

บทที่ 1

บทนำ

ประเทศในภูมิภาคเอเชียเป็นแหล่งผลิตข้าวที่สำคัญของโลก และเป็นแหล่งพันธุกรรมที่หลากหลายของข้าวประเภทต่างๆ ประเทศเหล่านี้ส่วนใหญ่มีพันธุ์ข้าวเป็นของตัวเองที่ปลูกติดต่อกันมาช้านาน และมีความเหมาะสมกับสภาพพื้นที่ เรียกว่า “พันธุ์พื้นเมือง” ข้าวพันธุ์พื้นเมืองของแต่ละประเทศมักมีบางพันธุ์ที่มีคุณสมบัติพิเศษกว่าพันธุ์ข้าวที่รู้จักกัน โดยทั่วไปรวมอยู่ด้วยเสมอ คุณสมบัติพิเศษอย่างหนึ่งคือ “ความหอม” หรือ “กลิ่นหอม” ซึ่งเป็นสิ่งดึงดูดใจให้ข้าวนำรับประทานมากขึ้น ปัจจุบันประชากรของประเทศที่บริโภคข้าวเป็นอาหารหลักได้รู้จักข้าวหอมและข้าวหอมได้รับความนิยมมากขึ้น จึงทำให้มีราคาสูงกว่าข้าวคุณภาพดีทั่วไป พันธุ์ข้าวหอมของไทยที่มีชื่อเสียงเป็นที่รู้จักในตลาดโลกมีเพียงพันธุ์เดียว คือ ขาวดอกมะลิ 105 ถึงแม้ว่าจะมีราคาสูงกว่าข้าวทั่วไป แต่ศักยภาพในการให้ผลผลิตยังอยู่ในเกณฑ์ต่ำ อีกทั้งไม่ต้านทานต่อโรคและแมลงศัตรูข้าวหลายชนิด ซึ่งการปรับปรุงพันธุ์เป็นแนวทางหนึ่งที่สำคัญต่อการพัฒนาพันธุ์ข้าวให้ได้ตามวัตถุประสงค์ต่อไป

ในสถานะที่ตลาดข้าวของโลกมีการแข่งขันอย่างสูง เพื่อให้ประเทศไทยเป็นผู้นำในการส่งออกข้าวตลอดไป รัฐบาล ผู้ประกอบการค้าข้าว และผู้ผลิต จะต้องร่วมมือกันหากลยุทธ์ในการตลาด และการผลิตข้าวให้ได้คุณภาพดี ได้มาตรฐานตรงตามความต้องการของตลาด อย่างไรก็ตามเนื่องจากสภาพแวดล้อมของโลกมีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา ทำให้ความเหมาะสมของพันธุ์ข้าวแต่ละพันธุ์อยู่ได้ในช่วงระยะเวลาหนึ่งเท่านั้น จึงจำเป็นต้องสร้างและพัฒนาพันธุ์ข้าวใหม่ๆ มาเสริมหรือทดแทนพันธุ์ที่มีอยู่เดิม เพื่อให้เหมาะสมกับสภาพที่เปลี่ยนไป ดังนั้นงานวิจัยเพื่อปรับปรุงพันธุ์ข้าวหอม การพัฒนาเทคนิคการตรวจวัดปริมาณสารหอม 2-อะเซทิล-1-ฟีโรลีน ในเมล็ดข้าว รวมถึงการเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการของข้าว จึงจำเป็นต้องทำการวิจัยอย่างต่อเนื่องต่อไป ⁽¹⁾

1.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับข้าว

ข้าวเป็นพืชวงศ์หญ้า (Family Graminae) ซึ่งเจริญเติบโตได้ทั้งในเขตร้อนและเขตอบอุ่น และสามารถปลูกได้ทั้งในที่ราบไปจนถึงพื้นที่ที่มีความสูง 2,500 เมตรจากระดับน้ำทะเล สามารถปลูกในที่ที่มีน้ำขัง (ซึ่งอาจลึกถึง 4 เมตร) หรือปลูกในที่ซึ่งไม่มีน้ำขังเลยก็ได้ นอกจากนี้ยังเจริญเติบโตได้ในดินหลายประเภทที่มีความเป็นกรดและความเค็มต่างๆ กัน การที่ข้าวสามารถเจริญเติบโตในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันมากนี้ ส่วนหนึ่งเกิดจากจำนวนพันธุ์ข้าวที่มีมากในปัจจุบันซึ่งแต่ละพันธุ์มีคุณสมบัติและมีความเหมาะสมกับสภาวะแวดล้อมแต่ละแห่งแตกต่างกันไป⁽²⁻³⁾

ปัจจุบันข้าวที่ปลูกเพื่อใช้เป็นอาหารแบ่งเป็น 2 ชนิดที่สำคัญ คือ ออไรซ่า ชาโดวา (*Oryza sativa*) ซึ่งปลูกในทวีปเอเชีย และออไรซ่า แกลเบอริมา (*Oryza glaberrima*) ซึ่งปลูกในทวีปแอฟริกา ซึ่งข้าวทั้งสองชนิดนี้มีบรรพบุรุษร่วมกัน โดยออไรซ่า ชาโดวา มีจำนวนพันธุ์และความแตกต่างในลักษณะของพันธุ์มากกว่าออไรซ่า แกลเบอริมา มาก ส่วนข้าวที่มีการเพาะปลูกอย่างแพร่หลายและขายกันในตลาดโลกในปัจจุบันเป็น ออไรซ่า ชาโดวา เกือบทั้งหมด โดยแบ่งออกเป็น 3 ชนิดย่อย ตามแหล่งที่ปลูก⁽³⁻⁵⁾ คือ

(1) ข้าวอินดิกา (Indica) เป็นข้าวที่ปลูกในภูมิภาคเอเชียเขตร้อน คือ ทางเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ไทย จีน ฟิลิปปินส์ เวียดนาม ลาว กัมพูชา พม่า มาเลเซีย อินโดนีเซีย และในแถบเอเชียใต้ เช่น อินเดีย ศรีลังกา ต่อมาถูกนำไปปลูกในทวีปอเมริกาด้วย มีลักษณะเด่น คือ รวงข้าวมีระแงะแตกเป็นแขนง เมล็ดยาว แคน ร่วงง่ายถึงยาก มีปริมาณแป้งอมิโลส สูงประมาณ 20-30 % ดันสูง อ่อน หักล้มง่าย แตกกอมาก ใบกว้าง สีเขียวอ่อน และโค้งงอ วัชพืชการตอบสนองต่อช่วงแสง ตามปกติจะไม่ตอบสนองต่อปุ๋ยหรือตอบสนองต่ำ จึงให้ผลผลิตค่อนข้างต่ำ แต่สามารถปรับตัวได้ดีในสภาพดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ ทนต่อความแห้งแล้ง แต่ไม่ทนต่อสภาพอากาศที่หนาวเย็น

(2) ข้าวจาปอนิกา (Japonica) เป็นข้าวที่ปลูกในเขตหนาว เช่น ญี่ปุ่น จีน เกาหลี สหรัฐอเมริกา มีลักษณะเด่น คือ เมล็ดสั้นป้อม ร่วงยาก มีปริมาณแป้งอมิโลสต่ำประมาณ 15-20% ลำต้นเตี้ยและแข็ง แตกกอปานกลาง ใบแคบ สีเขียวแก่ ใบตั้งและสั้น ไม่ต้านทานต่อความแห้งแล้ง

ไม่ตอบสนองต่อช่วงแสง ตอบสนองต่อปุ๋ยได้ดีและต้านทานต่อการหักล้ม จึงทำให้ผลผลิตสูงกว่าพันธุ์ข้าวอินดิคามาก

(3) ข้าวจาวานิกา (Javanica) มีปลูกในประเทศอินโดนีเซีย และฟิลิปปินส์ ข้าวประเภทนี้มีต้นสูงแข็ง ใบกว้างแข็ง สีเขียวอ่อน และมีเมล็ดยาว กว้างและหนา ร่วงยาก แต่ให้ผลผลิตต่ำกว่าข้าวอินดิคาและไม่ค่อยตอบสนองต่อปุ๋ยจึงไม่นิยมปลูกกันในปัจจุบัน

1.1.1 การจำแนกชนิดของข้าว ^(3, 6-8)

การจำแนกชนิดข้าวเฉพาะในประเทศไทยมีหลายรูปแบบด้วยกัน ได้แก่ การจำแนกตามคุณสมบัติทางเคมีภายในเมล็ด ธาตุกลู รูปร่างของเมล็ดข้าวสาร ความไวต่อช่วงความสั้นของช่วงแสงต่อวัน อายุการเก็บเกี่ยว และพื้นที่เพาะปลูก เป็นต้น ในงานวิจัยนี้ขอกล่าวถึงเฉพาะการจำแนกชนิดของข้าวตามคุณสมบัติทางเคมีภายในเมล็ด

การจำแนกตามคุณสมบัติทางเคมีภายในเมล็ด ประกอบด้วยการจำแนกตามอัตราส่วนของอมิโลส (amylose) ในแป้ง อุณหภูมิที่แป้งสุก ความคงตัวของแป้ง การยึดตัวของเมล็ดเมื่อหุง ความชื้น และกลิ่นหอม ฯลฯ

1) สัดส่วนของอมิโลส และอมิโลเพคตินในแป้ง

แป้งในเมล็ดข้าวประกอบด้วยอมิโลสและอมิโลเพคติน (amylopectin) ถ้าข้าวพันธุ์ใดมีอมิโลสสูง ก็จะมีอมิโลเพคตินต่ำ อมิโลสจะทำให้ข้าวมีลักษณะร่วนเป็นตัวและแข็ง นอกจากนี้อมิโลสจะดูดซับน้ำได้ดี จึงมีผลต่อการหุงขึ้นหม้อของข้าว ข้าวที่มีอมิโลสมากจะหุงขึ้นหม้อ ส่วนความนุ่มและความเหนียวของข้าวที่หุงสุกแล้ว จะขึ้นกับสัดส่วนของอมิโลเพคตินในแป้ง แป้งในข้าวเหนียวมักเป็นอมิโลเพคตินทั้งหมด แต่ข้าวเจ้าจะมีปริมาณของอมิโลสในสัดส่วนต่างๆ กัน ข้าวเจ้าในประเทศไทยมีส่วนประกอบของแป้งที่เป็นอมิโลสอยู่ระหว่างร้อยละ 12-31 โดยข้าวที่มีความอ่อนนุ่ม เช่น ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 มักมีอมิโลสประมาณร้อยละ 12-18 จากสัดส่วนของอมิโลสและอมิโลเพคตินในแป้ง ทำให้จำแนกข้าวเป็นดังนี้

ก. ข้าวเจ้า (non-glutinous rice) ประกอบด้วยแป้ง (starch) ประมาณ 90% ซึ่งแป้งนี้มีส่วนประกอบใหญ่ๆ 2 ส่วนด้วยกัน คือ อมิโลเพคติน ประมาณ 60-90% และมีอมิโลส ประมาณ 10-30%

ข. ข้าวเหนียว (glutinous rice) ประกอบด้วยอมิโลเพคตินประมาณ 95% แต่มีอมิโลสน้อยมาก บางครั้งพบว่าไม่มีเลย

2) อุณหภูมิที่แป้งสุก (gelatinization temperature)

อุณหภูมิที่แป้งสุก หมายถึง อุณหภูมิซึ่งเมล็ดแป้งเริ่มพองในน้ำร้อน ถ้าอุณหภูมิที่แป้งสุกสูง ข้าวจะหุงสุกช้า ข้าวไทยส่วนใหญ่มีอุณหภูมิแป้งสุกต่ำถึงปานกลาง ยกเว้นข้าวเหนียวพันธุ์ กข 4

3) ความคงตัวของแป้ง (gel consistency)

สำหรับข้าวที่มีปริมาณอมิโลสใกล้เคียงกัน ความนุ่มของข้าวจะขึ้นกับความคงตัวของแป้ง ข้าวพันธุ์ที่มีความคงตัวของแป้งต่ำจะนุ่มกว่าข้าวพันธุ์ที่มีความคงตัวของแป้งสูงเมื่อทำให้สุกแล้ว

4) ความยืดของเมล็ดข้าว (elongation)

ข้าวพันธุ์ของไทยนั้นเมื่อหุงแล้วจะขยายตัวทั้งตามยาวและตามเส้นรอบวง คือ เมล็ดข้าวจะมีขนาดยาวขึ้นและใหญ่ขึ้น พันธุ์ข้าวที่มีความยืดของเมล็ดข้าวตามทางยาวโดยไม่มีการขยายตัวทางเส้นรอบวง ได้แก่ ข้าวบาสุมาติของอินเดียและปากีสถาน

5) กลิ่นหอม

ในความเป็นจริงแล้วประเทศไทยมีพันธุ์ข้าวหอมหลายพันธุ์ แต่ไม่มีพันธุ์ข้าวหอมใดที่มีชื่อเสียงเท่าพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ความหอมนี้เกิดจากสารน้ำมันซึ่งส่วนใหญ่จะอยู่ในเมล็ดตั้ง

แต่เนื้อเยื่อของเมล็ดข้าวกล้องงอกเข้าไปในเมล็ดข้าวกล้อง ความหอมในเมล็ดข้าวหอมจึงสูญเสียไปได้ ถ้าเก็บรักษาไม่ดีหรือทิ้งไว้เป็นเวลานาน

6) ความชื้นในเมล็ดข้าว

ความชื้นในเมล็ดข้าวจะมีผลต่อการที่ข้าวหุงขึ้นหม้อและความร่วนของข้าวเช่นกัน ข้าวที่มีความชื้นต่ำซึ่งส่วนใหญ่เป็นข้าวเก่าจะหุงขึ้นหม้อและมีความร่วนมากกว่าข้าวที่มีความชื้นสูงหรือข้าวใหม่ ในประเทศไทยผู้บริโภคข้าวเจ้านิยมบริโภคข้าวเก่าซึ่งหุงขึ้นหม้อดีกว่าและราคาข้าวเจ้าที่เป็นข้าวเก่าจะสูงกว่าราคาข้าวใหม่

1.1.2 ข้าวหอม

1) ความหอมของข้าว ⁽¹⁾

ความหอมเป็นลักษณะทางคุณภาพที่สามารถถ่ายทอดได้ ความหอมถูกควบคุมด้วยยีน 1 ถึง 4 คู่ ยีนที่ควบคุมมีทั้งที่เป็นลักษณะแฝงหรือลักษณะด้อย (recessive) และลักษณะเด่นหรือลักษณะเด่น (dominant) รวมทั้งระบบและการทำงานของยีนที่ควบคุมความหอมค่อนข้างซับซ้อน

ความหอมนอกจากจะถูกควบคุมทางพันธุกรรมแล้ว ยังแปรปรวนไปตามสภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ แสงแดด ความชื้น ชนิดและความอุดมสมบูรณ์ของดิน รวมทั้งปริมาณธาตุอาหารต่างๆ และนอกจากสภาพแวดล้อมดังกล่าว ยังอาจมีปัจจัยอื่นเข้ามาเกี่ยวข้องอีก เช่น ปริมาณน้ำฝน ความเข้มของแสงแดด และความยาวของแสงในแต่ละวัน นอกจากนี้การเก็บเกี่ยว การตาก และการเก็บรักษาก็มีส่วนทำให้ความหอมเปลี่ยนไป สารหอมนี้ส่วนใหญ่จะอยู่ที่เมล็ดตั้งแต่เนื้อเยื่อของเมล็ดข้าวกล้องงอกเข้าไปในเมล็ดข้าวกล้อง ดังนั้นการเก็บเกี่ยวข้าวที่แก่จัด หรือตากแดดนานเกินไป อาจทำให้สารที่มีความหอมระเหยไปได้ การรักษาความหอมจะต้องเก็บในรูปข้าวเปลือกจึงจะรักษาความหอมไว้ได้นานกว่าการเก็บในรูปข้าวสาร ควรเก็บไว้ในที่ไม้อ่อนอบอ้าว และอากาศถ่ายเทสะดวก

2) พันธุ์ข้าวหอม ^(1, 9-12)

