

บทที่ 2

การทดลอง

การทดลองตอนที่ 1

การตรวจวัดปริมาณสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ในเมล็ดข้าวโดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยาเคมีกับรีเอเจนต์ 2-aminobenzaldehyde

2.1 เครื่องมือ วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และวัตถุดิบที่ใช้

2.1.1 เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์

- 1) เครื่องลิกวิดโครมาโทกราฟ-แมสสเป็คโตรมิเตอร์ (Liquid Chromatograph-Mass Spectrometer : LC-MS) รุ่น 1100 series ผลิตโดยบริษัท Hewlett Packard
- 2) เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ-แมสสเป็คโตรมิเตอร์ (Gas Chromatograph-Mass Spectrometer : GC-MS) รุ่น 6890 ผลิตโดยบริษัท Hewlett Packard
- 3) เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ (Gas Chromatograph : GC) รุ่น 5890 series II plus ผลิตโดยบริษัท Hewlett Packard
- 4) เครื่องยูวีวิสิเบิลสเป็คโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-VIS spectrophotometer) รุ่น U-2000 ผลิตโดยบริษัท HITACHI
- 5) คาปิลลารีคอลลัมน์ DB-1 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร ยาว 30 เมตร ขนาดของ film thickness 0.25 ไมโครเมตร ผลิตโดยบริษัท J & W Scientific
- 6) คาปิลลารีคอลลัมน์ HP-5MS ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร ยาว 30 เมตร ขนาดของ film thickness 0.25 ไมโครเมตร ผลิตโดยบริษัท Hewlett Packard

- 7) เครื่องหมุนระเหยความดันต่ำ (vacuum rotary evaporator) รุ่น B-169 ผลิตโดย บริษัท Buchi
- 8) เข็มฉีดยา (syringe) ขนาด 10.0 ไมโครลิตร ผลิตโดยบริษัท Hewlett Packard
- 9) เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) model D-78532 Tuttlingen ผลิตโดยบริษัท Hettich
- 10) เครื่องกวนแม่เหล็ก (magnetic stirrer) และแท่งแม่เหล็ก (magnetic bar)
- 11) กระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 ผลิตโดยบริษัท Whatman
- 12) กรวยกรอง (glass funnel)
- 15) เมมเบรน ขนาด 0.45 ไมครอน ผลิตโดยบริษัท Sartorius
- 16) เครื่องบดไฟฟ้า ผลิตโดยบริษัท Maulinex
- 17) ลูกโป่งยาง ชนิดบรรจุก๊าซฮีเลียม
- 18) เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น AC 210 S ผลิตโดยบริษัท Sartorius
- 19) Autopipet ขนาด 20-100 ไมโครลิตร ผลิตโดยบริษัท BRAND

2.1.2 สารเคมี

- 1) 2-Acetylpyrrole purum > 98 % ผลิตโดยบริษัท Fluka
- 2) 5% Rhodium on activated alumina (5% Rh on Al) AR grade ผลิตโดยบริษัท Fluka
- 3) Sodium carbonate AR grade 99.5 % ผลิตโดยบริษัท Merck
- 4) Silver nitrate AR grade 99.8 % ผลิตโดยบริษัท BDH
- 5) Celite ผลิตโดยบริษัท Fluka
- 6) Ferrous sulfate heptahydrate AR grade 99 % ผลิตโดยบริษัท Riedel-deHaen
- 7) 2-Nitrobenzaldehyde HPLC grade ≥ 99 % ผลิตโดยบริษัท Fluka
- 8) Methanol AR grade 99 % ผลิตโดยบริษัท J.T. Baker
- 9) Methanol HPLC grade 99.9 % ผลิตโดยบริษัท BDH
- 10) Benzene AR grade 99.7 % ผลิตโดยบริษัท LAB-SCAN
- 11) Hydrochloric acid assay 37.0 % ผลิตโดยบริษัท BDH
- 12) Ammonia solution ผลิตโดยบริษัท BDH

13) Hydrogen gas HP grade บริษัท ลานนา เชียงใหม่

14) Nitrogen gas HP grade บริษัท ลานนา เชียงใหม่

2.1.3 วัตถุดิบที่ใช้

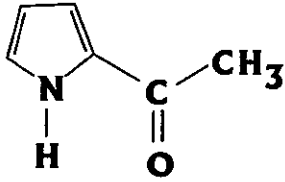
เมล็ดข้าวกล้องพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (ก.พ.ส.) จากภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน เก็บเกี่ยวเดือนธันวาคม 2542

2.2 การสังเคราะห์สารมาตรฐาน 2-acetyl-1-pyrroline

2.2.1 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์สารมาตรฐาน 2-acetyl-1-pyrroline

การสังเคราะห์สาร 2-acetyl-1-pyrroline เพื่อนำมาใช้เป็นสารมาตรฐาน ได้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Buchi และ Wuest⁽⁹⁸⁾ และวิธีของ Buttery และคณะ⁽⁷⁸⁾ แบ่งได้เป็น 2 ขั้นตอนดังแสดงในแผนภาพรูปที่ 2.1 โดยขั้นแรกนำ 2-acetylpyrrole ซึ่งใช้เป็นสารตั้งต้นมาทำปฏิกิริยาไฮโดรจิเนชัน ได้ 2-(1-hydroxyethyl) pyrrolidine เป็นผลผลิต จากนั้นในขั้นตอนที่ 2 จึงนำผลผลิตที่ได้ไปทำปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ 2-acetyl-1-pyrroline เป็นผลผลิตหลัก โดยมีรายละเอียดดังนี้

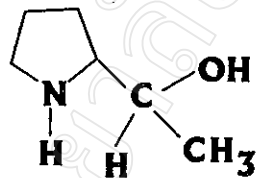
ขั้นแรก คือ การทำปฏิกิริยาไฮโดรจิเนชัน โดยชั่งสารตั้งต้น 2-acetylpyrrole มา 0.7000 กรัม ใส่ในขวดทำปฏิกิริยา (B) แสดงดังรูป 2.2 เติมตัวทำละลาย methanol 25.0 มิลลิลิตร เขย่าจนสารตั้งต้นละลายหมด เติมตัวเร่งปฏิกิริยา 5% rhodium on activated alumina 1.0 กรัม ลงไปในสารละลาย จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาไฮโดรจิเนชัน กับแก๊สไฮโดรเจนที่บรรจุในลูกโป่งยาง (A) พร้อมกับคนสารละลายตลอดเวลาโดยใช้เครื่องกวนแม่เหล็ก (C) เมื่อสารตั้งต้นทำปฏิกิริยาหมด (ตรวจสอบด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี) จึงหยุดปฏิกิริยา จากนั้นตั้งทิ้งไว้ประมาณ 2-3 ชั่วโมงเพื่อให้ตัวเร่งปฏิกิริยาดกตะกอน แยกเอาสารละลายใสมากรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน นำไปประเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องหมุนระเหยความดันต่ำ ได้สาร 2-(1-hydroxyethyl) pyrrolidine 0.4456 กรัม



2-acetylpyrrole (0.7000 กรัม) + methanol 25.0 มิลลิลิตร

ปฏิกิริยาไฮโดรจิเนชัน

- 5% Rhodium on alumina (1.0 กรัม)
- แก๊สไฮโดรเจน
- กรองชั้นสารละลายใส
- ระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องหมุนระเหยความดันต่ำ



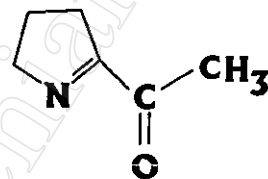
2-(1-hydroxyethyl) pyrrolidine + silver carbonate on celite

(0.4456 กรัม)

(5.0 กรัม ในเบนซีน 25.0 มิลลิลิตร)

ปฏิกิริยาออกซิเดชัน

- reflux ภายใต้ N_2 เป็นเวลา 45 ชม.
- กรอง silver carbonate on celite ออก

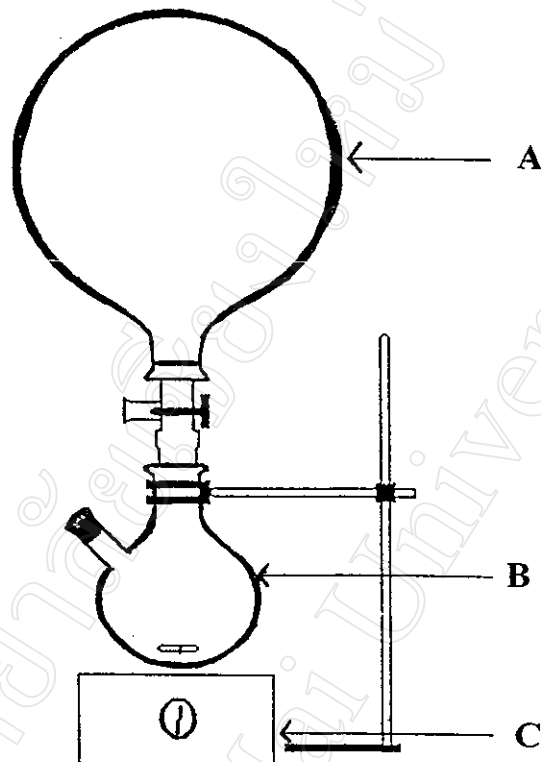


2-acetyl-1-pyrroline → วิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC, GC-MS
(ในตัวทำละลายเบนซีน)

- สกัดด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก
- 0.10 โมลต่อลิตร

วิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS

รูป 2.1 แผนผังแสดงขั้นตอนการสังเคราะห์ 2-acetyl-1-pyrroline



- A คือ ลูกโป่งยางที่บรรจุแก๊สไฮโดรเจน
 B คือ ขวดทำปฏิกิริยา
 C คือ เครื่องกวนแม่เหล็ก

รูปที่ 2.2 การจัดตั้งอุปกรณ์ในการทำปฏิกิริยาไฮโดรจิเนชัน

ขั้นที่สอง คือ การทำปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยนำ silver carbonate on celite 5.0 กรัม (ดูวิธีการเตรียมในภาคผนวก) ใส่ในขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำทำละลายเบนซีน 25.0 มิลลิลิตร และนำผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาไฮโดรจิเนชันเดิมลงไป reflux ภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจนเป็นเวลา 45 ชั่วโมง ได้สารละลาย 2-acetyl-1-pyrroline เป็นผลผลิตหลัก กรอง silver carbonate on celite ออก โดยใช้กระดาษกรอง วัดปริมาตรสารละลายเบนซีนได้ 18.80 มิลลิลิตร

2.3 การวิเคราะห์ผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาการสังเคราะห์สารมาตรฐาน 2-acetyl-pyrroline โดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี

