

## บทที่ 2 วิธีการทดลอง

### 2.1 วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และวัตถุดิบที่ใช้

#### 2.1.1 วัสดุอุปกรณ์

1. เครื่องก๊าซโครมาโทกราฟี (Gas Chromatograph, GC), รุ่น 5890 series II, บริษัท HEWLETT PACKARD
2. เครื่องก๊าซโครมาโทกราฟี/ แมสสเปคโตรมิเตอร์ (Gas Chromatograph/ Mass Spectrometer, GC/MS), เครื่องก๊าซโครมาโทกราฟี รุ่น GC 14A, เครื่องแมสสเปคโตรมิเตอร์ รุ่น GP 2000 A, บริษัท SHIMADZU
3. เครื่องอินฟราเรดสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Infrared spectrophotometer, IR), รุ่น 810, บริษัท JASCO
4. คอลัมน์คาร์บอกซิล DB-1, บริษัท J & W Scientific
5. คอลัมน์คาร์บอกซิล CP-WAX 51, บริษัท Chrompack
6. เข็มฉีดยา (syringe) ขนาด 5.0 ไมโครลิตร
7. เครื่องหมุนระเหยความดันต่ำ (vacuum rotary evaporator), รุ่น B-169, บริษัท BUCHI
8. เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge), model D-78532 Tuttlingen, บริษัท HETTICH
9. เครื่องกวนแม่เหล็ก (magnetic stirrer)
10. กระดาษกรอง ชนิด phase separator, บริษัท Whatman
11. เมมเบรน ขนาด 0.45 ไมครอน บริษัท Sartorius
12. เครื่องบัดไฟฟ้า
13. ลูกโป่งยาง ชนิดบรรจุก๊าซฮีเลียม

### 2.1.2 สารเคมี

1. 2-Acetyl-1-pyrrole,  $C_6H_7NO$ , assay > 98 %, A.R. grade, บริษัท Fluka
2. 5% Rhodium on alumina (5% Rh on Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), A.R. grade, บริษัท Fluka
3. Methanol,  $CH_3OH$ , assay 99.8 %, A.R. grade, บริษัท JT. Baker
4. Benzene,  $C_6H_6$ , assay 99.7 %, A.R. grade, บริษัท LAB.SCAN
5. Silver nitrate,  $AgNO_3$ , assay 99.8 %, A.R. grade, บริษัท BDH
6. Sodium carbonate,  $Na_2CO_3$ , assay 99.5 %, A.R. grade, บริษัท Merck
7. Hydrochloric acid,  $HCl$ , assay 35.4 %, บริษัท BDH
8. Sodium hydroxide,  $NaOH$ , assay 98.0 %, commercial grade, บริษัท EKA
9. Dichloromethane,  $CH_2Cl_2$ , commercial grade, บริษัท ICI
10. Sodium sulfate anhydrous,  $Na_2SO_4$ , assay 99.5 %, A.R. grade, บริษัท Fluka
11. 2,4,6-Trimethylpyridine,  $C_8H_{11}N$ , assay 99 %, บริษัท Merck
12. Silicone antifoam, assay 30 % in water, บริษัท Fluka
13. Celite, บริษัท Fluka
14. Hydrogen gas,  $H_2$ , HP grade, บริษัท ลานนา เชียงใหม่
15. Nitrogen gas,  $N_2$ , HP grade, บริษัท ลานนา เชียงใหม่

### 2.1.3 วัตถุดิบที่ใช้

1. เมล็ดข้าวกล้องพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 จากแปลงเพาะปลูกคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เก็บเกี่ยวเดือนพฤศจิกายน 2542
2. เมล็ดข้าวกล้องพันธุ์หอมคลองหลวง จากศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลก จังหวัดพิษณุโลก เก็บเกี่ยวเดือนพฤศจิกายน 2541
3. เมล็ดข้าวกล้องพันธุ์หอมพม่าจากภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน เก็บเกี่ยวเดือนธันวาคม 2542
4. เมล็ดข้าวกล้องพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 (ก.พ.ส.) จากภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน เก็บเกี่ยวเดือนธันวาคม 2542

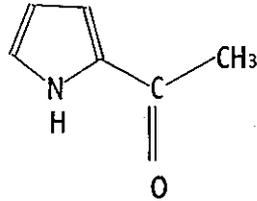
## 2.2 การสังเคราะห์สารมาตรฐาน 2-acetyl-1-pyrroline

### 2.2.1 ปฏิบัติการสังเคราะห์สาร 2-acetyl-1-pyrroline

วิธีการสังเคราะห์สารหอม 2-acetyl-1-pyrroline นี้ ดัดแปลงมาจากวิธีของ Buchi และ Wuest<sup>13</sup> และ Buttery และคณะ<sup>10</sup> มีขั้นตอนแสดงรายละเอียดดังรูป 2.1