ในประเทศแต่ละประเทศก็มีพันธุ์ข้าวหอมแทบทุกประเทศ พันธุ์ข้าวหอมที่มีชื่อเสียงและได้รับความนิยมในตลาดโลกมี 2 พันธุ์ พันธุ์แรก คือ ข้าวบาสมาติ ซึ่งเป็นข้าวหอมของประเทศอินเดีย และปากีสถาน เป็นข้าวหอมที่มีลักษณะพิเศษ คือ ข้าวหอมพันธุ์นี้มีเมล็ดเรียวยาว เมล็ดยาวกว่าพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 เสียอีกเมื่อหุงหรือนึ่งสุก นอกจากจะมีกลิ่นหอมแล้ว ยังมีการขยายตัวได้ดีมาก (ข้าวสุกยาวกว่าข้าวสาร 2 เท่า) ข้าวสุกร่วน นุ่ม มีรสชาติดี เป็นที่นิยมของประชากรในประเทศแถบตะวันออกกลางและพันธุ์ที่สอง คือ ข้าวขาวดอกมะลิ 105 หรือข้าวหอมมะลิของไทย ซึ่งเป็นข้าวที่มีรสชาติดี ข้าวที่หุงหรือนึ่งเมื่อสุกจะนุ่ม เหนียว และมีกลิ่นหอม เป็นที่นิยมของประชากรในประเทศแถบเอเชีย ตะวันออกกลางและอเมริกา พันธุ์ข้าวหอมที่มีชื่อเสียงของประเทศอื่นๆ ได้แก่ พันธุ์ Malagkit Sungsong, Azucena และ Milagrosa ของประเทศฟิลิปปินส์ พันธุ์ Seratus Malam ของอินโดนีเซีย พันธุ์ Hieri ของญี่ปุ่น พันธุ์ Goolarah ของออสเตรเลีย และพันธุ์ Della ของอเมริกา มีกลิ่นหอมคล้ายกลิ่นของข้าวโพดคั่ว รสชาติดี

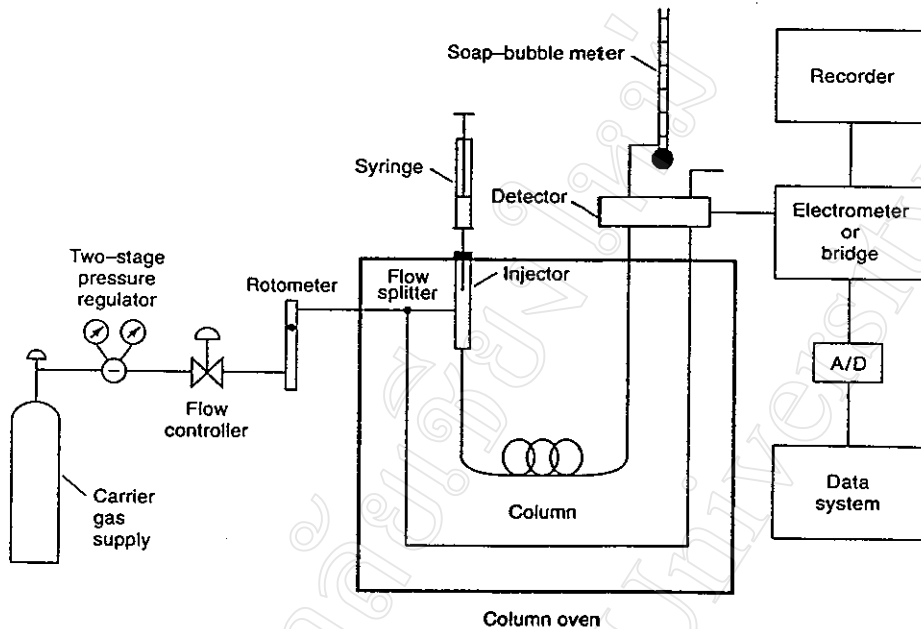
ประเทศไทยได้มีการปลูกข้าวหอมในทุกภาคของประเทศและมีพันธุ์ข้าวหอมมากมายหลายพันธุ์ แต่ข้าวหอมของไทยที่มีชื่อเสียงซึ่งเป็นที่นิยมของผู้บริโภคทั้งในตลาดโลกและตลาดภายในประเทศมีพันธุ์เดียว คือ พันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 หรือต่างประเทศรู้จักในชื่อ jasmine rice

1.2 แก๊สโครมาโทกราฟี⁽¹³⁻²⁶⁾ (gas chromatography : GC)

แก๊สโครมาโทกราฟี เป็นเทคนิคทางโครมาโทกราฟีที่นิยมใช้อย่างกว้างขวางสำหรับแยกสารที่สามารถเปลี่ยนให้เป็นแก๊สที่เสถียรและไม่สลายตัวที่อุณหภูมิ 400-450 °C หรือต่ำกว่า แต่กรณีที่สารเปลี่ยนเป็นแก๊สได้ยาก อาจมีเทคนิคอื่นช่วยทำให้อยู่ในสถานะแก๊สได้ง่าย เช่น อาศัยปฏิกิริยาทางเคมีในการเตรียมอนุพันธ์ของสาร เป็นต้น การแยกเกิดขึ้นเมื่อสารอยู่ในสถานะแก๊สผ่านไปยังคอลัมน์ที่บรรจุด้วยเฟสคงที่ (stationary phase) โดยอาศัยการพาไปของเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) หรือแก๊สพา สารแต่ละตัวในสารผสมจะถูกแยกออกจากกันเนื่องจากการเคลื่อนที่ในเฟสคงที่ไม่เท่ากัน แก๊สโครมาโทกราฟีที่มีส่วนเฟสคงที่เป็นของแข็ง จะเรียกว่า โครมาโทกราฟีแบบแก๊ส-ของแข็ง (gas-solid chromatography, GSC) แต่ถ้าเฟสคงที่เป็นของเหลวที่ฉาบอยู่บนอนุภาคของแข็ง จะเรียกว่าโครมาโทกราฟีแบบแก๊ส-ของเหลว (gas-liquid chromatography, GLC) ข้อจำกัดของสารตัวอย่างที่วิเคราะห์ทาง GLC คือ สารตัวอย่างจะต้องระเหยกลายเป็นไอได้ในช่วงอุณหภูมิที่อยู่ในคอลัมน์ โดยส่วนใหญ่แล้วจะใช้กับสารที่ไม่แตกตัวเป็นไอออนที่มีขนาดเล็กและกลาง (C_1 - C_{25}) สารอินทรีย์ทั้งของแข็งและของเหลว และสารพวก organometallic แต่ไม่สามารถใช้ได้กับเกลือของสารอินทรีย์หรือเกลือของสารอนินทรีย์ และสารพวก macromolecules รวมทั้งสารพวก biological polymer ด้วย

1.2.1 เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ

เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ มีองค์ประกอบดังรูปที่ 1.1 หลักการวิเคราะห์สารด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟแบบย่อๆ คือ ถังแก๊สที่บรรจุแก๊สพา จะมีส่วนที่ควบคุมการไหลของแก๊สที่ปล่อยแก๊สออกมา เมื่อฉีดสารตัวอย่างเข้าไปในตำแหน่งฉีดสารของเครื่อง สารตัวอย่างจะถูกทำให้เป็นแก๊ส แล้วมีแก๊สพานำไอของสารผ่านไปยังคอลัมน์ ซึ่งเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้เกิดการแยกของสาร เมื่อสารออกจากคอลัมน์ จะเข้าสู่ตัวตรวจวัดที่ใช้ตรวจวัดสารแต่ละชนิดที่ถูกแยกออกจากคอลัมน์ ซึ่งจะทำให้เกิดสัญญาณขึ้น และจะถูกส่งไปยังเครื่องประมวลผล



รูปที่ 1.1 องค์ประกอบที่สำคัญของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ⁽¹³⁾

1.2.2.1 แก๊สพา (carrier gas)

แก๊สพาทำหน้าที่พาไอของสารตัวอย่างผ่านเข้าไปในคอลัมน์ แก๊สพาที่ดีควรเป็นแก๊สที่เหมาะสมกับตัวตรวจวัด (detector) ควรมีความบริสุทธิ์สูง มีสมบัติเฉื่อย เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยากับสารตัวอย่าง หรือตัวทำละลายหรือเฟสคงที่ มีการแพร่ต่ำ มีมวลโมเลกุลต่ำ และราคาไม่แพง

1.2.2.2 ระบบฉีดสารตัวอย่าง (sample injection system)

การฉีดสารตัวอย่างเข้าไปในเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ โดยทั่วไปใช้เข็มฉีด (syringe) ซึ่งสามารถใช้เข็มฉีดด้วยมือ (manual syringe) หรืออัตโนมัติก็ได้

ระบบฉีดสารตัวอย่างสำหรับคานัลารี่คอลัมน์

เนื่องจากคอลัมน์ชนิดนี้เป็นชนิดหลอดเล็ก ทำให้มีความจุสารตัวอย่างต่ำเมื่อเทียบกับแพ็คเกจคอลัมน์ ในทางปฏิบัติจึงมีเทคนิคที่ใช้กับคอลัมน์ชนิดนี้ 3 แบบ คือ การฉีดแบบสปลิต (split injection) การฉีดสารแบบสปลิตเลส (splitless injection) และการฉีดสารเข้าสู่คอลัมน์โดยตรง (on-column injection) โดยจะขอกล่าวถึงเฉพาะการฉีดแบบสปลิต และการฉีดสารแบบสปลิตเลส

(1) การฉีดแบบสปลิต (split injection) เนื่องจากการยากที่จะฉีดสารตัวอย่างปริมาณน้อยๆ (0.001-0.5 ไมโครลิตร) เข้าไปในคานัลารี่คอลัมน์ ระบบนี้จึงได้พัฒนาขึ้น โดยสารที่ฉีดเข้าไปจะถูกเปลี่ยนให้เป็นไอ แล้วไอของสารจะมีการผสมกันก่อนที่จะถึงจุดแบ่งแยกสารตัวอย่าง ที่จุดนี้ไอของสารตัวอย่างส่วนน้อยและมีปริมาณแน่นอนจะเข้าสู่คอลัมน์ แต่ส่วนใหญ่จะถูกระบายออกไป ส่วนที่เข้าคอลัมน์คำนวณได้จากอัตราการสปลิต (split ratio) ดังสมการ

อัตราการสปลิต (split ratio) = ส่วนที่ระบายออก : ส่วนที่เข้าคอลัมน์

(2) การฉีดสารแบบสปลิตเลส (splitless injection) เป็นเทคนิคที่มีประโยชน์มากในการวิเคราะห์สารปริมาณน้อยๆ โดยที่สารตัวอย่างจะถูกทำให้เจือจางด้วยตัวทำละลายแล้วให้สารตัวอย่างทั้งหมดเข้าสู่คอลัมน์

1.2.2.3 ตู้อบ (oven)

ตู้อบ เป็นส่วนที่ควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์ เนื่องจากในเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี สารตัวอย่างและเฟสคงที่จะมีแรงกระทำระหว่างกัน และการแยกจะขึ้นกับจุดเดือดของสารตัวอย่าง ดังนั้นเวลาในการแยกสารออกจากคอลัมน์และประสิทธิภาพในการแยก (resolution) จึงขึ้นกับอุณหภูมิ ดังนั้นการโปรแกรมอุณหภูมิจึงเป็นที่นิยมใช้กันมาก และสังเกตเห็นว่าที่อุณหภูมิสูง สารตัวอย่างจะถูกแยกออกจากคอลัมน์ได้เร็วกว่า แต่จะเสียประสิทธิภาพในการแยก

1.2.2.4 คอลัมน์ (column)

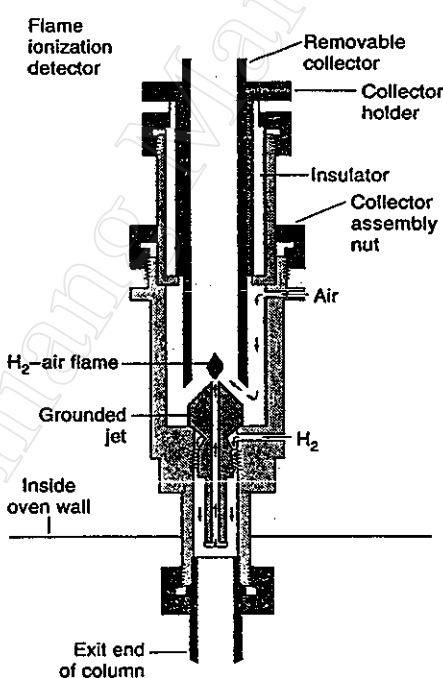
คอลัมน์เป็นส่วนสำคัญที่สุดในการใช้แยกสารด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี การที่สารตัวอย่างจะแยกได้ดีหรือไม่ขึ้นอยู่กับการเลือกคอลัมน์ คอลัมน์ที่ใช้กับเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี มี 2 ชนิด คือ แพ็คคอลัมน์ (pack column) และคาปิลลารีคอลัมน์ (capillary column) ในปัจจุบันคาปิลลารีคอลัมน์ที่มีเฟสคงที่เกิดพันธะเคมีกับหมู่ silanol จะนิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการแยกสูง โดยทั่วไปคาปิลลารีคอลัมน์มีรัศมีภายใน 0.3-0.6 มิลลิเมตร ความยาวอยู่ในช่วง 25-100 เมตร

1.2.2.5 ตัวตรวจวัด (Detector)

ตัวตรวจวัดเป็นส่วนที่ต่อกับคอลัมน์ สามารถบ่งบอกว่ามีสารที่ต้องการวิเคราะห์หรือมีสารอื่นที่แตกต่างไปจากแก๊สพาออกมาจากคอลัมน์หรือไม่ ถ้ามีก็สามารถวัดได้ว่ามีปริมาณเท่าใดได้ด้วย ดังนั้นตัวตรวจวัดจึงต้องเป็นเครื่องมือที่มีลักษณะเฉพาะสามารถให้สัญญาณกับสารต่างๆ ได้ ให้สภาพไวที่สูงพอ มีการตอบสนองที่ดีในช่วงความเข้มข้นของสารที่กว้างพอ และมีหลากหลายชนิด แล้วแต่งานของห้องปฏิบัติการนั้นๆ ตัวตรวจวัดที่นิยมกันอย่างแพร่หลาย คือ ตัวตรวจวัดแบบเปลวไอออไนเซชัน (flame ionisation detector, FID) ตัวตรวจวัดแบบเทอร์มัลคอนดักติวิตี (thermal conductivity detector, TCD) ตัวตรวจวัดแบบอิเล็กตรอนแคปเจอร์ (electron capture detector, ECD) ตัวตรวจวัดแบบไนโตรเจนฟอสฟอรัส (nitrogen phosphorus detector, NPD) ตัวตรวจวัดแบบเปลวโฟโตเมตริก (flame photometric detector, FPD) และแบบแมสสเปกโตรมิเตอร์ (mass spectrometer) ในการการวิจัยนี้จะขอลำถึงเฉพาะตัวตรวจวัดแบบเปลวไอออไนเซชัน และแมสสเปกโตรมิเตอร์ เท่านั้นเนื่องจากเหมาะสำหรับการวิเคราะห์สารอินทรีย์โดยทั่วไป

ตัวตรวจวัดแบบเปลวไอออไนเซชัน (flame ionisation detector, FID) เป็นตัวตรวจวัดที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในการตรวจหาพวกสารประกอบอินทรีย์ ลักษณะตัวตรวจวัดแบบเปลวไอออไนเซชัน จะมีแก๊สไฮโดรเจนที่ถูกจุดให้ติดไฟด้วยไฟฟ้า ซึ่งอยู่ใกล้ๆ flame jet และอากาศที่ผ่านเข้ามาจะทำหน้าที่ช่วยการเผาไหม้ของแก๊สไฮโดรเจน และช่วยพาแก๊สที่เผาไหม้แล้วให้ออกไป เมื่อแก๊สพาและสารตัวอย่างที่ออกมาจากคอลัมน์เข้าสู่เปลวไฟ จะทำให้สารเหล่านั้นเกิด

