การศึกษาสารให้ความหอมในเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

เอกสารวิชาการ BIOTEC 1/2540

สุกัญญา มหาธีรานนท์

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ศช.)
สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)

ISBN 974-7576-33-3

การศึกษาสารให้ความหอมในเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

เอกสารวิชาการ BIOTEC 1/2540

สุกัญญา มหาธีรานนท์

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สนับสนุนโดย :

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ศช.)
สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)

ISBN 974-7576-33-3

คำนำ

เนื่องจากงานวิจัยทางเทคโนโลยีชีวภาพข้าวได้รับการสนับสนุนอย่างมากจากแหล่งทุนทั้งในและต่างประเทศ และข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ก็เป็นพันธุ์ข้าวที่กำลังได้รับความสนใจจากนักวิชาการข้าวหลายกลุ่มด้วยกัน ซึ่งการศึกษาวิจัยอาจเกี่ยวข้องกับสารให้ความหอมในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 อยู่บ้าง รวมถึงการตรวจวัดสารหอม จึงเป็นเหตุให้มีการจัดทำเอกสารเรื่อง "การศึกษาสารให้ความหอมในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105" ฉบับนี้ขึ้นเพื่อเป็นข้อมูลประกอบ โดยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าเอกสารฉบับนี้จะเป็นประโยชน์บ้างต่อนักวิชาการบางท่านที่กำลังศึกษาหรือทำวิจัยเกี่ยวกับพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105

เอกสารฉบับนี้ได้เรียบเรียงและย่อส่วนมาจากส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยเรื่อง "การศึกษาสารอินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับความหอมและสารอินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับระบบต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลของข้าวไทยบางพันธุ์" ซึ่งได้รับการสนับสนุนเงินอุดหนุนโครงการวิจัยจาก ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ นอกจากนี้ทางศูนย์ฯ ยังได้ให้ความอนุเคราะห์ในการจัดพิมพ์เพื่อเผยแพร่ ซึ่งผู้เขียนขอแสดงความขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ท้ายนี้ผู้เขียนใคร่ขอขอบคุณผู้ร่วมวิจัยในโครงการฯ ทั้งสองท่านคือ อาจารย์อดิศักดิ์ เจียมพิริยะกุล และคุณสมนึก พรมแดง ซึ่งหากปราศจากความร่วมมือเป็นอย่างดีจากทั้งสองท่านโครงการวิจัยนี้คงไม่สามารถประสบความสำเร็จลงได้ด้วยดี โครงการวิจัยดังกล่าวยังได้รับอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์ข้าว จากศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี และการปฏิบัติการวิจัยโดย gas chromatograph/mass spectrometer (GC/MS) จากศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ด้วยความรู้สึกขอบพระคุณเป็นอย่างสูงเช่นกัน หากท่านผู้อ่านมีข้อสงสัยหรือเห็นจุดบกพร่องที่ใด ซึ่งควรได้มีการแก้ไขปรับปรุง ขอความกรุณาแนะนำมายังผู้เขียนได้ที่ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จักเป็นพระคุณอย่างยิ่ง

สุกัญญา มหาธีรานนท์
เมษายน 2540

สารบัญ

	หน้า
คำนำ	i
สารบัญ	iii
บทนำ	1
การสังเคราะห์ 2-acetyl-1-pyrroline	3
การสกัดสารระเหยจากตัวอย่างเมล็ดข้าวโดยเทคนิคการสกัดด้วยไอน้ำแบบง่าย	9
การสกัดสารระเหยจากตัวอย่างเมล็ดข้าวโดยเทคนิคการสกัดด้วยไอน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์แบบต่อเนื่อง	10
การวิเคราะห์สารหอมในสารสกัดจากเมล็ดข้าวด้วยเทคนิค GC/MS	11
การประเมินความหอมโดยวิธีการดม	24
การสกัดสารหอมจากเมล็ดข้าวขาวดอกมะลิ 105 โดยวิธีการสกัดด้วยสารละลายกรด	26
สรุปและข้อเสนอแนะ	29
ภาคผนวก	32
เอกสารอ้างอิง	33

บทนำ

นักวิชาการมากมายทั้งในอดีตและปัจจุบันสนใจเกี่ยวกับเคมีของกลิ่นของอาหารชนิดต่างๆ โดยมีจุดมุ่งหมายในเชิงการปรับปรุงคุณภาพอาหารและในเชิงการค้า ความหอมของข้าวก็เป็นที่น่าสนใจในทำนองเดียวกัน เนื่องจากประชากรกว่าครึ่งหนึ่งของประชากรโลกบริโภคข้าวเป็นอาหารหลักและมีแนวโน้มที่ข้าวมีกลิ่นหอมจะได้รับความนิยมจากตลาดข้าวในยุโรปและอเมริกามากขึ้น ด้วยเหตุนี้จึงมีรายงานเกี่ยวกับการศึกษาองค์ประกอบสารระเหยในข้าวสุกของข้าวบางพันธุ์ต่อเนื่องกันมาจนถึงปัจจุบัน ตลอดจนมีรายงานเกี่ยวกับวิธีการต่างๆ ที่ใช้ในการศึกษาสารระเหยในเมล็ดข้าว ซึ่งส่วนใหญ่มักใช้วิธีการสกัดด้วยไอน้ำ และสกัดสารอินทรีย์ที่ได้จาก distillate ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมอีกทีหนึ่งตามลำดับ

ในระยะแรกการทดลองดังกล่าวนี้ต้องใช้ปริมาณตัวอย่างข้าวค่อนข้างมาก อาจเนื่องจากประสิทธิภาพของทั้งวิธีการในการสกัดและวิเคราะห์ยังไม่ดีพอ ตัวอย่างเช่น ได้มีรายงานการศึกษาสารระเหยในข้าวพันธุ์ 'Koshihikari' (Yajima, *et al.*, 1978) ซึ่งสกัดด้วยไอน้ำโดยใช้ภาชนะขนาดใหญ่ประมาณ 50 ลิตร ใช้ตัวอย่างข้าวครั้งละ 6 กิโลกรัม ทำการทดลองซ้ำกัน 8 ครั้ง หรือรวมแล้วใช้ตัวอย่างข้าวประมาณ 48 กิโลกรัม จึงได้สารสกัดที่สามารถนำมาศึกษาองค์ประกอบของสารระเหยต่อด้วยเทคนิค gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) และพบสารระเหยกว่าร้อยชนิดเป็นองค์ประกอบอยู่ในสารสกัดด้วยไอน้ำของข้าวพันธุ์ดังกล่าว

Yajima และคณะ (1979) ได้ทำการวิจัยในเวลาต่อมาในทำนองเดียวกันกับข้าวพันธุ์ 'Kaorimai' (*O. sativa japonica*) ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวหอม โดยศึกษาเปรียบเทียบกับพันธุ์ 'Koshihikari' ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวธรรมดา พบองค์ประกอบสารระเหยกว่าร้อยชนิดเช่นกันจากการสกัดข้าวตัวอย่างจำนวน 60 กิโลกรัม แต่ไม่พบองค์ประกอบที่เป็นสารให้ความหอมของข้าวหอมพันธุ์ 'Kaorimai'

ต่อมา Buttery และคณะ (Buttery and Ling, 1982; Buttery, *et al.*, 1983, 1988) ได้รายงานการค้นพบสารระเหยที่เป็นสารให้ความหอมในข้าวคือ 2-acetyl-1-pyrroline ซึ่งพบสารดังกล่าวมีปรากฏอยู่ทั้งในพันธุ์ข้าวหอมเช่นพันธุ์ 'Malagkit Sungsong' 'Basmati' และ 'Khao Dawk Mali 105' และพันธุ์ข้าวที่ไม่หอมอย่างเช่นพันธุ์ 'Calrose' โดยพบว่ามีปริมาณมากในพันธุ์ข้าวหอมและน้อยในพันธุ์ข้าวที่ไม่หอมตามลำดับ ผู้วิจัยกลุ่มนี้ยังได้ประยุกต์ใช้เทคนิคการสกัดด้วยไอน้ำที่สามารถทำให้ใช้ตัวอย่างข้าวในปริมาณน้อยลง คือชุดสกัดด้วยไอน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์แบบต่อเนื่องตามแบบของ "Likens and Nikerson" (Likens-Nikerson simultaneous steam distillation/ solvent extraction apparatus) (Likens and Nikerson, 1964) ซึ่งทำให้สามารถใช้ปริมาณข้าวตัวอย่างประมาณ 500 กรัม นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบ 2-acetyl-1-pyrroline ในสารสกัดของใบเตยแห้ง (Buttery, *et al.*, 1983) โดยพบในปริมาณที่สูงกว่าในข้าวหอมมาก คณะผู้วิจัยกลุ่มนี้ยังได้สรุปสาเหตุที่ไม่มีรายงานการค้นพบสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ก่อนหน้านี้ว่าอาจเนื่องจากสารดังกล่าวมีเสถียรภาพที่ต่ำมากประกอบกับเทคนิคการสกัดและวิเคราะห์อาจไม่รัดกุมเพียงพอ

ข้อมูลเกี่ยวกับองค์ประกอบสารระเหยที่เป็นสารให้ความหอมในข้าวดังที่กล่าวมาข้างต้นน่าจะมีประโยชน์อย่างมากในแง่ของการปรับปรุงพันธุ์ข้าวหอม โดยการใช้สารหอมดังกล่าวเป็นสารอ้างอิงในการตรวจสอบความหอมของข้าวลูกผสมที่ได้ แต่อย่างไรก็ตามยังมีข้อจำกัดอยู่เนื่องจากการตรวจสอบดังกล่าวต้องอาศัยเทคนิคการสกัดและวิเคราะห์หลายขั้นตอน รวมทั้งต้องอาศัยเครื่องมือวิเคราะห์ระดับสูงที่ให้ประสิทธิภาพดี ซึ่งก็จะมีราคาแพงและจำเป็นต้องอาศัยบุคลากรที่มีความชำนาญเฉพาะทาง นอกจากนี้การใช้ข้าวตัวอย่างในปริมาณที่มากเพื่อวิเคราะห์สารหอมก็เป็นข้อจำกัดอย่างหนึ่งในแง่ของการปรับปรุงพันธุ์

Tanchotikul และ Hsieh, (1991) ได้ปรับปรุงเทคนิคการตรวจหาสาร 2-acetyl-1-pyrroline โดยการสกัดด้วยชุดสกัดด้วยไอน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์แบบต่อเนื่องที่มีขนาดเล็ก (microscale steam distillation and solvent extraction device) สามารถสกัดข้าวตัวอย่างโดยใช้ปริมาณน้อยที่สุดเพียง 1 กรัม หากแต่ต้องอาศัยเทคนิคการวิเคราะห์ในระดับที่สูงขึ้นคือเทคนิค selected ion monitoring/high-resolution gas chromatography/mass spectrometry ทำให้มีข้อจำกัดในการวิจัยเนื่องจากเครื่องมือมีราคาแพงมากและต้องอาศัยบุคลากรที่มีความชำนาญในเทคนิคเฉพาะทาง

งานวิจัยที่จะได้กล่าวถึงในรายละเอียดต่อไปนี้เป็นการศึกษาและวิเคราะห์สารให้ความหอมในข้าวหอมพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวที่กำลังเป็นที่สนใจของนักปรับปรุงพันธุ์ในการพัฒนาให้พันธุ์ข้าวดังกล่าวมีความต้านทานต่อโรคและแมลงและเพื่อเพิ่มผลผลิตต่อไร่ให้สูงขึ้น โดยได้ศึกษาถึงองค์ประกอบสารระเหยอื่นๆ ที่อาจเกี่ยวข้องกับความหอมของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 นอกจาก 2-acetyl-1-pyrroline ที่ได้มีรายงานการค้นพบมาก่อนหน้านี้แล้ว วิธีการสกัดสารระเหยอาศัยการสกัดด้วยไอน้ำทั้งแบบง่าย (simple steam distillation) และแบบการสกัดด้วยไอน้ำ และตัวทำละลายอินทรีย์แบบต่อเนื่อง (continuous steam distillation and solvent extraction device) ซึ่งได้ดัดแปลงมาจากชุดสกัดสารระเหยมีพิษที่เป็นสารตกค้างในตัวอย่างน้ำ การวิเคราะห์องค์ประกอบสารระเหยในสารสกัดใช้เทคนิคควบ gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS)