นำสารตั้งต้น 2-acetylpyrrole และผลผลิตที่ได้ คือ 2-(1-hydroxyethyl) pyrrolidine และ 2-acetyl-1-pyrroline จากปฏิกิริยาการสังเคราะห์สารมาตรฐาน 2-acetyl-1-pyrroline ในการทดลองที่ 2.2 มาวิเคราะห์องค์ประกอบโดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี มีสภาวะที่ใช้ในการทดลองดังนี้

เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

ตัวนำสารเข้า

อุณหภูมิของตัวนำสารเข้า	230	องศาเซลเซียส
Mode	Split	
Split ratio	100 : 1	

คอลัมน์

คอลัมน์	Capillary Column HP-5MS (5%)-Diphenyl (95%)- Dimethylpolysiloxane
---------	---

ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง	250 ไมโครเมตร
-----------------------	---------------

ความยาว	30 เมตร
---------	---------

เคลือบด้วยเฟสคงที่หนา	0.25 ไมโครเมตร
-----------------------	----------------

อัตราการไหลของแก๊สฮีเลียม	1 มิลลิลิตรต่อนาที
---------------------------	--------------------

โปรแกรมอุณหภูมิของคอลัมน์

อุณหภูมิเริ่มต้น	50 องศาเซลเซียส
------------------	-----------------

อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ	10 องศาเซลเซียสต่อนาที
-----------------------	------------------------

อุณหภูมิสุดท้าย	230 องศาเซลเซียส
-----------------	------------------

ปริมาตรสารที่ฉีด	1 ไมโครลิตร
------------------	-------------

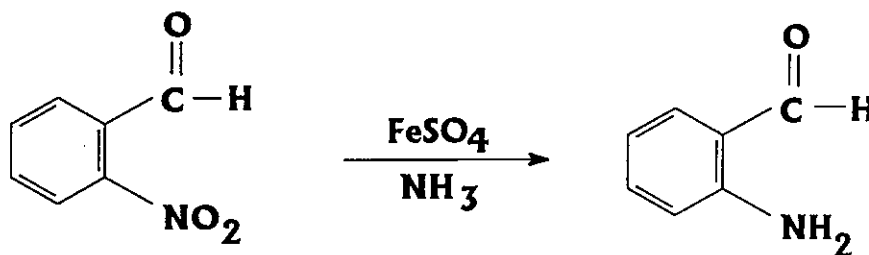
เครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์

แบบของการสแกนมวลต่อประจุ	สแกนทุกมวลต่อประจุที่กำหนดในช่วงมวลต่อประจุ 29-500 amu
อุณหภูมิของส่วนเชื่อมต่อ	280 องศาเซลเซียส
วิธีการผลิตไอออน	electron impact ionisation (EI)
พลังงานเฉลี่ยของอิเล็กตรอน	70 อิเล็กตรอน โวลต์
อุณหภูมิของตัวกำเนิดไอออน	230 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิของควอดรูโพล	150 องศาเซลเซียส

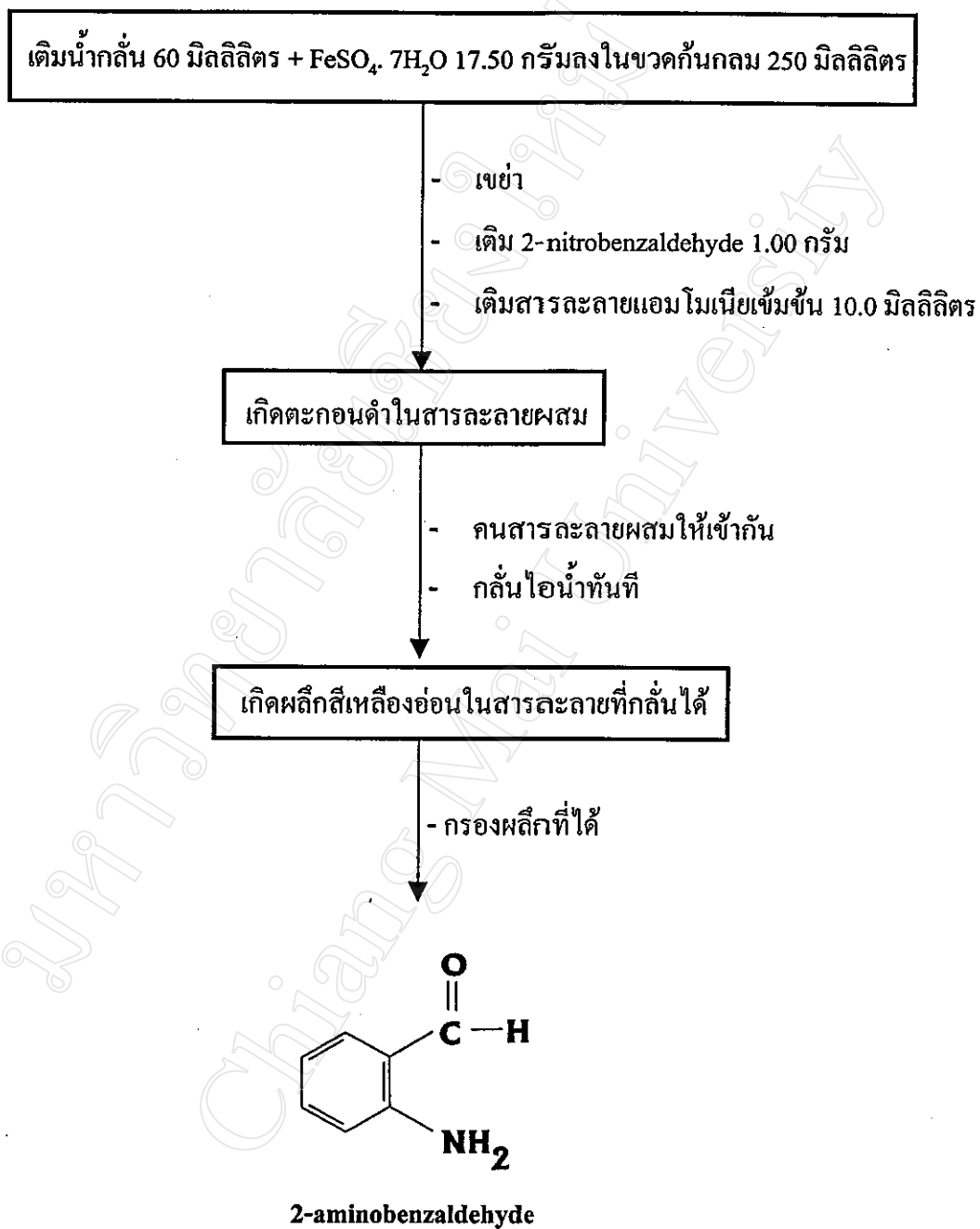
2.4 การสังเคราะห์ 2-aminobenzaldehyde

การสังเคราะห์ 2-aminobenzaldehyde ได้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Brian ⁽⁹¹⁾ และคณะ ซึ่งเตรียมโดยการนำ 2-nitrobenzaldehyde มาทำปฏิกิริยารีดักชันในสารละลายเฟอร์รัสซัลเฟตและแอมโมเนีย ได้ 2-aminobenzaldehyde เป็นผลผลิต ดังรูปที่ 2.3 แต่เนื่องจากผลผลิตที่ได้มีหมู่ฟังก์ชันเป็นอัลดีไฮด์ และอะมิโน ซึ่งสามารถที่จะเกิดปฏิกิริยาโพลีเมอไรเซชันได้ง่าย ดังนั้นต้องแยกผลผลิตออกอย่างรวดเร็วด้วยเทคนิคการกลั่นไอน้ำ โดยมีวิธีการทดลองอย่างละเอียดดังนี้

เติมน้ำกลั่น 60 มิลลิลิตร และ ferrous sulfate heptahydrate 17.50 กรัม ลงในขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร เหย้าจน ferrous sulfate heptahydrate ละลายหมด จากนั้นจึงเติม 2-nitrobenzaldehyde 1.00 กรัมและสารละลายแอมโมเนียเข้มข้น 10.0 มิลลิลิตร ลงไปทันที เป็นผลให้เกิดตะกอนดำ คนสารละลายผสม จากนั้นจึงนำไปกลั่นไอน้ำทันที โดยให้ความร้อนอย่างรวดเร็วจนถึงอุณหภูมิ 80 °C และคงที่ที่อุณหภูมินี้ 10 นาที เพื่อกำจัดแอมโมเนียออกไป จากนั้นจึงให้ความร้อนต่อจนกระทั่งสารละลายผสมเดือด เก็บผลิตภัณฑ์เหลืองอ่อนที่เกิดขึ้นในสารละลายที่กลั่นได้ 40 มิลลิลิตร ดังในแผนภาพรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.3 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ 2-aminobenzaldehyde



รูปที่ 2.4 แผนภาพการสังเคราะห์ 2-aminobenzaldehyde

2.5 การวิเคราะห์ผลผลิตจากปฏิกิริยาการสังเคราะห์ 2-aminobenzaldehyde

นำสารตั้งต้น 2-nitrobenzaldehyde และผลผลิตที่ได้ คือ 2-aminobenzaldehyde จากปฏิกิริยาการสังเคราะห์ 2-aminobenzaldehyde ในการทดลองที่ 2.4 มาวิเคราะห์องค์ประกอบโดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี มีสภาวะที่ใช้เหมือนการทดลองที่ 2.3

2.6 ปฏิกิริยาระหว่างสาร 2-acetyl-1-pyrroline และ 2-aminobenzaldehyde วิเคราะห์ด้วยเทคนิคยูวีวิชีเบิลสเปกโตรโฟโตเมตรี

2.6.1 เตรียมสารสังเคราะห์ 2-acetyl-1-pyrroline 250 ppm ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.10 โมลต่อลิตร

ปีเปตสารสังเคราะห์ 2-acetyl-1-pyrroline ในตัวทำละลายเบนซีน จากการสังเคราะห์ 2-acetyl-1-pyrroline ในการทดลองที่ 2.2 มา 3.28 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วทำการปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลายเบนซีนจนครบขีดปริมาตร จากนั้นนำมาสกัด 2-acetyl-1-pyrroline ออกจากชั้นตัวทำละลายเบนซีนด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.10 โมลต่อลิตร จำนวนสองครั้ง ครั้งละ 125.00 มิลลิลิตร ได้สารมาตรฐาน 2-acetyl-1-pyrroline 250 ppm (ดูวิธีการคำนวณในภาคผนวก)

2.6.2 เตรียม 2-aminobenzaldehyde 2500 ppm ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.10 โมลต่อลิตร