ไอออไนเซชัน ได้เป็นอิเล็กตรอนและไอออนบวก อิเล็กตรอนจะวิ่งไปยัง flame jet ส่วนไอออนบวกจะวิ่งไปยังอิเล็กโทรด สัญญาณที่เกิดขึ้นจะถูกส่งไปยังอิเล็กโตรมิเตอร์และบันทึกสัญญาณด้วยเครื่องบันทึกได้เป็นโครมาโทแกรม ตัวตรวจวัดแบบเฟลมไอออไนเซชัน ให้สภาพไวที่ดีกับสารต่างๆ โดยเฉพาะสารอินทรีย์ แต่ไม่ดีกับแก๊สต่อไปนี้ He, Ar, Kr, Ne, Xe, O₂, N₂, CS₂, H₂S, SO₂, NO, N₂O, NO₂, NH₃, CO, CO₂, H₂O, SiHCl₃ และ SiF₄ ลักษณะของตัวตรวจวัดแบบเฟลมไอออไนเซชัน แสดงดังรูปที่ 1.2 จากการเผาไหม้ในตัวตรวจวัดแบบเฟลมไอออไนเซชัน จะเกิดไอน้ำขึ้น เพื่อป้องกันการกลั่นตัวของไอน้ำ ควรตั้งอุณหภูมิของตัวตรวจวัดให้สูงกว่า 100 องศาเซลเซียส โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อสารตัวอย่างเป็นสารประกอบคลอรีน ผลจากการเผาไหม้จะทำให้เกิดการฟุ้งร่อนได้ง่าย เป็นผลให้สภาพไวของตัวตรวจวัดเสียไป บางครั้งสารประกอบพวกที่มีมวลโมเลกุลใหญ่ๆ การเผาไหม้จะไม่สมบูรณ์ ทำให้เกิดเขม่าอุดตัน flame jet ได้ จึงต้องใช้อุณหภูมิของตัวตรวจวัดให้สูงขึ้น



รูปที่ 1.2 ลักษณะของตัวตรวจวัดแบบเฟลมไอออไนเซชัน⁽²³⁾

1.3 โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography : HPLC) ^(13-14, 16, 18-21,23, 26-34)

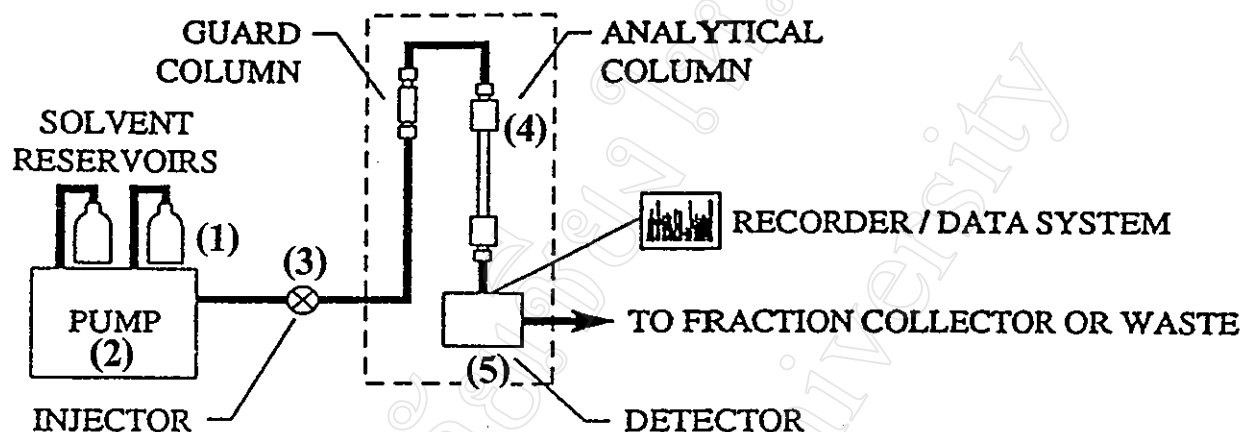
HPLC เป็นเทคนิคการแยกและการวิเคราะห์สารที่อาศัยหลักการเดียวกับแก๊สโครมาโทกราฟี เพียงแต่ต่างกันที่เฟสเคลื่อนที่ โดย HPLC นั้น ใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นของเหลว ในการวิเคราะห์สารโดยใช้เทคนิค HPLC นั้นเฟสเคลื่อนที่จะถูกอัดด้วยปั๊มที่มีคุณภาพสูงพาสารละลายตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์ด้วยอัตราการไหลไม่เกิน 5 มิลลิลิตรต่อนาที ถ้าองค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่มีเพียงองค์ประกอบเดียวและคงที่ จะเรียกว่า ไอโซคราติก อีลูชัน (isocratic elution) ในทางกลับกันถ้าองค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่มีการเปลี่ยนแปลงขณะที่แยกสาร จะเรียกว่า กราเดียนต์ อีลูชัน (gradient elution) ภายในคอลัมน์ทั้งเฟสเคลื่อนที่และเฟสคงที่จะสามารถเกิดแรงกระทำต่อสารตัวอย่างได้ ทำให้สารเกิดการแยก จากนั้นสารที่ถูกแยกจะออกจากคอลัมน์เข้าสู่ตัวตรวจวัดสัญญาณต่อไป

HPLC สามารถใช้ในการวิเคราะห์สารที่สลายตัวที่อุณหภูมิสูง และระเหยกลายเป็นไอได้ยาก นอกจากนี้สารที่มีสภาพขั้วสูง และมีหมู่ฟังก์ชันที่ไอออไนซ์ได้ ซึ่งจะแสดงโครมาโทแกรมเป็นลักษณะพีคที่เป็นหาง เมื่อใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี จึงต้องนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ดังนั้นเทคนิค HPLC จึงเป็นเทคนิคที่เหมาะสมสำหรับสารอนินทรีย์ หรืออนุมูลไอออน สารประกอบทางค่านยา ชีวเคมี เช่น สามารถประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์น้ำตาล กรดอินทรีย์ ไขมัน กรดอะมิโน เปปไทด์ สารประกอบเชิงซ้อนของโลหะ สารแอนติออกซิแดนซ์จำพวกฟีนอลิกในอาหาร สารพิษ เช่น อัลฟลาทอกซินในถั่วต่างๆ และวิตามิน เป็นต้น นอกจากนี้สามารถใช้ในการทำให้สารตัวอย่างบริสุทธิ์ขึ้น

1.3.1 เครื่อง HPLC

เครื่อง HPLC โดยทั่วไปมีส่วนประกอบดังรูปที่ 1.3 คือ

- (1) ภาชนะบรรจุเฟสเคลื่อนที่
- (2) ระบบปั๊ม
- (3) ตำแหน่งที่ฉีดสาร
- (4) คอลัมน์
- (5) ตัวตรวจวัดสัญญาณ



รูปที่ 1.3 ส่วนประกอบของเครื่อง HPLC ⁽²³⁾

1.3.1.1 ภาชนะบรรจุเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase reservoir)

โดยทั่วไป ภาชนะที่บรรจุเฟสเคลื่อนที่จะทำด้วยเหล็กกล้าไร้สนิม (stainless steel) หรือแก้ว และมีขนาด 1 ลิตร มีท่อเล็กๆ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1/8 นิ้ว ต่อจากภาชนะบรรจุเฟสเคลื่อนที่เพื่อพาเฟสเคลื่อนที่เข้าสู่ปั๊ม เฟสเคลื่อนที่ก่อนจะเข้าสู่ปั๊มจะต้องกรองด้วยเมมเบรนขนาด 0.45 หรือ 0.2 ไมครอน ให้ปราศจากผง ฝุ่น และอนุภาคแขวนลอยต่างๆ ซึ่งจะทำให้เกิดการแทรกสอดการทำงานของปั๊มได้ และอาจทำลายวาล์วของปั๊มได้ อีกประการหนึ่งที่สำคัญ คือ ฟองแก๊สหรืออากาศที่ละลายอยู่ในเฟสเคลื่อนที่ โดยเฉพาะแก๊สออกซิเจน และแก๊สไนโตรเจน ถ้าไม่กำจัดจะทำให้เกิดฟองแก๊สภายในคอลัมน์ หรืออาจจะเข้าไปรบกวนตัวตรวจวัดหรือทำให้การทำงานของปั๊มเสียไป หรือไปทำปฏิกิริยากับเฟสเคลื่อนที่ ดังนั้นจึงต้องกำจัดแก๊สที่ละลายอยู่ในเฟสเคลื่อนที่ก่อนด้วยระบบทำลายแก๊ส (degassing system) การทำลายแก๊สอาจทำได้โดยการเก็บเฟสเคลื่อนที่ไว้ภายใต้สุญญากาศ หรือโดยให้ความร้อนและคนเฟสเคลื่อนที่ด้วยระบบอัลตราโซนิก หรืออาจจะผ่านแก๊สฮีเลียมอย่างช้าๆ และต่อเนื่อง

1.3.1.2 ระบบปั๊ม (pumping system)

ปั๊มทำหน้าที่ส่งเฟสเคลื่อนที่เข้าสู่คอลัมน์ เนื่องจากคอลัมน์บรรจุด้วยอนุภาคขนาดเล็ก ดังนั้นจึงมีความต้านทานการไหลของเฟสเคลื่อนที่เมื่อเฟสเคลื่อนที่ไหลผ่านคอลัมน์ ความต้านทานการไหลจะมากขึ้นเมื่อคอลัมน์บรรจุด้วยอนุภาคที่มีขนาดเล็กลง เป็นผลให้ต้องใช้ความดันสูงในการดันเฟสเคลื่อนที่ให้ไหลไป ระบบปั๊มที่ใช้ในเครื่อง HPLC แบ่งออกเป็น 2 ระบบ คือ ปั๊มที่ควบคุมให้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่คงที่ และปั๊มที่ควบคุมให้ความดันของการไหลของเฟสเคลื่อนที่คงที่ ระบบปั๊มและท่อเชื่อมต่างๆ ควรทำด้วยเหล็กกล้าไร้สนิม ซึ่งสามารถทนต่อความดันและการกัดกร่อนโดยสารพวกออกซิไดซ์ กรด เบส และตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆ

1.3.1.4 ตำแหน่งที่ฉีดสาร

การฉีดสารตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์มีความสำคัญค่อนข้างมากต่อการแยกสาร เนื่องจากสารตัวอย่างที่ผ่านเข้าไปในคอลัมน์ควรอยู่ในลักษณะที่เป็นแถบที่แคบมากที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้ ดังนั้นวิธีการต่างๆ ที่ใช้มีมากมายหลายวิธี วิธีที่ง่ายที่สุด คือ การฉีดสารตัวอย่างผ่าน septum ด้วยเข็มฉีดยา (microsyringe) แต่ต้องระมัดระวังเนื่องจากภายในระบบมีความดันสูง ส่วนวิธีที่นิยมใช้กันมากเป็นการฉีดสารตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์ผ่านลู่วาล์ว (loop valve) ซึ่งมี 2 แบบ คือ แบบที่มีลู่วาล์วอยู่ภายนอก (external loop valve) และแบบที่มีลู่วาล์วอยู่ภายใน (internal loop valve) นอกจากนี้ยังมีการฉีดสารตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์แบบอัตโนมัติ (autosampler) ซึ่งสามารถฉีดสารตัวอย่างได้จำนวนมาก ทำให้ช่วยลดแรงงานและปรับปรุงความแม่นยำในการวิเคราะห์ และในงานวิจัยนี้เครื่องลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์ที่ใช้ จะมีระบบฉีดสารตัวอย่างเป็นแบบอัตโนมัติ

1.3.1.5 คอลัมน์ (column)

คอลัมน์เป็นอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับแยกสารตัวอย่าง ส่วนใหญ่ทำด้วยเหล็กกล้าไร้สนิม ซึ่งเหมาะกับงานที่ต้องใช้ความดันสูง นอกจากนี้อาจทำด้วยแก้ว ซึ่งเหมาะกับงานที่ใช้ความดันต่ำ หรืออาจทำด้วยพลาสติก คอลัมน์ที่ใช้ใน HPLC ประกอบด้วย

1) **พรีคอลัมน์ (precolumn)** ถูกนำมาใช้ในกรณีที่ต้องการปรับภาวะของเฟสเคลื่อนที่ หรือทำให้เฟสเคลื่อนที่อิ่มตัว โดยนำมาต่ออยู่ระหว่างปั๊มและส่วนฉีดสารตัวอย่าง บรรจุด้วยเฟสคงที่เหมือนกับคอลัมน์ที่ใช้แยกสาร เพียงแต่มีอนุภาคขนาดใหญ่กว่า

2) **การ์ดคอลัมน์ (guard column)** อยู่ระหว่างส่วนฉีดสารกับคอลัมน์ที่ใช้ในการแยกสาร ทำหน้าที่ช่วยกรองสิ่งเจือปนออกจากสารละลายตัวอย่างและเฟสเคลื่อนที่ และป้องกันคอลัมน์ที่ใช้ในการแยกสารจากสารที่มีความสามารถในการดูดซับได้ดี มีความยาวไม่เกิน 5 เซนติเมตร ภายในบรรจุด้วยอนุภาคเหมือนกับคอลัมน์ที่ใช้ในการแยกสาร และ guard column ถูกออกแบบให้มีปริมาตรช่องว่าง (dead volume) น้อยที่สุด ดังนั้นประสิทธิภาพในการแยกจะลดลงน้อยที่สุด หรือไม่มีการสูญเสียประสิทธิภาพในการแยกเลย

3) **คอลัมน์ที่ใช้ในการแยกสาร (analytical column)** โดยปกติมีความยาว 15, 25 หรือ 30 เซนติเมตร มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 4.6 หรือ 5 มิลลิเมตร บรรจุด้วยอนุภาคขนาด 3, 5 หรือ 10 ไมครอน และอัตราการไหล 1-2 มิลลิลิตรต่อนาที ปัจจุบันคอลัมน์ที่ใช้กับ HPLC มีแนวโน้มที่จะมีเส้นผ่านศูนย์กลางภายในเล็กลง และบรรจุด้วยอนุภาคที่มีขนาดน้อยกว่าหรือเท่ากับ 3 ไมครอน

1.3.1.6 ตัวตรวจวัด (detector)

การเลือกตัวตรวจวัดในเครื่องลิควิด โครมาโทกราฟี ขึ้นอยู่กับชนิดของสารตัวอย่าง ความเข้มข้น ความไว ความเข้ากันได้กับตัวทำละลาย และแบบของการอีลูชัน (elution) ตัวตรวจวัดในเครื่องลิควิด โครมาโทกราฟี สามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ

1) **general detector** เป็นการวัดการเปลี่ยนแปลงของสมบัติทางกายภาพของเฟสเคลื่อนที่รวมทั้งของตัวถูกละลาย เช่น refractive index determination และ conductivity detector

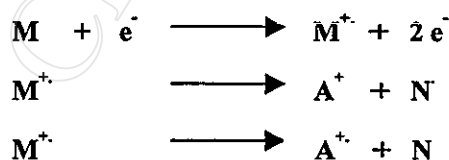
2) **selective detector** เป็นการวัดการเปลี่ยนแปลงของตัวถูกละลายเพียงอย่างเดียวเท่านั้น เช่น UV-Vis detector, fluorescent detector, electrochemical detector และ mass spectrometer เป็นต้น ในงานวิจัยนี้จะขอกกล่าวถึงเฉพาะตัวตรวจวัดแบบแมสสเป็คโตรมิเตอร์เท่านั้น

1.4 แมสสเปกโตรเมตรี (mass spectrometry : MS) ^(13-14, 16-20, 35-38)

แมสสเปกโตรเมตรีเป็นเทคนิคทางเคมีวิเคราะห์อีกชนิดหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ศึกษาหาข้อมูลเกี่ยวกับโครงสร้างและมวลโมเลกุลของสาร โดยอาศัยการทำให้โมเลกุลของสารแตกตัวเป็นไอออนด้วยการให้โมเลกุลของสารรับพลังงานที่มากพอ โดยทั่วไปพลังงานที่ใช้อยู่ในช่วง 5-70 eV (1 eV เท่ากับ 23.06 Kcal/mol) ซึ่งเป็นพลังงานที่สูงพอที่จะทำให้อิเล็กตรอนหลุดออกจากอะตอม หรือโมเลกุลของสาร ทำให้โมเลกุลของสารกลายเป็นไอออนบวก จากนั้นจึงแตกตัวเป็นไอออนย่อย ซึ่งการแตกตัวเป็นไอออนย่อยนี้ขึ้นอยู่กับหมู่ฟังก์ชัน (functional group) การสลายตัวของโมเลกุลเนื่องจากความร้อน ซึ่งอาจเกิดขึ้นได้ที่แหล่งกำเนิดไอออน และพลังงานที่ใช้ จากนั้นทำการแยกไอออนโดยอาศัยความแตกต่างของอัตราส่วนมวลต่อประจุและตรวจวัดไอออนที่เกิดขึ้นนั้นอีกครั้งหนึ่งด้วยตัวตรวจวัด ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้สารตัวอย่างที่ใช้จะต้องเสียไป แต่เทคนิคทางแมสสเปกโตรเมตรีนี้ใช้สารตัวอย่างน้อยมาก ส่วนข้อมูลที่ได้รับเกี่ยวกับโครงสร้างมีมากมาย จึงทำให้เทคนิคนี้เป็นที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง

1.4.1 หลักการและทฤษฎีของแมสสเปกโตรเมตรี

เมื่อทำให้โมเลกุลเกิดการสูญเสียอิเล็กตรอน โมเลกุลสารจะกลายเป็นไอออนและมีประจุบวก ซึ่งถ้าโมเลกุลที่มีประจุบวกนี้มีพลังงานสูงพอ จะเกิดการแตกตัวออกเป็นส่วนย่อยๆ ซึ่งอาจเป็นอนุภาคที่เป็นกลาง (N) อนุภาคที่เป็นแคตไอออนแรดิคัล (A^+) หรือ แคตไอออน (A^+) ดังนี้

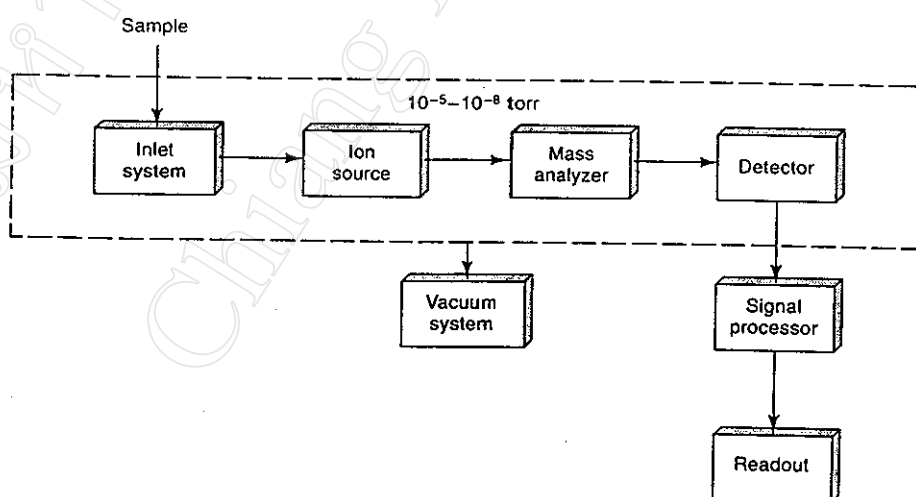


ในทำนองเดียวกัน ถ้าไอออนย่อย (A^+ หรือ A^+) มีพลังงานมากพอก็จะเกิดการแตกตัวต่อไปอีกเป็นไอออนย่อยต่อไปเรื่อยๆ จนเหลือพลังงานน้อยสุดที่ไม่สามารถแตกตัวต่อไปได้อีก เมื่อพิจารณาแมสสเปกตรัม จะบ่งบอกถึงลักษณะการแตกตัวของโมเลกุลไอออน หรือรวมรูปแบบการแตก

ตัวของแต่ละไอออนทั้งหมดเข้าด้วยกัน ได้รูปแบบการแตกตัวของโมเลกุลที่เป็นลักษณะเฉพาะของสารแต่ละชนิด เนื่องจากแมสสเป็คโตรมิเตอร์เป็นเครื่องมือที่ใช้แยกและวัดมวลของไอออนด้วยการใช้อัตราส่วนมวลต่อประจุ (m/z) โดยทั่วไปแล้วไอออนมักจะมีประจุ $+1$ ($z = 1$) ดังนั้น ค่า m/z จึงมีค่าเท่ากับมวลของไอออนโดยตรง

1.4.2 เครื่องแมสสเป็คโตรมิเตอร์ (mass spectrometer)

ในการวิเคราะห์สารโดยแมสสเป็คโตรมิเตอร์นั้น ต้องทำสารตัวอย่างให้กลายเป็นไอ จากนั้นทำให้เป็นไอออน โดยไอออนที่มีพลังงานมากพอจะเกิดการแตกตัวเป็นไอออนย่อยต่อไปอีก จากนั้นไอออนที่เกิดขึ้นทั้งหมดจะถูกแยกจากกันตามค่ามวลต่อประจุที่แตกต่างกันแล้วส่งไปยังตัวตรวจวัดและเครื่องบันทึก อุปกรณ์ที่จำเป็นสำหรับเครื่องแมสสเป็คโตรมิเตอร์ ประกอบด้วยส่วนใหญ่ว่า 4 ส่วน คือ inlet system, ion source, mass analyzer และ detector แสดงดังรูปที่ 1.4



รูปที่ 1.4 แผนภาพแสดงองค์ประกอบของเครื่องแมสสเป็คโตรมิเตอร์⁽¹³⁾

1.4.2.1 ระบบนำสารเข้า (inlet system)

เครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ โดยทั่วไปจะมีระบบใส่สารตัวอย่างหลายวิธี เช่น ระบบการใส่สารตัวอย่างที่เป็นแก๊ส ของเหลว และของแข็งที่มีความเป็นไอสูงปานกลาง ระบบใส่สารตัวอย่างที่ใส่สารตัวอย่างเข้าไปในบริเวณที่ทำให้เกิดเป็นไอออนโดยตรงสำหรับของแข็งที่มีมวลโมเลกุลสูง ไม่ระเหย และเป็นสารประกอบที่ไม่เสถียรต่อความร้อน นอกจากนี้ยังมีการใส่สารตัวอย่างที่ต่อเข้ากับเครื่องโครมาโทกราฟี เช่น แก๊สโครมาโทกราฟี และลิกวิดโครมาโทกราฟี เป็นต้น ทั้งนี้ระบบใส่สารตัวอย่างจะต้องเลือกให้เหมาะสมกับชนิดของสารตัวอย่างและแหล่งที่มาของสารตัวอย่าง

1.4.2.2 แหล่งกำเนิดไอออน (ionisation source)

แหล่งกำเนิดไอออนเป็นแหล่งที่ทำให้โมเลกุลของสารตัวอย่างเกิดเป็นไอออน และเกิดการแตกตัวเป็นไอออน ซึ่งถือเป็นหัวใจสำคัญของเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ วิธีการที่ทำให้สารเกิดเป็นไอออน มีหลายวิธีที่สำคัญ เช่น electron impact ionisation (EI), chemical ionisation (CI), electrospray ionisation (ESI), atmospheric pressure chemical ionisation (APCI), field desorption (FD), fast atom bombardment (FAB) เป็นต้น ซึ่งในงานวิจัยนี้จะขอลำถึงเฉพาะ EI, CI และ ESI เท่านั้น

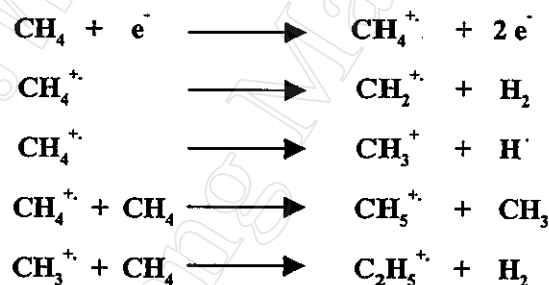
(1) **Electron impact ionisation (EI)** เป็นวิธีการทำให้โมเลกุลเกิดเป็นไอออนที่นิยมกันมากที่สุด โดยโมเลกุลของสารตัวอย่างเกิดเป็นไอออนบวกด้วยการชนกับอิเล็กตรอนที่มีพลังงานสูง โดยทั่วไปพลังงานของอิเล็กตรอนที่นิยมใช้จะมีค่าเท่ากับ 70 eV พลังงานจำนวนนี้จะทำให้อิเล็กตรอนในโมเลกุลของสาร 1 ตัว หลุดไปจากออร์บิทัล (orbital) วงนอกสุด ได้ไอออนที่มีประจุบวก เรียกว่า molecular ion ซึ่งโมเลกุลของสารอินทรีย์ส่วนใหญ่จะมีอิเล็กตรอนเป็นเลขคู่ เมื่ออิเล็กตรอนหลุดออกไป 1 ตัว จึงทำให้เกิด radical cation ขึ้น ดังนี้



เมื่อ M คือ โมเลกุลของสารตัวอย่าง และ M^+ คือ molecular ion หรือ radical cation

เมื่อไอออนบวกมีพลังงานสูงก็จะสามารถแตกตัวเป็นไอออนย่อยได้อีก จนเหลือไอออนที่มีพลังงานน้อยสุดที่ไม่สามารถแตกตัวได้จึงผ่านไปยังส่วนแยกไอออนต่อไป ซึ่งจะถูกรวบรวมได้ด้วยตัวตรวจวัดและบันทึกลงบนแผ่นกราฟ เรียกว่า แมสสเปกตรัม ซึ่งแสดงความเข้มข้นของไอออน เรียกว่า ความอุดม (abundance) เป็นฟังก์ชันของอัตราส่วนของมวลต่อประจุ หรือ m/z แหล่งกำเนิดไอออนแบบ electron impact ionisation เป็นหัวใจสำคัญของเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ ซึ่งมีประสิทธิภาพ ทนทานและมีความสามารถในการทำให้เกิดไอออนบวกได้อย่างดีและสม่ำเสมอ จึงจำเป็นต้องได้รับการดูแลอย่างสม่ำเสมอ

(2) Chemical Ionisation (CI) เป็นการทำให้เกิดไอออนด้วยวิธีทางเคมี ในการแตกตัวเป็นไอออนโดยวิธีนี้สารตัวอย่างจะถูกนำเข้าสู่แหล่งกำเนิดไอออนที่ความดันประมาณ 1 ทอร์ พร้อมกับแก๊สที่จะทำปฏิกิริยาด้วย เช่น มีเทน ไอโซบิวเทน และแอมโมเนีย ในกรณีมีเทน เมื่อถูกชนด้วยอิเล็กตรอน มีเทนจะเกิดเป็นไอออนบวก และเกิดปฏิกิริยาที่สำคัญต่างๆ ดังนี้



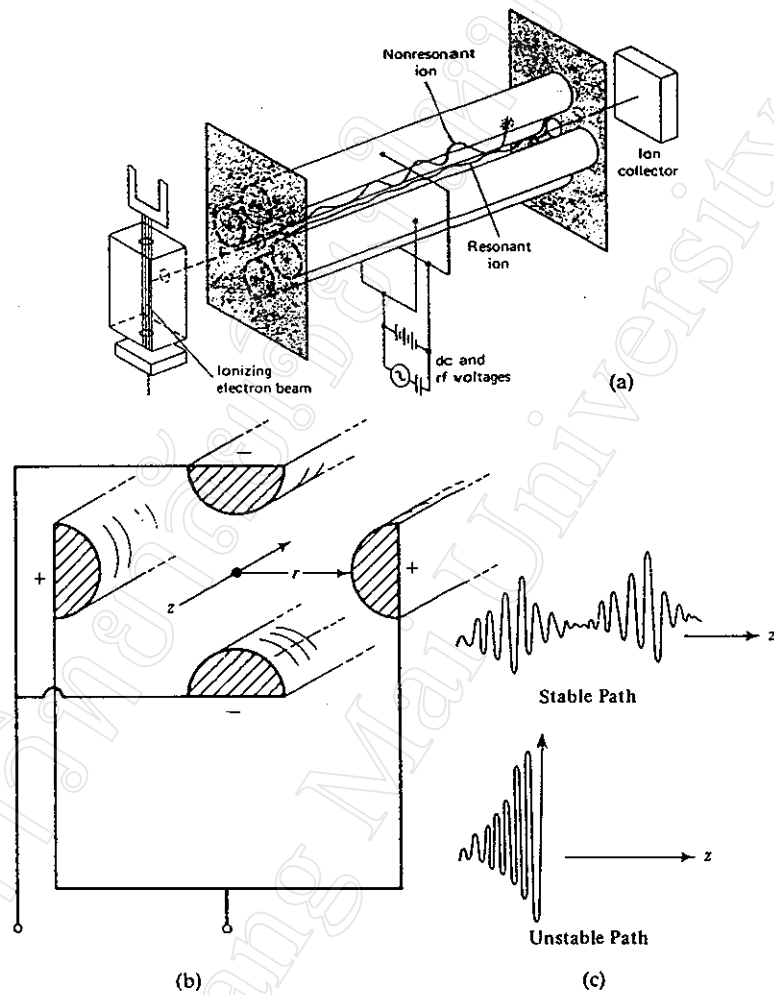
จากนั้นไอออน CH_5^+ และหรือ C_2H_5^+ ซึ่งเกิดขึ้นในเปอร์เซ็นต์สูง จะทำปฏิกิริยาโดยให้โปรตอนกับโมเลกุลของสารตัวอย่าง (M) ให้เกิดเป็นไอออน แล้วไอออนเหล่านี้จะผ่านเข้าส่วนวิเคราะห์มวลตามปกติ ดังสมการ



ดังนั้นแมสสเปกตรัมของ CI จึงต่างจากแมสสเปกตรัมของ EI โดยมักจะให้ $(\text{M} + \text{H})^+$ เป็นพีคหลัก และมีไอออนที่เกิดการแตกหักน้อย รูปแบบของแมสสเปกตรัมแบบ CI ขึ้นอยู่กับความบริสุทธิ์ของแก๊สที่เข้าทำปฏิกิริยา ทำให้ไม่มีทางที่จะจัดทำ mass spectral library ได้

1.4.2.3 ตัววิเคราะห์มวล (mass analyser) ตัววิเคราะห์มวลอยู่ระหว่างแหล่งกำเนิดไอออน (ion source) และตัวตรวจวัด ตัววิเคราะห์มวลที่สำคัญๆ มีหลายแบบ ได้แก่ magnetic sector analyzer, quadrupole analyzer, ion trap analyzer, time of flight analyzer เป็นต้น ตัววิเคราะห์มวลแบบ quadrupole หรือเรียกว่า quadrupole mass filter ประกอบด้วยแท่งโลหะกลม 4 แท่งที่วางขนานกัน แท่งโลหะคู่ที่อยู่ตรงข้ามกันจะต่อเข้าด้วยกันด้วยแหล่งให้กระแสตรง นอกจากนี้ยังป้อนกระแสตรงและความถี่คลื่นวิทยุที่มีศักย์ไฟฟ้าแบบกระแสสลับให้กับแท่งโลหะทุกแท่ง โดยแท่งโลหะแต่ละคู่ได้ศักย์ไฟฟ้าเท่ากัน แต่มีประจุตรงข้ามกัน ดังรูปที่ 1.5 a จากนั้นเมื่อมีสนามไฟฟ้าเกิดขึ้นทำให้ไอออนจากแหล่งกำเนิดที่ใส่เข้าไปตามแกน Z ดังรูปที่ 1.5 b เกิดการสั่น ไอออนที่มีมวลต่อประจุค่าหนึ่งจะเกิดการสั่นเป็นแบบ stable path และผ่านออกไปสู่ ion collector หรือตัวตรวจวัดได้ ส่วนไอออนอื่นที่มีมวลต่อประจุต่างไปจะมีการสั่นแบบ unstable path ทำให้เกิดการชนกับแท่งโลหะ ประจุจะถูกทำลายไป เรียกว่า filtered out ดังรูปที่ 1.5 c การสแกนมวลสามารถทำได้โดยการเปลี่ยนศักย์ไฟฟ้าและให้ความถี่คลื่นวิทยุคงที่หรือเปลี่ยนความถี่คลื่นวิทยุและให้ศักย์ไฟฟ้าคงที่ก็ได้

1.4.2.4 ตัวตรวจวัด (detector) ตัวตรวจวัดที่ใช้กันทั่วไปในเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์มีหลายอย่าง คือ ฟาราเดย์คัพ (faraday cup) อิเล็กตรอนมัลติพลายเออร์ (electron multiplier) ซิลทิลเลชัน เคาน์เตอร์ (scintillation counter) และแผ่นฟิล์มถ่ายภาพ (photographic plate) แต่ที่นิยมใช้กันมาก คือ ตัวตรวจวัดแบบอิเล็กตรอน มัลติพลายเออร์ (electron multiplier detector) ที่ใช้กันมีอยู่หลายแบบ รุ่นแรกๆ ของอิเล็กตรอนมัลติพลายเออร์ที่ใช้จะมีลักษณะคล้ายกับหลอดโฟโตมัลติพลายเออร์ เมื่อไอออนออกมาจากตัววิเคราะห์มวลจะชนกับแคโทด ทำให้เกิดอิเล็กตรอนขึ้นมาหลายอิเล็กตรอน แล้วถูกดึงดูดไปยังไดโนด (dynode) อิเล็กตรอนแต่ละตัวเมื่อชนไดโนดแต่ละอันจะให้อิเล็กตรอนออกมาหลายอิเล็กตรอน เป็นเช่นนี้เรื่อยไปจะทำให้ได้กระแสเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ กระแสที่ได้จะถูกวัดเก็บไว้แล้วส่งไปยังเครื่องบันทึก