ซึ่งสารตั้งต้น 2-acetyl-1-pyrrole มา 1.2000 กรัม ใส่ในขวดทำปฏิกิริยา (A) ดังรูป 2.2 แล้วเติมตัวทำละลาย methanol 25.00 มิลลิลิตร เขย่าจนสารตั้งต้นละลายหมด เติมตัวเร่งปฏิกิริยา 5% rhodium on alumina 1.80 กรัม ลงไปในสารละลาย แล้วนำไปทำปฏิกิริยาไฮโดรจิเนชันกับ hydrogen gas ที่บรรจุในลูกโป่งยาง (B) และคนสารละลายตลอดเวลาโดยใช้เครื่องกวนแม่เหล็ก (C) เมื่อปฏิกิริยาลิ้นสุด (สารตั้งต้นหมด) ตรวจสอบด้วยเทคนิคก๊าซโครมาโทกราฟี แล้วจึงหยุดปฏิกิริยาและตั้งทิ้งไว้ประมาณ 2-3 ชั่วโมงเพื่อให้ตัวเร่งปฏิกิริยาตกตะกอน แยกเอาสารละลายใสมารองผ่านเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน แล้วนำไปประเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องระเหยความดันต่ำ จะได้สาร 2-(1-hydroxyethyl)pyrrolidine 0.9724 กรัม หลังจากนั้น ซึ่ง silver carbonate on celite 5.50 กรัม (ดูวิธีการเตรียมในภาคผนวกหน้า 150) ใส่ในขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วเติมตัวทำละลาย benzene 25.0 มิลลิลิตร และนำสารที่ได้จากปฏิกิริยาไฮโดรจิเนชันใส่ตามลงไป นำไปทำปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยการ reflux ภายใต้บรรยากาศของ nitrogen gas เป็นเวลา 45 ชั่วโมง จะได้สารละลาย 2-acetyl-1-pyrroline เป็นผลผลิตหลัก ปล่อยให้สารละลายเย็น จากนั้นกรองเอา silver carbonate on celite ออก โดยใช้กระดาษกรอง วัดปริมาตรสารละลาย benzene ได้ 23.0 มิลลิลิตร

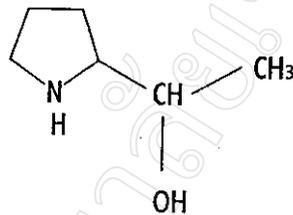
แบ่งสารสังเคราะห์ 2-acetyl-1-pyrroline มา 5.00 มิลลิลิตร ทำการสกัดสาร 2-acetyl-1-pyrroline ออกจากสารละลาย benzene โดยใช้สารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร สองครั้ง จากนั้นปรับพีเอชสารละลายให้เป็นเบสอ่อนๆด้วยสารละลาย sodium hydroxide เข้มข้น 5.0 โมลต่อลิตร แล้วสกัดทันทีด้วยตัวทำละลาย dichloromethane ปริมาตร 10.0 มิลลิลิตร สองครั้ง นำชั้น dichloromethane มารวมกัน แล้วเติม sodium sulfate anhydrous เพื่อกำจัดน้ำและกรอง sodium sulfate anhydrous ออกด้วยกระดาษกรอง จะได้สารสังเคราะห์ 2-acetyl-1-pyrroline ในตัวทำละลาย dichloromethane



2-acetyl-1-pyrrole (1.200 กรัม) + methanol 25.0 มิลลิลิตร

ปฏิกิริยาไฮโดรจิเนชัน :

- 5% Rhodium on alumina (1.80 กรัม)
- hydrogen gas
- กรอง : - แยกสารละลายใส่ด้วยเมมเบรน 0.45 ไมครอน
- ระเหยด้วยเครื่องหมุนระเหย : - ระเหยตัวทำละลายออก



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

(0.9724 กรัม)

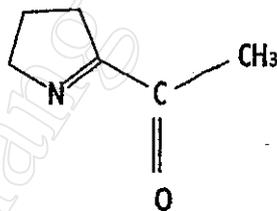
(5.50 กรัม ใน benzene 25.0 มิลลิลิตร)

Reflux :

- ภายใต้บรรยากาศ nitrogen เป็นเวลา 45 ชั่วโมง

กรอง :

- กำจัด silver carbonate on celite



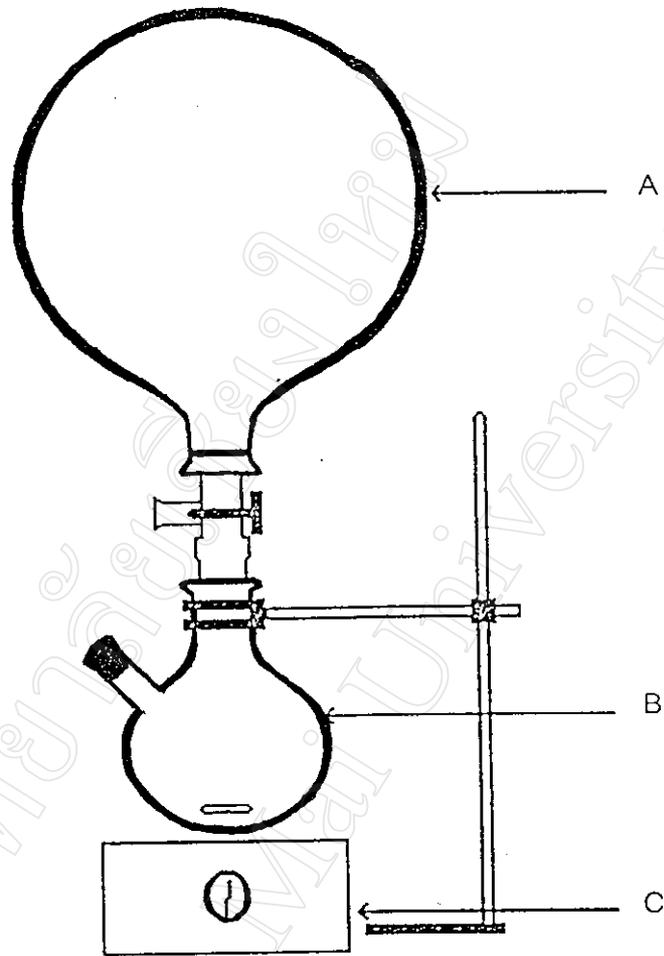
2-acetyl-1-pyrroline

(ในสารละลาย benzene)

- สกัดด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร
- ทำให้เป็นเบสด้วย sodium hydroxide
- สกัดด้วย dichloromethane
- ระเหยเอาตัวทำละลายออก

