การประเมินสารหอม 2-Acetyl-1-Pyrroline: 2AP ในข้าวกล้องพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 โดยเทคนิค NIR Spectroscopy

Evaluation of Aromatic Compound : 2-Acetyl-1-Pyrroline (2AP) in Khao Dawk Mali 105 Brown Rice by NIR Spectroscopy

จารุวรรณ บางแวก[1/] อรวรรณ จิตต์ธรรม [1/] อรณิชชา สุวรรณโฉม [1/]

Charuwan Bangwaek[1/] Orawan Jitham[1/] Onitcha Suwanachom[1/]

ABSTRACT

Khao Dawk Mali 105 is an aromatic rice with variable prices due to the smell from volatile gas called 2-Acetyl-1-pyrroline (2AP). The smell was rapidly gone after 6 months of storage or at high temperature condition. Improvement of aromatic rice variety is rather difficult to detect in the smell of 2AP practically amount of screen. The conventional method of determination is time consuming, sample destroyed, high experience needed and costly. Hence, NIR spectroscopy is new ideal technique for 2AP determination because of saving time, free chemicals, and nondestructive sample. Then introduction of determination the amount of aromatic compound: 2AP was made. One hundred and five test samples of brown rice namely KDML105 were prepared by oven at 50°C. In order to get various amount of 2AP, the samples were divided into 2 sets, one was scanned by NIR spectroscopy with 800-2500 nm in mode of reflection and another was analyzed the amount 2AP by GC-headspace. The correlation between 2AP peak by GC instead of the amount of 2AP and pretreated spectra with second derivative was analyzed. The model was accepted with high R: 0.89 and low SEP: 0.96 pA*s. Regression coefficient contained the wavelengths involved with aroma, starch and cellulose were 1143, 1410, 1540, 1705 and. 1920 nm, respectively.

Key words : aromatic rice, 2-Acetyl pyrroline (2AP), Khao Dawk Mali 105 brown rice, NIR spectroscopy

[1/] สำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม. 10900

[1/] Postharvest and Processing Research and Development Office, Department of Agriculture, Chatuchak, Bangkok 10900

บทคัดย่อ

ข้าวขาวดอกมะลิ 105 เป็นข้าวหอมที่มีสารหอมระเหย 2-Acetyl-1-pyrroline (2AP) เมื่อได้รับความร้อนหรือเก็บไว้เป็นเวลานาน ความหอมจะสูญเสียได้ง่าย ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวหอมมีความจำเป็นต้องวัดปริมาณความหอม ซึ่งการวัดเป็นวิธีค่อนข้างยาก เพราะต้องใช้ผู้มีประสบการณ์ในการดมกลิ่น ถ้าเป็นวิธีสกัดสาร 2AP ก็จะเป็นวิธีที่ยุ่งยาก จึงได้นำเทคนิค NIR spectroscopy มาประเมินสารหอมในข้าวขาวดอกมะลิ 105 ผลการศึกษาของสำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว และแปรรูปผลิตผลเกษตรปี พ.ศ. 2552 พบว่าสามารถสร้างสมการในการประเมินปริมาณ สาร 2AP ได้ถูกต้องและเป็นที่ยอมรับได้ โดยการนำเมล็ดข้าวกล้องพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 จำนวน 105 ตัวอย่าง ที่ได้จากการนำข้าวที่เก็บเกี่ยวใหม่ไปอบที่อุณหภูมิ 50 °ซ. เป็นเวลาต่างๆ เพื่อลดปริมาณสารหอม ทำให้ตัวอย่างมีปริมาณสารหอมที่หลากหลาย แล้วนำตัวอย่างข้าวไปผ่านแสง near infrared ที่ช่วงความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง NIR spectrometer (FOSS system 6500) แสดงออกมาในรูปค่าการดูดซับแสง ที่ความยาวคลื่นที่ต่างกัน (spectra) หลังจากนั้นนำตัวอย่างไปวัดปริมาณสาร 2AP ด้วยเครื่อง GC-headspace ทันที นำค่าการดูดกลืนแสง NIR ที่ปรับแต่งทางคณิตศาสตร์ด้วยวิธี second derivative และค่าพื้นที่ใต้กราฟที่เวลาของสาร 2AP จากเครื่อง GC-headspace ที่แสดงปริมาณสาร 2AP มาสร้างสมการ จนได้สมการที่มีค่าสหสัมพันธ์ (R) ค่อนข้างสูง (R= 0.89) ค่าความคลาดเคลื่อนในการประเมิน (SEP) ต่ำ (SEP =0.96 pA*s) และค่า regression coefficient สูงที่ความยาวคลื่น 1143 1410 1540 1705 และ 1920 นาโนเมตร ตามลำดับ ซึ่งเป็นความยาวคลื่นที่เกี่ยวข้องกับความหอม แป้งและเซลลูโลส