รูปที่ 1.5 Quadrupole analyzer⁽¹⁴⁾

1.5 การวิเคราะห์เชิงคุณภาพขององค์ประกอบในสารสกัดจากเมล็ดข้าวโดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี และการวิเคราะห์เชิงปริมาณโดยใช้เทคนิคฟลูออเรสเซนซ์อิเล็กโตรสเปรย์ไอออไนเซชันแมสสเปกโตรเมตรี

ข้อมูลที่สำคัญที่สามารถนำไปใช้เพื่อการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีของสารหรือหาปริมาณของสารมี 3 ประการ คือ เวลาเรเทนชัน ขนาดของพีค และลักษณะของพีคที่ได้ สามารถนำไปเป็นข้อมูลในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ และปริมาณได้ แต่การใช้เทคนิคนี้เพียงอย่างเดียวสำหรับการวิเคราะห์สารตัวอย่างที่มีโครงสร้างทางเคมีค่อนข้างซับซ้อน ควรที่จะต้องใช้เทคนิคอื่นเข้ามาช่วยในการวิเคราะห์ด้วย เช่น IR, NMR และ MS เพื่อให้การวิเคราะห์มีความถูกต้องแม่นยำขึ้น

1.5.1 การวิเคราะห์เชิงคุณภาพขององค์ประกอบในสารสกัดจากเมล็ดข้าวโดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี

การวิเคราะห์เชิงคุณภาพด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีนั้น วิธีที่ง่ายที่สุด คือ หาจากเวลาเรเทนชัน (retention time, t_R) ซึ่งเป็นเวลาที่สารแต่ละชนิดเดินทางผ่านคอลัมน์ และเป็นลักษณะเฉพาะของสารแต่ละชนิด โดยจะขึ้นอยู่กับอัตราการไหลของแก๊สตัวพา อุณหภูมิของคอลัมน์ หรือชนิดของคอลัมน์ที่ใช้ ในการพิสูจน์ชนิดของสารแต่ละตัวในสารตัวอย่างผสม จะต้องทำการวิเคราะห์ทั้งสารตัวอย่างและสารมาตรฐานที่ใช้สถานะต่างๆ อย่างเดียวกัน นำค่าเวลาเรเทนชันมาเปรียบเทียบกับกันก็จะสามารถบอกได้ว่าแต่ละพีคในสารผสมตัวอย่งนั้นเป็นพีคของสารใดบ้าง หรืออีกกรณีหนึ่ง คือ นำสารตัวอย่างมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีจนได้โครมาโทแกรมของสารตัวอย่างก่อน จากนั้นนำสารตัวอย่างผสมกับสารมาตรฐานที่ทราบแล้วว่าเป็นสารใด นำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีอีกครั้ง ถ้าโครมาโทแกรมที่ได้มีพีคของสารตัวอย่างขนาดใหญ่ขึ้นเปรียบเทียบกับพีคของสารอื่น แสดงว่าสารตัวอย่างและสารมาตรฐานเป็นตัวเดียวกัน

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการวิเคราะห์เชิงคุณภาพขององค์ประกอบในสารสกัดจากเมล็ดข้าวที่สกัดด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก โดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีและได้นำเทคนิคแมสสเป็คโตรเมตรีที่มีแหล่งกำเนิดไอออนเป็นแบบ electron impact ionisation และ chemical ionisation ช่วยในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ โดยแหล่งผลิตกำเนิดไอออนแบบ electron impact ionisation นั้นสามารถนำข้อมูลแมสสเป็คตรัมที่ได้มาเปรียบเทียบกับข้อมูลแมสสเป็คตรัมของสารมาตรฐานจากฐานข้อมูลใน The Wiley 275 library ของเครื่องคอมพิวเตอร์ได้ และแหล่งกำเนิดไอออนที่เป็นแบบ chemical ionisation จะให้ข้อมูลเกี่ยวกับมวลโมเลกุลของสาร เพื่อให้การวิเคราะห์เชิงคุณภาพมีความถูกต้องแม่นยำยิ่งขึ้น และเนื่องจากในงานวิจัยนี้ได้ทำการตรวจวัดปริมาณสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ในสารสกัดจากเมล็ดข้าวโดยใช้เทคนิคฟลูออโรเจนเซนส์อิเล็กโตรสเปรย์ไอออนไนเซชันแมสสเป็คโตรเมตรี และใช้แบบของการสแกนมวลต่อประจุเป็นแบบเก็บเฉพาะที่มวลต่อประจุเท่ากับมวลต่อประจุของสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ดังนั้นจึงต้องทำการวิเคราะห์เชิงคุณภาพขององค์ประกอบในสารสกัดจากเมล็ดข้าวก่อน เพื่อที่จะวิเคราะห์องค์ประกอบอื่นๆ ในสารสกัดจากเมล็ดข้าวที่อาจมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 111 amu และให้ความสมบูรณ์ของ protonated molecular ion ที่มีมวลต่อประจุเท่ากับ 112 amu นอกเหนือจากสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline

1.5.2 การวิเคราะห์เชิงปริมาณโดยใช้เทคนิคฟลูออโรเจนเซนส์อิเล็กโตรสเปรย์ไอออนไนเซชันแมสสเป็คโตรเมตรี

ในการทดลองนี้จะใช้เทคนิคฟลูออโรเจนเซนส์อิเล็กโตรสเปรย์ไอออนไนเซชันแมสสเป็คโตรเมตรีในการตรวจวัดปริมาณสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ในสารสกัดจากเมล็ดข้าว โดยใช้แบบของการสแกนมวลต่อประจุเป็นแบบเก็บเฉพาะที่มวลต่อประจุเท่ากับมวลต่อประจุของสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ดังนั้นปริมาณของสารตัวอย่างที่ฉีดเข้าไปในเครื่องลิวิดโครมาโทกราฟี-แมสสเป็คโตรมิเตอร์ จะสัมพันธ์โดยตรงกับขนาดของพีกที่ได้พีกที่ได้ โดยเครื่องลิวิดโครมาโทกราฟี-แมสสเป็คโตรมิเตอร์จะมีเครื่องคอมพิวเตอร์ใช้ร่วมอยู่ด้วย ซึ่งจะทำหน้าที่คำนวณพื้นที่ของแต่ละพีก ตลอดจนหาค่าเวลารีเทนชัน หลังจากทราบขนาดและพื้นที่ได้พีกแล้ว สามารถนำมาคำนวณหาปริมาณของสารแต่ละชนิดในสารตัวอย่างได้ นอกจากนี้เพื่อให้การตรวจวัดมีความถูกต้องยิ่งขึ้น อาจประยุกต์วิธีสารมาตรฐานควบคู่ไปด้วย ซึ่งได้แก่ normalization method, external standardization method และ internal standardization method ซึ่งในงานวิจัยนี้จะขอกกล่าวถึงเฉพาะ internal standardization method

Internal standardization method เป็นวิธีที่ใช้หาปริมาณของสารได้ถูกต้องที่สุด ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับ การเลือกใช้สารมาตรฐานภายใน (internal standard) ซึ่งหลักการเลือกมาตรฐานภายใน คือ

- สารนั้นต้องมีสมบัติคล้ายกับสารที่จะวิเคราะห์และต้องเป็นสารที่ไม่เป็นองค์ประกอบหรือมีอยู่ในสารตัวอย่าง เช่น ในการทดลองนี้สารที่ต้องการวิเคราะห์ คือ 2-acetyl-1-pyrroline และสารมาตรฐานภายในที่เลือกใช้ คือ 2,4,6-trimethylpyridine
- เป็นสารที่เสถียร โดยไม่ทำปฏิกิริยากับสารอื่นๆ
- สารมาตรฐานที่เติมลงไปควรมีความเข้มข้นใกล้เคียงกับสารที่ต้องการวิเคราะห์

การวิเคราะห์โดย internal standardization method ทำได้โดย

- 1) เตรียมสารมาตรฐานภายในที่มีปริมาณใกล้เคียงกับสารตัวอย่าง โดยผสมกับตัวทำละลายที่เหมาะสม
- 2) เตรียมสารมาตรฐานที่จะวิเคราะห์ให้มีปริมาณสารใกล้เคียงกับสารตัวอย่าง
- 3) ผสมสารมาตรฐานภายในและสารมาตรฐานที่จะวิเคราะห์ โดยให้ปริมาณสารมาตรฐานภายในคงที่ และใช้ปริมาณสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน เมื่อฉีดส่วนผสมนี้เข้าเครื่องลิควิดโครมาโทกราฟ-แมสสเปกโตรมิเตอร์ หาอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐานต่อสารมาตรฐานภายใน แล้วนำอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคไปสร้างกราฟอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐานต่อสารมาตรฐานภายใน กับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน เรียกกราฟที่ได้นี้ว่า กราฟมาตรฐาน
- 4) เติมสารมาตรฐานภายในลงในสารตัวอย่างที่จะนำมาวิเคราะห์ นำสารละลายผสมนี้ฉีดเข้าเครื่องลิควิดโครมาโทกราฟ-แมสสเปกโตรมิเตอร์ หาอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของสารตัวอย่างต่อสารมาตรฐานภายใน แล้วนำไปเทียบกับกราฟมาตรฐานจากข้อ 3 ก็จะสามารถหาปริมาณสารตัวอย่างได้

ข้อดีของการวิเคราะห์เชิงปริมาณโดยวิธี internal standardization method คือ

- 1) ผลการวิเคราะห์จะถูกต้องมากขึ้น
- 2) ค่าที่วิเคราะห์ได้ไม่ขึ้นกับสภาพความไวของตัวตรวจวัดซึ่งอาจเปลี่ยนแปลงได้ขณะทำการวิเคราะห์
- 3) ผลการวิเคราะห์ไม่ขึ้นอยู่กับขนาดของสารตัวอย่างที่ฉีด
- 4) สารตัวอย่างทั้งหมดไม่จำเป็นต้องถูกชะออกมาหมด

ข้อเสียของการวิเคราะห์เชิงปริมาณโดยวิธี internal standardization method คือ
สารมาตรฐานภายในต้องผสมลงไปในการตัวอย่าง และค่อนข้างหายาก

1.6 การคู่ควบโครมาโทกราฟีและแมสสเปกโตรเมตรี

(chromatography-mass spectrometry coupling)

การนำเครื่องโครมาโทกราฟี เช่น แก๊สโครมาโทกราฟี และลิกวิดโครมาโทกราฟี มาต่อเข้ากับเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ เพื่อใช้เป็นระบบนำสารเข้า (inlet system) นั้นมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของเทคนิคแมสสเปกโตรเมตรี ให้สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีองค์ประกอบซับซ้อนได้ โดยสารตัวอย่างจะถูกแยกออกเป็นองค์ประกอบย่อยๆ ก่อนด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี และจะถูกนำไปวิเคราะห์ต่อทันทีด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมตรี จึงเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของเทคนิคนี้ และทำให้เกิดความสะดวกในการวิเคราะห์สารอินทรีย์ในตัวอย่าง โดยเฉพาะตัวอย่างที่เป็นสารสกัดจากธรรมชาติ และเนื่องจากเทคนิคแมสสเปกโตรเมตรี ทำงานที่สภาวะความดันต่ำมากประมาณ 10^{-5} torr แต่ในขณะที่สารที่ถูกแยกออกมาจากเครื่องโครมาโทกราฟีนั้นนอกจากจะมีความดันปกติแล้วยังมีเฟสเคลื่อนที่ที่เป็นส่วนเกินของการวิเคราะห์ที่ต้องกำจัดออกไป การคู่ควบเทคนิคทั้งสองนี้จึงต้องอาศัยตัวกลาง (interface) ซึ่งจะทำหน้าที่เปลี่ยนรูปสารตัวอย่างให้ไปอยู่ในรูปที่จะสามารถวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมตรี โดยกระบวนการที่เรียกว่า การทำให้เกิดเป็นไอออน (ionisation) นอกจากนี้ตัวกลางยังทำหน้าที่รักษาสสมดุลภายในของทั้งสองระบบ และกำจัด mobile phase ที่เป็นส่วนเกิน

1.6.1 การคู่ควบแก๊สโครมาโทกราฟีและแมสสเปกโตรเมตรี (13, 16-17, 20, 35-40)

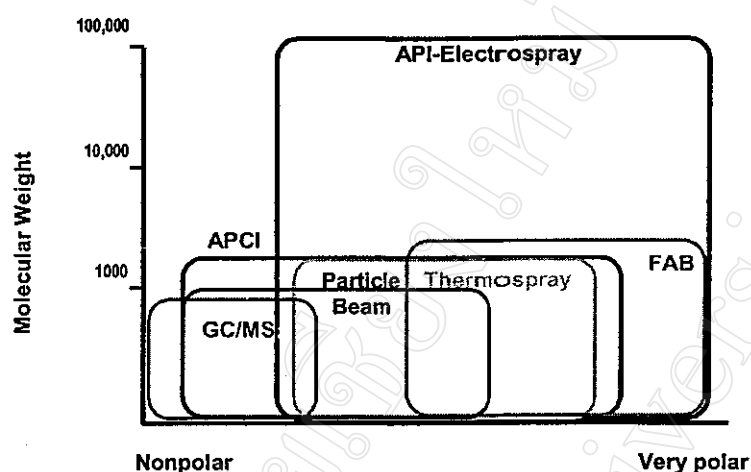
(gas chromatography-mass spectrometry coupling)

เนื่องจากเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีเป็นเทคนิคการแยกสารระเหยที่มีประสิทธิภาพมาก แต่อย่างไรก็ตามจะเกิดปัญหาในการจำแนกสารที่แยกออกมาจากคอลัมน์ ซึ่งในบางครั้งอาจจะเป็นสารที่ไม่สามารถพิสูจน์เอกลักษณ์หรือโครงสร้างทางเคมีได้ (unknown) ดังนั้นการนำเอาเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีมาคู่ควบกับเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์นั้นจะทำให้สามารถจำแนกหรือยืนยันสารได้ชัดเจนยิ่งขึ้น โดยเปรียบเทียบข้อมูลแมสสเปกตรัมของแต่ละองค์ประกอบกับข้อมูลแมสสเปกตรัมของสารมาตรฐานในฐานข้อมูล แต่ในขณะที่สารถูกแยกออกมาจากเครื่องโครมาโทกราฟีนั้น จะประกอบด้วยส่วนผสมของสารตัวอย่างและแก๊สพาซึ่งเป็นส่วนเกินของการวิเคราะห์ ดังนั้นการคู่ควบเทคนิคทั้งสองนี้จึงต้องอาศัยตัวกลาง (interface) ซึ่งจะทำหน้าที่แยกแก๊สพาออกไปก่อนที่จะเข้าไปยังเครื่องแมสสเปก

โครมิเตอร์ซึ่งภายในเป็นสุญญากาศ แต่สำหรับคาปิลลารีคอลัมน์ อัตราการไหลของแก๊สพาจะต่ำมาก คือ ประมาณ 1-2 มิลลิตรต่อนาที ดังนั้นจึงสามารถกำจัดออกไปด้วยระบบสุญญากาศภายในแหล่งกำเนิดไอออนได้ จึงไม่จำเป็นต้องมีตัวกลางเชื่อมต่อระหว่างเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟกับเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ เนื่องจากสามารถต่อคาปิลลารีคอลัมน์เข้าไปในส่วนของแหล่งกำเนิดไอออนได้โดยตรง โดยอาจจะต้องควบคุมอุณหภูมิตรงส่วนต่อระหว่างเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟกับเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ให้สูงพอที่อุณหภูมิสูงสุดของคอลัมน์

1.6.2 การคู่ควบลิควิดโครมาโทกราฟีและแมสสเปกโตรเมตรี ^(13, 16-17, 20, 35-39) (liquid chromatography-mass spectrometry coupling)