วิเคราะห์โดยเทคนิค IR, GC, GC/MS

รูป 2.1 แผนภาพแสดงขั้นตอนการสังเคราะห์ 2-acetyl-1-pyrroline



A คือ ลูกโป่งยางที่บรรจุก๊าซไฮโดรเจน

B คือ ขวดทำปฏิกิริยา

C คือ เครื่องกวนแม่เหล็ก

รูป 2.2 การจัดตั้งอุปกรณ์ในการทำปฏิกิริยาไฮโดรจีนชั้น

## 2.2.2 การวิเคราะห์ผลผลิตด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโตรสโคปี ก๊าซโครมาโทกราฟี และก๊าซโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโตรเมตรี

นำสารตั้งต้น 2-acetyl-1-pyrrole และผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาไฮโดรจิเนชันและปฏิกิริยาออกซิเดชัน มาวิเคราะห์องค์ประกอบด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโตรสโคปีและก๊าซโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโตรเมตรี การวิเคราะห์สารด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโตรสโคปีนี้ สารตั้งต้นใช้วิธีผสมกับ KBr ที่เป็นของแข็ง บดให้เข้ากัน แล้วนำไปอัดภายใต้ความดันจะได้สารเป็นแผ่นบางใส แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องอินฟราเรดสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ส่วนผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาไฮโดรจิเนชันและผลผลิตจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน ใช้วิธีระเหยตัวทำละลายออกจนได้สารที่ขึ้น-หนึ่ดหยดลงบนเซลลูล์โลสสาร แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องอินฟราเรดสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ส่วนการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคก๊าซโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโตรเมตรี นำสารตั้งต้นมาละลายในตัวทำละลาย methanol ผลผลิตจากปฏิกิริยาไฮโดรจิเนชันในตัวทำละลาย methanol และผลผลิตจากปฏิกิริยาออกซิเดชันในตัวทำละลาย dichloromethane มาวิเคราะห์ด้วยเครื่องก๊าซโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโตรมิเตอร์ ใช้คอลัมน์ DB-1 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร ยาว 30 เมตร เคลือบด้วยเฟสคงที่ (stationary phase) คือ 100% Dimethylpolysiloxane และมีสภาวะที่ใช้ในการทดลองดังนี้

### เครื่องก๊าซโครมาโทกราฟี

อุณหภูมิของตัวนำสารเข้า	250	องศาเซลเซียส
โปรแกรมอุณหภูมิของคอลัมน์		
อุณหภูมิเริ่มต้น	50	องศาเซลเซียส
อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ	5	องศาเซลเซียสต่อนาที
อุณหภูมิสุดท้าย	250	องศาเซลเซียส
คงที่ที่อุณหภูมิสุดท้าย	5	นาที
อัตราการไหลของก๊าซฮีเลียม	1	มิลลิลิตรต่อนาที
ปริมาตรสารที่ฉีด	1	ไมโครลิตร

### เครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์

อุณหภูมิของส่วนเชื่อมต่อ	250	องศาเซลเซียส
วิธีการผลิตไอออน	Electron Impact Ionization (EI)	
พลังงานเฉลี่ยของอิเล็กตรอน	70	อิเล็กตรอนโวลท์
อุณหภูมิของตัวผลิตไอออน	250	องศาเซลเซียส

และหาเปอร์เซ็นต์ของสารสังเคราะห์ 2-acetyl-1-pyrroline ต่อผลผลิตทั้งหมดใน ตัวทำละลาย benzene และตัวทำละลาย dichloromethane โดยเทคนิคก๊าซโครมาโทกราฟี เพื่อ คำนวณหาปริมาณสารสังเคราะห์ 2-acetyl-1-pyrroline ในตัวทำละลาย benzene (สารละลายที่ ใช้เป็นสารละลายมาตรฐาน) การวิเคราะห์สารด้วยเทคนิคก๊าซโครมาโทกราฟี ใช้คอลัมน์แบบคา บิลลารี ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร ยาว 30 เมตร เคลือบด้วยเฟสคงที่ คือ CP-WAX 51 และมีสภาวะที่ใช้ในการทดลองดังนี้

อุณหภูมิของตัวนำสารเข้า	230	องศาเซลเซียส
โปรแกรมอุณหภูมิของคอลัมน์		
อุณหภูมิเริ่มต้น	50	องศาเซลเซียส
อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ	10	องศาเซลเซียสต่อนาที
อุณหภูมิสุดท้าย	230	องศาเซลเซียส
อุณหภูมิของเครื่องตรวจวัด	250	องศาเซลเซียส
อัตราการไหลของก๊าซ nitrogen	2	มิลลิลิตรต่อนาที
ปริมาตรสารที่ฉีด	1	ไมโครลิตร

