู่ในระดับปานกลางเมื่อเทียบกับช่วงของปริมาณตัวอย่าง