ความพยายามที่จะนำเครื่องลิควิดโครมาโทกราฟต่อเข้ากับเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ เห็นได้จากการพัฒนาตัวกลางขึ้นมาหลากหลายชนิดเป็นระยะเวลามากกว่า 20 ปีที่ผ่านมา แต่มีตัวกลางเพียงไม่กี่ชนิดที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้งานได้จริงๆ ได้แก่ moving-belt (MB), direct liquid introduction (DLI), thermospray (TSP), ionspray (ISP), continuous flow fast atom bombardment (CF-FAB), particle-beam (PB), matrix-assisted laser desorption (MALDI), electrospray ionisation (ESI) และ atmospheric pressure chemical ionisation (APCI) เป็นต้น แต่ละชนิดมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกันไป ในระยะหลังนี้ตัวกลางชนิดที่เป็น atmospheric pressure ionisation : API ได้รับความนิยมสูงในท้องตลาด เนื่องจากตัวกลางนี้สามารถประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์สารได้กว้าง ตั้งแต่ที่มีมวลโมเลกุลเล็กไปจนถึงสารชีวโมเลกุล และครอบคลุมสารตั้งแต่ประเภทที่มีขั้วปานกลางไปจนถึงประเภทที่มีขั้วมาก ดังแสดงในแผนภาพรูปที่ 1.6



รูปที่ 1.6 แผนภาพแสดงขอบเขตมวลโมเลกุลของสารที่สามารถวิเคราะห์ได้ด้วยตัวกลางสำหรับ LC-MS ชนิดต่างๆ⁽⁴¹⁾

ในการทดลองนี้ขอกล่าวถึงเฉพาะตัวกลางที่เป็นอิเล็กโตรสเปรย์ไอออนไนเซชัน (electrospray ionisation : ESI) เท่านั้น

อิเล็กโตรสเปรย์ไอออนไนเซชัน (electrospray ionisation : ESI)⁽⁴²⁻⁶²⁾

อิเล็กโตรสเปรย์ไอออนไนเซชัน เป็นเทคนิคที่ทำให้สารตัวอย่างเกิดเป็นไอออนโดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าสูงในการทำให้เกิดละอองเล็กๆ ที่มีไอออนของสารตัวอย่างอยู่ภายในแล้วทำให้สารตัวอย่างเกิดเป็นไอออนในสถานะแก๊ส หรือเป็นเทคนิคที่ทำให้ไอออนของสารตัวอย่างที่มีอยู่ในสารละลายเปลี่ยนไปเป็นไอออนในสถานะแก๊ส โดยเกิดขึ้นภายใต้ความดันบรรยากาศ

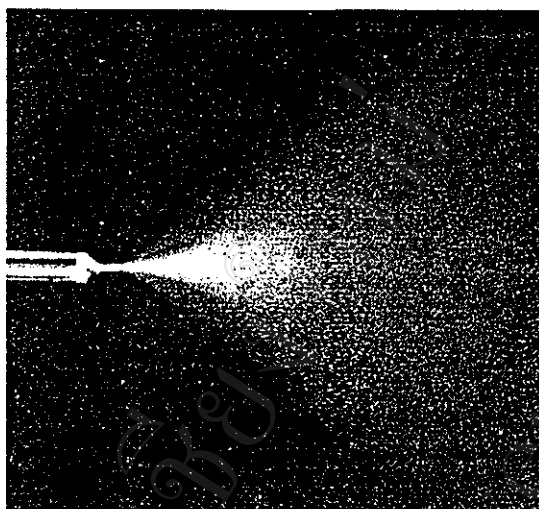
อิเล็กโตรสเปรย์ไอออนไนเซชัน ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลักๆ คือ

- 1) Nebulization และ charging
- 2) Desolvation
- 3) Ion evaporation

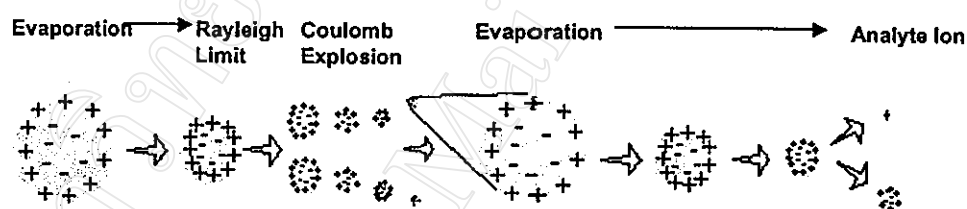
จากรายงาน⁽⁴¹⁻⁶²⁾ ที่ผ่านมามีเกี่ยวกับการทำให้สารเกิดเป็นไอออนโดยอิเล็กโตรสเปรย์นั้น ยังไม่สามารถสรุปกระบวนการเกิดไอออนได้อย่างชัดเจน แต่สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 สมมุติฐาน ซึ่งสมมุติฐานทั้งสองนี้จะแตกต่างกันที่การเกิดประจุ (charging) ในละอองเล็กๆ หลังจากทีละอองเล็กๆ ถูกสเปรย์ออกจากหัวฉีดเท่านั้น ส่วนขั้นตอนการ nebulization, desolvation และ ion evaporation จะเหมือนกัน ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้ คือ

สมมุติฐานที่ 1. การ nebulization และ charging เกิดขึ้น โดยของเหลวจากระบบ HPLC ถูกนำเข้ามาในแหล่งกำเนิดไอออน (ion source) โดยผ่าน nebulizing needle ซึ่งทำด้วยเหล็กกล้าไร้สนิม เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 100 ไมครอนอยู่ในหัวฉีด (nebulizer) โดยที่หัวฉีดนี้จะมีมีความต่างศักย์ไฟฟ้าสูงมาก จากความแตกต่างของความต่างศักย์ไฟฟ้าประมาณ 3-6 กิโลโวลต์ระหว่างหัวฉีด และ counter electrode (เช่น mass spectrometer sampling orifice) ซึ่งอยู่ห่างกัน 0.5-3 ซม. นี้ จะทำให้เกิดสนามไฟฟ้าอย่างแรง ซึ่งจะเหนี่ยวนำให้เกิดประจุขึ้นภายในของเหลว ขณะออกจากหัวฉีดเป็นละอองเล็กๆ มีลักษณะเป็น aerosol plume ดังรูปที่ 1.7 ซึ่งประจุที่เกิดขึ้นมีทั้งประจุบวกและประจุลบอยู่ภายในละอองเล็กๆ มากมาย

จากนั้นตัวทำละลายที่อยู่ในละอองเล็กๆ จะถูกทำให้ระเหยออกไปโดยแก๊สไนโตรเจนที่ร้อน ซึ่งพ่นออกมาจากหลอดเล็กๆ ที่อยู่ด้านเดียวกับคาปิลลารี (capillary) และอยู่ในแนวตั้งฉากกับสเปรย์ ทำให้ขนาดของละอองเล็กๆ ลดลงเรื่อยๆ ส่งผลให้ charge density เพิ่มขึ้น จนประจุบนละอองเล็กๆ ไม่สามารถอยู่ด้วยกันได้ หรือทำให้ repulsive electrostatic (coulombic) forces เกินกว่าแรง cohesive forces (surface tension) ทำให้ละอองเล็กๆ แยกออกเป็นละอองขนาดเล็กลงๆ ไปอีก กระบวนการนี้จะเกิดขึ้นซ้ำกันไปเรื่อยๆ จนกระทั่งที่ผิวของของเหลวมีสนามไฟฟ้ามากเกินพอที่จะทำให้ไอออนของสารตัวอย่างแยกตัวกันออกมาอยู่ในสถานะแก๊ส (ion evaporation) ดังรูปที่ 1.8 ประสิทธิภาพของการเกิดไอออนในสถานะแก๊สขึ้นอยู่กับทำให้สารตัวอย่างเกิดประจุ (charging) และการที่ไอออนของสารตัวอย่างแยกตัวกันออกมาจากละอองเล็กๆ (evaporation)

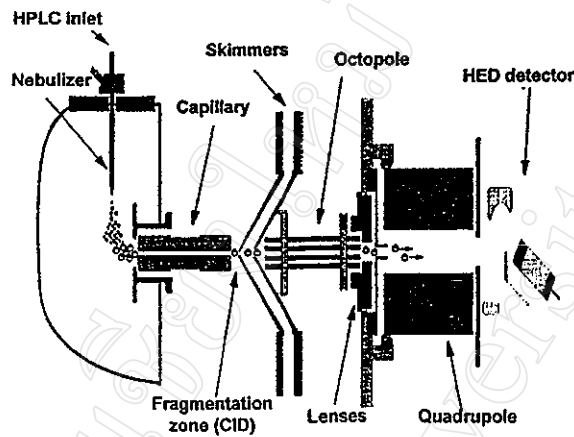


รูปที่ 1.7 Electrospray aerosol plume ⁽⁴²⁾



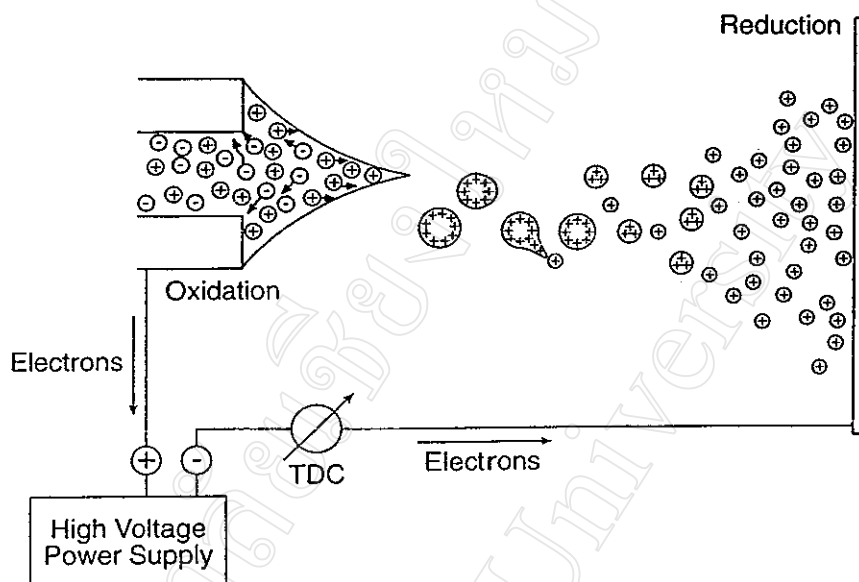
รูปที่ 1.8 กระบวนการเกิดเป็นไอออนในสถานะแก๊สของสารตัวอย่าง ⁽⁴¹⁾

จากนั้นไอออนจะถูกดึงไปยังคาปิลลารี ซึ่งกั้นระหว่างแหล่งกำเนิดไอออนที่เป็นความดันบรรยากาศกับภายในซึ่งเป็นสุญญากาศ เมื่อไอออนออกจากคาปิลลารีจะถูกกระตุ้นให้ผ่านไปยังเลนส์รูปกรวย (skimmer) เลนส์รูปกรวยนี้จะทำหน้าที่เป็นทั้งเลนส์ คือโฟกัสไอออน และสกัดพวกแก๊สและโมเลกุลของตัวทำละลายที่เกินออก โดยจะถูกปั๊มออกไปโดย turbomolecular pump จากนั้นไอออนจึงถูกวิเคราะห์ด้วยตัววิเคราะห์มวล (mass analyser) ต่อไป ดังรูปที่ 1.9



รูปที่ 1.9 องค์ประกอบของ orthogonal electrospray system⁽⁴³⁾

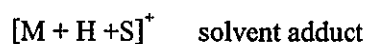
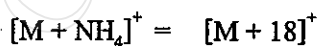
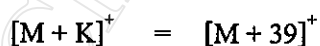
สมมุติฐานที่ 2. จากความแตกต่างของความต่างศักย์ไฟฟ้าประมาณ 3-6 กิโลโวลต์ระหว่างหัวฉีด และ counter electrode (เช่น mass spectrometer sampling orifice) ซึ่งอยู่ห่างกัน 0.5-3 ซม.นี้ จะทำให้เกิดสนามไฟฟ้าอย่างแรง ซึ่งจะเหนี่ยวนำให้เกิดประจุขึ้นมากมายทั้งประจุบวกและลบภายในของเหลวที่ปลายของ needle ภายใต้อิทธิพลของสนามไฟฟ้าที่เป็นบวก (เมื่อทำการทดลองใน positive ion mode) ไอออนบวกในของเหลวจะเคลื่อนที่มาอยู่ที่ผิวตรงปลาย needle ในขณะที่ไอออนลบจะเคลื่อนที่ออกจากผิวของของเหลว กระบวนการแยกประจุที่เกิดขึ้นที่ผิวนี้ บางครั้งกระบวนการนี้จะเรียกว่า electrophoretic charging process ทำให้ที่ผิวของของเหลวตรงปลาย needle มีเฉพาะประจุบวก ซึ่งถ้าแรงผลักระหว่างประจุบวกมีมากกว่า surface tension ของของเหลว จะทำให้เกิด cone ตรงปลาย needle และในขณะเดียวกันนี้แก๊สไนโตรเจนจะถูกส่งมาที่หัวฉีด โดยผ่านหลอดเล็กๆ ที่อยู่รอบๆ needle เพื่อช่วยผสมและดันของเหลวออกจากตอนปลายของ cone นั้นทำให้เกิดละอองขนาดเล็กๆ ซึ่งมีเฉพาะประจุบวกเท่านั้น ดังรูปที่ 1.10 ส่วนประจุลบที่เกิดขึ้นในตอนแรกๆ ก็จะถูกทำให้เสียประจุ (discharge) ที่บริเวณผิวของ needle นั่นเอง แต่ถ้าทำการทดลองภายใต้อิทธิพลของสนามไฟฟ้าที่เป็นลบ ก็ทำให้เกิดประจุตรงกันข้ามกัน นอกจากนี้ได้มีรายงานว่า⁽⁴²⁾ รัศมีของละอองเล็กๆ ในตอนแรกๆ จะประมาณ 0.5-1 ไมครอน และจะลดลงเหลือประมาณ 10 นาโนเมตร ก่อนที่ไอออนของสารตัวอย่างจะแยกออกจากละอองเล็กๆ



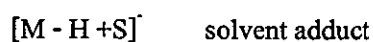
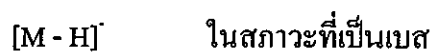
รูปที่ 1.10 กระบวนการเกิด charged droplets ⁽⁴⁴⁾

โดยทั่วไปไอออนของสารโมเลกุลเล็กที่เกิดขึ้นโดยอิเล็กโตรสเปรย์ไอออนไนเซชัน จะให้แมสสเปกตรัมที่มี base peak เป็น $[M+H]^+$ ส่วน pseudomolecular ion อื่นๆ อาจเกิดขึ้นได้ขึ้นอยู่กับเฟสเคลื่อนที่ การเตรียมและการเก็บสารตัวอย่าง สารเติมแต่ง (additives) และสิ่งเจือปนอื่นๆ

สำหรับ positive mode มี pseudomolecular ion อื่นๆ เช่น



สำหรับ negative mode มี pseudomolecular ion อื่นๆ เช่น



1.6.3 ปัจจัยที่ทำให้เกิดเป็นไอออนโดยอิเล็กโตรสเปรย์

ปัจจัยที่ทำให้เกิดเป็นไอออนโดยอิเล็กโตรสเปรย์ มีดังนี้ คือ

1) เคมีของสารละลาย

- อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ ซึ่งจะมีความสำคัญต่อการระเหยของตัวทำละลายในละอองเล็กๆ
- ค่า pK ของสารตัวอย่าง และค่า pH ของสารละลาย
- ความสามารถในการนำไฟฟ้าของสารละลาย จะมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการหลุด (desorb) ของไอออนออกจากละอองเล็กๆ ซึ่งอาจเติม isopropanol เพื่อปรับปรุงความสามารถในการนำไฟฟ้าของตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว

นอกจากนี้แล้วตำแหน่งและสภาวะของ needle และความดันที่เนบิวไลเซอร์ มีผลต่อการเกิดเป็นไอออนของสาร เนื่องจากการปรับ needle นี้จะถูกกำหนดโดยลักษณะของละอองเล็กๆ เช่น ความสมมาตรของละอองเล็กๆ ที่ถูกสเปรย์ออกมา ขนาดของละอองเล็กๆ และสารละลายตัวอย่างที่ออกมาจากหัวฉีด สภาวะและการตั้งค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่คาปิลลารี และ Chamber มีผลต่อกระบวนการเกิดเป็นไอออน