ชั่ง 2-aminobenzaldehyde ที่ได้จากการสังเคราะห์ 2-aminobenzaldehyde ในการทดลองที่ 2.4 มา 0.6250 กรัม ใส่ในขวดวัดปริมาตร 250 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.10 โมลต่อลิตร จนครบขีดปริมาตร จะได้สารมาตรฐาน 2-aminobenzaldehyde 2500 ppm (ดูวิธีการคำนวณในภาคผนวก)

2.6.3 ปฏิกริยาระหว่างสารสังเคราะห์ 2-acetyl-1-pyrroline และ 2-aminobenzaldehyde

นำสารสังเคราะห์ 2-acetyl-1-pyrroline 250 ppm ที่เตรียมได้ในการทดลองที่ 2.6.1 มา 1.00 มิลลิลิตร และ 2-aminobenzaldehyde 2500 ppm ที่เตรียมได้ในการทดลองที่ 2.6.2 มา 1.00 มิลลิลิตร ผสมกัน เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.10 โมลต่อลิตรจนมีปริมาตรรวม 3.00 มิลลิลิตร คนสารละลายให้เข้ากัน นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส สังเกตสีเหลืองของสารละลายผสมที่เกิดขึ้น นำไปวัดการดูดกลืนแสงยูวีและวิชิเบลโดยใช้เทคนิคยูวีวิชิเบลสเป็คโตรโฟโตเมตรี

2.6.4 ปฏิกริยาระหว่างสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ในสารสกัดจากเมล็ดข้าว และ 2-aminobenzaldehyde

ในการทดลองใช้ตัวอย่างข้าวกล้องพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (ก.พ.ส) มาบดให้ละเอียดเป็นผงด้วยเครื่องบดไฟฟ้า บรรจุผงเมล็ดข้าวน้ำหนัก 10.00 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.10 โมลต่อลิตร ที่มี 2-aminobenzaldehyde 2500 ppm ปริมาตร 30 มิลลิลิตร คนอย่างสม่ำเสมอด้วยเครื่องคนแม่เหล็กไฟฟ้า เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นกรองและนำสารละลายที่ได้มาหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง เพื่อกำจัดอนุภาคของตะกอนจนได้สารละลายใส แล้วนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 °C นำไปวัดการดูดกลืนแสงยูวีและวิชิเบลโดยใช้เทคนิคยูวีวิชิเบลสเป็คโตรโฟโตเมตรี

2.7 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารสังเคราะห์ 2-acetyl-1-pyrroline และ 2-aminobenzaldehyde

ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารสังเคราะห์ 2-acetyl-1-pyrroline กับ 2-aminobenzaldehyde ได้ทำการทดลองดังนี้

2.7.1 การศึกษาผลของความเข้มข้นของสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้เป็นตัวทำละลาย

เตรียมสารสังเคราะห์ 2-acetyl-1-pyrroline 250 ppm และ 2-aminobenzaldehyde 2500 ppm ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้นต่างๆ กันดังนี้ คือ 0.01, 0.10, 1.0 และ 5.0 โมลต่อลิตร ผสมสารละลายทั้งสองในแต่ละความเข้มข้นในอัตราส่วน 1:1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกในแต่ละความเข้มข้นจนมีปริมาตรรวม 3.00 มิลลิลิตร คนสารละลายให้เข้ากัน จากนั้นนำสารละลายผสมไปวัดการดูดกลืนแสง โดยใช้เทคนิคยูวีวิซibelสเปคโตรโฟโตเมตริกที่ความยาวคลื่น 432 นาโนเมตร ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

2.7.2 การศึกษาระยะเวลาของการดำเนินไปของปฏิกิริยา

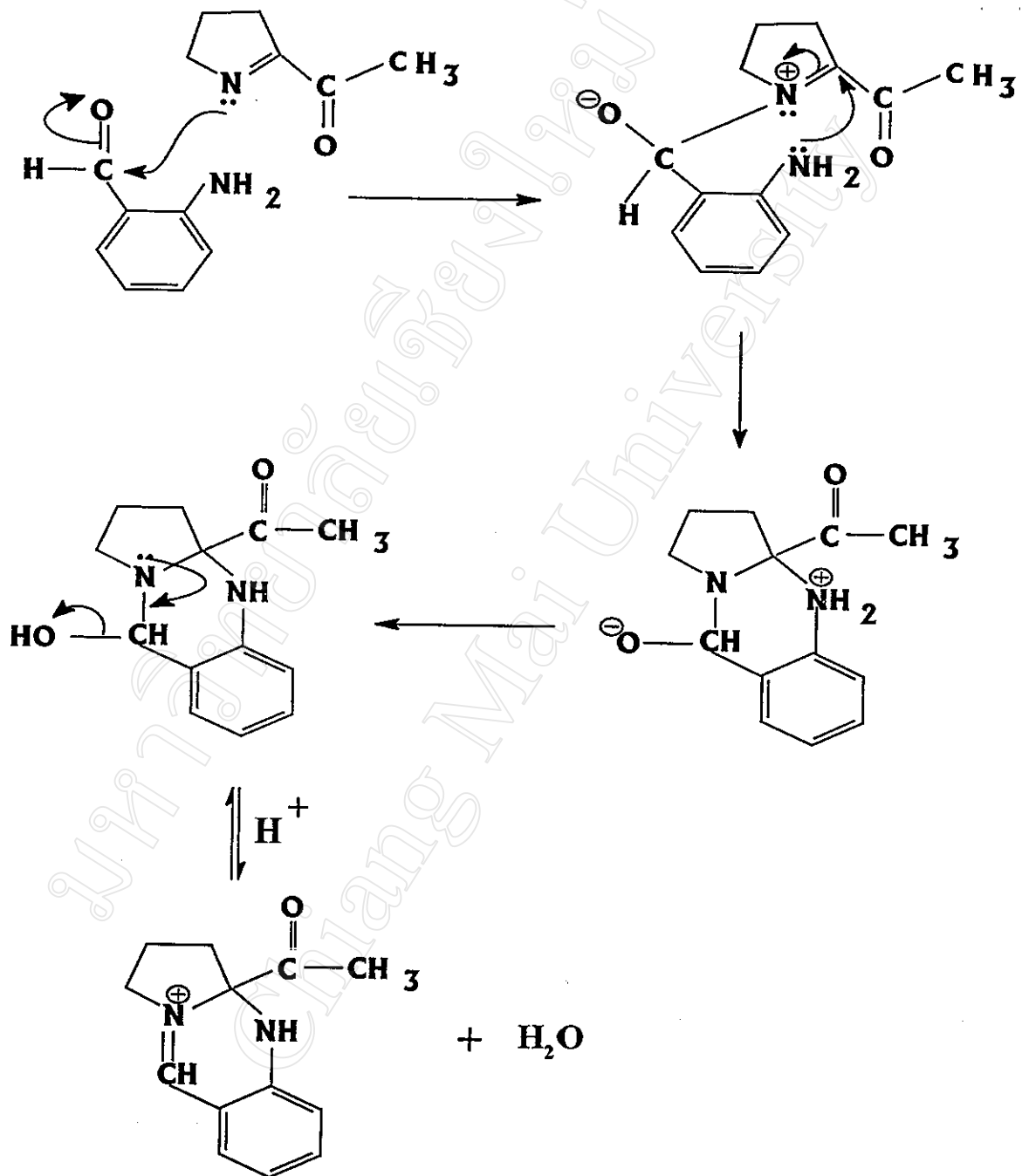
เตรียมสารสังเคราะห์ 2-acetyl-1-pyrroline 250 ppm และ 2-aminobenzaldehyde 2500 ppm ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.10 โมลต่อลิตร ผสมสารละลายทั้งสองเข้าด้วยกันในอัตราส่วน 1:1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.10 โมลต่อลิตร จนมีปริมาตรรวม 3.00 มิลลิลิตร คนสารละลายให้เข้ากัน ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นนำสารละลายผสมไปวัดการดูดกลืนแสงด้วยเทคนิคยูวีวิซibelสเปคโตรโฟโตเมตริกที่ความยาวคลื่น 432 นาโนเมตร ทุกๆ 6 ชั่วโมง รวมเป็นเวลา 66 ชั่วโมง

2.7.3 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารสังเคราะห์ 2-acetyl-1-pyrroline และ 2-aminobenzaldehyde

เตรียมสารละลายผสมเหมือนในหัวข้อ 2.7.2 จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 40, 60, 80 และ 100 องศาเซลเซียส โดยแต่ละอุณหภูมิทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นนำสารละลายผสมไปวัดการดูดกลืนแสงด้วยเทคนิคยูวีวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมตรีที่ความยาวคลื่น 432 นาโนเมตร ทุกๆ 30 นาที รวมเป็นเวลา 6 ชั่วโมง

2.8 การพิสูจน์โครงสร้างของผลผลิตจากปฏิกิริยาระหว่างสารสังเคราะห์ 2-acetyl-1-pyrroline และ 2-aminobenzaldehyde

ในการทดลองนี้ได้นำสารสังเคราะห์ 2-acetyl-1-pyrroline ทำปฏิกิริยากับ 2-aminobenzaldehyde โดยมีสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.10 โมลต่อลิตร เป็นตัวทำละลาย จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ให้ผลผลิตที่มีสีเหลือง คาดว่ากลไกการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารสังเคราะห์ 2-acetyl-1-pyrroline และ 2-aminobenzaldehyde ได้ผลผลิตที่มีสีเหลืองเป็นดังรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 กลไกการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารตั้งเคราะห์ 2-acetyl-1-pyrroline และ 2-aminobenzaldehyde

เนื่องจากผลผลิตที่เกิดขึ้นมีสีเหลือง และอยู่ในสภาพไอออนในสารละลาย ดังนั้นการพิสูจน์โครงสร้างของผลผลิตที่เกิดขึ้น จึงใช้เทคนิคลิวคโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรีที่มีแหล่งกำเนิดไอออนแบบอิเล็กโตรสเปรย์ไอออนไนเซชัน (electrospray ionisation : ESI) และใช้สภาวะในการทดลองดังนี้

เครื่องลิวคโครมาโทกราฟี

อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่	0.50	มิลลิลิตรต่อนาที
เฟสเคลื่อนที่	เมทานอลและน้ำ ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร	
ปริมาตรที่ฉีด	20	ไมโครลิตร
คอลัมน์		
ชนิดของคอลัมน์	C ₁₈	
ความยาวของคอลัมน์	25.0	เซนติเมตร
ขนาดของอนุภาคที่บรรจุ	5.0	ไมครอน

เครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์

แบบของการสแกนมวลต่อประจุ	สแกนทุกมวลต่อประจุในช่วงมวลต่อประจุ 100-300 amu	
ชนิดของไอออนที่วิเคราะห์	ไอออนบวก	
อุณหภูมิของควอดรูโพล	100	องศาเซลเซียส
การเกิดเป็นไอออน		
วิธีการผลิตไอออน	electrospray ionisation	
ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่แฟร็กเมนเตอร์	100	โวลท์
ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่คาปิลลารี	3000	โวลท์
อัตราการไหลของ แก๊สอบแห้ง	10	ลิตรต่อนาที
ความดันที่เนบิวไลเซอร์	40	พีเอสไอ
อุณหภูมิของแก๊สอบแห้ง	300	องศาเซลเซียส

2.9 การศึกษาผลของความต่างศักย์ไฟฟ้าที่แฟรกเมนเตอร์ต่อรูปแบบการเกิดเป็นไอออนของผลผลิตจากปฏิกิริยาระหว่างสารสังเคราะห์ 2-acetyl-1-pyrroline และ 2-aminobenzaldehyde

นำผลผลิตจากปฏิกิริยาระหว่างสารสังเคราะห์ 2-acetyl-1-pyrroline 250 ppm และ 2-aminobenzaldehyde 2500 ppm ในการทดลองที่ 2.6.3 ไปวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคฟลูออเรสเซนซ์อิเล็กโตรสเปรย์ไอออนไนเซชันแมสสเปกโตรเมตรี (flow injection ionisation-electrospray ionisation-mass spectrometry : FI-ESI-MS) โดยมีแหล่งกำเนิดไอออนเป็นแบบอิเล็กโตรสเปรย์ไอออนไนเซชัน เพื่อหาความต่างศักย์ไฟฟ้าที่แฟรกเมนเตอร์ที่เหมาะสมในการแตกตัวเป็นไอออนของผลผลิต โดยเปลี่ยนค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่แฟรกเมนเตอร์ตั้งแต่ 60-150 โวลต์ มีรายละเอียดของการทดลองดังนี้

เครื่องลิวคิโดโครมาโทกราฟี

อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่	0.50	มิลลิลิตรต่อนาที
เฟสเคลื่อนที่	เมธานอลและน้ำ ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร	
ปริมาตรที่ฉีด	20	ไมโครลิตร

เครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์

แบบของการสแกนมวลต่อประจุ	สแกนทุกมวลต่อประจุในช่วงมวลต่อประจุ 100-300 amu	
ชนิดของไอออนที่วิเคราะห์	ไอออนบวก	
อุณหภูมิของควอดรูโพล	100	องศาเซลเซียส
การเกิดเป็นไอออน		
วิธีการผลิตไอออน	electrospray ionisation	
ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่คาปิลลารี	3000	โวลต์
อัตราการไหลของ แก๊สอบแห้ง	10	ลิตรต่อนาที
ความดันที่เนบิวไลเซอร์	40	พีเอสไอ
อุณหภูมิของแก๊สอบแห้ง	350	องศาเซลเซียส

เมื่อได้โครมาโทแกรม ทำการเปรียบเทียบข้อมูลแมสสเปกตรัม และพิจารณาการแตกตัวเป็นไอออนของผลผลิตจากปฏิกิริยาระหว่างสารสังเคราะห์ 2-acetyl-1-pyrroline และ 2-aminobenzaldehyde เพื่อเลือกค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่แฟรกเมนเตอร์ที่เหมาะสมต่อไป

2.10 การหาสถานะที่เหมาะสมต่อปริมาณการเกิดเป็นไอออนโดยอิเล็กโตรสเปรย์ของผลผลิตจากปฏิกิริยาระหว่างสารสังเคราะห์ 2-acetyl-1-pyrroline และ 2-aminobenzaldehyde โดยใช้เทคนิคฟลอสชันเจกชันอิเล็กโตรสเปรย์ไอออนในเซชันแมสสเปกโตรเมตรี (flow injection-electrospray ionisation-mass spectrometry : FI-ESI-MS)

2.10.1 การศึกษาผลของความต่างศักย์ไฟฟ้าที่แฟรกเมนเตอร์

นำผลผลิตจากปฏิกิริยาระหว่างสารสังเคราะห์ 2-acetyl-1-pyrroline 250 ppm และ 2-aminobenzaldehyde 2500 ppm ในการทดลองที่ 2.6.3 ไปวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค FI-ESI-MS เพื่อหาสถานะต่างๆ ที่มีผลต่อปริมาณการเกิดเป็นไอออนและการแตกตัวเป็นไอออนโดยอิเล็กโตรสเปรย์ โดยเปลี่ยนค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่แฟรกเมนเตอร์เป็น 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140 และ 150 โวลต์ และใช้สภาวะการทดลองดังนี้ คือ

เครื่องลิวิดโครมาโทกราฟี

อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่	0.50	มิลลิลิตรต่อนาที
เฟสเคลื่อนที่	เมธานอลและน้ำ ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร	
ปริมาตรที่ฉีด	20	ไมโครลิตร

เครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์

แบบของการสแกนมวลต่อประจุ	เก็บที่มวลต่อประจุเท่ากับ 215 amu
ชนิดของไอออนที่วิเคราะห์	ไอออนบวก
อุณหภูมิของควอดรูโพล	100 องศาเซลเซียส

การเกิดเป็นไอออน

วิธีการผลิตไอออน

electrospray ionisation

ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่คาปิลลารี

3000 โวลต์

อัตราการไหลของ แก๊สอบแห้ง

10 ลิตรต่อนาที

ความดันที่เนบิวไลเซอร์

40 พีเอสไอ

อุณหภูมิของแก๊สอบแห้ง

350 องศาเซลเซียส

2.10.2 การศึกษาผลของความต่างศักย์ไฟฟ้าที่คาปิลลารี

ทำการทดลองเหมือนกับการทดลองที่ 2.10.1 โดยเปลี่ยนค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่คาปิลลารี เป็น 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500 และ 5000 โวลต์ และใช้ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่แฟรกเมนเตอร์เป็น 80 โวลต์

2.10.3 การศึกษาผลของอัตราการไหลของแก๊สอบแห้ง

ทำการทดลองเหมือนกับการทดลองที่ 2.10.1 โดยเปลี่ยนอัตราการไหลของแก๊สอบแห้งเป็น 5, 6, 7, 8, 9, 10 และ 11 ลิตรต่อนาที ส่วนพารามิเตอร์อื่นมีค่าคงที่ คือ ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่แฟรกเมนเตอร์เป็น 80 โวลต์ และค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่คาปิลลารีเป็น 1500 โวลต์

2.10.4 การศึกษาผลของความดันที่เนบิวไลเซอร์

ทำการทดลองเหมือนกับการทดลองที่ 2.10.1 โดยเปลี่ยนความดันที่เนบิวไลเซอร์เป็น 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 และ 55 พีเอสไอ ส่วนพารามิเตอร์อื่นมีค่าคงที่ คือ ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่แฟรกเมนเตอร์เป็น 80 โวลต์ ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่คาปิลลารีเป็น 1500 โวลต์ และอัตราการไหลของแก๊สอบแห้งเป็น 8 ลิตรต่อนาที

2.10.5 การศึกษาผลของอุณหภูมิของแก๊สสอบแห้ง

ทำการทดลองเหมือนกับการทดลองที่ 2.10.1 โดยเปลี่ยนอุณหภูมิของแก๊สสอบแห้งเป็น 200, 225, 250, 275, 300, 325 และ 350 องศาเซลเซียส ส่วนพารามิเตอร์อื่นมีค่าคงที่ คือ ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่แฟรกเมนเตอร์เป็น 80 โวลต์ ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่คาปิลลารีเป็น 1500 โวลต์ อัตราการไหลของแก๊สสอบแห้งเป็น 8 ลิตรต่อนาที และความดันที่เนบิวไลเซอร์เป็น 40 พิเอสไอ

2.11 การวิเคราะห์ปริมาณสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ในสารสกัดจากเมล็ดข้าวโดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยากับ 2-aminobenzaldehyde ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.10 โมลต่อลิตร

การวิเคราะห์ปริมาณสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ในสารสกัดจากเมล็ดข้าวโดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยาเคมีกับ 2-aminobenzaldehyde ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.10 โมลต่อลิตรนั้นจะทำโดยใช้เทคนิค internal standardization method ซึ่งมีการสังเคราะห์สารมาตรฐาน 2-acetyl-1-pyrroline ขึ้นและใช้ 2-acetylpyrrole เป็นสารมาตรฐานภายใน

เตรียมสารละลายผสมมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโฟลอินเจกชันอิเล็กโตรสเปรย์ไอออนไนเซชันแมสสเป็คโตรเมตรี จากนั้นสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน 2-acetyl-1-pyrroline กับอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของผลผลิตจากปฏิกิริยาระหว่างสารสังเคราะห์ 2-acetyl-1-pyrroline และ 2-aminobenzaldehyde ต่อสารมาตรฐานภายใน ความเข้มข้นของสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ในสารสกัดข้าว จำนวนได้จากการนำผลของอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ที่มีในสารสกัดต่อสารมาตรฐานภายในมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ได้

2.11.1 การทำกราฟมาตรฐาน

1) การเตรียมสารละลายมาตรฐาน 2-acetyl-1-pyrroline ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.10 โมลต่อลิตร

ปีเปตสารตั้งแรก 2-acetyl-1-pyrroline ในตัวทำละลายเบนซีนจากการสังเคราะห์ในหัวข้อ 2.2 มา 131.1 ไมโครลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตร 25 มิลลิลิตร แล้วทำการปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลายเบนซีนจนครบขีดวัดปริมาตร จากนั้นนำมาสกัด 2-acetyl-1-pyrroline ออกจากชั้นตัวทำละลายเบนซีนด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.10 โมลต่อลิตร จำนวนสองครั้ง ครั้งละ 50.00 มิลลิลิตร จะได้สารมาตรฐาน 2-acetyl-1-pyrroline เข้มข้น 25 ppm (ดูวิธีการคำนวณในภาคผนวก)

2) การเตรียมสารมาตรฐานภายใน 2-acetylpyrrole ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.10 โมลต่อลิตร

ชั่งสารมาตรฐานภายใน 2-acetylpyrrole 0.0500 กรัม ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 500 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรจนถึงขีดวัดปริมาตรด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.10 โมลต่อลิตร จะได้สารมาตรฐานภายในเข้มข้น 100 ppm (ดูวิธีการคำนวณในภาคผนวก)

3) การเตรียม 2-aminobenzaldehyde 10 ppm ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.10 โมลต่อลิตร

ปีเปตสารละลาย 2-aminobenzaldehyde 2500 ppm มา 2.00 มิลลิลิตรจากที่เตรียมได้ในการทดลองที่ 2.6.2 ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 500 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรจนถึงขีดวัดปริมาตรด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.10 โมลต่อลิตร จะได้ 2-aminobenzaldehyde เข้มข้น 10 ppm (ดูวิธีการคำนวณในภาคผนวก)