คำหลัก: ข้าวกล้องขาวดอกมะลิ 105 เทคนิค NIR spectroscopy, สารหอม 2-Acetyl-1-pyrroline (2AP)

คำนำ

สาร 2-Acetyl-1-pyrroline (2AP) เป็นสารหอมระเหยที่พบในข้าวหอม (Buttery *et al.*, 1982) ใบเตยและข้าวโพดคั่ว (Laksanalamai *et al.*, 1993) แต่ความหอมลดลงอย่างรวดเร็วในสภาพที่มีอุณหภูมิสูง หรือเมื่อเก็บรักษาไว้เป็นเวลานาน ข้าวที่เก็บเกี่ยวใหม่ๆ จะมีความหอมสูง แต่เมื่อเก็บข้าวไว้นานมากกว่า 6 เดือน ความหอมของข้าวจะลดลงและหมดไป (Wongpornchai *et al.*, 2004) ซึ่งเป็นเหตุให้ราคาข้าวหอมต่ำลง ข้าวหอมมีกลิ่นความหอมขณะที่หุงข้าวและรับประทาน จึงได้รับความนิยมในการบริโภคและเป็นเหตุหนึ่งที่ทำให้ข้าวหอมมีราคาสูงกว่าข้าวพันธุ์อื่นๆ การปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีความหอมตามความต้องการของตลาด จัดเป็นเป้าหมายที่สำคัญเพื่อเพิ่มมูลค่าข้าว แต่ต้องมีวิธีการวัด

ความหอมที่เป็นมาตรฐานและเป็นที่ยอมรับ ซึ่งวิธีการวัดความหอมข้าวโดยทั่วไปมี 2 วิธีคือ การดมกลิ่น แต่วิธีนี้ต้องใช้ผู้ที่มีความชำนาญซึ่งไม่สามารถระบุปริมาณที่แน่นอนได้ และการสกัดสารหอมแล้วนำไปวัดปริมาณสารหอม (2AP) ด้วยเครื่อง gas chromatography (GC) (Wongpornchai *et al.*, 2003) ก็เป็นวิธีการที่ค่อนข้างยาก ใช้เวลานาน ต้องการผู้ที่มีประสบการณ์สูง และเครื่องมือมีราคาสูง แต่ได้ค่าที่แน่นอน ดังนั้นในการปรับปรุงพันธุ์ หรือการค้าขายข้าวหอม ถ้ามีวิธีการตรวจวัดปริมาณความหอมที่รวดเร็ว ดำเนินการได้ง่าย ให้ผลที่ได้รับถูกต้อง น่าจะเป็นสิ่งที่ต้องการสำหรับเพิ่มความมั่นใจในการประเมินความหอม ของนักปรับปรุงพันธุ์และผู้ซื้อข้าวหอม