### 2.2.3 การประเมินกลิ่นของสารสังเคราะห์ 2-acetyl-1-pyrroline

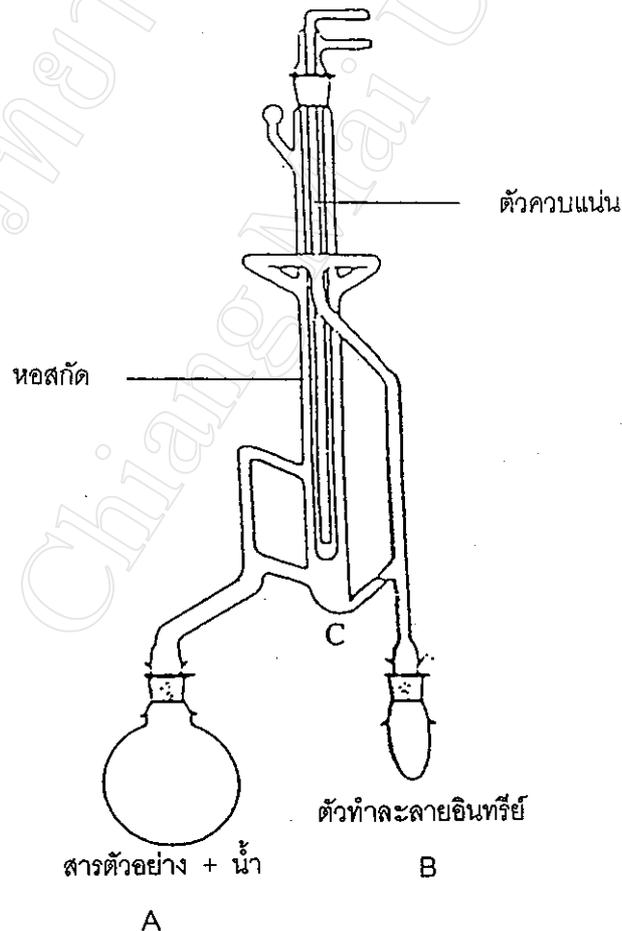
และทำการทดสอบกลิ่นหอมของสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ที่สังเคราะห์ได้ โดยวิธีการดมกลิ่น ทำโดยใช้ผู้ทดสอบเป็นนักเรียนและนักศึกษาจำนวน 122 คน ที่มีอายุระหว่าง 15-30 ปี ให้ทำการทดสอบกลิ่นของสาร 3 ตัวอย่าง ให้เป็นตัวอย่าง ก, ข และ ค โดยที่ตัวอย่าง ก คือ 2-(1-hydroxyethyl) pyrrolidine ละลายในน้ำกลั่น ตัวอย่าง ข คือ 2-acetyl-1-pyrroline ที่ทำการสกัดมาอยู่ในชั้นกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร และตัวอย่าง ค คือ สารละลาย 2-acetyl-1-pyrroline ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกมาปรับพีเอชให้เป็นเบส

นำสารตัวอย่างใส่ในขวดแก้ว มีฝาปิดและมีฉลากติดข้างขวดว่า ตัวอย่าง ก, ข และ ค โดยผู้ทดสอบจะไม่ทราบว่าเป็นสารอะไร เมื่อผู้ทดสอบดมกลิ่นของสารตัวอย่างภายใน ขวด ให้บอกว่ากลิ่นที่ได้สุดคมในแต่ละขวดนั้นเหมือนหรือใกล้เคียงกลิ่นอะไรมากที่สุด ตามความเห็นของผู้ทดสอบ โดยมีตัวเลือกให้ได้แก่ ข้าวสาร ข้าวหุงสุก ใบเตย ดอกมะลิ น้ำมะพร้าวหอม ข้าว น้ำตาลสด และอื่นๆ โดยผู้ทดสอบหนึ่งท่านตอบได้เพียงกลิ่นเดียวต่อหนึ่งตัวอย่าง

## 2.3 การวิเคราะห์เชิงคุณภาพขององค์ประกอบในสารสกัดจากเมล็ดข้าว ด้วยเทคนิค ก๊าซโครมาโทกราฟี/ แมสสเปคโตรเมตรี

### 2.3.1 การสกัดสารระเหยจากเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และข้าวพันธุ์หอมคลองหลวง โดยวิธีการสกัดด้วยไอน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์แบบต่อเนื่อง และวิเคราะห์สารสกัดด้วยเทคนิคก๊าซโครมาโทกราฟี/ แมสสเปคโตรเมตรี ใช้คอลัมน์ DB-1

การสกัดสารระเหย (volatile compounds) จากเมล็ดข้าวกล้องพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 โดยวิธีการสกัดด้วยไอน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์แบบต่อเนื่อง (continuous steam distillation and solvent extraction) ใช้ชุดสกัดด้วยไอน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์แบบต่อเนื่อง (continuous steam distillation and solvent extraction device) ดังแสดงในรูป 2.3



รูป 2.3 ชุดสกัดด้วยไอน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์แบบต่อเนื่อง

นำข้าวกล้องพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 มาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดไฟฟ้า แล้วบรรจุผงข้าวน้ำหนัก 100 กรัม ลงในขวดแก้วทรงกลมขนาด 1000 มิลลิลิตร (A) ของชุดสกัด จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร และสารละลาย silicon antifoam ปริมาตร 20 มิลลิลิตร (ดูวิธีการเตรียมในภาคผนวกหน้า 151) ลงในขวดแก้วทรงกลม แล้วนำมาต่อเข้ากับคอขวดด้านหนึ่งของหอสกัด ส่วนที่คออีกด้านหนึ่งต่อเข้ากับขวดแก้วทรงกลมรีขนาด 40 มิลลิลิตร (B) ที่บรรจุตัวทำละลายอินทรีย์ dichloromethane ปริมาตร 30 มิลลิลิตร เมื่อผ่านน้ำเย็นที่มีอุณหภูมิประมาณ 15 องศาเซลเซียส ไปยังตัวควบแน่นเป็นเวลา 10 นาที จึงเริ่มให้ความร้อนแก่ขวดแก้วทรงกลม (A) เมื่อสารละลายตัวอย่างข้าวเริ่มเดือดจึงให้ความร้อนประมาณ 45 องศาเซลเซียส แก่ขวดแก้วทรงกลมรี (B) อาจใช้ลมร้อนจากที่เป่าผม (hair dryer) ช่วยให้ความร้อนแก่แขนทั้งสองข้างของหอสกัดที่ต่อกับขวดแก้วทั้งสองเพื่อช่วยให้ไอน้ำและไอของตัวทำละลายอินทรีย์ผ่านไปยังตัวควบแน่นได้สะดวก และควบแน่นลงมาแยกชั้นกันอยู่ที่ส่วน C ของหอสกัดอย่างต่อเนื่อง ทิ้งไว้เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จึงหยุดให้ความร้อน