นอกจากนี้เพื่อเป็นการพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบความหอมในเมล็ดข้าวให้ได้เทคนิคที่ง่ายและสะดวกขึ้น จึงได้ศึกษาการสกัด 2-acetyl-1-pyrroline ซึ่งจากผลการวิจัยต่อมาพบว่าเป็นสารที่มีบทบาทมากที่สุดในความหอมของข้าวขาวดอกมะลิ 105 โดยสกัดด้วยสารละลายกรด (acidic extraction) พบว่าเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก และให้ประสิทธิภาพการสกัดสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ที่ดีกว่าการสกัดด้วยไอน้ำ และสามารถตรวจวัดปริมาณ 2-acetyl-1-pyrroline ด้วยเทคนิค gas chromatography (GC) หรือ GC/MS โดยใช้ปริมาณตัวอย่างเมล็ดข้าวเพียง 1-3 กรัมเท่านั้น จึงน่าจะเป็นวิธีที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้ดีกว่าในแง่ของการตรวจวัดสารหอมในตัวอย่างเมล็ดข้าวที่มีปริมาณตัวอย่างไม่มากนัก

อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์สารหอมดังกล่าวยังต้องอาศัยเครื่องมือวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพสูงและมีราคาแพง อย่างเช่น GC หรือ GC/MS เพราะสารสกัดที่ได้มักมีความซับซ้อนขององค์ประกอบสารระเหยอื่นๆ ที่ถูกสกัดออกมารวมอยู่ด้วย การใช้ GC/MS ในการวิเคราะห์สารหอมอาจให้ขั้นตอนในการวิเคราะห์ที่สะดวกกว่า เพราะไม่ต้องยุ่งยากในการเตรียมสารมาตรฐาน 2-acetyl-1-pyrroline เพื่อใช้เทียบ retention time สามารถใช้วิธีเปรียบเทียบจาก mass spectrum ได้ แต่เนื่องจากเครื่อง GC/MS ส่วนใหญ่มักมีราคาแพง การวิเคราะห์ด้วย GC เพียงอย่างเดียวจึงอาจเป็นทางเลือกที่ดีกว่าแม้จะต้องทำการสังเคราะห์ 2-acetyl-1-pyrroline ขึ้นมาเพื่อใช้เป็นสารมาตรฐานก็ตาม

ขั้นตอนในการสังเคราะห์สารหอม 2-acetyl-1-pyrroline โดยใช้ 2-acetylpyrrole เป็นสารตั้งต้นปฏิกิริยาได้มีการรายงานไว้แล้วโดย Buttery และคณะ (1983) ซึ่งวิธีการสังเคราะห์ดังกล่าวนี้ Buttery ได้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Buchi และ Wuest (1971) ในการสังเคราะห์สารที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกันคือ 2-acetyl-1,4,5,6-tetrahydropyridine แต่เนื่องจากตัวเร่งปฏิกิริยาในขั้นตอนหนึ่งของการสังเคราะห์คือ Rhodium นั้นมีราคาค่อนข้างแพง ประกอบกับการสังเคราะห์ 2-acetyl-1-pyrroline เพื่อนำมาใช้เป็นสารมาตรฐานในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC ต้องการปริมาณสารเพียงเล็กน้อยเท่านั้น การสังเคราะห์ในระดับ small scale จึงน่าที่จะเพียงพอ การทำ 2-acetyl-1-pyrroline ที่ได้จากการสังเคราะห์ให้บริสุทธิ์โดยการกลั่นอาจไม่จำเป็น เนื่องจากสามารถใช้สารดังกล่าวในเทคนิค GC ในสภาพสารละลายได้ อีกทั้งการกลั่นสารอินทรีย์ที่มีจุดเดือดต่ำมาก ต้องอาศัยชุดอุปกรณ์ที่เหมาะสม ตลอดจนประสบการณ์และความระมัดระวังเป็นพิเศษ ขั้นตอนการสังเคราะห์ 2-acetyl-1-pyrroline ในงานวิจัยนี้จึงหันมาใช้วิธีการแยกโดยการสกัดแทนการกลั่น ซึ่งแตกต่างไปจากวิธีของ Buttery และคณะ ดังจะได้กล่าวถึงในรายละเอียดต่อไป

การสังเคราะห์ 2-acetyl-1-pyrroline

การสังเคราะห์ 2-acetyl-1-pyrroline ซึ่งเป็นสารหอมที่มีรายงานพบในพันธุ์ข้าวหอมและพันธุ์ข้าวไม่หอมบางพันธุ์ (Buttery, *et al.*, 1983) เพื่อนำมาใช้เป็นสารมาตรฐานในการบอกชนิดและปริมาณของสารดังกล่าวที่อาจพบในตัวอย่างสารสกัดด้วยไอน้ำของข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่ทำการทดลองและเพื่อใช้ในการทดสอบกลิ่นของสารดังกล่าวโดยวิธีการดมกลิ่น วิธีการสังเคราะห์แสดงใน Figure 1.1 ซึ่งเป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Buchi และ Wuest (1971) และ Buttery และคณะ (1982) โดยใช้ 2-acetylpyrrole เป็นสารตั้งต้นทำปฏิกิริยารีดักชั่น (hydrogenation)[1] โดยมี rhodium-on-alumina เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ให้ผลผลิตเป็น 2-(1-hydroxyethyl)-pyrrolidine ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 115 ลักษณะเป็นของเหลวใสค่อนข้างหนืดมีกลิ่นหอมใกล้เคียงกับกลิ่นใบเตย เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย mass spectrometer (MS) และ nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) ให้ EI mass spectrum ดังแสดงใน Figure 1.3 และ ^{1}H-NMR spectrum แสดงใน Figure 1.4

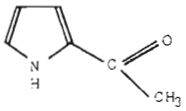
สาร 2-(1-hydroxyethyl)-pyrrolidine เมื่อนำมาทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นกับ silver carbonate (on celite) ในสารละลายของ benzene ภายใต้บรรยากาศของก๊าซ N_2 จะให้ผลผลิตหนึ่งเป็น 2-acetyl-1-pyrroline ซึ่งสามารถสกัดออกมาจากตัวทำละลาย benzene โดยใช้สารละลาย 1.0 M HCl จากนั้นทำสารละลายกรดให้เป็นเบสเล็กน้อยด้วยสารละลาย 5 M NaOH และสกัด 2-acetyl-1-pyrroline จากสารละลายเบสด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ dichloromethane จากนั้นทำการระเหยตัวทำละลาย dichloromethane ออกโดยใช้ vacuum rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 28 °C จนได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมแล้วจึงนำสารสังเคราะห์ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC/MS ซึ่งจะได้ reconstructed total ion chromatogram (RIC)[2] ดังแสดงใน Figure 1.5 (A) และ mass spectrum แสดงใน Figure 1.5 (B)

หากต้องการสารสังเคราะห์ 2-acetyl-1-pyrroline เพื่อนำมาทดสอบความหอมโดยวิธีการดม สามารถทำได้โดยการเติมสารละลาย 5 M NaOH ลงในสารละลาย 1.0 M HCl ที่ใช้สกัด 2-acetyl-1-pyrroline จากตัวทำละลาย benzene ในขั้นตอนสุดท้ายของปฏิกิริยาการสังเคราะห์ และควบคุม pH ให้เป็นกลาง ส่วนความเข้มข้นหรือปริมาณของ 2-acetyl-1-pyrroline อาจหาได้โดยใช้เทคนิค GC หรือ GC/MS โดยวิเคราะห์ควบคู่ไปกับ internal standard

ดังที่ได้กล่าวมาแล้วเกี่ยวกับสมบัติของสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ซึ่งเป็นสารระเหยที่มีจุดเดือดต่ำมาก ถ้าสารนี้อยู่ในสภาพบริสุทธิ์จะต้องเก็บในภาชนะที่ปิดมิดชิดและที่อุณหภูมิต่ำ (น้อยกว่า -20 °C) จึงสามารถป้องกันการระเหยหายไปของสารได้ อีกวิธีหนึ่งคือการเก็บไว้ในสภาพสารละลายเช่น ในสารละลายกรดอ่อน หรือในตัวทำละลาย benzene ก็เป็นวิธีที่สะดวกและสามารถยืดอายุการเก็บสารหอมนี้ได้ระยะหนึ่ง

[1] ปฏิกิริยา hydrogenation เป็นการทำปฏิกิริยาระหว่างก๊าซ H_2 กับสารตั้งต้นโดยมีตัวเร่งปฏิกิริยาที่เหมาะสม เช่น โลหะ Rhodium ในการทำปฏิกิริยาที่ใช้ปริมาณสารไม่มากนักหรือในระดับ small scale อาจจัดปฏิกิริยาใน reaction flask ขนาดเล็กและบรรจุก๊าซ H_2 ใน gas bag หรือ balloon (ลูกโป่งยาง) ซึ่งต่อเข้ากับ reaction flask โดยตรงผ่าน 3-way tab ดังแสดงใน Figure 1.2 หากบรรจุ H_2 ใน gas bag อาจใช้หนังสติ๊กรัดรอบ gas bag เพื่อให้เกิดความดันของก๊าซที่เพียงพอ

[2] RIC คือข้อมูลแสดงผลการแยกองค์ประกอบในสารตัวอย่างเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC/MS



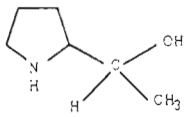
2-acetylpyrrole (700 mg) + methanol 20 mL

Hydrogenation: - 5% Rhodium on alumina powder (1.0 g)

- 10 psi H_2

Filtration: - to remove powder

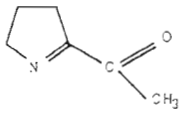
Rotary evaporation: - removal of solvent



2-(1-hydroxyethyl) pyrrolidine (600 mg) + stirred suspension of silver carbonate on celite (3.2 g in 30 mL benzene)

Reflux: - under N_2 for 15 hr

Filtration: - to remove Ag_2CO_3



2-acetyl-1-pyrroline

(in benzene solution)

- extraction into 1.0 M HCl
- neutralization with 5 M NaOH
- extraction into CH_2Cl_2
- removal of solvent