4) การเตรียมสารละลายผสมมาตรฐาน

ขวดที่ 1 ปิเปตสารละลายมาตรฐาน 2-acetyl-1-pyrroline จากข้อ 1) มา 20.0 ไมโครลิตร
 ขวดที่ 2 ปิเปตสารละลายมาตรฐาน 2-acetyl-1-pyrroline จากข้อ 1) มา 40.0 ไมโครลิตร
 ขวดที่ 3 ปิเปตสารละลายมาตรฐาน 2-acetyl-1-pyrroline จากข้อ 1) มา 80.0 ไมโครลิตร
 ขวดที่ 4 ปิเปตสารละลายมาตรฐาน 2-acetyl-1-pyrroline จากข้อ 1) มา 120.0 ไมโครลิตร
 ขวดที่ 5 ปิเปตสารละลายมาตรฐาน 2-acetyl-1-pyrroline จากข้อ 1) มา 160.0 ไมโครลิตร

ทุกขวดเติมสารละลายมาตรฐานภายใน 2-acetylpyrrole จากข้อ 2) ปริมาตร 25.0 ไมโครลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.10 โมลต่อลิตร ที่มี 2-aminobenzaldehyde 10 ppm ให้ได้ 10.00 มิลลิลิตร เขย่าสารละลายมาตรฐานผสม แล้วนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 °C กรองสารละลายผสมมาตรฐานด้วยเมมเบรน 0.45 ไมครอน จึงนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโฟลอินเจกชันอิเล็กโตรสเปรย์ไอออนไนเซชันแมสสเปกโตรเมตรี โดยใช้สภาวะการทดลองที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองในข้อ 2.10 ดังนี้

เครื่องลิกวิดโครมาโทกราฟี

อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่	0.50	มิลลิลิตรต่อนาที
เฟสเคลื่อนที่	เมธานอลและน้ำในอัตราส่วน 1 : 1 โดยปริมาตร	
ปริมาตรที่ฉีด	20	ไมโครลิตร

เครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์

แบบของการสแกนมวลต่อประจุ	เก็บที่มวลต่อประจุเท่ากับ 215 amu สำหรับผลผลิต และ 110 amu สำหรับสารมาตรฐานภายใน	
ชนิดของไอออนที่วิเคราะห์	ไอออนบวก	
อุณหภูมิของควอดรูโพล	100	องศาเซลเซียส

การเกิดเป็นไอออน

วิธีการผลิตไอออน	electrospray ionisation	
ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่แฟร็กเมนต์เตอร์	80	โวลท์
ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่คาปิลลารี	1500	โวลท์
อัตราการไหลของ แก๊สอบแห้ง	8	ลิตรต่อนาที
ความดันที่เนบิวไลเซอร์	40	พีเอสไอ
อุณหภูมิของแก๊สอบแห้ง	350	องศาเซลเซียส

จากโครมาโทแกรมของสารละลายผสมมาตรฐาน หาแมสโครมาโทแกรมของไอออนที่มวลต่อประจุเท่ากับ 215 ซึ่งเป็นน้ำหนักโมเลกุลของไอออนของผลผลิตที่มีสี และที่มวลต่อประจุเท่ากับ 110 ซึ่งเป็นน้ำหนักโมเลกุลของไอออนบวกที่เกิดจากการรับโปรตอน (protonated molecular ion) ของสารมาตรฐานภายใน 2-acetylpyrrole จะได้แมสโครมาโทแกรมของไอออนที่มวลต่อประจุเท่ากับ 215 และที่มวลต่อประจุเท่ากับ 110 จากนั้นหาพื้นที่ใต้พีค และคำนวณหาอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของผลผลิตจากปฏิกิริยาระหว่างสารสังเคราะห์ 2-acetyl-1-pyrroline และ 2-aminobenzaldehyde ต่อสารมาตรฐานภายใน 2-acetylpyrrole ดังสมการ

$$\text{อัตราส่วนพื้นที่ใต้พีค} = \frac{\text{พื้นที่ใต้พีคของผลผลิตจากปฏิกิริยาระหว่างสารสังเคราะห์ 2-acetyl-1-pyrroline และ 2-aminobenzaldehyde}}{\text{พื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐานภายใน 2-acetylpyrrole}}$$

นำผลที่ได้มาเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน 2-acetyl-1-pyrroline กับอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของผลผลิตจากปฏิกิริยาระหว่างสารสังเคราะห์ 2-acetyl-1-pyrroline และ 2-aminobenzaldehyde ต่อสารมาตรฐานภายใน 2-acetylpyrrole นำไปใช้ในการหาปริมาณสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ในสารสกัดจากเมล็ดข้าวตอกต่อไป

การทดลองตอนที่ 2

การตรวจวัดปริมาณสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ในเมล็ดข้าวโดยใช้เทคนิคฟลูออโรอิเล็กชัน อิเล็กโตรสเปรย์ไอออไนเซชันแมสสเปกโตรเมตรี (flow injection-electrospray ionisation-mass spectrometry)

2.12 เครื่องมือ วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และวัตถุดิบที่ใช้

2.12.1 เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์

- 1) เครื่องลิกวิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์ (Liquid Chromatograph-Mass Spectrometer : LC-MS) รุ่น 1100 series ผลิตโดยบริษัท Hewlett Packard
- 2) เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์ (Gas Chromatograph-Mass Spectrometer : GC-MS) รุ่น 6890 ผลิตโดยบริษัท Hewlett Packard
- 3) เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatograph : GC) รุ่น 5890 series II plus ผลิตโดยบริษัท Hewlett Packard
- 4) คอลัมน์ DB-1 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร ยาว 30 เมตร ขนาดของ film thickness 0.25 ไมโครเมตร ผลิตโดยบริษัท J & W Scientific
- 5) คอลัมน์ HP-5MS ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร ยาว 30 เมตร ขนาดของ film thickness 0.25 ไมโครเมตร ผลิตโดยบริษัท Hewlett Packard
- 6) เข็มฉีดยา (syringe) ขนาด 10.0 ไมโครลิตร
- 7) เครื่องหมุนระเหยความดันต่ำ (vacuum rotary evaporator) รุ่น B-169 ผลิตโดยบริษัท Buchi
- 8) เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) model D-78532 Tuttlingen ผลิตโดยบริษัท Hettich
- 9) เครื่องกวนแม่เหล็ก (magnetic stirrer) และแท่งแม่เหล็ก (magnetic bar)

- 10) กระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 และ phase separator ผลิตโดยบริษัท Whatman
- 11) กรวยกรอง (glass funnel)
- 12) กรวยแยก (separatory funnel)
- 13) เมมเบรน ขนาด 0.45 ไมครอน ผลิตโดยบริษัท Sartorius
- 14) เครื่องบดไฟฟ้า ผลิตโดยบริษัท Sartorius
- 15) ลูกโป่งยาง ชนิดบรรจุก๊าซฮีเลียม
- 16) เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ผลิตโดยบริษัท Sartorius
- 17) Autopipet ขนาด 20-100 ไมโครลิตร ผลิตโดยบริษัท BRAND

2.12.2 สารเคมี

- 1) 2-Acetylpyrrole purum > 98 % ผลิตโดย บริษัท Fluka
- 2) 5% Rhodium on activated alumina (5% Rh on Al) AR grade ผลิตโดยบริษัท Fluka
- 3) 2,4,6-Trimethylpyridine AR grade 99 % ผลิตโดยบริษัท Merck
- 4) Sodium carbonate AR grade 99.5 % ผลิตโดยบริษัท Merck
- 5) Silver nitrate AR grade 99.8 % ผลิตโดยบริษัท BDH
- 6) Sodium sulfate anhydrous AR grade 99.5 % ผลิตโดยบริษัท Fluka
- 7) Celite ผลิตโดยบริษัท Fluka
- 8) Methanol AR grade 99 % ผลิตโดยบริษัท J.T. Baker
- 9) Methanol HPLC grade 99.9 % ผลิตโดยบริษัท BDH
- 10) Dichloromethane comercial grade ผลิตโดยบริษัท ICI
- 11) Dichloromethane AR grade ≥ 99.5 % ผลิตโดยบริษัท CARLO ERBA
- 12) Dichloromethane HPLC grade 99.9 % ผลิตโดยบริษัท LAB-SCAN
- 13) Benzene AR grade 99.7 % ผลิตโดยบริษัท LAB-SCAN
- 14) Hydrochloric acid assay 37.0 % ผลิตโดยบริษัท BDH
- 15) Sodium hydroxide assay comercial grade 98.0 % ผลิตโดยบริษัท EKA
- 16) Hydrogen gas HP grade บริษัท ลานนา เชียงใหม่

17) Nitrogen gas HP grade บริษัท ถานนา เชียงใหม่

2.12.3 วัตถุดิบที่ใช้

- 1) เมล็ดข้าวกล้องพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 จากแปลงเพาะปลูกคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เก็บเกี่ยวเดือนพฤศจิกายน 2542
- 2) เมล็ดข้าวกล้องพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 (ก.พ.ส.) จากภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน เก็บเกี่ยวเดือนธันวาคม 2542
- 3) เมล็ดข้าวสารพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 (ก.พ.ส.) จากภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน เก็บเกี่ยวเดือนธันวาคม 2543
- 4) เมล็ดข้าวกล้องพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 จากแปลงเพาะปลูก ต. บ้านไผ่ อ. ราชบุรี จ. ราชบุรี
- 5) เมล็ดข้าวกล้องพันธุ์ กข 7 จากคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- 6) เมล็ดข้าวเหนียวแพร่ จากคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- 7) เมล็ดข้าวเปลือกพันธุ์นางมลิศ 4 จากศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลก จังหวัดพิษณุโลก เก็บเกี่ยวเดือนพฤศจิกายน 2541

2.13 การวิเคราะห์เชิงคุณภาพขององค์ประกอบของสารสกัดจากเมล็ดข้าวโดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี

2.13.1 การสกัดสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline จากเมล็ดข้าวด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.10 โมลต่อลิตร และวิเคราะห์องค์ประกอบด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี ที่มีแหล่งกำเนิดไอออนแบบ electron impact ionisation

วิธีการสกัดสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline จากเมล็ดข้าวโดยการสกัดด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.10 โมลต่อลิตร แสดงดังรูป 2.6 โดยนำเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 มาบดให้ละเอียดเป็นผงด้วยเครื่องบดไฟฟ้า แล้วบรรจุผงข้าวน้ำหนัก 25 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.10 โมลต่อลิตร ปริมาตร 80 มิลลิลิตร คนอย่างสม่ำเสมอด้วยเครื่องคนแม่เหล็กไฟฟ้า เป็นเวลา 45 นาที แล้วกรอง จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง เพื่อกำจัดอนุภาคของตะกอนจนได้สารละลายใส แล้วนำสารละลายปริมาตร 80 มิลลิลิตร มาทำให้เป็นเบสด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 5.0 โมลต่อลิตร และสกัดต่อทันทีด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ไดคลอโรมีเทน ปริมาตร 200 มิลลิลิตร สองครั้ง แยกเก็บชั้นของตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนมารวมกัน เติม sodium sulfate anhydrous เพื่อกำจัดน้ำ และกรองผ่านกระดาษกรองเพื่อกำจัด sodium sulfate anhydrous ทำการทดลองซ้ำ 8 ครั้ง นำสารละลายมารวมกันและนำมาระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องหมุนระเหยความดันต่ำที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จนเหลือปริมาตรประมาณ 2.0 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายบรรจุในขวดเก็บสารตัวอย่างโดยไม่ปิดฝาและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเหลือปริมาตรประมาณ 0.2 มิลลิลิตร จึงนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบในสารสกัดด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี ที่มีสภาวะการทดลองเป็นดังนี้

เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ

ตัวนำสารเข้า

อุณหภูมิของตัวนำสารเข้า	230	องศาเซลเซียส
Mode	Split	
Split ratio	50 : 1	

คอลัมน์

คอลัมน์

Capillary Column HP-5MS
(5%)-Diphenyl (95%)-Dimethyl
polysiloxane

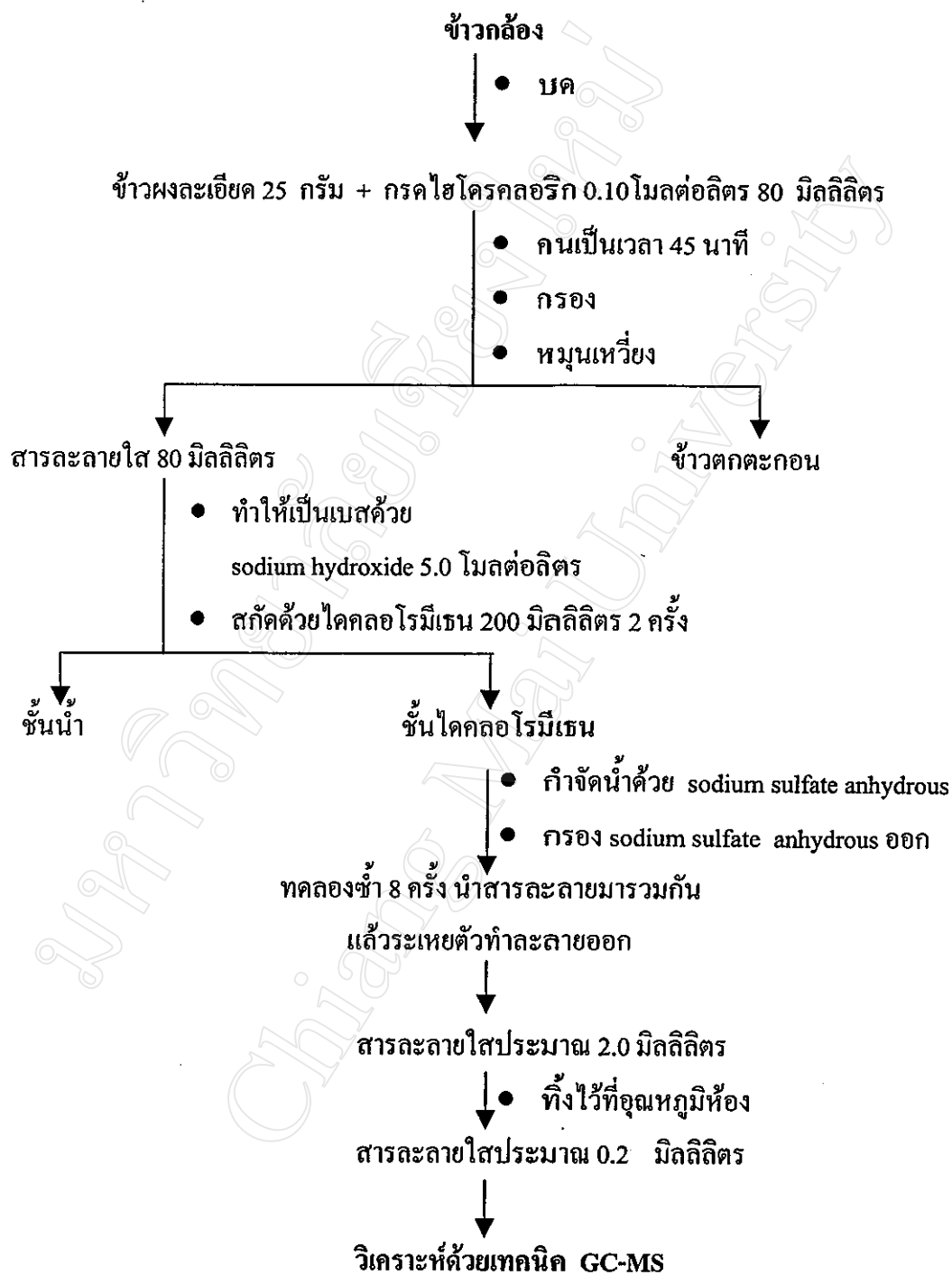
ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง	250 ไมโครเมตร
ความยาว	30 เมตร
เคลือบด้วยเฟสคงที่หนา	0.25 ไมโครเมตร
อัตราการไหลของแก๊สฮีเลียม	1.3 มิลลิลิตรต่อนาที

โปรแกรมอุณหภูมิของคอลัมน์

อุณหภูมิเริ่มต้น	40 องศาเซลเซียส
คงที่ที่อุณหภูมิเริ่มต้น	5 นาที
อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ	3 องศาเซลเซียสต่อนาที
อุณหภูมิสุดท้าย	250 องศาเซลเซียส
คงที่ที่อุณหภูมิสุดท้าย	15 นาที
ปริมาตรสารที่ฉีด	1 ไมโครลิตร

เครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์

แบบของการสแกนมวลต่อประจุ	สแกนทุกมวลต่อประจุที่กำหนด ในช่วงมวลต่อประจุ 29-550 amu
อุณหภูมิของส่วนเชื่อมต่อ	320 องศาเซลเซียส
วิธีการผลิตไอออน	electron impact ionisation (EI)
พลังงานเฉื่อยของอิเล็กตรอน	70 อิเล็กตรอนโวลต์
อุณหภูมิของตัวผลิตไอออน	250 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิของควอดรูโพล	150 องศาเซลเซียส



รูปที่ 2.6 แผนภาพการสกัดสารหอมจากเมล็ดข้าวโดยวิธีการสกัดด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.1 โมลต่อลิตร วิเคราะห์โดยใช้เทคนิค GC-MS

2.13.2 การสกัดสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline จากเมล็ดข้าวด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.10 โมลต่อลิตร และวิเคราะห์องค์ประกอบด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี ที่มีแหล่งกำเนิดไอออนแบบ chemical ionisation

วิธีการสกัดสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline จากเมล็ดข้าวด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.10 โมลต่อลิตร ได้ทำการทดลองเหมือนกับการทดลองที่ 2.13.1 แต่มีสภาวะที่ใช้ในการทดลองดังนี้

เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

ตัวนำสารเข้า

อุณหภูมิของตัวนำสารเข้า 230 องศาเซลเซียส

Mode Splitless

คอลัมน์

คอลัมน์ Capillary Column HP-5MS
(5%)-Diphenyl (95%)-Dimethyl polysiloxane

ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 250 ไมโครเมตร

ความยาว 30 เมตร

เคลือบด้วยเฟสคงที่ 0.25 ไมโครเมตร

อัตราการไหลของแก๊สฮีเลียม 1.3 มิลลิลิตรต่อนาที

โปรแกรมอุณหภูมิของคอลัมน์

อุณหภูมิเริ่มต้น 40 องศาเซลเซียส

คงที่ที่อุณหภูมิเริ่มต้น 5 นาที

อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 3 องศาเซลเซียสต่อนาที

อุณหภูมิสุดท้าย 250 องศาเซลเซียส

คงที่ที่อุณหภูมิสุดท้าย 15 นาที

ปริมาตรสารที่ฉีด 1 ไมโครลิตร

เครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์

แบบของการสแกนมวลต่อประจุ	สแกนทุกมวลต่อประจุที่กำหนดในช่วงมวลต่อประจุ 60-550 amu
อุณหภูมิของส่วนเชื่อมต่อ	320 องศาเซลเซียส
วิธีการผลิตไอออน	chemical ionisation (CI)
ชนิดของแก๊สรีเอเจนต์	มีเทน
พลังงานเฉลี่ยของอิเล็กตรอน	70 อิเล็กตรอนโวลต์
อุณหภูมิของตัวผลิตไอออน	250 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิของควอดรูโพล	106 องศาเซลเซียส

2.14 การศึกษาผลของความต่างศักย์ไฟฟ้าที่แฟรกเมนเตอร์ต่อรูปแบบการเกิดเป็นไอออนของสารสังเคราะห์ 2-acetyl-1-pyrroline

เนื่องจากความต่างศักย์ไฟฟ้าที่แฟรกเมนเตอร์มีผลมากต่อรูปแบบการแตกตัวเป็นไอออนของสาร จึงได้ทำการทดลองศึกษาผลของความต่างศักย์ที่แฟรกเมนเตอร์ต่อรูปแบบการเกิดเป็นไอออนของสารสังเคราะห์ 2-acetyl-1-pyrroline ดังนี้ คือ

เตรียมสารสังเคราะห์ 2-acetyl-1-pyrroline ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.10 โมลต่อลิตร 20 ppm โดยปีเปตสารสังเคราะห์ 2-acetyl-1-pyrroline ในตัวทำละลายเบนซีน จากการสังเคราะห์ในการทดลองที่ 2.2 มา 105.1 ไมโครลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตร 25 มิลลิลิตร แล้วทำการปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลายเบนซีนจนครบขีดวัดปริมาตร จากนั้นนำมาสกัด 2-acetyl-1-pyrroline ออกจากชั้นตัวทำละลายเบนซีนด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.10 โมลต่อลิตร ปริมาตร 50.00 สองครั้ง จะได้สารมาตรฐาน 2-acetyl-1-pyrroline 20 ppm (ดูวิธีการคำนวณในภาคผนวก)

นำสารสังเคราะห์ 2-acetyl-1-pyrroline 20 ppm ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.10 โมลต่อลิตร ไปวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคฟลูออโรสแกนนิ่งอิเล็กโตรสเปรย์ไอออนในเซชันแมสสเปกโตรเมตรี โดยเปลี่ยนค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่แฟร็กเมนต์ตั้งแต่ 60-150 โวลต์ และมีสภาวะที่ใช้ในการทดลองดังนี้