นำสารละลายในขวดแก้วทรงกลมรี (B) มากำจัดน้ำโดยเติม sodium sulfate anhydrous และนำสารละลายมากรองผ่านกระดาษกรอง ทำการทดลองทั้งหมดซ้ำอีกครั้ง แล้วจึงนำสารละลายมารวมกันและทำการระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องหมุนระเหยความดันต่ำ ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จนเหลือปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายบรรจุในขวดเก็บสารตัวอย่าง (sample vial) โดยไม่ปิดฝาและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเหลือปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร จึงนำไปวิเคราะห์ห้องค์ประกอบของสารระเหยด้วยเทคนิคก๊าซโครมาโทกราฟี/แมสสเปคโตรเมตรี ใช้คอลัมน์ DB-1 ซึ่งมีสภาวะในการทดลองเหมือนหัวข้อ 2.2.2 (หน้า 31)

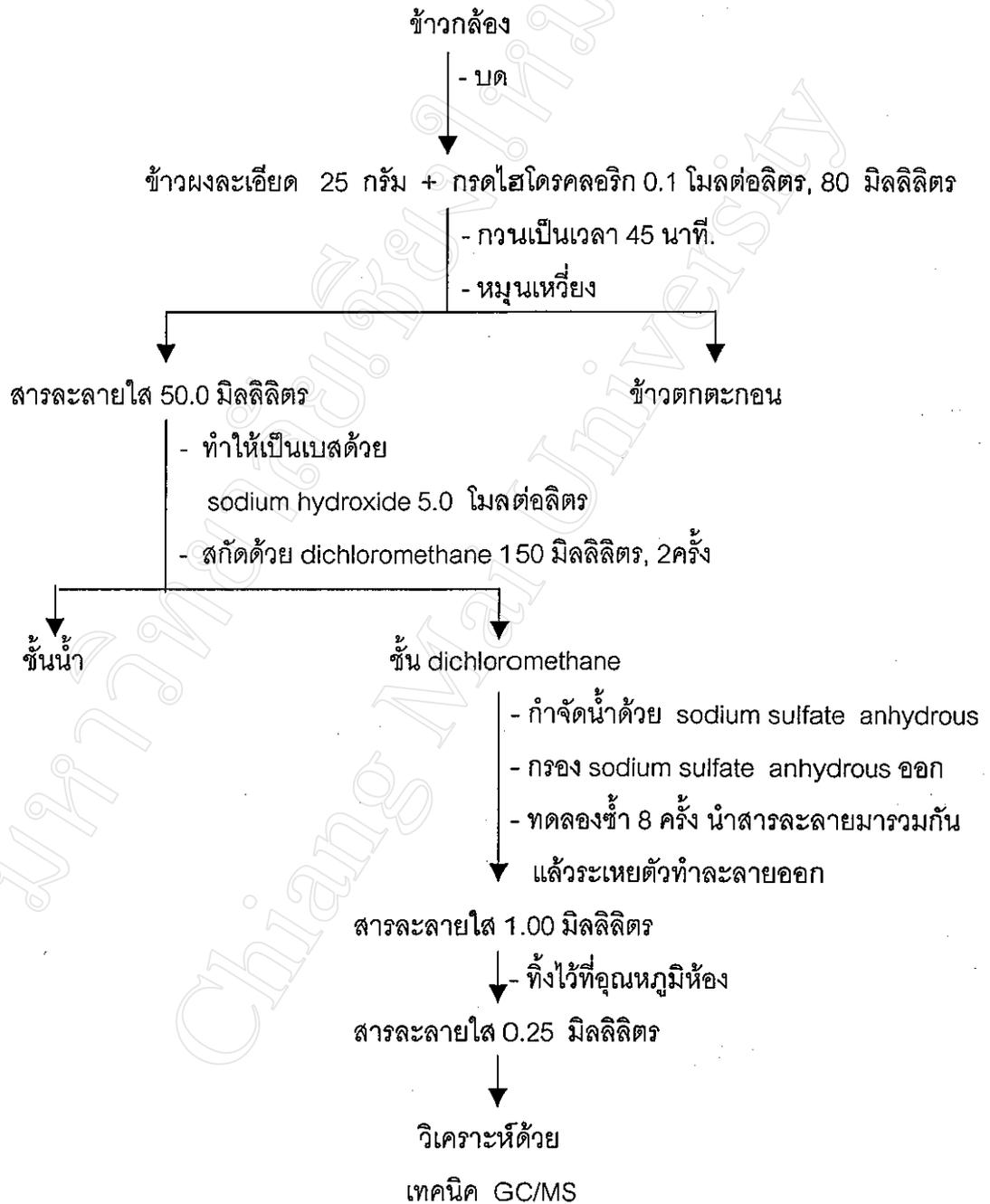
สำหรับการสกัดสารระเหยจากเมล็ดข้าวพันธุ์หอมคลองหลวงโดยวิธีการสกัดด้วยไอน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์แบบต่อเนื่องนั้นก็ทำการทดลองในทำนองเดียวกัน และในการวิเคราะห์ห้องค์ประกอบในสารสกัดจากเมล็ดข้าวพันธุ์หอมคลองหลวง โดยวิธีการสกัดด้วยไอน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์แบบต่อเนื่อง ก็ทำการทดลองในทำนองเดียวกัน

2.3.2 การสกัดสารอินทรีย์จากเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และข้าวพันธุ์หอมคลองหลวง โดยวิธีการสกัดด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก และวิเคราะห์สารสกัดด้วยเทคนิคก๊าซโครมาโทกราฟี/แมสสเปคโตรเมตรี ใช้คอลัมน์ DB-1