ในการทดลองนี้ได้ทำการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมของการเกิดเป็นไอออนของสารโดยอิเล็กโตรสเปรย์โดยใช้เทคนิคฟลูอิดเจ็ทอิเล็กโตรสเปรย์แมสสเป็คโตรเมตรี ซึ่งมีการศึกษาผลของความต่างศักย์ไฟฟ้าที่แฟร็กเมนเตอร์ (fragmentor voltage) ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่คาปิลลารี (capillary voltage) ความดันที่เนบิวไลเซอร์ (nebulizer pressure) อัตราการไหลของแก๊สอบแห้ง (drying gas flow) และ อุณหภูมิของแก๊สอบแห้ง (drying gas temperature) ต่อการเกิดเป็นไอออนของสาร แต่ปัจจัยดังกล่าวจะขึ้นอยู่กับลักษณะของสารตัวอย่าง องค์ประกอบและอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่อีกด้วย โดยความดันที่เนบิวไลเซอร์ อัตราการไหลของแก๊สอบแห้ง และอุณหภูมิของแก๊สอบแห้ง จะขึ้นอยู่กับองค์ประกอบและอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ ส่วนความต่างศักย์ไฟฟ้าที่คาปิลลารีจะขึ้นอยู่กับลักษณะของสารตัวอย่าง เป็นต้น

2) ควรหลีกเลี่ยงสารตัวอย่างที่ไม่มีขั้ว เช่น polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) และ polychlorinated biphenyl (PCBs)

3) ตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับตัวกลางอิเล็กโตรสเปย์ (electrospray interface) ได้แก่ methanol, ethanol, propanol, isopropanol, butanol, acetonitrile, water, acetic acid, formic acid, acetone, dichloromethane, chloroform, ส่วน dimethylformamide และ dimethylsulfoxide ควรใช้ $\leq 10\%$ เพื่อช่วยทำให้เกิดไอออนในสารละลายและควรหลีกเลี่ยงตัวทำละลายดังต่อไปนี้ ได้แก่ toluene, benzene, hydrocarbon เช่น hexane, styrene, cyclic hydrocarbon, CCl_4 และ CS_2

เนื่องจากเทคนิคอิเล็กโตรสเปย์ไอออนในเซชัน เป็นเทคนิคที่ทำให้สารตัวอย่างเกิดเป็นไอออนในสถานะแก๊สหรือทำให้ไอออนของสารตัวอย่างที่อยู่ในสารละลายเปลี่ยนไปเป็นไอออนที่อยู่ในสถานะแก๊ส และเทคนิคนี้ก็สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์สารตัวอย่างได้กว้างตั้งแต่ที่มีมวลโมเลกุลเล็กไปจนถึงสารชีวโมเลกุล และครอบคลุมสารตั้งแต่ประเภทที่มีขั้วปานกลาง ไปจนถึงประเภทที่มีขั้วมาก จึงทำให้มีรายงานการวิจัยมากมายที่นำเอาเทคนิคนี้ไปใช้ในการวิเคราะห์สารตัวอย่าง⁽⁴¹⁻⁶²⁾ ได้แก่

- จำแนกและหาลักษณะพิเศษของโปรตีนและเปปไทด์จากอาหาร เช่น ไข่ หางนม นม เนื้อสัตว์และปลา รัญพืช และเมล็ดถั่วต่างๆ

- วิเคราะห์ทางพิษวิทยาของยาและยาพิษต่างๆ ใน biosamples
- วิเคราะห์ bile salts
- วิเคราะห์หาปริมาณ biomedicine
- ตรวจวัดและหาสีย้อม
- วิเคราะห์พวกที่เป็นไอออนในสารละลาย เช่น quaternary ammonium salts, phosphonium salts และเกลือของกรดแก่ เช่น phosphates, sulphates, sulphonates

- วิเคราะห์พวก organic base เช่น amine, alkaloids, drugs เพราะ drugs หลายชนิด จะมีอะตอมของไนโตรเจนอยู่ในโครงสร้างซึ่งสามารถถูก protonate ได้ง่าย ปกติจะใช้ formic acid และ acetic acid เพื่อช่วยทำให้เกิดเป็นไอออน และพวก organic acid เช่น phenol, carboxylic acids,

phosphonic acids และ sulphonic acids ซึ่งปกติจะใช้แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ เพื่อช่วยทำให้เกิดเป็นไอออน

- วิเคราะห์สารที่ไม่มีหมู่ฟังก์ชันที่เป็นกรด หรือเบส อยู่ในโมเลกุล ซึ่งสามารถทำให้เกิดเป็นไอออนได้ โดยจะต้องมีไอออนอื่นๆ อยู่ในสารละลาย เช่น NH_4^+ , Na^+ สำหรับตรวจวัดไอออนบวก และ Cl^- , CH_3COO^- , HCOO^- และ CF_3COO^- สำหรับตรวจวัดไอออนลบ

- วิเคราะห์ alkali metal complex ของ organic ligand หลายๆ ชนิด และวิเคราะห์ ion metal complex ของสารชีวโมเลกุล เช่น metalloporphyrin ซึ่งมีพลังงานการเกิดไอออนในเซชันต่ำ แต่สามารถตรวจวัดเป็น radical cation หลังจากเกิด oxidation ที่ปลายของ electrospray needle

- ใช้วิเคราะห์ไอโซโทปของไอออนโลหะที่หายาก

- ใช้กำหนด species ของธาตุเกือบทั้งหมดในตารางธาตุ ยกเว้น noble gas, ธาตุที่ไม่เสถียร และ Ge, Hf, Ta, Bi และ Th

- ใช้ตรวจวัดพวก alkali metal ions เช่น Li^+ , Na^+ , K^+ , Cs^+ และ Rb^+ , alkaline earth ions เช่น Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} และตรวจวัดพวกไอออนลบของ inorganics acids เช่น NO_3^- , Cl^- , H_2PO_4^- และ SO_4^{2-} ได้

- วิเคราะห์ organic และ inorganic salts และสารประกอบ organometallic

- วิเคราะห์เชิงคุณภาพและปริมาณของสารที่มีมวลโมเลกุลสูง เช่น โปรตีน และเปปไทด์ ร่วมกับเทคนิคทางด้าน DNA นอกจากนี้ยังใช้วิเคราะห์โครงสร้างของสารพวกเปปไทด์ โปรตีน และสารที่มีมวลโมเลกุลต่ำ เช่น กรดไขมัน วิตามิน สเตอรอยด์ และกรดนิวคลีอิก และประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวางกับผลิตภัณฑ์ทางยา เช่น ยาต่อต้านโรคมะเร็ง

- วิเคราะห์ยา ขาฆ่าแมลง และสารตกค้างในอาหาร

1.7 โฟลอินเจกชันอิเล็กโตรสเปรย์ไอออนในเซชันแมสสเปกโตรเมตรี (flow injection-electrospray ionisation-mass spectrometry : FI-ESI-MS) ⁽⁶³⁻⁷⁷⁾

โฟลอินเจกชันอิเล็กโตรสเปรย์ไอออนในเซชันแมสสเปกโตรเมตรี เป็นเทคนิคการวิเคราะห์สารตัวอย่างโดยการนำสารตัวอย่างเข้าสู่ระบบลิวิดโครมาโทกราฟี และวิเคราะห์สารตัวอย่างด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมตรี โดยอาศัยการพาไปของเฟสเคลื่อนที่ และไม่มีการแยกของสารตัวอย่างที่คอลัมน์ เพราะฉะนั้นในการจำแนกสารตัวอย่างต้องยึดหลักอยู่บนความแตกต่างของมวลต่อประจุของไอออนของสารตัวอย่างเท่านั้น ไม่สามารถนำเวลาริเทนชันไปเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานได้

เทคนิคนี้สามารถ screen สารตัวอย่างได้อย่างรวดเร็วประมาณ 40-50 วินาที ขึ้นอยู่กับอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ ทำให้ประหยัดเวลา นอกจากนี้ยังใช้สารตัวอย่างปริมาณน้อย มีความไวในการวิเคราะห์ ใช้หาสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดเป็นไอออนของสารตัวอย่าง สามารถวิเคราะห์หาปริมาณสารตัวอย่าง และ limit of detection ได้

ในปัจจุบันนี้ได้มีรายงานวิจัยเกี่ยวกับการนำเทคนิคโฟลอินเจกชันแมสสเปกโตรเมตรี ไปประยุกต์ใช้ในงานหลายๆ ด้าน ⁽⁶⁷⁻⁷⁷⁾ ได้แก่

- การหามวลโมเลกุลของสารที่เป็น analogue ของ pectenotoxin-2 ซึ่งแยกได้จากแพลงตอนพืช และสัตว์จำพวก กุ้ง หอย และปู ทั้งใน positive ion และ negative ion mode และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค tandem mass spectrometry ทั้งใน positive ion และ negative ion mode เช่นกัน ทำให้สามารถยืนยันได้ว่า สารดังกล่าว คือ pectenotoxin-2 seco acid (PTX-2Sas) ⁽⁶⁷⁾

- การหามวลโมเลกุลของสารที่เป็น analogue ของกรด okadiac acid ซึ่งแยกได้จากแพลงตอนพืชที่มีพิษ (*Dinophysis acuta*) ในแม่น้ำ Irish และเป็นสาเหตุของอาการท้องร่วง เมื่อรับประทานอาหารจำพวก กุ้ง หอย และปู โดยได้วิเคราะห์สารตัวอย่างที่มีปริมาณน้อยด้วยเทคนิคโฟลอินเจกชันแมสสเปกโตรเมตรีที่มีไอออนสเปรย์เป็นตัวกลาง ทำการทดลองทั้งใน positive ion และ negative ion mode ทำให้ทราบมวลโมเลกุลของสารตัวอย่าง จากนั้นนำสารตัวอย่างไปวิเคราะห์ต่อด้วยเทคนิค

tandem mass spectrometry ทั้งใน positive ion และ negative ion mode เช่นกัน ทำให้ทราบรูปแบบของการแตกตัวของสาร (fragmentation pattern) และสามารถสรุปได้ว่าสารที่เป็น analogue ของกรด okadiac acid นั่นคือ dinophysistoxin-2 (DTX-2) และ dinophysistoxin-2B (DTX-2B) ⁽⁶⁸⁾ และหามวลโมเลกุลของสาร DTX-2B ที่แยกได้จากหอย Irish โดยใช้เทคนิคฟลิวอิเดชันแมสสเปกโตรเมตรีที่มีทั้ง ionspray และ atmospheric pressure ionisation เป็นตัวกลางเช่นกัน ⁽⁶⁹⁾

นอกจากนี้เทคนิคฟลิวอิเดชันแมสสเปกโตรเมตริยังสามารถใช้ในการยืนยันลักษณะและความบริสุทธิ์ของ DTX-2 ⁽⁷⁰⁾ จำแนกสารอินทรีย์ในกระบวนการบำบัดน้ำเสียของเทศบาลเมือง Goteborg ประเทศสวีเดน และตรวจหาของเสียที่เป็นสารอินทรีย์มีขั้วในกระบวนการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมผลิตสิ่งทอ ⁽⁷¹⁻⁷²⁾ ตรวจหาสารอินทรีย์เป็นพิษในน้ำธรรมชาติที่มีสารมีขั้วที่ไม่สามารถกำจัดได้ เพื่อดูประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพ ⁽⁷³⁻⁷⁴⁾ วิเคราะห์ของเสียที่เป็นสารอินทรีย์มีขั้วในแม่น้ำ Elbe ⁽⁷⁵⁾ ประเมินประสิทธิภาพในการกำจัดของเสียในกระบวนการบำบัดน้ำเสีย ตลอดจนวิเคราะห์หาปริมาณ alkyl polyglycol ether, nonylphenol ethoxylates และ linear alkylbenzenesulfonic acid จากน้ำเสีย ⁽⁷⁶⁾ screening สารที่มีขั้วในระหว่างกระบวนการบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพจากโรงงานผลิตยา และหาปริมาณยาที่ผิดปกติในเซรัม และน้ำปัสสาวะ ⁽⁷⁷⁾ เป็นต้น

1.8 ทบทวนเอกสารและวัตถุประสงคในการวิจัย

1.8.1 การศึกษาปริมาณสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ⁽⁷⁸⁻⁹⁸⁾

ในระยะแรกๆ การศึกษาความหอมในเมล็ดข้าวยังไม่มีเครื่องมือที่จะพิสูจน์ความหอมในเมล็ดข้าวแต่ละพันธุ์ ว่าพันธุ์ไหนหอมมากหรือหอมน้อย หรือกลิ่นที่หอมประกอบด้วยอะไรบ้าง และไม่มีเครื่องมือที่แน่นอนในการตรวจวัดกลิ่น นอกจากจะใช้วิธีการนั่งข้าวหอมพันธุ์เหล่านั้นแล้วดมกลิ่นโดยผู้เชี่ยวชาญ และให้ระดับความหอมออกมาเป็นระดับมากหรือน้อย แต่การตรวจสอบความหอมของเมล็ดข้าวพันธุ์ผสมของสถาบันวิจัยข้าว ทำโดยการเกี่ยวครึ่งเมล็ดในส่วนที่ไม่มีกัณพล ถ้าหอมก็นำอีกครึ่งเมล็ดที่มีกัณพลไปปลูก ซึ่งขึ้นอยู่กับการวินิจฉัยของผู้เชี่ยวชาญเช่นกัน ทำให้นักวิจัยสนใจที่จะศึกษาสารให้ความหอมในเมล็ดข้าวกันมากขึ้น เพื่อจะได้พัฒนาเทคนิคการสกัดและตรวจวัดปริมาณสารหอมนั้นต่อไป จนกระทั่งปี ค.ศ 1982 Buttery และคณะ ⁽⁷⁸⁾ ได้รายงานการค้นพบสารหลักที่ให้กลิ่นหอมในเมล็ดข้าวเป็นครั้งแรก คือ 2-acetyl-1-pyrroline ซึ่งพบในข้าวหอมทั่วไป

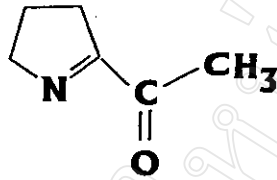
สารหอม 2-acetyl-1-pyrroline จะมีโครงสร้างและลักษณะ คือ เป็นสารประกอบในกลุ่ม pyrrole ซึ่งเป็นวงขนาด 5 เหลี่ยมที่มีไนโตรเจนเกาะอยู่ในวง มีพันธะระหว่างคาร์บอนกับไนโตรเจนเป็นพันธะคู่ (C=N) และมีหมู่ acetyl เกาะกับคาร์บอนที่เกิดพันธะคู่ ดังรูปที่ 1.11 สาร 2-acetyl-1-pyrroline ⁽⁷⁹⁾ มีสมบัติทางกายภาพเป็นของเหลวใสไม่มีสี และเนื่องจากเป็นสารประกอบไนโตรเจน ทำให้สารหอมนี้มีสมบัติเป็นเบสเล็กน้อย และเมื่อเก็บไว้เป็นเวลานานจะเปลี่ยนเป็นสีแดงหรือน้ำตาลเข้ม นอกจากนี้ยังเป็นสารที่ระเหยง่ายและไม่ค่อยเสถียรเมื่ออยู่ในรูปสารบริสุทธิ์ ดังนั้นจึงต้องเก็บในรูปของสารละลายที่เจือจางหรือในรูปของเกลือ บางครั้งทำให้เกิดความยุ่งยากในการวิเคราะห์สารหอมนี้ในตัวอย่างข้าว

นอกจากนี้สาร 2-acetyl-1-pyrroline ⁽⁸⁰⁾ ยังมีชื่อเรียกอื่นๆ คือ 5-acetyl-3,4-dihydro-2H-pyrrole และ 1-(3,4-dihydro-2H-pyrrol-5-yl) ethanone

CAS Number คือ 85213-22-5

มีสูตรโมเลกุล คือ C_6H_9NO

มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 111.143



รูปที่ 1.11 สารหอม 2-acetyl-1-pyrroline

ในระยะแรกๆ นักวิจัยได้ศึกษาสารระเหยที่เกี่ยวข้องกับความหอมของข้าวตลอดจนได้พยายามปรับปรุงเทคนิคการสกัดสารหอมในข้าว ซึ่งส่วนใหญ่ใช้เทคนิคการกลั่นไอน้ำหรือเทคนิคการกลั่นไอน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์แบบต่อเนื่อง แต่ต้องใช้ปริมาณข้าวตัวอย่างค่อนข้างมาก และตรวจวัดปริมาณสารหอมโดยใช้เครื่องมือวิเคราะห์ระดับสูง เช่น แก๊สโครมาโทกราฟีหรือแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์ ทำให้ระยะแรกๆ ไม่มีรายงานเกี่ยวกับสารหอมในข้าวมากนัก งานวิจัยที่เกี่ยวข้องมีรายงานดังนี้