Analysis

by spectroscopic techniques

Figure 1.1 แสดงขั้นตอนการสังเคราะห์สารหอม 2-acetyl-1-pyrroline

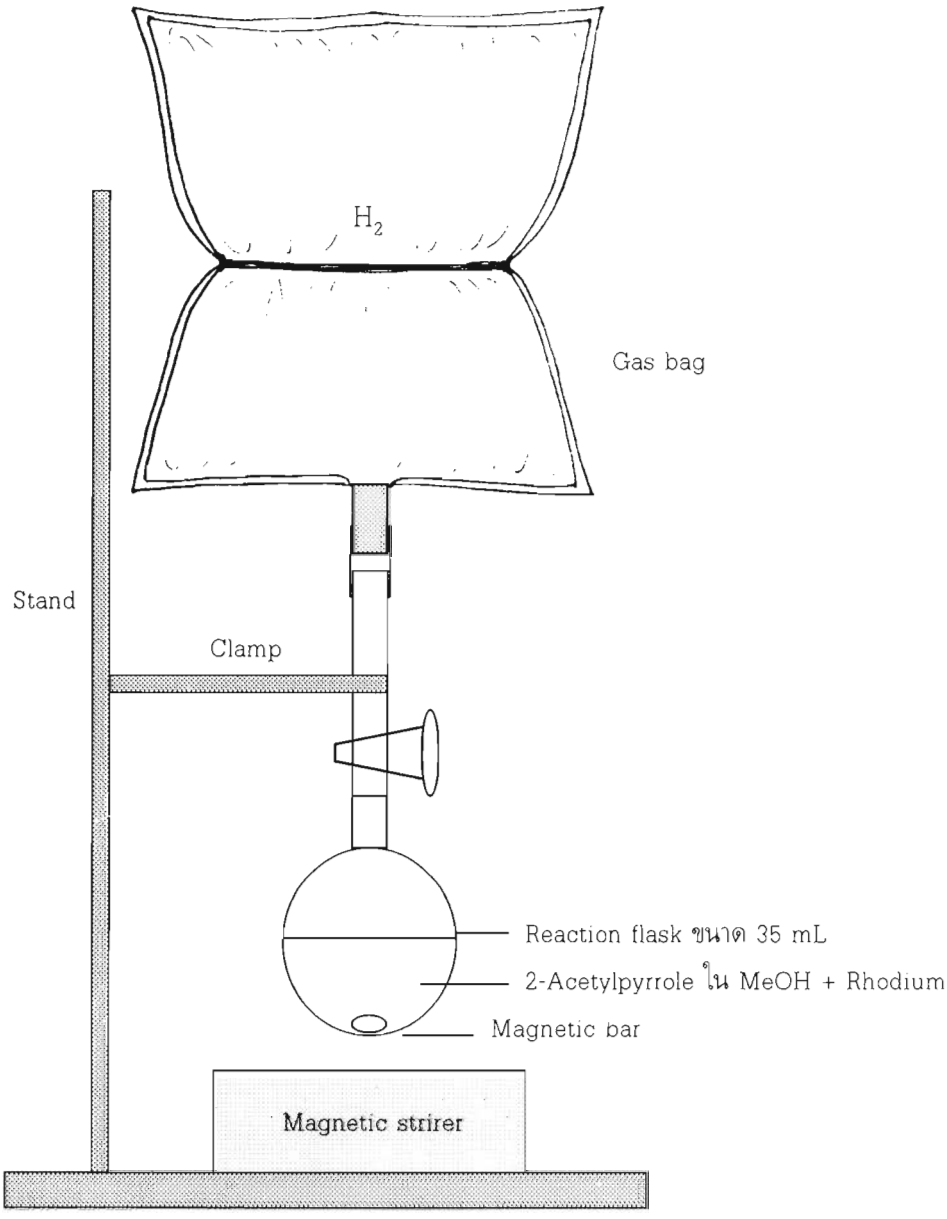


Figure 1.2 แสดงชุดอุปกรณ์แบบง่ายในการทำปฏิกิริยา Hydrogenation

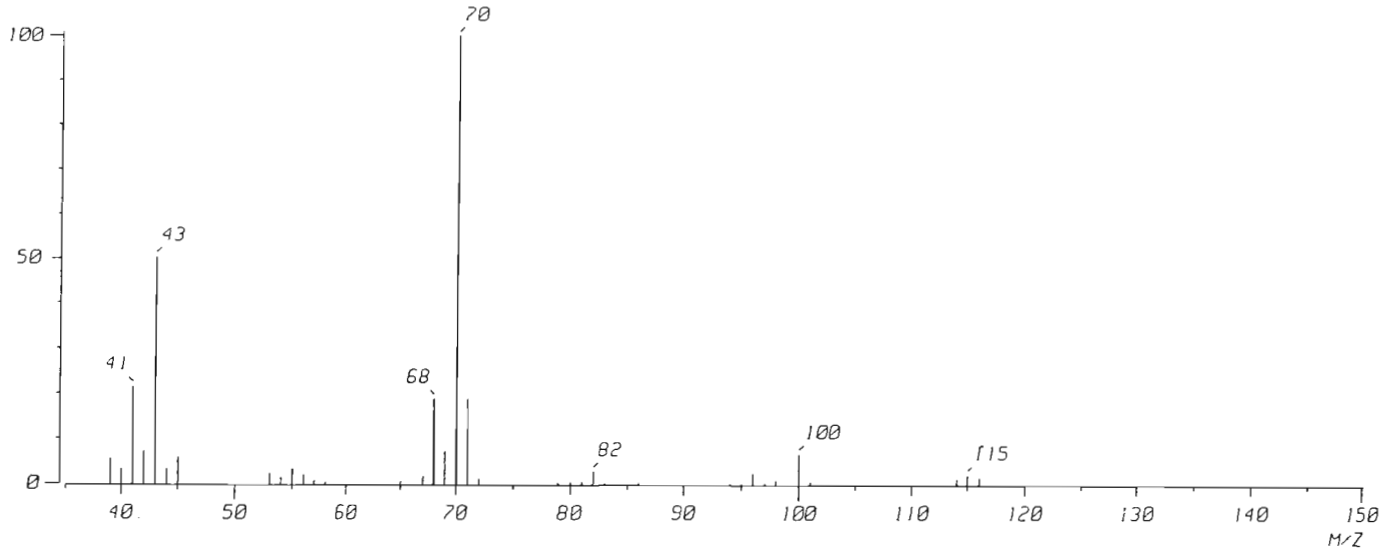


Figure 1.3 Mass spectrum of 2-(1-hydroxyethyl)-pyrrolidine.

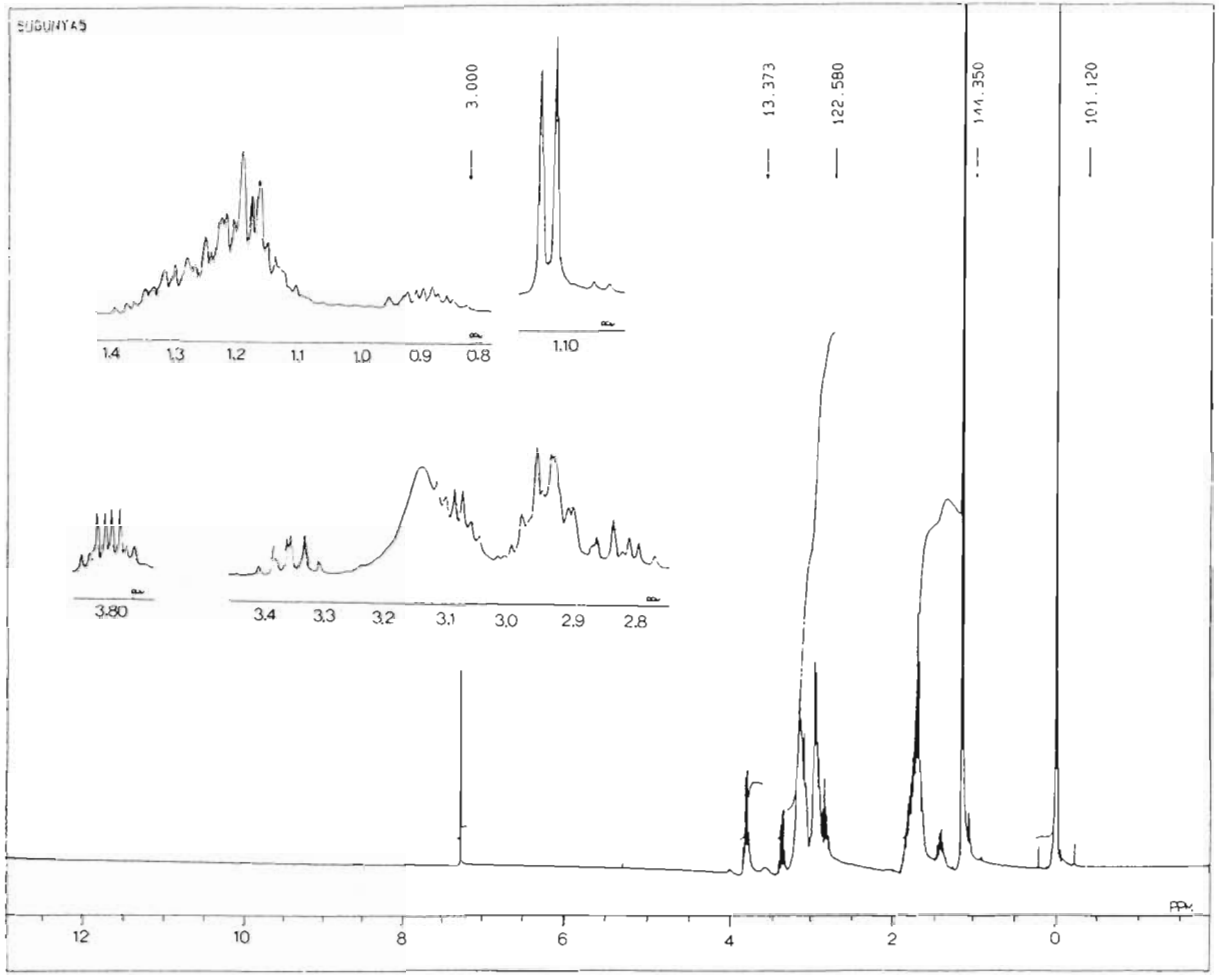


Figure 1.4 ^{1}H NMR spectrum of 2-(1-hydroxyethyl)-pyrrolidine

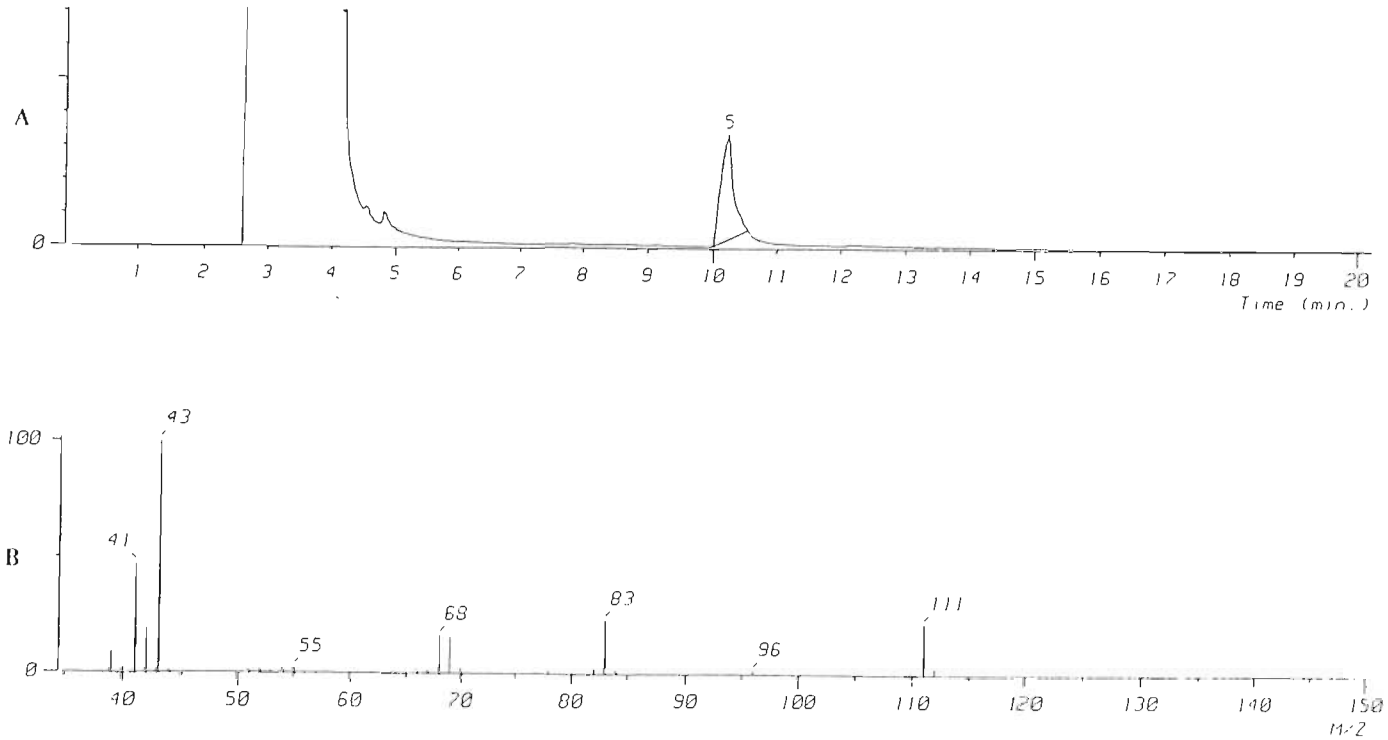


Figure 1.5 (A) Reconstructed total ion chromatogram of the synthetic 2-acetyl-1-pyrroline
(B) Mass spectrum of the synthetic 2-acetyl-1-pyrroline