วิธีการสกัดสารหอมจากข้าวโดยการสกัดด้วยสารละลายกรด (hydrochloric acid) จะแสดงดังรูป 2.4 โดยนำเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 มาบดให้ละเอียดเป็นผงด้วยเครื่องบดไฟฟ้า แล้วบรรจุผงข้าวน้ำหนัก 25 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร ปริมาตร 80 มิลลิลิตร คนอย่างสม่ำเสมอด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กไฟฟ้า เป็นเวลา 45 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ให้ข้าวตกตะกอน แล้วจึงค่อยๆ ตูดเอาสารละลายส่วนบนมาหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง เพื่อกำจัดอนุภาคของตะกอนจนได้สารละลายใส แล้วนำสารละลายปริมาตร 50.00 มิลลิลิตร มาทำให้เป็นเบสด้วยสารละลาย sodium hydroxide เข้มข้น 5.0 โมลต่อลิตร และสกัดต่อทันทีด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ dichloromethane ปริมาตร 150 มิลลิลิตร สองครั้ง แยกเก็บชั้นของตัวทำละลาย dichloromethane มารวมกัน เติม sodium sulfate anhydrous เพื่อกำจัดน้ำ และนำสารละลายมากรองผ่านกระดาษกรองเพื่อกำจัด sodium sulfate anhydrous ทำการทดลองทั้งหมดซ้ำ 8 ครั้ง แล้วจึงนำสารละลายมารวมกันและนำมาระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องหมุนระเหยความดันต่ำที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จนเหลือปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายบรรจุในขวดเก็บสารตัวอย่างโดยไม่ปิดฝาและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเหลือปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร จึงนำไปวิเคราะห์ห้องค์ประกอบในสารสกัดด้วยเทคนิคก๊าซโครมาโทกราฟี/แมสสเปคโตรเมตรี ใช้คอลัมน์ DB-1 และมีสภาวะการทดลองคล้ายกับหัวข้อ 2.2.2 (หน้า 31) แต่เปลี่ยนโปรแกรมอุณหภูมิของคอลัมน์เป็นดังนี้

อุณหภูมิเริ่มต้น	50	องศาเซลเซียส
อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ	4	องศาเซลเซียสต่อนาที
อุณหภูมิสุดท้าย	250	องศาเซลเซียส
คงที่ที่อุณหภูมิสุดท้าย	10	นาที

สำหรับการสกัดสารจากเมล็ดข้าวพันธุ์หอมคลองหลวง โดยวิธีการสกัดด้วยสารละลายกรด ก็ทำการสกัดในทำนองเดียวกับการสกัดจากเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และการวิเคราะห์ห้องค์ประกอบในสารสกัดจากเมล็ดข้าวพันธุ์หอมคลองหลวง ที่สกัดด้วยสารละลายกรด ก็ทำการทดลองในทำนองเดียวกันกับการวิเคราะห์สารสกัดจากเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่สกัดด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก



รูป 2.4 แผนภาพการสกัดสารหอมจากเมล็ดข้าวโดยวิธีการสกัดด้วยสารละลายกรด

- 2.3.3 การสกัดสารระเหยจากเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และข้าวพันธุ์หอมคลองหลวง โดยวิธีการสกัดด้วยไอน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์แบบต่อเนื่อง และวิเคราะห์สารสกัดด้วยเทคนิคก๊าซโครมาโทกราฟี/แมสสเปคโตรเมตรี ใช้คอลัมน์ CP-WAX 51

ในการสกัดสารระเหยจากเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 โดยวิธีการสกัดด้วยไอน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์แบบต่อเนื่อง จะทำการสกัดเหมือนหัวข้อ 2.3.1 แต่จะใช้ปริมาณข้าวทั้งหมด 100 กรัม และในการวิเคราะห์องค์ประกอบในสารสกัดจากข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเทคนิคก๊าซโครมาโทกราฟี/แมสสเปคโตรเมตรี ใช้คอลัมน์ CP-WAX 51 ก็ทำการทดลองในสภาวะดังนี้

#### เครื่องก๊าซโครมาโทกราฟี

อุณหภูมิของตัวนำสารเข้า	230	องศาเซลเซียส
โปรแกรมอุณหภูมิของคอลัมน์		
อุณหภูมิเริ่มต้น	50	องศาเซลเซียส
คงที่ที่อุณหภูมิเริ่มต้น	7	นาที
อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ ที่ 1	4	องศาเซลเซียสต่อนาที
อุณหภูมิสุดท้าย ที่ 1	90	องศาเซลเซียส
อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ ที่ 2	6	องศาเซลเซียสต่อนาที
อุณหภูมิสุดท้าย ที่ 2	250	องศาเซลเซียส
คงที่ที่อุณหภูมิสุดท้าย	7	นาที
อัตราการไหลของก๊าซฮีเลียม	1	มิลลิลิตรต่อนาที
ปริมาตรสารที่ฉีด	1	ไมโครลิตร

#### เครื่องแมสสเปคโตรมิเตอร์

อุณหภูมิของส่วนเชื่อมต่อ	200	องศาเซลเซียส
อุณหภูมิของตัวผลิตไอออน	Electron Impact Ionization (EI)	
พลังงานเฉลี่ยของอิเล็กตรอน	70	อิเล็กตรอนโวลท์
อุณหภูมิของตัวผลิตไอออน	250	องศาเซลเซียส

สำหรับการสกัดสารระเหยจากเมล็ดข้าวพันธุ์หอมคลองหลวงโดยวิธีการสกัดด้วยไอน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์แบบต่อเนื่องก็ทำการสกัดเหมือนหัวข้อ 2.3.1 และการวิเคราะห์หาองค์ประกอบในสารสกัดจากข้าวพันธุ์หอมคลองหลวงที่สกัดด้วยไอน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์แบบต่อเนื่อง ก็ทำการวิเคราะห์เหมือนการวิเคราะห์องค์ประกอบในสารสกัดจากข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเทคนิคก๊าซโครมาโทกราฟี/ แมสสเปคโตรเมตรี ใช้คอลัมน์ CP-WAX 51

2.3.4 การสกัดสารจากเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และข้าวพันธุ์หอมคลองหลวง โดยวิธีการสกัดด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก และวิเคราะห์ด้วยเทคนิคก๊าซโครมาโทกราฟี/ แมสสเปคโตรเมตรี ใช้คอลัมน์ CP-WAX 51

ในการสกัดสารจากเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 โดยวิธีการสกัดด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก จะทำการสกัดเหมือนหัวข้อ 2.3.2 แต่ในการวิเคราะห์ทั้งหมด 100 กรัม สำหรับการวิเคราะห์องค์ประกอบในสารสกัดจากเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่สกัดด้วยสารละลายกรด โดยเทคนิคก๊าซโครมาโทกราฟี/ แมสสเปคโตรเมตรี ใช้คอลัมน์ CP-WAX 51 จะมีสถานะในการทดลองเหมือนหัวข้อ 2.3.3

ในการสกัดสารจากเมล็ดข้าวพันธุ์หอมคลองหลวงที่สกัดด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก จะทำการสกัดเหมือนกับการสกัดสารจากเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่สกัดด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก และในการวิเคราะห์องค์ประกอบในสารสกัดจากเมล็ดข้าวพันธุ์คลองหลวงที่สกัดด้วยสารละลายกรด โดยเทคนิคก๊าซโครมาโทกราฟี/ แมสสเปคโตรเมตรี ใช้คอลัมน์ CP-WAX 51 จะมีสถานะในการทดลองเหมือนหัวข้อ 2.3.3

## 2.4 การวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารให้ความหอม 2-acetyl-1-pyrroline ในสารสกัดจากเมล็ดข้าว ด้วยเทคนิคก๊าซโครมาโทกราฟี

### 2.4.1 การทำกราฟสารละลายมาตรฐาน

#### ก. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน 2-acetyl-1-pyrroline ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก

ปิเปตสารสังเคราะห์ 2-acetyl-1-pyrroline ในตัวทำละลาย benzene จากการสังเคราะห์ในหัวข้อ 2.2 มา 0.11 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตร 25.00 มิลลิลิตร แล้วทำการปรับปริมาตรด้วยตัวละลาย benzene จนครบขีดวัดปริมาตร และนำมาสกัด 2-acetyl-1-pyrroline ออกจากชั้นตัวทำละลาย benzene ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร ปริมาตร 25.00 มิลลิลิตร สองครั้ง จะได้สารมาตรฐาน 2-acetyl-1-pyrroline 2.5 มิลลิกรัม ในสารละลาย benzene 50 มิลลิลิตร (ดูการคำนวณในภาคผนวกหน้า 151)

#### ข. การเตรียมสารละลายมาตรฐานภายใน 2,4,6-trimethylpyridine ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก

ปิเปตสารมาตรฐานภายใน 2,4,6-trimethylpyridine มา 27.5 ไมโครลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 250.00 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรจนถึงขีดด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร จะได้สารมาตรฐานภายใน 2,4,6-trimethylpyridine 25 มิลลิกรัม (ดูการคำนวณในภาคผนวกหน้า 151)

#### ค. การเตรียมสารละลายผสมมาตรฐาน

ขวดที่ 1 ปิเปตสารละลายมาตรฐาน 2-acetyl-1-pyrroline จากข้อ ก. มา 25.0 ไมโครลิตร

ขวดที่ 2 ปิเปตสารละลายมาตรฐาน 2-acetyl-1-pyrroline จากข้อ ก. มา 50.0 ไมโครลิตร

ขวดที่ 3 ปิเปตสารละลายมาตรฐาน 2-acetyl-1-pyrroline จากข้อ ก. มา 100.0 ไมโครลิตร

ขวดที่ 4 ปิเปตสารละลายมาตรฐาน 2-acetyl-1-pyrroline จากข้อ ก. มา 150.0 ไมโครลิตร

ทุกขวดเติมสารละลายมาตรฐานภายใน 2,4,6-trimethylpyridine จากข้อ ข. ปริมาตร 62.5 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร ให้ได้ 25.00 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายผสมที่ได้มาปรับพีเอชให้เป็นเบสอ่อนๆ ด้วยสารละลาย sodium hydroxide เข้มข้น 5.0 โมลต่อลิตร และสกัดต่อทันทีด้วยตัวทำละลาย

dichloromethane ปริมาตร 75.00 มิลลิลิตร สองครั้ง นำชั้น dichloromethane มารวมกันแล้ว  
 กำจัดน้ำโดยเติม sodium sulfate anhydrous และกรองเอา sodium sulfate anhydrous ออก  
 ด้วยกระดาษกรอง แล้วจึงนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องหมุนระเหยความดันต่ำ ที่  
 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จนเหลือปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายบรรจุในขวดเก็บ  
 สารตัวอย่างโดยไม่ปิดฝาและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเหลือปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร จึงนำไป  
 วิเคราะห์ห้องค์ประกอบในสารสกัดด้วยเทคนิคก๊าซโครมาโทกราฟี ใช้คอลัมน์ CP-WAX 51 และมี  
 สภาวะการทดลองเป็นดังนี้

อุณหภูมิของตัวนำสารเข้า	230	องศาเซลเซียส
โปรแกรมอุณหภูมิของคอลัมน์		
อุณหภูมิเริ่มต้น	50	องศาเซลเซียส
อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ ที่ 1	10	องศาเซลเซียสต่อนาที
อุณหภูมิสุดท้าย ที่ 1	70	องศาเซลเซียส
คงที่ที่อุณหภูมิสุดท้าย ที่ 1	10	นาที
อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ ที่ 2	10	องศาเซลเซียสต่อนาที
อุณหภูมิสุดท้าย ที่ 2	230	องศาเซลเซียส
คงที่ที่อุณหภูมิสุดท้าย ที่ 2	2	นาที
อัตราการไหลของก๊าซ	1	มิลลิลิตรต่อนาที
ปริมาตรสารที่ฉีด	1	ไมโครลิตร
split ratio	20 : 1	

จากโครมาโทแกรมของสารละลายผสมมาตรฐาน จะหาอัตราส่วนพื้นที่ที่ได้พีคของ  
 สารมาตรฐาน 2-acetyl-1-pyrroline และสารมาตรฐานภายใน 2,4,6-trimethylpyridine ได้ดังนี้