Near infrared spectroscopy (NIR spectroscopy) เป็นเทคนิคที่ใช้ประเมินองค์ประกอบที่เป็นอินทรีย์สาร อาทิ น้ำหนักแห้งในหัวหอม (Birth *et al.*, 1985) soluble solids ในแคนตาลูป (Dull *et al.*, 1989) ค่าความหวาน (°Brix) ในพีช (Kawano *et al.*, 1992) ปริมาณแป้ง ความชื้นเมล็ด ปริมาณโปรตีนในข้าวสาลี เป็นต้น และในอุตสาหกรรมประเภทต่างๆ เช่น อาหาร เสื้อผ้า เส้นใยสังเคราะห์ ยา ปิโตรเลียม และเครื่องสำอาง (Iwamoto, 2006) ทั้งในสหรัฐอเมริกา ยุโรป ญี่ปุ่น เกาหลี จีนและอีกหลายประเทศทั่วโลก ซึ่งมีผลงานวิจัยที่มีมากขึ้นเป็นจำนวนมาก และเทคนิคนี้เป็นวิธีที่ให้ความถูกต้อง แม่นยำ ใช้ระยะเวลาสั้น ไม่ใช้สารเคมี และไม่ทำลายตัวอย่าง เทคนิคนี้ใช้หลักการดูดกลืนแสง (absorption) ในช่วงความยาวคลื่น near infrared (800 - 2500 นาโนเมตร) ของตัวอย่าง เมื่อองค์ประกอบในตัวอย่างได้รับแสงจะดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่างๆ และถ่ายทอดพลังงานออกมาในปริมาณที่ไม่เท่ากันขึ้นกับชนิดของสาร เช่น โมเลกุลน้ำดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 970 1450 นาโนเมตร โมเลกุลเกี่ยวกับสารหอมดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 1143 1417 1446 นาโนเมตร เป็นต้น (Osborne, 1986) แล้วทำสมการโดยนำค่าการดูดกลืนแสงเพื่อให้ได้มาซึ่งความสัมพันธ์กับผลวิเคราะห์จากห้องปฏิบัติการพร้อมทั้งหาค่าความคลาดเคลื่อนในการประเมิน สมการที่ดีควรมีความสัมพันธ์ (R) สูง แต่มีค่าความคลาดเคลื่อนในการประเมิน (standard error of prediction, SEP) ต่ำ เมื่อได้สมการที่ผ่านการตรวจสอบที่มีประสิทธิภาพต่อไปก็นำสมการนี้ไปใช้ประเมินตัวอย่างเป้าหมาย ซึ่งขั้นตอนนี้ใช้เวลาเพียง 2 - 3 นาที และไม่ทำลายตัวอย่าง จึงเป็นวิธีการเหมาะที่จะใช้ในขั้นตอนการทำงานตรวจวิเคราะห์ โดยเฉพาะงานห้องปฏิบัติการที่เป็นงานประจำ (routine) ฉะนั้นควรมีการนำเทคนิค NIR spectroscopy เพื่อศึกษาและประเมินปริมาณสารหอมในตัวอย่างข้าวกล้องหอมต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองดำเนินการที่สำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

โดยมีลำดับขั้นตอนการดำเนินงาน ในปี

พ.ศ. 2552-2553 คือ

1. การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างข้าวเปลือกพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 หลังเก็บเกี่ยวไว้ในห้องเย็นที่อุณหภูมิ 10°ซ. ทันทีเพื่อรักษาความหอม และแบ่งข้าวเปลือก 5 กก. กะเทาะเปลือกออกเป็นข้าวกล้อง แล้วอบที่อุณหภูมิ 50°ซ. โดยสุ่มเก็บตัวอย่างตั้งแต่เริ่มอบ (0 ชม.) และทุก 2 ชม. ครั้งละ 6 ตัวอย่าง จนได้ตัวอย่างทั้งหมด 144 ตัวอย่าง (แต่จากการทำสมการใช้ตัวอย่างจำนวน 142 ตัวอย่าง เพราะตัดออก 2 ตัวอย่าง ที่มีค่าต่างจากกลุ่มตัวอย่างมาก หรือ outlier ไม่สามารถใช้ได้ในการวิเคราะห์ ลักษณะของตัวอย่าง (Table 1)

2. การวัดค่าการดูดกลืนแสง NIR

นำเมล็ดข้าวกล้องไปวัดค่าการดูดกลืนแสง NIR จากเครื่อง NIR spectrometer รุ่น FOSS system 6500 ในช่วงความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร โดยใช้หลักการสะท้อนกลับของแสง (reflection) และบันทึกการดูดกลืนแสง หลังจากนั้นนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ปริมาณสาร 2AP ด้วย GC-headspace ระบบ flame ionized detector ตามวิธีของ Wongpornchai และคณะ (2003)