การสกัดสารระเหยจากตัวอย่างเมล็ดข้าวโดยเทคนิคการสกัดด้วยไอน้ำแบบง่าย

การสกัดสารระเหยจากเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 โดยวิธีการสกัดด้วยไอน้ำแบบง่ายใช้ชุดอุปกรณ์ดังแสดงใน Figure 1.6 เริ่มจากการนำตัวอย่างเมล็ดข้าวที่แกะเปลือกออกด้วยมือจำนวน 500 กรัม บรรจุลงในขวดแก้วทรงกลม 2 คอ (2-necked round bottom flask) ขนาดปริมาตร 1 ลิตรของชุดสกัด จากนั้นผ่านไอน้ำจากแหล่งผลิตไอน้ำเข้ามาที่คอด้านหนึ่งของขวดแก้วทรงกลมลงมาตามท่อแก้วจนถึงก้นขวด ที่คอขวดอีกด้านหนึ่งต่อเข้ากับหลอดสองคอและตัวควบแน่น (condenser) ปลายด้านหนึ่งของตัวควบแน่นต่อเข้ากับขวดเก็บ distillate ที่แช่อยู่ในภาชนะซึ่งบรรจุน้ำแข็งผสมเกลือป่น ทำการผ่านไอน้ำเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ภายใต้ความดันต่ำหรือจนได้ distillate ปริมาตร 400 mL จากนั้นแบ่ง distillate ที่ได้มาจำนวน 200 mL นำมาสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ dichloromethane ปริมาตร 200 mL สองครั้ง แยกเก็บชั้นของ dichloromethane ที่ได้จากการสกัดทั้งสองครั้งซึ่งมีปริมาตรรวมประมาณ 400 mL มาระเหย dichloromethane ออกโดยใช้ vacuum rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 28 °C จนสารสกัดมีปริมาตร 2 mL

นำ distillate อีกส่วนหนึ่งซึ่งมีปริมาตร 200 mL มาสกัดและระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ dichloromethane ออกโดยวิธีการภายใต้สภาวะเดียวกันกับข้างต้น จนเหลือสารสกัดมีปริมาตร 2 mL เช่นกัน จากนั้นนำสารสกัดสุดท้ายที่ได้ทั้งสองครั้งมารวมกันและทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนมีปริมาตรลดลงเหลือ 0.1 mL จึงนำไปวิเคราะห์ทันทีด้วยเทคนิค capillary gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) สารสกัดที่เหลือจากการวิเคราะห์ด้วย GC/MS นี้นำมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอีกเป็นเวลานาน 7 วัน หรือจนกลิ่นหอมหมดไป จึงนำมาเติมตัวทำละลาย และวิเคราะห์อีกครั้งด้วยเทคนิค GC/MS ภายใต้สภาวะเดียวกัน

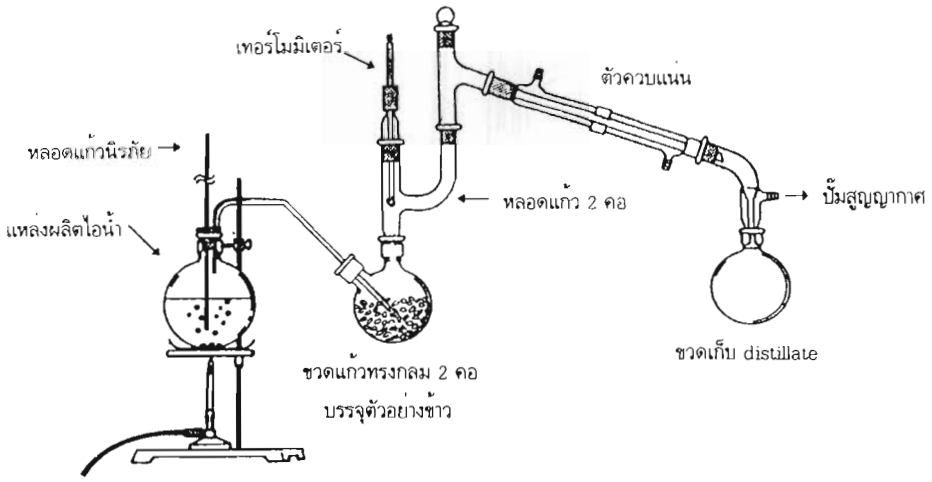


Figure 1.6 ชุดอุปกรณ์สำหรับการกลั่นด้วยไอน้ำแบบง่าย

การสกัดสารระเหยจากเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 โดยวิธีการสกัดด้วยไอน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์แบบต่อเนื่อง

การสกัดสารระเหยจากเมล็ดข้าวกล้องพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 โดยวิธีการสกัดด้วยไอน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์แบบต่อเนื่อง (continuous steam distillation and solvent extraction) ใช้ชุดสกัดด้วยไอน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์แบบต่อเนื่อง (continuous steam distillation and solvent extraction device) ซึ่งดัดแปลงมาจากชุดสกัดสารระเหยมีพิษตกค้างในตัวอย่างน้ำและดินดังที่แสดงใน Figure 1.7

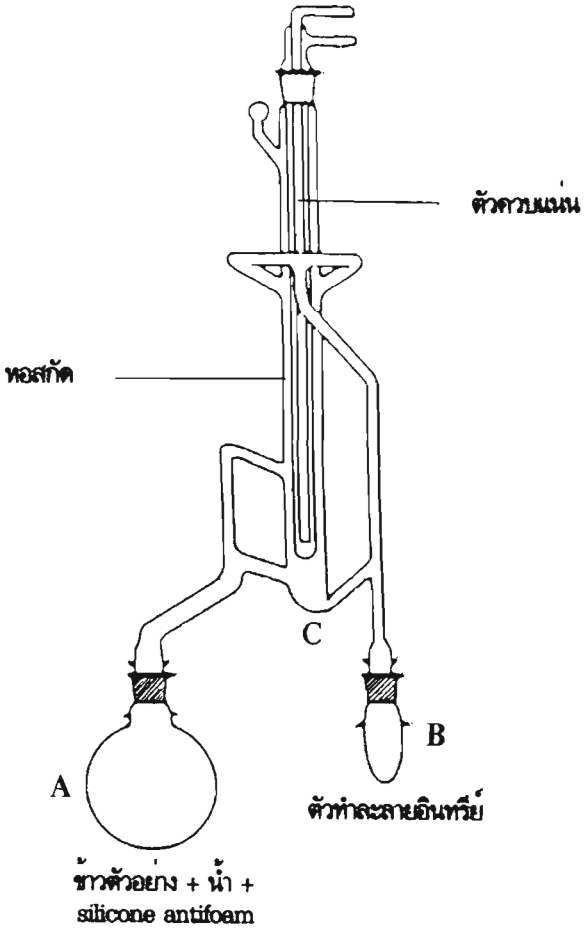


Figure 1.7 ชุดสกัดสารระเหยด้วยไอน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์แบบต่อเนื่อง

นำข้าวกล้องพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งแกะเปลือกออกด้วยมือ มาบดให้ละเอียดเป็นผงด้วยเครื่องบดไฟฟ้า แล้วบรรจุผงข้าวน้ำหนัก 50 กรัม ลงในขวดแก้วทรงกลมขนาดปริมาตร 250 mL (A) ของชุดสกัด จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 mL และสารละลายของ silicon antifoam (วิธีเตรียมในภาคผนวก) ปริมาตร 20 mL แล้วนำมาต่อเข้ากับคอด้านหนึ่งของหอสกัด ส่วนที่คออีกด้านหนึ่งของหอสกัดต่อเข้ากับขวดแก้วทรงกลมรีขนาดปริมาตร 40 mL (B) ที่บรรจุตัวทำละลายอินทรีย์ dichloromethane ปริมาตร 30 mL ไว้ เมื่อผ่านน้ำเย็นที่มีอุณหภูมิประมาณ 10 °C ไปยังตัวควบแน่นแล้วเป็นเวลา 10 นาที จึงเริ่มให้ความร้อนในช่วงอุณหภูมิ 120-150 °C แก่ขวดแก้วทรงกลมที่บรรจุตัวอย่างข้าวพร้อมกับกวนตัวอย่างสม่ำเสมอโดยใช้ magnetic stirrer และเมื่อสารละลายของตัวอย่างข้าวในขวดทรงกลมเริ่มเดือด จึงให้ความร้อนประมาณ 45 °C แก่ขวดแก้วทรงกลมรีที่บรรจุตัวทำละลายอินทรีย์ dichloromethane ในขณะเดียวกันอาจใช้ลมร้อนจากที่เป่าผม (hair dryer) ช่วยให้ความร้อนแก่แขนทั้งสองข้างของหอสกัดที่ต่อกับขวดแก้วที่บรรจุสารตัวอย่างและที่บรรจุตัวทำละลายอินทรีย์เพื่อช่วยให้ไอน้ำและไอของ dichloromethane ผ่านไปยังตัวควบแน่นโดยสะดวก

เมื่อสังเกตุเห็นน้ำและ dichloromethane ควบแน่นลงมาแยกชั้นกันอยู่ที่ส่วน C ของหอสกัดอย่างต่อเนื่องสม่ำเสมอ จึงปล่อยให้การทำงานของชุดสกัดดำเนินต่อไปเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จึงหยุดให้ความร้อน จากนั้นนำสารละลายในขวดแก้วทรงกลมรี (B) มาระเหยตัวทำละลาย dichloromethane ออกโดยใช้ vacuum rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 28 °C จนเหลือปริมาตร 1 mL แล้วนำสารละลายบรรจุในขวดเก็บตัวอย่าง (sample vial) โดยไม่ปิดฝาและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเหลือปริมาตร 0.1 mL จึงนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบของสารระเหยด้วยเทคนิค capillary GC/MS

การวิเคราะห์สารหอมในสารสกัดจากเมล็ดข้าวด้วยเทคนิค GC/MS

สารสกัดที่ได้จากการสกัดเมล็ดข้าวหอมด้วยไอน้ำนั้นมีองค์ประกอบของสารระเหยชนิดต่างๆ รวมกันอยู่เป็นจำนวนมาก ซึ่งไม่สามารถแยกแต่ละองค์ประกอบให้บริสุทธิ์จากกันเพื่อนำไปศึกษาโครงสร้างทางเคมีได้ วิธีการหนึ่งที่ใช้ในการศึกษาโครงสร้างทางเคมีหรือชนิดของแต่ละองค์ประกอบในสารสกัดที่มีความซับซ้อนนั้นจำเป็นต้องอาศัยเทคนิคควบระหว่างวิธีทาง chromatography ซึ่งให้ผลในทางการแยกองค์ประกอบของสารสกัดออกจากกัน และวิธีทาง spectroscopy ซึ่งจะให้ผลออกมาเป็นข้อมูลที่สามารถแปลเป็นโครงสร้างทางเคมีได้ เช่น mass spectrometry หรือ infrared spectroscopy เทคนิคควบ gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) นับเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการศึกษาและวิเคราะห์สารหอมในเมล็ดข้าวด้วยเหตุผลดังที่กล่าวมา ถึงแม้ข้อมูลที่ได้จาก mass spectra เพียงอย่างเดียวอาจไม่เพียงพอในการหาโครงสร้างทางเคมีที่แน่นอนของสารระเหยบางสารได้ก็ตาม

การวิเคราะห์สารหอมในเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเทคนิค GC/MS ในงานวิจัยนี้อาศัยการวิเคราะห์องค์ประกอบทั้งหมดในสารสกัดเปรียบเทียบกัน ระหว่างองค์ประกอบในสารสกัดที่สดและมีกลิ่นหอมกับองค์ประกอบในสารสกัดเดิมแต่ปล่อยทิ้งไว้ให้สารหอมระเหยไปจนไม่มีความหอมเหลืออยู่ องค์ประกอบที่หายไปในการวิเคราะห์สารสกัดทั้งสองเปรียบเทียบกันจึงคาดได้ว่าเกี่ยวข้องกับความหอมของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเมื่อทราบโครงสร้างทางเคมีขององค์ประกอบเหล่านี้แล้ว จึงนำมาทำการประเมินค่าความหอมโดยวิธีการดม (sensory evaluation) ต่อไป