ปี ค.ศ. 1978 Yajima และคณะ⁽⁸¹⁾ ได้รายงานการศึกษาสารระเหยในข้าวพันธุ์โคชิฮิการิ (Koshihigari) โดยใช้เทคนิคการสกัดด้วยการกลั่นไอน้ำ ใช้ภาชนะขนาดใหญ่ ประมาณ 50 ลิตร และใช้ตัวอย่างข้าวครั้งละ 6 กิโลกรัม ทำการทดลองซ้ำ 8 ครั้ง รวมแล้วใช้ตัวอย่างข้าว 48 กิโลกรัม จึงได้สารสกัดที่สามารถนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบโดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีหรือเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์ (GC-MS) พบว่ามีสารระเหยกว่าร้อยชนิดที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดของข้าวพันธุ์ดังกล่าว

ปี ค.ศ. 1979 Yajima และคณะ⁽⁸²⁾ ได้รายงานการศึกษาสารระเหยในข้าวพันธุ์กาโอริมาอิ (Kaorimai) ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวหอม โดยใช้เทคนิคการสกัดด้วยการกลั่นไอน้ำ ใช้ข้าวตัวอย่าง 60 กิโลกรัม พบว่าในการวิเคราะห์สารสกัดจากข้าวโดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์ มีสารระเหยกว่าร้อยชนิดที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดจากข้าวพันธุ์กาโอริมาอิ แต่ไม่พบองค์ประกอบที่เป็นสารให้ความหอมของข้าวหอมพันธุ์กาโอริมาอิ

ปี ค.ศ. 1982 Buttery และคณะ⁽⁷⁸⁾ ได้รายงานการค้นพบสารให้กลิ่นหอมในข้าว คือ 2-acetyl-1-pyrroline และเสนอให้เป็นสารหลักที่ให้กลิ่นหอมในข้าว โดยมีกลิ่นหอมใกล้เคียงที่สุดกับกลิ่นของข้าวสุก และมีกลิ่นหอมเหมือนข้าวโพดคั่ว ซึ่งพบในข้าวหอมและข้าวไม่หอมในปริมาณต่างกัน โดยประยุกต์เทคนิคการสกัดด้วยไอน้ำ มาเป็นการสกัดด้วยไอน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์แบบต่อเนื่องตามแบบของ Likens และ Nikerson⁽⁸³⁾ (Likens-Nikerson simultaneous steam distillation/ solvent extraction apparatus) โดยใช้ตัวอย่างข้าวเพียง 500 กรัม นอกจากนี้ Buttery และคณะ⁽⁸⁴⁾ ได้เสนอว่า สารที่เกี่ยวข้องกับการให้กลิ่นหอมในข้าวนั้นประกอบด้วยสารทั้งหมด 17 ชนิด ได้แก่ hexanal, heptanal, 2-pentylfuran, (E)-2-heptanal, 2-acetyl-1-pyrroline, hexanol, octanal, nonanal, benzaldehyde, (E)-2-nonenal, decanal, (E)-2-decenal, nonanol, 4-vinylphenol, (E,E)-2,4-decadienal, 2-phenylethanol และ 4-vinylguainocol โดยมี 2-acetyl-1-pyrroline เป็นสารหลักที่ให้กลิ่นหอมในข้าวมากที่สุด

ต่อมา Buttery และคณะ^(79,85) ได้ทำการสกัดด้วยไอน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์แบบต่อเนื่อง เพื่อตรวจวัดปริมาณสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline กับข้าวหอมบางพันธุ์ เช่น Malagkit sungsong, Basmati 370 และข้าวขาวดอกมะลิ 105 กับข้าวพันธุ์ไม่หอม เช่น คาลโรส (Calrose) การวิเคราะห์เชิงปริมาณใช้เทคนิคสารมาตรฐานภายในและมี 2,4,6-trimethylpyridine (TMP) เป็นสารมาตรฐานภายใน (internal standard) พบว่า ข้าวหอมที่ยังไม่ได้ขัดสี จะมีปริมาณ 2-acetyl-1-pyrroline อยู่ 0.1-0.2 ppm และข้าวที่ขัดสีแล้วจะมีปริมาณ 0.04-0.09 ppm แต่ข้าวที่ไม่หอมจะมีปริมาณน้อยมาก คือ 0.006-0.008 ppm และจากการทดลอง Buttery ยังพบอีกว่าปริมาณสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline นอกจากจะขึ้นกับชนิดของข้าวแต่ละพันธุ์แล้ว ยังขึ้นอยู่กับการบ่มและการขัดสีด้วย เพราะกระบวนการขัดสีนั้นเมล็ดข้าวจะสูญเสียเนื้อเยื่อชั้นนอกออกไป

ปี ค.ศ. 1983 Buttery และคณะ⁽⁸⁶⁾ ได้ศึกษาสารสกัดจากใบเตยแห้ง (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.) โดยใช้เทคนิคการสกัดด้วยไอน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์แบบต่อเนื่อง นำสารสกัดมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี พบว่าปริมาณสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline มีมากกว่าในเมล็ดข้าวหอมที่ไม่ได้ขัดสีถึงประมาณ 10 เท่า และมากกว่าในข้าวไม่หอมถึง 100 เท่า

ปี ค.ศ. 1991 Tanchotikul และ Hsieh ⁽⁸⁷⁾ รายงานว่า ได้ปรับปรุงเทคนิคการตรวจวัดปริมาณสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline โดยใช้เทคนิคการสกัดด้วยการกลั่นไอน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์แบบต่อเนื่องขนาดเล็ก สามารถใช้ตัวอย่างข้าวเพียง 1 กรัม และต้องอาศัยเทคนิคการวิเคราะห์ระดับสูง คือ selected ion monitoring high resolution gas chromatography-mass spectrometry ซึ่งเทคนิคนี้เครื่องมือมีราคาแพงมาก และต้องอาศัยบุคลากรที่มีความชำนาญเฉพาะทางสูง พบว่าข้าวพันธุ์เดลตา (Della) ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวไม่หอมมีความเข้มข้นของสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline อยู่ในช่วง 76.2 ± 1.8 ppb ข้าวพันธุ์บาสมати (Basmati) 370 อยู่ในช่วง 87.4 ± 3.4 ppb และข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 อยู่ในช่วง 156.1 ± 8.4 ppb

ปี ค.ศ. 1993 Laksanalamai และ Ilangantileke ⁽⁸⁸⁾ ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ในตัวอย่างข้าวขาวดอกมะลิ 105 และใบเตย (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.) โดยใช้เทคนิคการสกัดด้วยการกลั่นไอน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ต่อเนื่อง พบว่า 2-acetyl-1-pyrroline ที่สกัดได้จากใบเตยสามารถใช้เป็นสารอ้างอิงในการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีได้ เพราะทั้งข้าวและใบเตยต่างมีสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline เป็นสารหลักในการให้กลิ่นหอมแต่ปริมาณ 2-acetyl-1-pyrroline ในใบเตยจะสูงกว่าข้าว

ปี ค.ศ. 2001 Mahatheeranont และคณะ ⁽⁸⁹⁾ ได้ทำการวิจัยเพื่อตรวจวัดปริมาณสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ในข้าวคิบบที่ยังไม่ได้ขัดสีพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 โดยใช้เทคนิคการสกัดด้วยการกลั่นไอน้ำแบบอ้อมภายใต้ความดันต่ำและควบคุมอุณหภูมิเพื่อป้องกันไม่ให้ข้าวสุก จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี พบว่ามีสารระเหยมากกว่า 140 ชนิดเป็นองค์ประกอบ ซึ่งมีเพียง 70 ชนิดที่สามารถจำแนกได้รวมถึง 2-acetyl-1-pyrroline ซึ่งเป็นสารหอมที่พบในข้าวหุงสุกด้วย นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังได้พัฒนาเทคนิคการตรวจวัดปริมาณสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ในข้าวคิบบที่ยังไม่ได้ขัดสีพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ที่สกัดด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก และวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี โดยตัวตรวจวัดที่ใช้ คือ เฟลมไอออไนเซชันและคอลัมน์ที่ใช้ คือ CP-WAX 51 ซึ่งเหมาะกับสารพวกเอมีน พบว่าตัวอย่างข้าวน้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดสาร 2-acetyl-1-pyrroline ได้ คือ 0.5 กรัมเท่านั้น

ดังนั้นจะเห็นว่าการตรวจวัดปริมาณสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ในเมล็ดข้าวนั้น แต่เดิมมักใช้วิธีการสกัดด้วยไอน้ำเป็นส่วนใหญ่ พบว่าเป็นวิธีที่ยุ่งยาก ใช้เวลานานและสิ้นเปลืองตัวทำละลายอินทรีย์ ต้องอาศัยการสกัดและวิเคราะห์หลายขั้นตอน อาจส่งผลให้เกิดความคลาดเคลื่อนในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ นอกจากนี้อาจต้องใช้ปริมาณข้าวตัวอย่างค่อนข้างมาก จุดประสงค์ของงานวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะพัฒนาและปรับปรุงเทคนิคการตรวจวัดปริมาณสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ในเมล็ดข้าวโดยใช้ปฏิกิริยาเคมีที่จำเพาะเจาะจง เพื่อให้การตรวจวัดสารหอมทำได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว ขึ้น โดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสาร 2-acetyl-1-pyrroline กับรีเอเจนต์ 2-aminobenzaldehyde สังเคราะห์ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ให้ผลผลิตเป็นสารประกอบที่มีสี หาสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดผลผลิตที่มีสีโดยศึกษาตัวแปร 3 ชนิดคือ ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก อุณหภูมิ และระยะเวลาในการดำเนินไปของปฏิกิริยาของการเกิดผลผลิตที่มีสี พิสูจน์เอกลักษณ์ของผลผลิตที่มีสีโดยใช้เทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี และหาสภาวะที่เหมาะสมของการเกิดเป็นไอออนของผลผลิตที่มีสีโดยศึกษาผลของความต่างศักย์ไฟฟ้าที่แฟรกเมนเตอร์ ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่คาปิลลารี ความดันที่เนบิวไลเซอร์ อัตราการไหลของแก๊สอบแห้งและอุณหภูมิของแก๊สอบแห้ง โดยใช้เทคนิคโฟลอินเจกชันอิเล็กโตรสเปรย์ไอออนไนเซชันแมสสเปกโตรเมตรี ซึ่งสามารถวิเคราะห์ผลผลิตที่มีสีได้อย่างรวดเร็ว และมีความแม่นยำ จากนั้นสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของผลผลิตที่มีสีต่อสารมาตรฐานภายใน 2-acetylpyrrole กับความเข้มข้นของสารสังเคราะห์ 2-acetyl-1-pyrroline ปริมาณสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ในตัวอย่างสารสกัดจากเมล็ดข้าว สามารถหาได้โดยการคำนวณจากกราฟมาตรฐานของสารสังเคราะห์ 2-acetyl-1-pyrroline นั้น

ส่วนรายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสาร 2-aminobenzaldehyde ซึ่งใช้เป็นรีเอเจนต์ในการทำปฏิกิริยากับสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline มีดังนี้

ปี ค.ศ. 1968 Holmstedt และคณะ⁽⁹⁰⁾ รายงานการตรวจวัดเอนไซม์ของเอนไซม์ diamine oxidase โดยศึกษาจากผลผลิตที่มีสีเหลืองจากปฏิกิริยาระหว่าง 2-aminobenzaldehyde กับ 1-pyrroline โดยเริ่มจากการนำสาร putrescine ซึ่งเป็นสารตั้งต้นทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ diamine oxidase ได้ γ -amino-butryaldehyde เป็นผลผลิต และเมื่อผลผลิตนี้สูญเสียไป 1 โมเลกุล จะได้ 1-pyrroline จากนั้นจึงนำ 1-pyrroline มาทำปฏิกิริยากับ 2-aminobenzaldehyde ได้ผลผลิตที่มีสีเหลือง และให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร

ปี ค.ศ. 1993 Brain และคณะ⁽⁹⁰⁾ รายงานการสังเคราะห์ 2-aminobenzaldehyde โดยเตรียมจากปฏิกิริยารีดักชันของ 2-nitrobenzaldehyde ในสารละลายเฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) และแอมโมเนียเข้มข้น แต่เนื่องจาก 2-aminobenzaldehyde มีทั้งหมู่อัลดีไฮด์ และอะมิโน อยู่ในโมเลกุลเดียวกัน จึงสามารถเกิดปฏิกิริยาโพลีเมอไรเซชันได้ง่าย ดังนั้นจึงต้องแยก 2-aminobenzaldehyde ออกจากปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วโดยวิธีการกลั่นไอน้ำ

ปี ค.ศ. 1998 Ling-Jen Chen และ Leo T. Burka⁽⁹¹⁾ รายงานว่า เมื่อนำ 2-nitrosobenzaldehyde มาทำปฏิกิริยารีดักชันกับสารจำพวก biological thiols ได้แก่ glutamine, cysteine และ N-acetylcysteine ใน acetonitrile ค่อน้ำ ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิห้อง จะได้ 2-aminobenzaldehyde เป็นผลผลิต โดยเปรียบเทียบข้อมูลทางสเปกโตรสโกปีและโครมาโทกราฟีกับสารมาตรฐาน 2-aminobenzaldehyde

ปี ค.ศ. 1997 Franz von Nussbaum คณะ⁽⁹²⁾ รายงานว่า เมื่อนี้ดสารละลายของกรด anthranilic acid ที่ถูก label ด้วย ^{13}C และ ^{15}N เข้าไปในเห็ด *Hebeloma sacchariolens* ซึ่งพบในป่าชื้น หลังจากนั้น 3-5 วัน นำเห็ดดังกล่าวมาสกัดด้วยตัวทำละลายอีเทอร์ และวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรีที่มีประสิทธิภาพการแยกสูง พบว่ามี 2-aminobenzaldehyde เกิดขึ้น

จากรายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับ 2-aminobenzaldehyde ที่กล่าวมาแล้ว ยังมีรายงานวิจัยอื่นๆ⁽⁹³⁻⁹⁷⁾ ซึ่งนิยมใช้ 2-aminobenzaldehyde ในการทำปฏิกิริยาควบแน่น (condensation) เพื่อสังเคราะห์สารต่างๆ เช่น luotonin A ซึ่งสามารถต่อต้านโรค leukemic และสารประกอบเชิงซ้อนของโลหะหนักเกิด และทองแดง เป็นต้น

ในงานวิจัยนี้นอกจากจะตรวจวัดปริมาณสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ในเมล็ดข้าวโดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยากับ 2-aminobenzaldehyde แล้ว ยังได้ตรวจวัดปริมาณสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ในเมล็ดข้าวโดยใช้เทคนิคฟลูออโรเจนเจชันอิเล็กโตรสเปกโตรอิมมูโนเซนซิงแมสสเปกโตรเมตรี ซึ่งมุ่งที่จะพัฒนาเทคนิคการตรวจวัดปริมาณสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ให้ง่าย สะดวก รวดเร็ว มีความไว และความแม่นยำในการตรวจวัดสูงกว่าการตรวจวัดปริมาณสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ในเมล็ดข้าวโดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยากับ 2-aminobenzaldehyde โดยวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถลดขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างสารสกัดและให้การวิเคราะห์โดยไม่ต้องทำการแยกด้วยคอลัมน์

1.8.2 วัตถุประสงค์ในงานวิจัย

1. เพื่อพัฒนาเทคนิคการตรวจวัดปริมาณสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ในเมล็ดข้าวให้ง่ายและรวดเร็ว โดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยากับรีเอเจนต์ที่เหมาะสม และได้ผลผลิตที่มีสี แทนการสกัดด้วยการกลั่นไอน้ำและวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี
2. เพื่อพัฒนาเทคนิคโฟลอินเจกชันอิเล็กโตรสเปรย์ไอออนในเซชันแมสสเป็คโตรเมตรีให้เหมาะสำหรับการวิเคราะห์เชิงปริมาณของสาร 2-acetyl-1-pyrroline ในสารสกัดจากเมล็ดข้าว โดยไม่ต้องอาศัยการแยกสารด้วยคอลัมน์