3. การวิเคราะห์ผล

แบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 ชุดๆ ที่ 1 คือ calibration ทำหน้าที่เป็นตัวอย่างที่ใช้สร้างสมการ เพื่อใช้ประเมินค่าความหอม ส่วนชุดที่ 2 คือชุด validation เป็นชุดที่ใช้ทดสอบความถูกต้องของสมการที่สร้างขึ้นมา

4. การทำสมการ Calibration

นำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่างๆ (spectra) และพื้นที่ใต้กราฟที่เวลาของสาร 2AP ไปสร้างสมการหาความสัมพันธ์ และค่าความคลาดเคลื่อนในการประเมินด้วยสมการ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป The Unscrambler (Camo, Norway) วิเคราะห์แบบ partial least square (PLS) และใช้ second derivative ปรับปรุง spectra ซึ่งเป็นวิธีทางคณิตศาสตร์

Table 1. Statistical Characteristics of Khao Dawk Mali 105 brown rice samples used

Item	Brown rice	
	Calibration	Validation
Number of samples	72	70
Range oF aroma	0.90-15.11	0.94-15.11
Mean value of aroma	5.77	5.56
Standard deviation	4.13	3.93
Unit used	pA*s	pA*s

pA*s – peak area within time in second

ผลการทดลองและวิจารณ์

NIR Spectra ของเมล็ดข้าวกล้องหอม

ค่าการดูดกลืนแสง (log 1/R) ของเมล็ดข้าวกล้องที่มีปริมาณสาร 2AP ปริมาณต่างๆ การดูดกลืนแสงมากจะอยู่ที่ 1,206 1,434 1,768 และ 1,928 นาโนเมตร (Figure 1) เนื่องจากเป็นการดูดกลืนของสารที่ให้ความหอม (2AP) หลังจากปรับค่า spectra ด้วยวิธีทางคณิตศาสตร์คือ second derivative พบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่างๆชัดเจนขึ้น

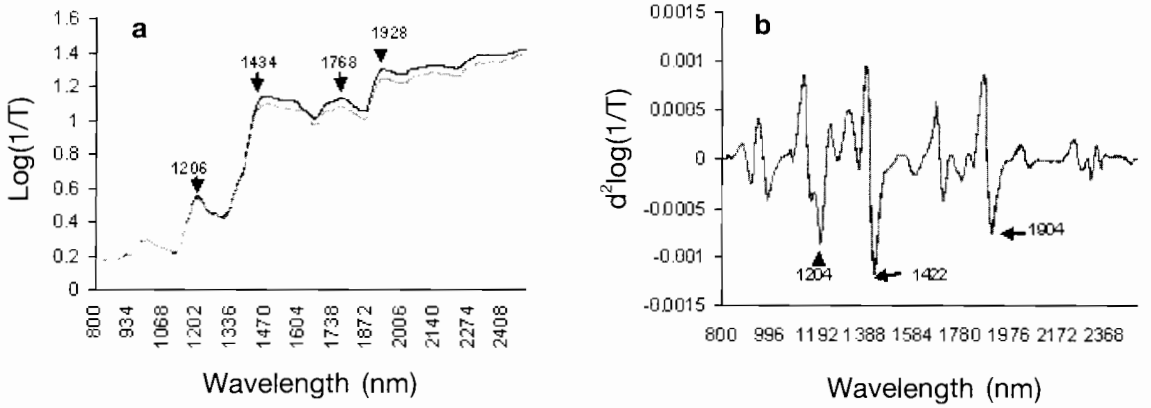

Figure 1. Original spectra (a) and second derivative spectra (b) of aromatic brown rice in the wavelength region 800-2500 nm

Table 2. Partial least square (PLS) calibration results for area of peak of 2AP measured from brown rice kernels.