การวิเคราะห์สารสกัดจากเมล็ดของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 โดยเทคนิค gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) นั้น ส่วนของ gas chromatograph ใช้รุ่น HP 5890A ผลิตโดยบริษัท Hewlett-Packard ประเทศสหรัฐอเมริกา GC column เป็นแบบ fused silica capillary ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.25 mm

ความยาว 30 เมตร เคลือบด้วยเฟสคงที่ (stationary phase) คือ 5% Biphenyl : 95% Dimethylpolysiloxane (DB-5) ผลิตโดยบริษัท J&W Scientific Co, Ltd. ประเทศสหรัฐอเมริกา ส่วน GC column อีกอันหนึ่งเป็นแบบ Amine bonded fused silica capillary ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.25 mm และความยาว 30 เมตรเช่นกัน ใช้ก๊าซฮีเลียมบริสุทธิ์เป็นตัวพา อุณหภูมิของ injector ตั้งไว้ที่ 280 °C ทำงานในระบบ split mode ส่วนอุณหภูมิของคอลัมน์ตั้งไว้ในแบบ temperature program โดยมีรายละเอียดของ program ขึ้นกับสารสกัดแต่ละตัวอย่าง

ส่วนของ mass spectrometer เป็นแบบ double-focusing magnetic sector mass spectrometer รุ่น JMX-DX 505WA ผลิตโดยบริษัท JEOL Ltd. ซึ่งต่อเข้ากับ gas chromatograph โดยตรง (direct interface) ผ่านส่วนเชื่อมต่อ (interface line) ซึ่งตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 250 °C ion source ของ mass spectrometer ทำงานที่อุณหภูมิ 200 °C ในระบบ electron impact ionization (EI) โดยมีพลังงานเฉลี่ยของอิเลคตรอนเท่ากับ 70 eV และความต่างศักดิ์ของ repeller เท่ากับ 3000 kV

สารสกัดจากเมล็ดข้าวกล้องพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่สกัดโดยวิธีการสกัดด้วยไอน้ำแบบง่าย เมื่อทำสารสกัดให้เข้มข้นจนเหลือปริมาตร 0.1 mL ได้สารสกัดที่มีกลิ่นหอมซึ่งเป็นกลิ่นที่เป็นลักษณะเฉพาะของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และเมื่อนำมาวิเคราะห์ทันทีด้วยเทคนิค capillary GC/MS โดยใช้คอลัมน์ DB-5 และ temperature program เริ่มต้นที่อุณหภูมิ 45 °C จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิขึ้นด้วยอัตราเร็ว 2 °C ต่อนาที จนถึงอุณหภูมิ 200 °C และคงอุณหภูมิไว้ที่ 200 °C เป็นเวลา 20 นาที ให้ผลของการแยกองค์ประกอบสารระเหยในสารสกัดของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 แสดงโดย reconstructed total ion chromatogram (RIC) ใน Figure 1.8 สารสกัดเดียวกันนี้เมื่อปล่อยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (20 °C) เป็นเวลานาน 7 วัน จนกลิ่นหอมหายไป(ตรวจสอบโดยการดม) จากนั้นปรับปริมาตรให้เท่าเดิม โดยเติมตัวทำละลายแล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค capillary GC/MS ภายใต้สภาวะเดียวกันให้ RIC แสดงใน Figure 1.9 A ส่วน Figure 1.9 B เป็น RIC ที่ได้จากการวิเคราะห์สารสกัดจากเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ได้มาจากแหล่งเดียวกันกับในการทดลองแรก แต่เป็นเมล็ดที่แกะเปลือกออกแล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 5 เดือน จึงนำมาทำการสกัดด้วยไอน้ำตามวิธีเดิม ข้อมูลเกี่ยวกับชนิดและโครงสร้างทางเคมีและรายละเอียดของ mass spectra ของแต่ละสารระเหยที่เป็นองค์ประกอบของสารสกัดแสดงอยู่ใน Table 1.1

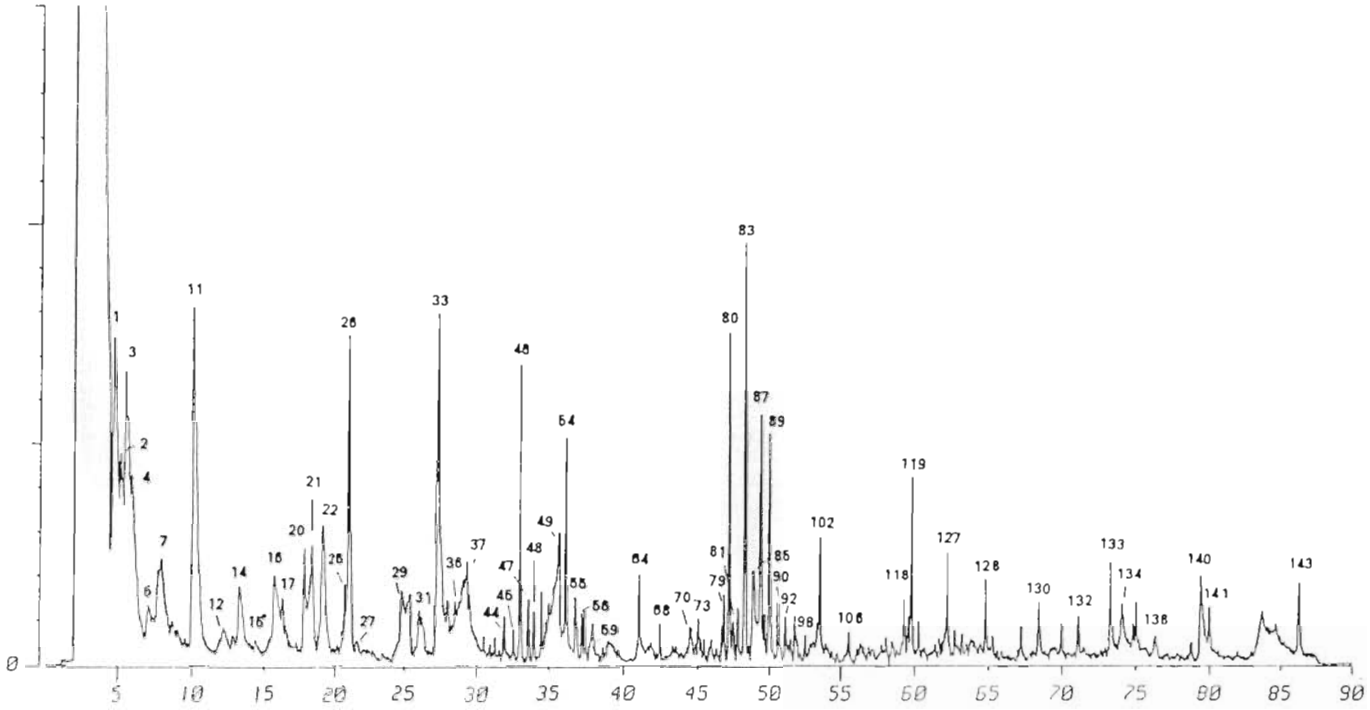


Figure 1.8 Reconstructed total ion chromatogram obtained by capillary GC/MS of steam distillate extract from uncooked brown rice of Khao Dawk Mali 105

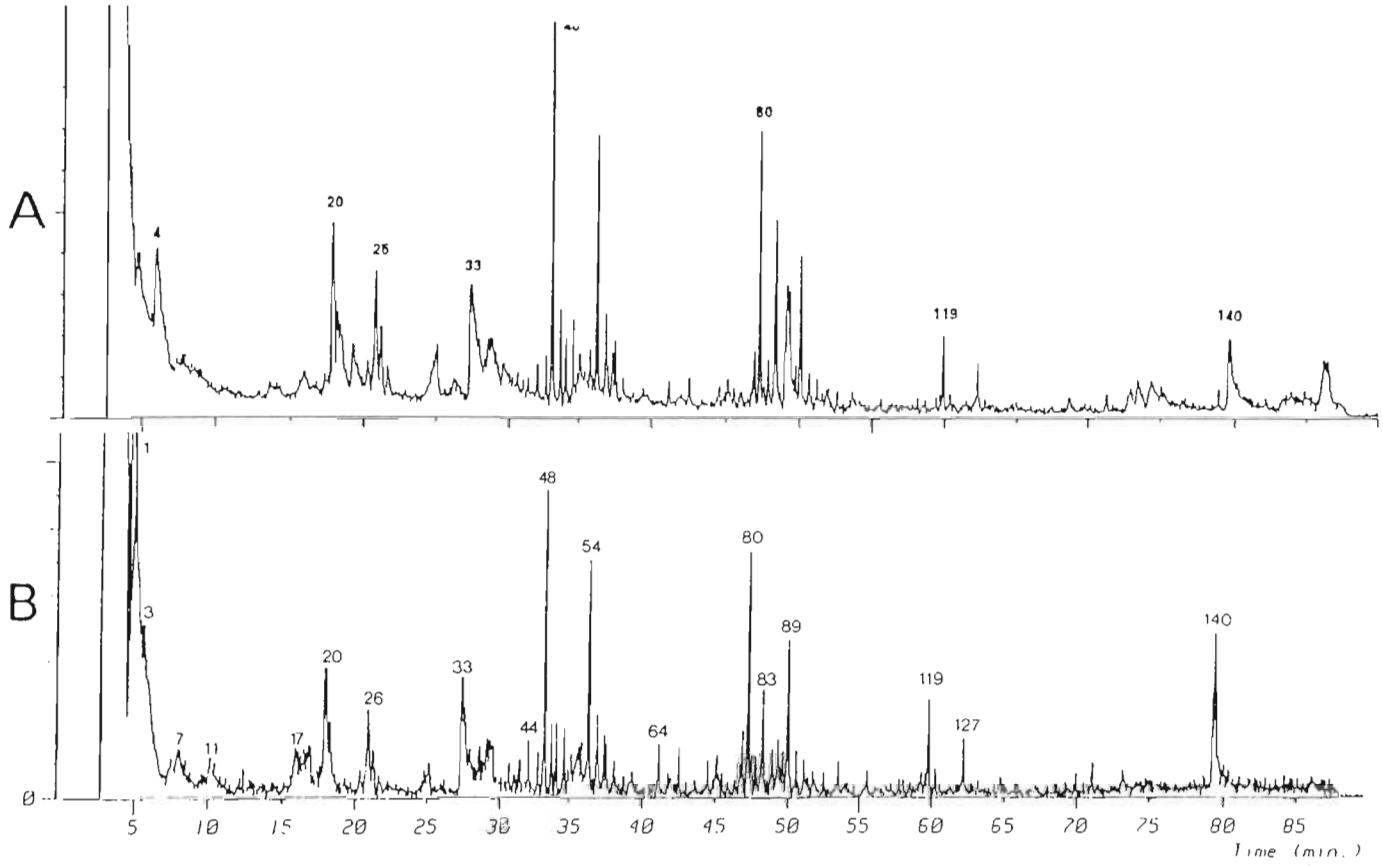


Figure 1.9 Reconstructed total ion chromatogram obtained by capillary GC/MS of

(A) The same extract as in Figure 1.8 but left at room temperature for 7 days

(B) "Old brown rice" left for 5 months before extraction

Table 1.1 Structural assignments and EI mass spectral data obtained by capillary GC/MS of steam distillate extract from uncooked brown rice of Khao Dawk Mali 105