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

และเมื่อทำการเขียนกราฟระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ที่ได้พีคกับอัตราส่วนน้ำหนักของ  
 สารมาตรฐาน 2-acetyl-1-pyrroline และสารมาตรฐานภายใน 2,4,6-trimethylpyridine (ดูการ

คำนวณในภาคผนวกหน้า 151) จะได้กราฟสารละลายมาตรฐาน (หน้า 121) ที่จะนำไปใช้ในการหาปริมาณสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ในสารสกัดจากข้าวต่อไป

#### 2.4.2 การศึกษาเปรียบเทียบช่วงเวลาที่ใช้ในการสกัดสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline จากเมล็ดข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก

นำตัวอย่างเมล็ดข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 มาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดไฟฟ้า แล้วบรรจุผงข้าวน้ำหนัก 10 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ขนาดปริมาตร 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร ที่มีสารมาตรฐานภายใน 2,4,6 trimethylpyridine (TMP) 0.25 ppm ปริมาตร 40 มิลลิลิตร (ดูวิธีการเตรียมในภาคผนวกหน้า 150) จากนั้นคนสม่ำเสมอโดยใช้เครื่องกวนแม่เหล็ก เป็นเวลา 5 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ให้ข้าวตกตะกอน แล้วจึงค่อยๆ ดูดเอาสารละลายส่วนบนมาหมุนเหวี่ยงเพื่อกำจัดอนุภาคของตะกอนจนได้สารละลายใส นำสารละลายใส ปริมาตร 25.00 มิลลิลิตร (มีปริมาณสารมาตรฐานภายใน 6.25 ไมโครกรัม ดูการคำนวณในภาคผนวกหน้า 153) มาทำให้เป็นเบสเกินพอด้วยสารละลาย sodium hydroxide เข้มข้น 5.0 โมลต่อลิตร และสกัดต่อทันทีด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ dichloromethane ปริมาตร 75 มิลลิลิตร สองครั้ง แยกเก็บชั้นของตัวทำละลายมารวมกัน เติม sodium sulfate anhydrous เพื่อกำจัดน้ำและนำมากรองผ่านกระดาษกรองเพื่อกำจัด sodium sulfate anhydrous แล้วนำสารละลายมา ระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ออกโดยใช้เครื่องหมุนระเหยความดันต่ำที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จนเหลือปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายบรรจุในขวดเก็บสารตัวอย่าง โดยไม่ปิดฝาและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเหลือปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร จึงนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบของสารระเหยด้วยเทคนิคก๊าซโครมาโทกราฟี ซึ่งมีสภาวะในการทดลองเหมือนหัวข้อ 2.4.1 (หน้า 40) และทำการทดลองเช่นเดียวกัน โดยเปลี่ยนช่วงเวลาที่ใช้ในสกัด เป็น 15, 30 และ 45 นาที

ในการหาปริมาณสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ในสารสกัดจากเมล็ดข้าว ทำโดยการคำนวณหาอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐาน 2-acetyl-1-pyrroline และสารมาตรฐานภายใน 2,4,6-trimethylpyridine แล้วนำอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคไปเทียบกับกราฟสารละลายมาตรฐาน (หน้า 121) ก็จะสามารถคำนวณหาปริมาณสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ในสารสกัดที่เวลาต่างๆ ได้

### 2.4.3 การหาปริมาณสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ในสารสกัดจากเมล็ดข้าวพันธุ์ต่างๆ ที่สกัดด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก

ในการทดลองจะใช้ตัวอย่างข้าวกล้อง 4 พันธุ์ คือ พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 , พันธุ์หอมคลองหลวง, พันธุ์หอมพม่า และพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (ก.พ.ส.) ทำสกัดข้าวเหมือนกับการทดลองในหัวข้อ 2.4.2 (หน้า 41) แต่ใช้ปริมาณข้าว 10 กรัม และใช้เวลาในการสกัด 45 นาที นำสารสกัดที่ได้วิเคราะห์ด้วยเทคนิคก๊าซโครมาโทกราฟี ซึ่งมีสภาวะในการทดลองเหมือนหัวข้อ 2.4.1 (หน้า 40) และในการหาปริมาณสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ในสารสกัดจากเมล็ดข้าว ทำโดยการคำนวณหาอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐาน 2-acetyl-1-pyrroline และสารมาตรฐานภายใน 2,4,6-trimethylpyridine แล้วนำอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคไปเทียบกับกราฟสารละลายมาตรฐาน (หน้า 121) ก็จะสามารถคำนวณหาปริมาณสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ในตัวอย่างข้าวทั้ง 4 พันธุ์

### 2.3.4 การหาปริมาณตัวอย่างที่น้อยที่สุดที่สามารถสกัดด้วยสารละลายกรด และให้สัญญาณเมื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ด้วยเทคนิคก๊าซโครมาโทกราฟี

ทำการสกัดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เช่นเดียวกับการทดลองในหัวข้อ 2.4.2 แต่จะเปลี่ยนปริมาณข้าวที่ใช้ คือ 0.5, 1 และ 3 กรัม ใช้เวลาในการสกัด 45 นาที แล้วนำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคก๊าซโครมาโทกราฟี ในสภาวะการทดลองเหมือนหัวข้อ 2.4.1 (หน้า 40) เพื่อหาว่าปริมาณข้าวน้อยที่สุดที่เครื่องก๊าซโครมาโทกราฟีสามารถตรวจวัดสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ได้ และสามารถหาปริมาณสารหอม โดยนำอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐาน 2-acetyl-1-pyrroline และสารมาตรฐานภายใน 2,4,6-trimethylpyridine ไปเทียบกับกราฟสารละลายมาตรฐาน (หน้า 121)