Wavelength region (nm)	Pretreatment	R	SEC	SEP	Bias	F
800-2000	Original	0.86	0.75	0.98	0.19	10
800-2000	Second derivative	0.89	0.68	0.96	0.14	9

F = the number of factors used in the calibration equation, R = multiple correlation coefficients
SEC = standard error of calibration, SEP = standard error of prediction
Bias = the average of difference between actual value and NIR value

และความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสง (d^2log (1/T)) สูงคือ 1,204 1,422 และ 1,904 นาโนเมตร แสดงว่าที่ความยาวคลื่นดังกล่าว มีความสัมพันธ์กับค่าความหอมและแป้งในเมล็ดข้าว

การทำ Calibration ด้วย PLS Regression

ในการพัฒนาสมการด้วยการวิเคราะห์แบบ PLS calibration โดยพัฒนาจาก original spectra ในข้าวกล้อง และพื้นที่ใต้กราฟที่จุดที่สารหอมออกมา (Table 2) สมการที่ได้ไม่เหมาะสมเพราะมีค่า R ต่ำ แต่ SEP สูง จึงนำวิธี second derivative มาปรับปรุง spectra จนกระทั่งได้สมการที่มีประสิทธิภาพ โดยมีค่า R สูง (R= 0.89) SEP = 0.96 pA*s ซึ่งต่ำกว่าค่า standard deviation (SD) จากการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ 4.13 % (Table 1) แสดงว่าสมการนี้สามารถใช้ประเมินปริมาณสารหอม 2AP ในเมล็ดข้าวกล้องได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ค่า regression coefficients แสดงถึงความสัมพันธ์ของสารที่สัมพันธ์กับความหอม แป้งและเซลลูโลส ที่ความยาวคลื่น1136 1410 นาโนเมตร (Figure 2) มีค่าใกล้เคียงกับความยาวคลื่น 1143 1417 นาโนเมตร ที่เกี่ยวข้องกับความหอม (Osborne, 1986) ซึ่งสนับสนุนว่าสมการนี้ครอบคลุมปัจจัย ที่เกี่ยวข้องกับความหอม

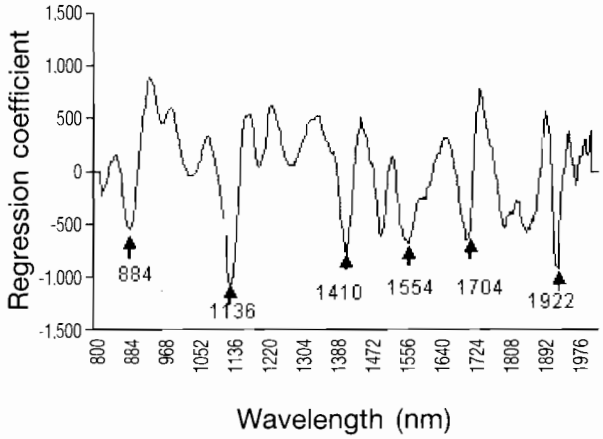

Figure 2. Regression coefficient plot for partial least square calibrations of 2-Acetyl-1-pyrroline (2AP) content (pA*s) in Khao Dawk Mali 105 brown rice

สมการนี้จึงมีประสิทธิภาพที่สามารถใช้ประเมินสาร 2AP ในเมล็ดข้าวกล้องขาวดอกมะลิ 105 ได้อย่างถูกต้อง

ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการประเมินจากสมการของข้าวกล้อง ที่มีปริมาณสารหอม 2AP ต่างๆ และค่าจากการวิเคราะห์โดย GC-headspace สูง (Figure 3) แสดงว่าค่าที่ประเมินได้จากสมการสามารถใช้แทนการประเมินค่าความหอมจากห้องปฏิบัติการ ทั้งมีค่าความคลาดเคลื่อนต่ำกว่าค่า SD แสดงว่าการพัฒนาสมการได้ค่าความถูกต้องที่เพียงพอ

สรุปผลการทดลอง

1. NIR spectroscopy เป็นเทคนิคหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการประเมินความหอมของข้าวกล้องหอม มีค่าความถูกต้องเป็นที่ยอมรับได้