Component	Structure	m/z (% relative intensity)
1	1,3,5-Cycloheptadiene	94(2),95(54),91(100),90(3),89(4),65(26),63(7),39(8)
2	Ester of carbonic acid	131(2),91(6),63(18),45(100)
3	Hexanal	100(3),87(2),82(16),72(15),56(74),44(100),41(28)
4	Unknown	170(1),101(1),85(4),73(15),61(17),43(100),41(10)
5	Unknown	62(100),61(97),46(79),44(16)
6	Benzene,1,4-dimethyl	107(6),106(55),105(33),92(9),91(100),78(6),77(13), 52(9),45(6),43(3)
7	? 1-Pentene,2-methoxy	100(56),85(71),74(56),72(88),59(59),57(100),56(89), 52(57),47(79),45(53),43(64),41(7),39(20)
11	2-Acetyl-1-pyrroline	111(16),83(18),69(15),68(15),43(100),42(23),41(39)
14	Unknown	111(1),100(2),85(8),72(15),57(100),43(15)
16	Cyclohexanol derivative	134(7),118(3),98(13),80(33),57(100),54(7),42(4)
20	Long chain hydrocarbon	170(3),155(2),127(8),113(14),99(7),85(43),71(86), 57(92),43(100),41(12)
21	Isocyanato methyl benzene	133(100),127(4),105(31),104(52),91(8),90(4),89(10), 78(24),51(12)
22	Cycloalkane	153(2),110(4),83(38),69(67),68(20),56(100),43(33), 42(30),41(48)
25	Unknown	128(25),114(17),113(6),112(26),107(27),97(23), 88(19), 71(100),63(10),59(17),54(28)
26	Nonanal	127(3),124(6),114(9),98(40),82(28),70(50),57(100), 43(94),41(70),40(39),39(14)
29	Unknown	136(8),122(9),109(13),98(20),88(92),70(35),58(15), 43(100)
31	? Nonanol	139(3),110(5),97(15),83(21),69(55),56(80),44(18), 43(48),42(22),41(38),40(100)
32	? Naphthalene	129(4),128(100),127(18),126(11),102(13),86(8),76(12), 64(19),63(10),51(25),47(10),44(13),41(37),40(29)
33	Ethanol, 2(2-butoxy ethoxy)	132(5),101(3),89(8),87(7),75(13),57(100),45(92),41(28)
36	Organic acid	169(4),144(7),127(6),95(10),87(29),73(37),60(100), 41(26),39(5)
37	Unknown	169(13),144(20),127(19),116(13),95(14),87(55), 71(60),57(100),56(11),55(25),43(74)
44	?? Undecane, 4-ethyl	164(7),155(15),141(16),137(8),113(22),99(25), 85(55),71(60),57(100),56(11),55(25),43(74)
45	?? Tetradecane, 2-methyl-	169(23),140(7),129(7),113(26),99(9),85(38),69(12), 68(10),57(100),43(71)

Table 1.1 (Cont.)

Component	Structure	m/z (% relative intensity)
46	?? Dodecane,2,7,10-trimethyl	169(2),155(5),141(27),127(9),113(11),99(9),85(61), 84(12),71(100),57(92),43(84),41(12)
47	Unknown (Branched chain alkane)	212(3),169(3),155(4),113(17),99(13),85(50),71(100), 57(98),43(95)
48	Unknown (Branched chain alkane)	212(4),158(3),155(5),127(12),120(10),99(19),85(39), 71(100),57(74),43(64)
49	Unknown (Branched chain alkane)	212(4),183(4),155(9),141(6),113(16),99(12),85(70), 71(100),57(84),43(63)
54	Unknown (Branched chain alkane)	212(2),155(7),127(14),113(12),85(51),71(100),57(92), 43(85)
55	?? Tetradecane, 5-methyl	212(4),197(3),169(5),155(6),127(18),99(13),85(61), 71(97),57(92),43(100)
56	Unknown (Branched chain alkane)	209(7),208(7),193(7),169(7),167(7),141(19),127(11), 113(19),99(14),85(35),71(100),57(72),43(68)
59	? Nonane, 5-methyl-5-propyl	141(19),127(21),113(17),94(9),85(61),71(83),57(85), 43(100)
64	Dodecane,2,5-dimethyl-	198(12),155(5),141(10),113(11),99(9),85(22),71(58), 57(100),43(34)
68	Unknown	169(6),154(6),140(6),127(7),113(17),99(25),85(49), 71(55),57(100),48(43)
70	Unknown (Branched chain alkane)	174(9),169(13),151(20),131(11),125(11),112(16), 99(16),85(42),71(50),57(100),43(70
73	? Undecane,3,8-dimethyl-	156(9),155(7),141(12),127(14),113(18),99(21),85(40), 71(70),57(100),43(52)
79	Unknown (Branched chain alkane)	211(7),169(7),155(11),141(21),127(24),113(26), 99(33), 85(33),71(100),57(88),43(43)
80	Hexadecane,7,9-dimethyl-	254(1),169(4),155(6),140(1),127(11),113(11),99(20), 85(62),71(89),57(100),43(62)
81	? Dodecane,2,6,10-trimethyl-	211(14),168(15),166(13),141(17),127(26),126(18), 113(28),97(31),85(63),77(29),71(23),57(100),43(24)
82	? Decane,3,6-dimethyl	170(6),169(7),155(12),141(8),127(19),113(13),99(27), 85(77),71(99),57(100),43(56)
83	Phenol,2,6-bis(1,1-dimethyl ethyl)-4-methyl	220(28),205(100),177(8),161(2),145(11),131(6),105(10), 95(7),81(16),57(27),41(9)
85	? Phenol,2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-	206(19),191(100),175(8),163(9),147(3),135(4),125(6), 111(12),85(19),71(33),57(75),41(20)
87	Unknown	211(3),155(19),139(7),113(5),99(100),57(24),41(13)

Table 1.1 (Cont.)

Component	Structure	m/z (% relative intensity)
89	Branched chain alkane (? Tetradecane-4-methyl)	211(3),169(7),155(5),127(12),113(6),99(14),85(52), 71(100),57(93),43(66)
90	Branched chain alkane (? Decane,5-ethyl-5-methyl)	169(13),155(14),141(7),127(12),113(18),99(30),85(68), 71(83),57(100),43(56)
92	Unknown (Branched chain alkane)	152(11),140(10),130(6),113(19),95(6),85(43),71(100), 57(86),43(53)
93	? Phenol2,6-bis(1,1-dimethyl ethyl)-4-ethyl	234(19),219(100),192(7),174(9),159(16),131(10),107(14), 88(18),74(11),56(11),53(8),39(8)
101	Ester of organic acid	243(13),155(16),143(17),126(11),111(12),110(14),107(13), 84(12),71(100),44(8),43(6)
102	? Hexadecane	226(7),222(2),169(7),140(10),122(14),99(22),85(37), 71(43),57(100),43(74),41(23)
118	Unknown (Branched chain alkane)	175(10),169(14),141(23),125(15),115(22),105(22),99(23), 85(45),71(71),57(100),43(61)
119	? Tetradecane,5-methyl	212(4),211(4),192(7),169(9),155(10),141(3),113(26), 99(33),85(72),71(100),57(93),43(55)
127	Unknown (Branched chain alkane)	215(6),169(20),141(12),113(22),85(29),71(100),57(77), 51(41)
130	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(1-methylethyl)ester	192(5),167(6),149(100),134(7),113(8),97(5),83(15), 57(41),41(17)
132	Unknown (Branched chain alkane)	153(16),142(15),125(19),113(36),99(32),85(46),71(57), 57(100),51(21),42(18)
133	? Tricosane	324(5),239(2),211(4),169(5),141(6),127(11),113(15), 99(21),85(46),71(89),57(100),43(62)
134	1,2-Benzenedicarboxylic acid, butyl-2-methylpropylester	278(4),265(2),241(2),223(9),205(9),182(2),160(8), 149(100),135(3),104(4),93(6),77(4),56(8),40(5)
138	Unknown	324(27),310(23),309(100),203(8),185(8),146(12),133(23), 119(13),77(13),57(15),51(12)
140	? 1-Octadecene	252(6),224(9),215(7),182(7),153(8),139(11),127(11), 97(57),83(52),69(86),57(77),55(54),43(100),41(48)
143	Tetracosane	338(2),267(2),225(3),211(3),197(3),183(3),169(4),155(5), 141(7),113(14),99(16),85(45),71(72),57(100),43(48)

สารสกัดจากเมล็ดข้าวกล้องพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่สกัดโดยวิธีการสกัดด้วยไอน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์แบบต่อเนื่อง (continuous steam distillation and solvent extraction) ใช้ตัวอย่างเมล็ดข้าว 50 กรัม เมื่อนำสารสกัดเข้มข้นมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค capillary GC/MS ใช้ Amine-bonded fused silica capillary column (Amine column) และ temperature program เริ่มต้นที่อุณหภูมิ 45 °C จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิขึ้นด้วยอัตราเร็ว 2 °C ต่อนาที จนถึงอุณหภูมิ 200 °C และคงไว้ที่ 200 °C เป็นเวลา 20 นาที ได้ผลของการแยกองค์ประกอบสารระเหย (volatile compounds) ในสารสกัดแสดงโดย reconstructed total ion chromatogram (RIC) ใน Figure 1.10 และ Table 1.2 แสดงข้อมูลเกี่ยวกับ mass spectra และชนิดหรือโครงสร้างทางเคมีของสารระเหยที่เป็นองค์ประกอบของสารสกัด

สารระเหยที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดด้วยไอน้ำของเมล็ดข้าวกล้องพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ทั้งที่สกัดด้วยไอน้ำแบบง่ายและที่สกัดด้วยไอน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์แบบต่อเนื่อง และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค capillary GC/MS ที่ทราบโครงสร้างทางเคมีโดยการเปรียบเทียบ mass spectra และ retention time กับสารมาตรฐาน ได้รวมสรุปไว้ใน Table 1.3 ซึ่งจะเห็นได้ว่าองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นสารประเภท hydrocarbons และ alcohols นอกจากนี้ยังมีสารประเภท aldehydes, ketones, organic acids, esters, phenol derivatives, aromatic และ nitrogeneous compounds รวมอยู่ด้วย

เมื่อทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบสารระเหยที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดด้วยไอน้ำของเมล็ดข้าวกล้องพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (Figure 1.8) กับสารระเหยที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดเดียวกันแต่ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกลิ่นหอมซึ่งเป็นกลิ่นที่เป็นลักษณะเฉพาะของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 หมดไปจากสารสกัดนั้น (Figure 1.9 A) พบว่ามีองค์ประกอบบางตัวหายไป ซึ่งคาดว่าองค์ประกอบเหล่านั้นน่าจะมีสารระเหยที่เป็นสารให้ความหอมของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 รวมอยู่ด้วย เมื่อทำการทดลองอีกในทำนองเดียวกันโดยใช้ "ข้าวเก่า" หรือข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ได้จากแหล่งเดียวกัน หากแต่เมื่อแกะเปลือกแล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 5 เดือนก่อนทำการทดลอง พบว่ามีองค์ประกอบบางตัวหายไปเช่นกัน (Figure 1.9 B) ซึ่งสามารถสรุปองค์ประกอบสารระเหยที่คาดว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับความหอมของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ได้ อันได้แก่

- butyl cyclopropane
- diethyl carbonate
- 2-(2-propoxyethoxy) ethanol
- nonanal
- isocyanatomethyl benzene
- 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methylphenol
- butyl acetate
- 7-octen-4-ol
- hexanal
- 1,4-dimethyl benzene
- 2-acetyl-1-pyrroline