เครื่องลิวคโครมาโทกราฟี

อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่	0.50	มิลลิลิตรต่อนาที
เฟสเคลื่อนที่	เมธานอลและน้ำ ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร	
ปริมาตรที่ฉีด	20	ไมโครลิตร

เครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์

แบบของการสแกนมวลต่อประจุ	สแกนทุกมวลต่อประจุในช่วงมวลต่อประจุ 100-200 amu	
ชนิดของไอออนที่วิเคราะห์	ไอออนบวก	
อุณหภูมิของควอดรูโพล	100	องศาเซลเซียส
การเกิดเป็นไอออน	electrospray ionisation	
วิธีการผลิตไอออน	electrospray ionisation	
ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่คาบิลลารี	3000	โวลต์
อัตราการไหลของ แก๊สอบแห้ง	10	ลิตรต่อนาที
ความดันที่เนบิวไลเซอร์	40	พีเอสไอ
อุณหภูมิของแก๊สอบแห้ง	350	องศาเซลเซียส

เมื่อได้แมสโครมาโทแกรม ทำการเปรียบเทียบข้อมูลแมสสเปกตรัม และพิจารณาการแตกตัวเป็นไอออนของสารสังเคราะห์ 2-acetyl-1-pyrroline เพื่อเลือกค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่แฟร็กเมนต์ที่เหมาะสมต่อไป

2.15 การหาสถานะที่เหมาะสมต่อปริมาณการเกิดเป็นไอออนโดยอิเล็กโตรสเปรย์ของสารสังเคราะห์ 2-acetyl-1-pyrroline โดยใช้เทคนิคฟลูออโรเจกชันอิเล็กโตรสเปรย์ไอออนในเซชันแมสสเปกโตรเมตรี

เนื่องจากการทำให้สารเกิดเป็นไอออนโดยอิเล็กโตรสเปรย์จะมีพารามิเตอร์ต่างๆ ที่มีผลต่อปริมาณการเกิดเป็นไอออนของสารซึ่งจะมีผลต่อไปถึงสภาพไว (sensitivity) ของการตรวจวัด พารามิเตอร์ต่างๆ เหล่านี้ ได้แก่ ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่แฟรกเมนเตอร์ ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่คาปิลลารี อัตราการไหลของแก๊สอบแห้ง ความดันที่เนบิวไลเซอร์ และอุณหภูมิของแก๊สอบแห้ง ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ศึกษาผลของพารามิเตอร์ต่างๆ ดังนี้ คือ

2.15.1 การศึกษาผลของความต่างศักย์ไฟฟ้าที่แฟรกเมนเตอร์

นำสารสังเคราะห์ 2-acetyl-1-pyrroline 20 ppm ที่เตรียมได้ในการทดลองที่ 2.5 มาวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคฟลูออโรเจกชันอิเล็กโตรสเปรย์ไอออนในเซชันแมสสเปกโตรเมตรี ในการทดลองนี้ได้ทำการทดลองเปลี่ยนค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่แฟรกเมนเตอร์เป็น 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140 และ 150 โวลต์ และมีสถานะที่ใช้การทดลองดังนี้ คือ

เครื่องลิวคิโดโครมาโทกราฟี

อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่คงที่ที่	0.50	มิลลิลิตรต่อนาที
เฟสเคลื่อนที่	เมธานอลและน้ำในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร	
ปริมาตรที่ฉีด	20	ไมโครลิตร

เครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์

แบบของการสแกนมวลต่อประจุ	เก็บที่มวลต่อประจุเท่ากับ 112 amu
ชนิดของไอออนที่วิเคราะห์	ไอออนบวก
อุณหภูมิของควอดรูโพล	100 องศาเซลเซียส

การเกิดเป็นไอออน

วิธีการผลิตไอออน	electrospray ionisation	
ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่คาปิลลารี	3000	โวลท์
อัตราการไหลของ แก๊สสอบแห้ง	10	ลิตรต่อนาที
ความดันที่เนบิวไลเซอร์	40	พีเอสไอ
อุณหภูมิของแก๊สสอบแห้ง	350	องศาเซลเซียส

2.15.2 การศึกษาผลของความต่างศักย์ไฟฟ้าที่คาปิลลารี

ทำการทดลองเหมือนกับการทดลองที่ 2.15.1 โดยเปลี่ยนค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่คาปิลลารีเป็น 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000 และ 4500 โวลท์ และใช้ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่แฟรกเมนเตอร์เป็น 90 โวลท์

2.15.3 การศึกษาผลของอัตราการไหลของแก๊สสอบแห้ง

ทำการทดลองเหมือนกับการทดลองที่ 2.15.1 โดยเปลี่ยนอัตราการไหลของแก๊สสอบแห้งเป็น 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 และ 11 ลิตรต่อนาที ส่วนพารามิเตอร์อื่นมีค่าคงที่ คือ ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่แฟรกเมนเตอร์เป็น 90 โวลท์ และค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่คาปิลลารีเป็น 1000 โวลท์

2.15.4 การศึกษาผลของความดันที่เนบิวไลเซอร์

ทำการทดลองเหมือนกับการทดลองที่ 2.15.1 โดยเปลี่ยนความดันที่เนบิวไลเซอร์เป็น 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 และ 50 พีเอสไอ ส่วนพารามิเตอร์อื่นมีค่าคงที่ คือ ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่แฟรกเมนเตอร์เป็น 90 โวลท์ ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่คาปิลลารีเป็น 1000 โวลท์ และอัตราการไหลของแก๊สสอบแห้งเป็น 10 ลิตรต่อนาที

2.15.5 การศึกษาผลของอุณหภูมิของแก๊สสอบแห้ง

ทำการทดลองเหมือนกับการทดลองที่ 2.15.1 โดยเปลี่ยนอุณหภูมิของแก๊สสอบแห้งเป็น 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325 และ 350 องศาเซลเซียส ส่วนพารามิเตอร์อื่นมีค่าคงที่ คือ ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่แฟรกเมนเตอร์เป็น 90 โวลต์ ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่คาปิลลารีเป็น 1000 โวลต์ อัตราการไหลของแก๊สสอบแห้งเป็น 10 ลิตรต่อนาที และความดันที่เนบิวไลเซอร์เป็น 45 พีเอสไอ

จากการทดลองศึกษาผลของความต่างศักย์ไฟฟ้าที่แฟรกเมนเตอร์ ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่คาปิลลารี อัตราการไหลของแก๊สสอบแห้ง ความดันที่เนบิวไลเซอร์ และอุณหภูมิของแก๊สสอบแห้ง เมื่อได้เมสโครมาโทแกรม ทำการหาพื้นที่ใต้พีค โดยที่พื้นที่ใต้พีคสูงสุดในแต่ละการทดลอง จะเป็นสถานะที่เหมาะสมของการเกิดเป็นไอออนโดยอิเล็กโตรสเปรย์ของสารมาตรฐาน 2-acetyl-1-pyrroline และจะนำผลการทดลองนี้ไปวิเคราะห์หาปริมาณสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ในเมล็ดข้าวต่อไป

2.16 การวิเคราะห์ปริมาณสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ในสารสกัดจากเมล็ดข้าวที่สกัดด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.10 โมลต่อลิตร

การวิเคราะห์ปริมาณสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ในสารสกัดจากเมล็ดข้าวด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.10 โมลต่อลิตรนั้นจะทำได้โดยใช้เทคนิค internal standardization method ซึ่งมีการสังเคราะห์สารมาตรฐาน 2-acetyl-1-pyrroline ขึ้น และใช้ 2,4,6-trimethylpyridine เป็นสารมาตรฐานภายใน

เตรียมสารละลายผสมมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคฟลูออโรเมตริชันอิเล็กโตรสเปรย์ไอออนไนเซชันแมสสเปกโตรเมตริ จากนั้นสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน 2-acetyl-1-pyrroline กับอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐาน 2-acetyl-1-pyrroline ต่อสารมาตรฐานภายใน ความเข้มข้นของสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ในสารสกัดข้าวคำนวณได้จากการนำผลของอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ที่มีในสารสกัดต่อสารมาตรฐานภายในมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ได้

2.16.1 การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐานภายใน 2,4,6-trimethylpyrrodine โดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี

นำสารมาตรฐานภายใน 2,4,6-trimethylpyrrodine ไปวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี และมีสภาวะที่ใช้ในการทดลองเหมือนกับการทดลองที่ 2.3 ในการทดลองตอนที่ 1

2.16.2 การทำกราฟมาตรฐาน

1) การเตรียมสารละลายมาตรฐาน 2-acetyl-1-pyrroline

เตรียมสารมาตรฐาน 2-acetyl-1-pyrroline 25 ppm ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.10 โมลต่อลิตร เหมือนในหัวข้อ 2.11.1 ข้อ 1) ในการทดลองตอนที่ 1

2) การเตรียมสารมาตรฐานภายใน 2,4,6-trimethylpyridine

ปิเปตสารมาตรฐานภายใน 2,4,6-trimethylpyridine มา 27.4 ไมโครลิตร จากขวดสาร 2,4,6-trimethylpyridine ที่มีความหนาแน่น 0.914 กรัมต่อมิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรจนถึงขีดวัดปริมาตรด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.10 โมลต่อลิตร จะได้สารมาตรฐานภายใน 2,4,6-trimethylpyridine 250 ppm

จากนั้นปิเปตสารมาตรฐานภายใน 2,4,6-trimethylpyridine 250 ppm มา 1.00 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรจนถึงขีดวัดปริมาตรด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.10 โมลต่อลิตร จะได้สารมาตรฐานภายใน 2,4,6-trimethylpyridine 0.25 ppm (ดูวิธีการคำนวณในภาคผนวก)

3) การเตรียมสารละลายผสมมาตรฐาน

ขวดที่ 1 ปิเปตสารละลายมาตรฐาน 2-acetyl-1-pyrroline จากข้อ 1) มา 20.0 ไมโครลิตร
 ขวดที่ 2 ปิเปตสารละลายมาตรฐาน 2-acetyl-1-pyrroline จากข้อ 1) มา 40.0 ไมโครลิตร
 ขวดที่ 3 ปิเปตสารละลายมาตรฐาน 2-acetyl-1-pyrroline จากข้อ 1) มา 80.0 ไมโครลิตร
 ขวดที่ 4 ปิเปตสารละลายมาตรฐาน 2-acetyl-1-pyrroline จากข้อ 1) มา 120.0 ไมโครลิตร
 ขวดที่ 5 ปิเปตสารละลายมาตรฐาน 2-acetyl-1-pyrroline จากข้อ 1) มา 160.0 ไมโครลิตร