2. เทคนิคที่ได้จะมีความสัมพันธ์กับความหอมสูง ในช่วงความยาวคลื่น 800-2000 นาโนเมตร spectra ที่ใช้ควรมีการปรับด้วยวิธี second derivative

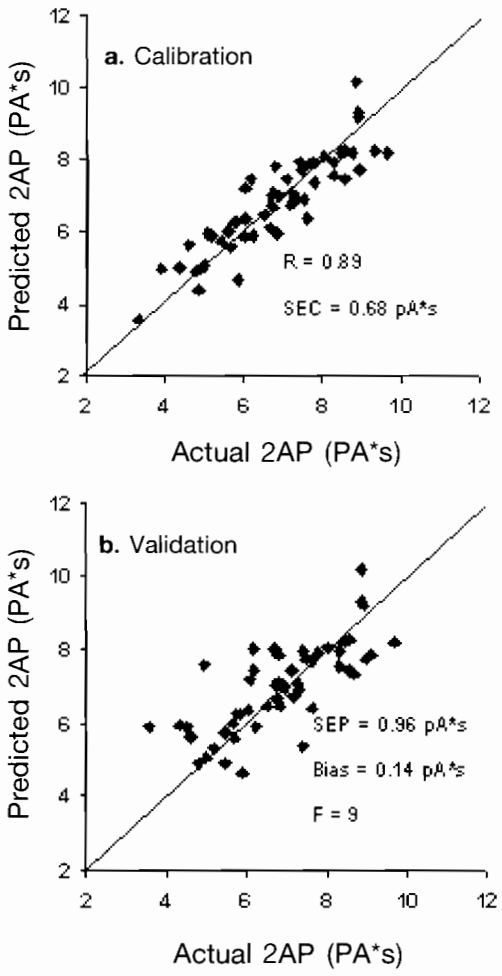

Figure 3. Scatter plots for predicting the amount of 2-Acetyl-1-pyrroline (2AP) in the calibration (a) and validation (b) samples sets using partial least square (PLS) equations and spectra treated with second derivative were developed

เอกสารอ้างอิง

Birth, G.S., G.G. Dull, W.T. Renfore and S.J. Kays. 1985. Nondestructive

spectrophotometric determination of dry matter in onions. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 110: 297-303.

Buttery, R. G., L.C. Ling and B.O. Juliano. 1982. *2-Acetyl-1-pyrroline: an important aroma component of cooked rice. Chem. Ind. (London)* 24:958-959.

Dull, G.G., G.S. Birth, D.A. Smittle and R.G. Leffler. 1989. Near infrared analysis of soluble solids in intact cantaloupe. *J. Food Sci.* 54: 393-395.

Iwamoto, M. 2006. *NIR Spectroscopy toward New Era: Learn a Lesson from the Past.* Page 10. *In: Japan-Korea Joint Symposium on Near Infrared Spectroscopy.* Hanyang University, Korea.

Kawano, S., H. Watanabe and M. Iwamoto. 1992. Determination of sugar content in intact peaches by near infrared spectroscopy with fiber optics in interactance mode. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 61 (2): 445-451.

Laksanalamai, V. and S. Ilangantileke. 1993. Comparison of aroma compound (2-Acetyl-1-pyrroline) in leaves from Pandan (*Pandamus amarullifolius*) and Thai fragrant rice (Khao Dawk Mali-105). *Cereal Chem.* 70:381-384.

Osborne, B.G. 1986. *Near Infrared Spectroscopy in Food Analysis.* Longman Scientific & Technical, Wiley, Harlow, Essex, England, New York. 200 p.

Wongpornchai, S.,T. Sriseadka and S. Choonvisage. 2003. Quantification of the rice aroma compound, 2-Acetyl-1-pyrroline, in bread flowers (*Vallaris glabra* Ktze). *J. Agric. Food Chem.* 51:457-462.

Wongpornchai, S., K. Dumri and S. Jongkaewwattana. 2004. Effect of drying methods and storage time on the aroma and milling quality of rice (*Oryza sativa* L.) cv. Khao Dawk Mali 105. *Food Chem.* 87:407-414.