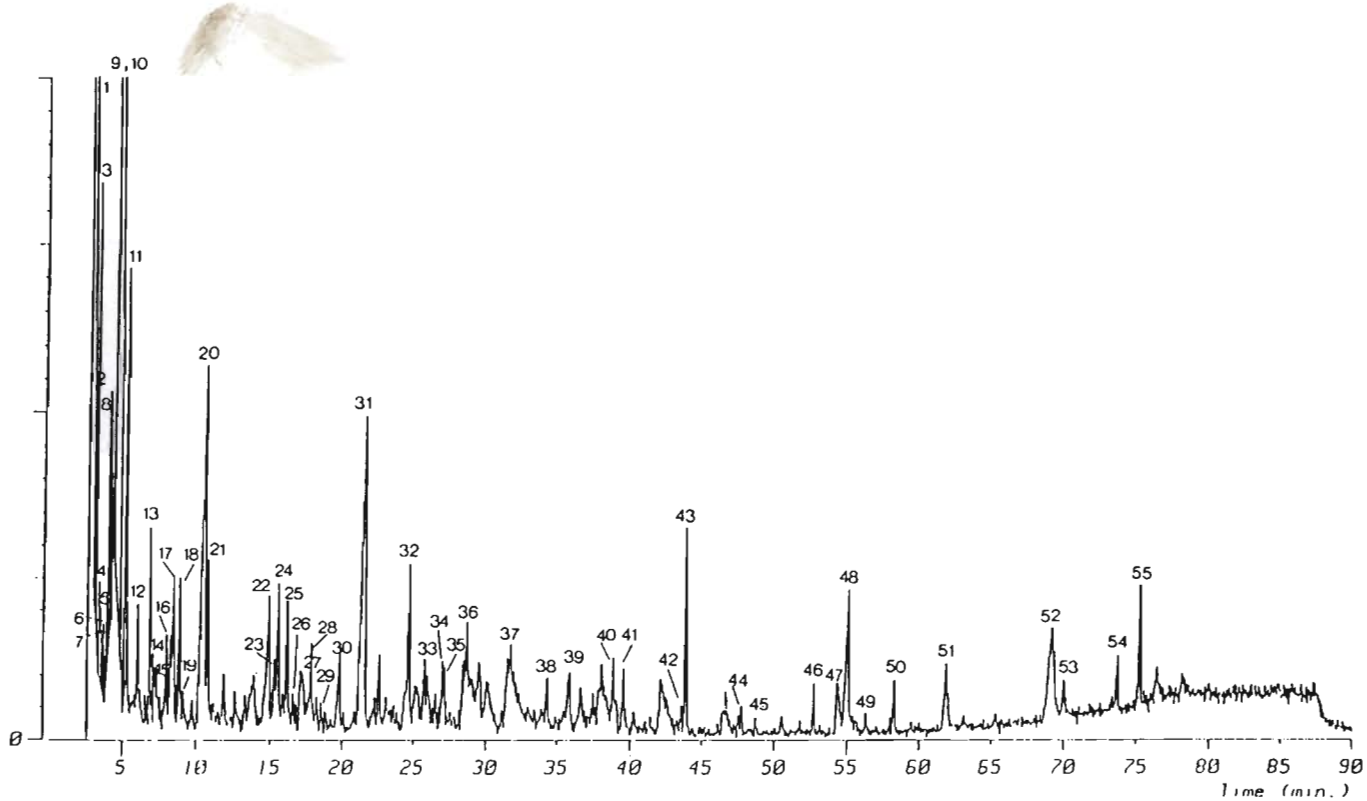


Figure 1.10 Reconstructed total ion chromatogram obtained by capillary GC/MS of extract from uncooked brown rice of Khao Dawk Mali 105 using continuous steam distillation and solvent extraction

Table 1.2 Structural assignments and EI mass spectral data obtained by capillary GC/MS of extract from cooked brown rice of Khao Dawk Mali 105 using continuous steam distillation/solvent extraction device

Component	Structure	m/z (% relative abundance)
1	Unknown	171(1),128(3),115(100),99(1),87(71),70(45),69(49),57(12) 41(15)
2	1-Methoxy-2-propanol	90(1),75(3),48(40),45(100)
3	Derivative of furan	86(15),71(100),58(13),43(29)
4	Dodecane	170(7),127(12),113(16),99(11),85(44),71(83),57(100), 43(34)
5	Branched chain alkane	120(4),104(8),87(49),69(8),59(100),45(25),43(25),41(23)
6	? 2-Butyldioxolane	129(11),73(100)
7	Unknown	120(10),105(7),70(44),66(67),42(100),41(48)
8	Hydroxy ketone	125(1),107(1),87(2),72(1),59(100),43(23),41(14)
9	Unknown	154(1),107(5),100(5),82(12),70(41),68(40),67(31),55(28), 42(18),41(100)
10	Unknown	107(4),87(11),69(13),53(2),45(100),41(34)
11	2-acetyl-1-pyrroline	111(18),83(17),69(21),56(48),55(28),43(100)
12	Unknown	206(49),191(100),149(44),135(36),121(91),98(40),83(56), 70(43),68(43),56(53)
13	Branched chain alkane	169(4),155(10),141(3),127(16),113(16),99(18),85(72), 71(100),57(98),43(84)
14	?Dodecane,4,6-dimethyl-	183(5),155(8),139(5),127(11),113(9),99(15),85(52),71(94) 57(100),43(58)
15	Branched chain alkane	169(15),123(13),111(22),99(21),85(53),71(54),57(100), 43(66),41(44)
16	Branched chain alkane	169(8),155(9),135(5),126(11),113(16),97(7),85(43), 71(100),57(77),43(36)
17	? Isomer of 18	103(35),73(26),59(100),45(24),43(27)
18	? 1-(2-Methoxy-1-methyl ethoxy)-2-propanol	103(37),73(28),),59(100),45(47),41(21)
19	Benzene derivatives	152(9),106(100),105(56),77(69),51(21),104(6),
20	1-(2-Methoxypropoxy)-2-propanol	89(1),73(8),59(100),45(9),41(9)
21	3-Methoxy-1-butanol	89(4),71(20),59(100),43(21),41(14)
22	Unknown	115(79),99(10),87(68),86(51),69(45),56(52),42(100), 41(80)
24	Unknown	126(6),105(12),100(11),76(38),70(60),59(78),55(68), 41(100)
25	5-ethyl-5-methylnonane	169(6),155(6),127(15),113(28),99(13),85(69),71(100), 57(94),43(49)
26	Branched chain alkane (? 5-Ethyl-2-methyloctane)	127(11),113(17),99(19),85(49),71(51),57(100),43(54), 41(34)

Table 1.2 (Cont'd)

Component	Structure	m/z (% relative abundance)
27	2-Propanone propylhydrazone	114(13),99(10),85(60),56(100),41(15)
28	Branched chain alkane	169(14),141(7),127(20),113(38),99(30),85(77),71(94), 57(100),43(98)
30	(? Dimethyl undecane)	226(6),169(6),141(8),113(12),99(16),85(33),71(58), 57(100),43(67)
31	2-(2-Buthoxyethoxy)ethanol	132(4),100(8),87(12),75(19),57(100),45(93),41(21)
32	1,2-Diphenylethanediol	168(3),108(91),107(79),91(18),79(100),77(54),51(29)
33	Phenol,2,6-bis(1,1-dimethyl ethyl)-4-methyl	220(27),205(100),177(5),145(9),81(26),57(59)
34	Branched chain alkane	234(8),219(35),197(13),155(10),141(11),99(32), 85(80), 71(100),57(98),43(80)
35	Branched chain alkane	251(6),169(9),155(8),141(6),111(11),99(41),85(73), 71(68), 57(100),43(83)
36	Organic acids	169(4),141(6),127(10),113(10),99(10),85(23),73(47), 71(30), 60(100),57(43)
38	Branched chain alkane	141(11),127(16),113(9),99(11),84(22),71(100),57(60), 43(47)
39	1-(2-methoxy-1-methyl ethoxy)-2-propanol	117(4),103(26),73(13),59(100),45(28),43(16)
40	Unknown (alcohol)	155(10),140(13),124(12),110(22),95(16),83(24),67(14), 59(100),58(65),43(23),41(50)
41	Phenol derivative	150(96),135(100),107(28),78(19),59(87)
43	2,4-bis(1,1-dimethylethyl)phenol	206(19),191(100),175(4),163(5),107(7),74(14),57(41), 41(10)
44	1H-Indole	118(13),117(100),90(42),63(16)
46	Phenol derivative	223(10),205(6),167(7),149(100),77(6),57(39)
47	Unknown	220(12),200(16),157(31),140(19),115(19),87(30),73(54), 57(100),41(51)
48	(E)-Octadecene	252(13),224(12),125(20),111(48),97(80),83(71),69(70), 57(100),43(60),41(77)
49	Derivative of benzaldehyde	152(34),151(100)
50	1,2-Benzenedicarboxylic acid derivative	223(9),205(6),149(100),122(5),105(5),104(4),93(3)
51	Organic acid (? Tetradecanoic acid)	228(49),185(28),129(31),73(81),60(72),43(52)
52	Organic acid (Hexadecanoic acid)	256(47),227(13),185(16),157(18),129(50),73(86), 60(69),57(68),43(100)
53	? Derivative of benzenamine	277(18),165(100),77(19)
54	? Tetracosahexaene	410(6),203(6),163(6),137(17),107(17),81(24),69(100)
55	Ester of 1,2-benzenedicarboxylic acid	279(16),167(51),149(100),112(16),113(17),71(27), 70(27),57(24),41(19)

Table 1.3 Mass spectral data obtained for volatile components identified in Khao Dawk Mali 105

Compounds	Major MS ions	Peak No.
Hydrocarbons		
pentylcyclopropane	112,84,70,69,56(100),55,43	a
4-dimethylheptane	128,85,71,57,43(100)	a
6-ethyl-2-methyloctane	127,85,71,57,43(100)	a
2,6-dimethylnonane	156,113,85,71,57,43(100)	a
undecane	156,113,85,57(100),43	73
2,5-dimethylundecane	184,113,85,71,57(100),43	a
2,10-dimethylundecane	184,113,99,85,71,57(100),43	a
dodecane	170,113,99,85,71,57(100),43	20
2,5-dimethyl dodecane	198,141,87,71,57(100)	64
2,6,10-trimethyl dodecane *	211,168,127,113,85,57(100)	
tetradecane	199,141,99,85,71,57(100),43	a
pentadecane	212,127,90,85,71,57(100)	55
2-methylpentadecane	226,183,99,85,71,57,43(100)	a
hexadecane	226,140,122,99,71,57(100)	102
7,9-dimethyl hexadecane	254,155,127,99,7157(100)	80
octadecane	252,224,139,97,69,57,43(100)	140
tricosane	324,127,113,85,71,57(100)	133
tetracosane	338,141,99,85,71,57(100)	143
1-octadecene	252,224,139,111,97,83,69,55,43(100)	140
Alcohols		
1,3-butanediol	90,75,57,45(100)	a
1-pentanol	70,57,55,42(100)	a
1-hexanol	84,69,56(100),43	a
2-cyclohexen-1-ol	98,97,83,70(100)	a
1-heptanol	98,70,55(100),43	a
1-hepten-4-ol	96,73,71,43(100)	a
(E)-2-octen-1-ol	110,95,82,68,57(100),41	a
1-nonanol	139,97,83,69,56,43,40(100)	31
benzene ethanol	122,92,91(100),65	a
2-butoxy ethanol	100,87,57(100)45	a
2-(2-propoxyethoxy) ethanol	132,89,75,57(100),45	33
1-(2-butoxyethoxy) ethanol	132,100,87,75,57,45(100)	a

a = additional volatile components analysed by Amine column.

Table 1.3 (Cont'd)

Compounds	Major MS ions	Peak No.
Aldehydes & ketones		
hexanal	100,82,72,56,44(100)	3
nonanal	127,114,98,82,70,57(100),43	26
(E)-2-nonenal	122,96,83,7055,41(100)	a
decanal	138,112,82,70,68,57(100),41	a
3-hydroxy-2-butanone	88,73,45(100),43	a
6,10-dimethyl-5,9-undecadiene-2-one	194,151,69,57,43(100)	a
1,7,7-trimethyl bicyclo 2'2'1'heptan-2-one	152,108,95(100),81,69,55,41	a
Aromatics		
methyl benzene	93,91(100),65,39	1
ethyl benzene	106,91(100),78,65,51	a
1,2-dimethylbenzene	106,91(100),77,65	a
1,3-dimethylbenzene	106,105,91(100),77,65	a
1,4-dimethyl benzene	106,105,91(100),77,52	6
naphthalene	128(100),86,64,51,41	a
Acids & esters		
ethyl carbamate	89,74,62,45,44(100)	a
octanoic acid	144,95,87,73,60(100),41	36
butyl acetate	116,87,73,56,43(100)	a
carbonic acid, diethyl ester	91,75,63,45(100)	2
1,2-benzenedicarboxylic acid, bis(1-methylethyl) ester	192,167,149(100),83,57,41	130
1,2-benzenedicarboxylic acid, butyl-2-methylpropylester	278,160,149(100),93,77,56	134
Phenolic compounds		
phenol	94(100),66,65,39	a
2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methylphenol	220,205(100),145,105,81,57	83
2,4-bis(1,1-dimethylethyl) phenol	206,191(100),111,85,71,57	8
2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol	234,219(100),159,107,88	93

a = additional volatile components analysed by Amine column.