ทุกขวดปรับปริมาตรด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.10 โมลต่อลิตร ที่มีสารละลายมาตรฐานภายใน 2,4,6-trimethylpyridine 0.25 ppm ให้ได้ 10.00 มิลลิลิตร เขย่าสารละลายมาตรฐานผสม กรองสารละลายผสมมาตรฐานด้วยเมมเบรน 0.45 ไมครอน จึงนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคฟลูออโรเมตริกอินฟราเรดโครมาโตกราฟีในเฟสเคลื่อนที่ และใช้สภาวะที่ใช้ในการทดลองที่เหมาะสม ซึ่งได้จากการทดลองที่ 2.15 ดังนี้

เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่	0.50	มิลลิลิตรต่อนาที
เฟสเคลื่อนที่	เมธานอลและน้ำ ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร	
ปริมาตรที่ฉีด	20	ไมโครลิตร

เครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์

แบบของการสแกนมวลต่อประจุ	เก็บที่มวลต่อประจุเท่ากับ 112 amu สำหรับสารตั้งเคราะห์ 2-acetyl-1-pyrroline และที่ 122 amu สำหรับสารมาตรฐานภายใน	
ชนิดของไอออนที่วิเคราะห์	ไอออนบวก	
อุณหภูมิของควอดรูโพล	100	องศาเซลเซียส

การเกิดเป็นไอออน

วิธีการผลิตไอออน	electrospray ionisation	
ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่แฟรกเมนเตอร์	90	โวลท์
ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่คาปิลลารี	1000	โวลท์
อัตราการไหลของ แก๊สอบแห้ง	10	ลิตรต่อนาที
ความดันที่เนบิวไลเซอร์	45	พาสเคิล
อุณหภูมิของแก๊สอบแห้ง	350	องศาเซลเซียส

จากโครมาโทแกรมของสารละลายผสมมาตรฐาน หาแมสโครมาโทแกรมของไอออนที่มีมวลต่อประจุเท่ากับ 112 ซึ่งเป็นน้ำหนักโมเลกุลของไอออนซึ่งเกิดจากการรับโปรตอนของสารมาตรฐาน 2-acetyl-1-pyrroline และที่มีมวลต่อประจุเท่ากับ 122 ซึ่งเป็นน้ำหนักโมเลกุลของไอออนซึ่งเกิดจากการรับโปรตอนของสารมาตรฐานภายใน 2,4,6-trimethylpyridine จะได้แมสโครมาโทแกรมของไอออนที่มีมวลต่อประจุเท่ากับ 112 และที่มีมวลต่อประจุเท่ากับ 122 จากนั้นหาพื้นที่ใต้พีค และคำนวณหาอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของสารตั้งเคราะห์ 2-acetyl-1-pyrroline ต่อสารมาตรฐานภายใน 2,4,6-trimethylpyridine ได้ตามสมการ

$$\text{อัตราส่วนพื้นที่ใต้พีค} = \frac{\text{พื้นที่ใต้พีค 2-acetyl-1-pyrroline}}{\text{พื้นที่ใต้พีค 2,4,6-trimethylpyridine}}$$

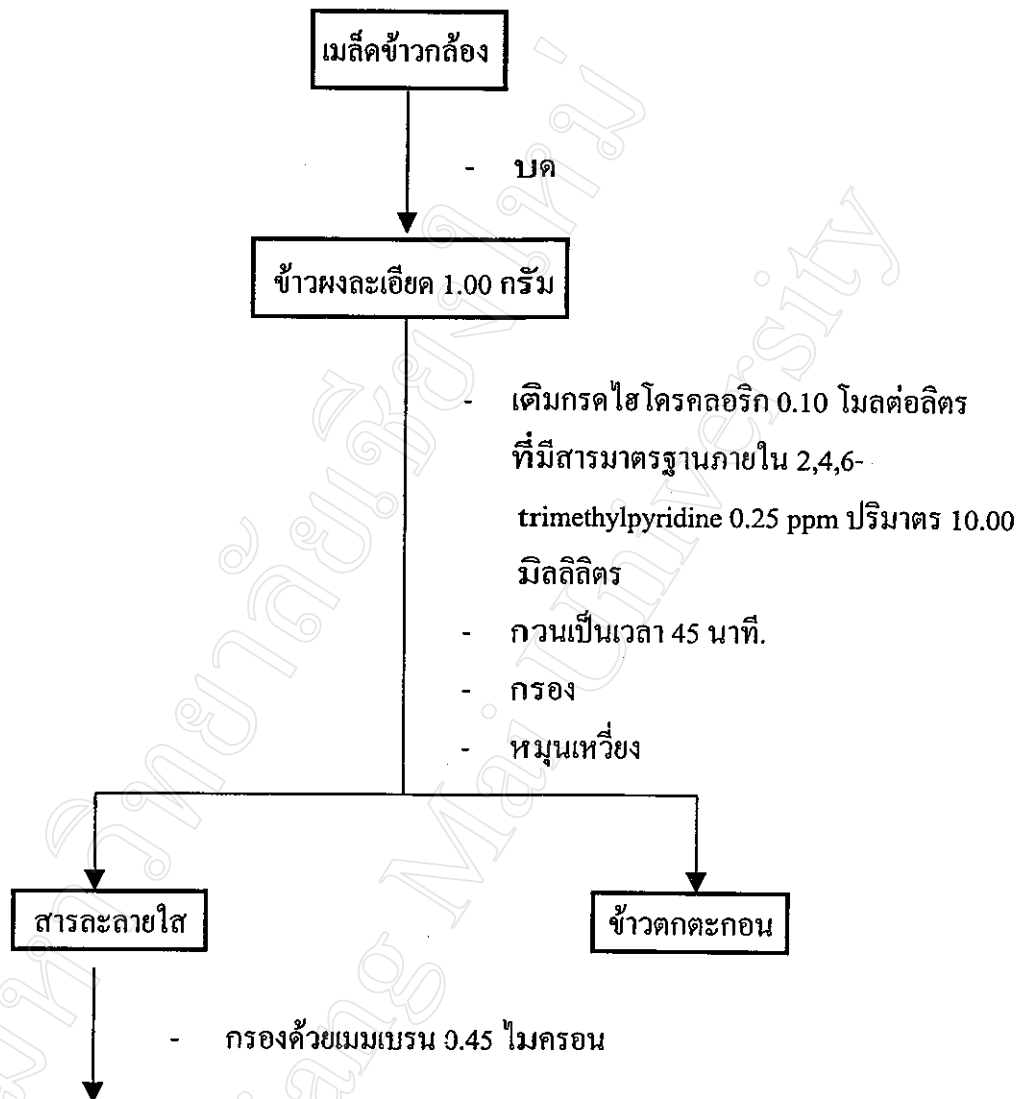
นำอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคมาเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน 2-acetyl-1-pyrroline และอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐาน 2-acetyl-1-pyrroline ต่อสารมาตรฐานภายใน 2,4,6-trimethylpyridine จะได้กราฟมาตรฐานซึ่งสามารถนำไปใช้ในการหาปริมาณสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ในเมล็ดข้าวต่อไป

2.16.3 การหาปริมาณสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ในสารสกัดจากเมล็ดข้าวพันธุ์ต่างๆ ที่สกัดด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.10 โมลต่อลิตร

- ในการทดลองนี้ใช้ตัวอย่างเมล็ดข้าว จากแปลงเพาะปลูกต่างกัันดังนี้ คือ
- ใช้
- ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 จากคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 - ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 จากภาควิชาพืชไร่ วิทยาเขตกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
 - ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 จาก ต.บ้านไผ่ อ.ธวัชบุรี จ.ร้อยเอ็ด
 - ข้าวพันธุ์นางมลิเอส 4 จากภาควิชาพืชไร่ วิทยาเขตกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ซึ่งก่อนที่จะนำมาวิเคราะห์ได้เก็บอยู่ในรูปข้าวเปลือก
 - ข้าวพันธุ์ กข 7 จากคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 - ข้าวสารพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 จากภาควิชาพืชไร่ วิทยาเขตกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
 - ข้าวเหนียวแพร่ จากคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

วิธีการสกัดสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline จากเมล็ดข้าวในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.10 โมลต่อลิตร แสดงในแผนภาพรูปที่ 2.7 และมีการทดลองโดยรายละเอียดดังนี้

นำเมล็ดข้าวมาบดให้ละเอียดเป็นผงด้วยเครื่องบดไฟฟ้า แล้วบรรจุผงเมล็ดข้าวน้ำหนัก 1.00 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 25 มิลลิลิตร และเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.10 โมลต่อลิตร ที่มีสารมาตรฐานภายใน 2,4,6-trimethylpyridine 0.25 ppm ปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร คนอย่างสม่ำเสมอด้วยเครื่องคนแม่เหล็กไฟฟ้า เป็นเวลา 45 นาที แล้วกรอง จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง เพื่อกำจัดอนุภาคของตะกอนจนได้สารละลายใส แล้วนำสารละลายใสที่ได้มากรองด้วยเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน อีกครั้ง แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโฟลอินเจกชันอิเล็กโตรสเปรย์ไอออนในเซชันแมสสเปกโตรเมตรี และมีสภาวะที่ใช้ในการทดลองเหมือนการทดลองที่ 2.16.2



วิเคราะห์ด้วยเทคนิคฟลูออโรเจนเจกซ์อิเล็กโตรสเปรย์ไอออนไนเซชันแมสสเปกโตรเมตรี

รูปที่ 2.7 แผนภาพการสกัดสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline จากเมล็ดข้าวโดยวิธีการสกัดด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.10 โมลต่อลิตร วิเคราะห์ด้วยเทคนิคฟลูออโรเจนเจกซ์อิเล็กโตรสเปรย์ไอออนไนเซชันแมสสเปกโตรเมตรี

จากโครมาโทแกรมของสารสกัดข้าว หามาโครมาโทแกรมของไอออนที่มีมวลต่อประจุเท่ากับ 112 ซึ่งเป็นน้ำหนักโมเลกุลที่เกิดจากการรับโปรตอนของไอออนของ 2-acetyl-1-pyrroline และที่มีมวลต่อประจุเท่ากับ 122 ซึ่งเป็นน้ำหนักโมเลกุลที่เกิดจากการรับโปรตอนของไอออนของสารมาตรฐานภายใน 2,4,6-trimethylpyridine จะได้มาโครมาโทแกรมของไอออนที่มีมวลต่อประจุเท่ากับ 112 และที่มีมวลต่อประจุเท่ากับ 122 หาพื้นที่ใต้พีค และคำนวณหาอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ต่อสารมาตรฐานภายใน 2,4,6-trimethylpyridine และนำไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน จะสามารถคำนวณหาปริมาณสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ในตัวอย่างข้าวทั้ง 7 ชนิดได้