Table 1.3 (Cont'd)

Compounds	Major MS ions	Peak No.
Nitrogeneous compounds		
2-acetyl-1-pyrroline	111,83,69,68,43(100)41	11
N,N-dimethyl formamide	73(100),44,42	a
1(1H-prrole-2-yl) ethanone	109,94(100),66,39	a
Miscellaneous		
isocyanato methylbenzene	133(133),105,104,91,89,78	21
1,2-benzisothiazole	135(100),108,91,82,63	a
benzothiazole		

a = additional volatile components analysed by Amine column.

การประเมินความหอมโดยวิธีการดม

สารระเหยที่คาดว่าน่าจะมีความเกี่ยวข้องกับความหอมของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ดังกล่าว เมื่อนำมาทดสอบกลิ่นโดยวิธีการดมโดยคณะผู้ทดสอบ (odour quality evaluation by panel judgements) จำนวน 26 คน โดยเตรียมสารละลายของสารบริสุทธิ์ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 mL ที่ความเข้มข้นต่ำที่สุดเท่าที่สารนั้นจะให้กลิ่นบรรจุในขวดพลาสติก (Teflon) ไร้กลิ่นที่มีปริมาตร 250 mL มีฝาเกลียวที่ฝามีท่อพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 cm ยาว 4 cm ต่ออยู่ เมื่อบีบขวดพลาสติกกลิ่นข้างในที่ว่างเหนือสารละลายจะผ่านออกมาตามท่อ ให้ผู้ทดสอบดมได้โดยผู้ทดสอบไม่เห็นสารละลายที่อยู่ภายในขวด จากนั้นให้ผู้ทดสอบตอบคำถามที่ว่า "สารในขวดตัวอย่างมีกลิ่นเหมือนหรือใกล้เคียงกับกลิ่นหอมของข้าวสุกพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 หรือไม่" ปรากฏว่ามี 2-acetyl-1-pyrroline เพียงสารเดียวเท่านั้นที่ผู้ทดสอบตอบว่ามีกลิ่นเหมือนหรือใกล้เคียงกับกลิ่นของข้าวสุกพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (12% ของจำนวนผู้ทดสอบทั้งหมด)

การทดลองโดยวิธีการเดียวกันเพื่อทดสอบกลิ่นของสาร 2-acetyl-1-pyrroline ที่เตรียมเป็นตัวอย่างไว้ 3 ลักษณะ คือ สารละลาย 100 mL ของ 2-acetyl-1-pyrroline ในน้ำกลั่นบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 1.0 ppm และ 0.1 ppm และสารละลาย 100 mL ของ 2-acetyl-1-pyrroline ในน้ำกลั่นบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 1.0 ppm ที่เติมข้าวพันธุ์ กข 7 ที่หุงสุกใหม่ๆ ลงไปปริมาณ 50 กรัม จากนั้นทำการทดสอบกลิ่นโดยการดมโดยคณะผู้ทดสอบจำนวน 27 คน และให้ผู้ทดสอบเขียนตอบว่าตัวอย่างในขวดพลาสติกแต่ละตัวอย่างมีกลิ่นเหมือนหรือใกล้เคียงกลิ่นอะไรมากที่สุดโดยให้ผู้ทดสอบคิดหาคำตอบเอง ผลการทดสอบปรากฏว่าผู้ทดสอบส่วนใหญ่มีความเห็นว่ากลิ่นของ 2-acetyl-1-pyrroline ในน้ำกลั่นบริสุทธิ์เหมือนกลิ่น "ใบเตย" นอกจากนี้ยังมีกลิ่นมะพร้าวน้ำหอม กลิ่นน้ำตาลสด กลิ่นข้าวหอม กลิ่นข้าว และกลิ่นมะลิ ส่วนตัวอย่างสารละลาย 2-acetyl-1-pyrroline ที่เติมข้าวพันธุ์ กข 7 ที่หุงสุกใหม่ๆ ลงไปปริมาณ 50 กรัมนั้น 76% ของจำนวนผู้ทดสอบทั้งหมดตอบว่ามีกลิ่นเหมือน "กลิ่นข้าวหอม" ดังแสดงใน Table 1.4

Table 1.4 Most often used panel odour descriptions of solutions of 2-acetyl-1-pyrroline

ตัวอย่าง	ร้อยละของผู้ทดสอบที่บอกกลิ่น					
	ใบเตย	ข้าวหอม	มะพร้าวน้ำหอม	น้ำตาลสด	ข้าว	ดอกมะลิ
สารละลาย 1.0 ppm 2-acetyl-1-pyrroline ในน้ำบริสุทธิ์	67	-	13	13	7	-
สารละลาย 0.1 ppm 2-acetyl-1-pyrroline ในน้ำบริสุทธิ์	68	10	12	-	-	10
สารละลาย 1.0 ppm 2-acetyl-1-pyrroline ในน้ำและเติมข้าวสุกพันธุ์ กข 7	16	76	8	-	-	-

นอกจากนี้ยังได้ทำการทดลองโดยนำดอกชมนาด (*Vallaris heynel*) ซึ่งเป็นดอกไม้ที่มีกลิ่นหอมคล้ายกลิ่นหอมของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 จำนวน 50 กรัม มาสกัดโดยวิธีการสกัดด้วยไอน้ำแบบง่ายและนำ distillate ที่ได้มาสกัดต่อด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ dichloromethane โดยมีรายละเอียดขั้นตอนและสภาวะการทดลองเช่นเดียวกับการสกัดใบข้าว นำสารสกัดเข้มข้นที่เตรียมได้มาทำการวิเคราะห์องค์ประกอบด้วยเทคนิค capillary GC/MS โดยใช้ Amine column และ temperature program เริ่มต้นที่อุณหภูมิ 40 °C จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิขึ้นด้วยอัตราเร็ว 2 °C ต่อนาที จนถึงอุณหภูมิ 200 °C และคงไว้ที่อุณหภูมิ 200 °C เป็นเวลา 10 นาที ได้ผลของการแยกองค์ประกอบสารระเหยแสดงโดย reconstructed total ion chromatogram (RIC) ใน Figure 1.11 ซึ่งพบว่ามีสาร 2-acetyl-1-pyrroline เป็นองค์ประกอบหลักสารหนึ่งในสารสกัดด้วยไอน้ำของดอกชมนาดเช่นกัน

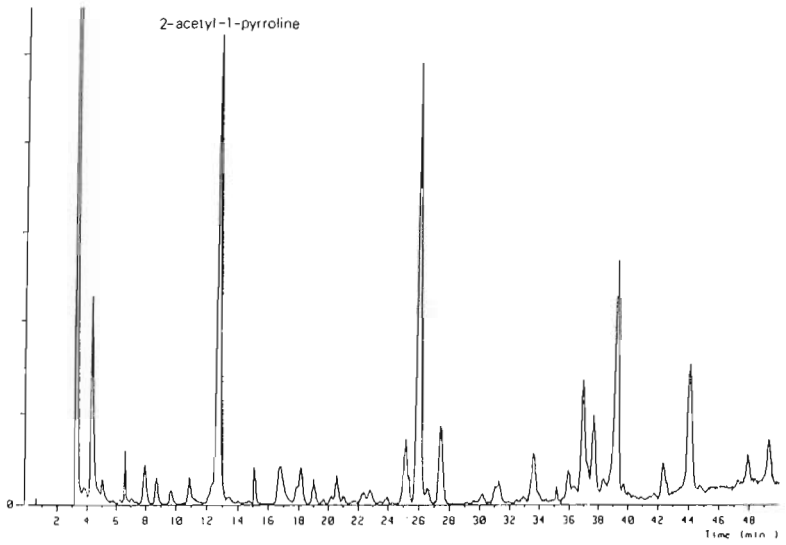


Figure 1.11 Reconstructed total ion chromatogram obtained by capillary GC/MS of steam distillate extract from Chom-Naad flower (*Vallaris heynel*)

การสกัดสารหอมจากเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 โดยวิธีการสกัดด้วยสารละลายกรด

การสกัดสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ในตัวอย่างเมล็ดข้าวด้วยสารละลายกรดนั้น คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาเพื่อพัฒนาวิธีการสกัดสารหอมให้ได้วิธีที่มีประสิทธิภาพ และสะดวก รวดเร็วกว่าวิธีการสกัดด้วยไอน้ำ โดยเน้นให้สามารถใช้เมล็ดข้าวตัวอย่างในปริมาณที่น้อยลง ทั้งนี้โดยอาศัยสมบัติความเป็นเบสของ 2-acetyl-1-pyrroline จึงถูกสกัดออกมาจากเมล็ดข้าวได้โดยใช้สารละลายกรด (1.0 M HCl) ในสารละลายกรดนั้น 2-acetyl-1-pyrroline ปรากฏอยู่ในสภาพไอออน จึงทำให้ถูกตรึงไว้ในสารละลายซึ่งมีน้ำเป็นตัวทำละลายได้โดยไม่ระเหยออกมา หรือระเหยออกมาได้น้อยมาก สารละลายกรดที่ได้จากการสกัดสารหอมในเมล็ดข้าวนี้จึงไม่ปรากฏกลิ่นหอม จากนั้นต้องทำการสกัด 2-acetyl-1-pyrroline ออกมาจากสารละลายกรดโดยทำสารละลายกรดให้เป็นกลาง หรือเป็นด่างเล็กน้อยด้วยสารละลายเบส (5M NaOH) แล้วจึงนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ dichloromethane และนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค capillary GC/MS

แผนภาพใน Figure 1.12 แสดงขั้นตอนการสกัดสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline โดยนำตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 จำนวน 3 กรัม หรือน้อยที่สุดเพียง 1 กรัม มาบดให้เป็นผงละเอียด ใส่ลงใน Erlenmeyer flask ขนาดปริมาตร 250 mL ที่บรรจุสารละลายกรด HCl 1.0 M ปริมาตร 25.0 mL จากนั้นคนสม่ำเสมอโดยใช้ magnetic stirrer เป็นเวลา 30 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้อีกเป็นเวลาประมาณ 30 นาทีเพื่อให้ตกตะกอน แล้วจึงค่อยๆ ดูดเอาสารละลายส่วนบนมากรอง(หรือหมุนเหวี่ยง) อีกครั้งเพื่อกำจัดอนุภาคของตะกอนผงข้าวทิ้งไป ให้หมดจนได้สารละลายใสพอสมควร จากนั้นนำสารละลายใสที่ได้ปริมาตร 20.0 mL มาทำให้เป็นเบสเล็กน้อย ด้วยสารละลาย 5M NaOH และสกัดต่อทันทีด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ dichloromethane ปริมาตร 20 mL สองครั้ง แยกเก็บชั้นของ dichloromethane ที่ได้จากการสกัดทั้งสองครั้งแล้วนำมารวมกัน เพื่อระเหยตัวทำละลาย dichloromethane ออกโดยใช้ vacuum rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 28 °C จนสารสกัดมีปริมาตรประมาณ 0.5 mL จากนั้นนำสารสกัดใส่ลงในขวดเก็บตัวอย่าง (sample vial) โดยไม่ปิดฝาและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนมีปริมาตร 0.1 mL จึงนำไปวิเคราะห์สารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ด้วยเทคนิค capillary GC หรือ capillary GC/MS ต่อไป

Figure 1.13 A และ 1.13 B แสดง reconstructed total ion chromatogram ของการวิเคราะห์องค์ประกอบสารสกัดจากเมล็ดข้าวโดยใช้วิธีสกัดด้วยสารละลายกรดจากตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องจำนวน 3 กรัม และ 1 กรัมตามลำดับ พบ peak ของ 2-acetyl-1-pyrroline ปรากฏอยู่ในสารสกัดจากเมล็ดข้าวเพียง 1 กรัมในปริมาณที่ตรวจวัดได้และให้ mass spectrum ที่สมบูรณ์ หากการวิเคราะห์ไม่สามารถทำได้โดยใช้ GC/MS ก็อาจใช้ capillary GC ในการวิเคราะห์ได้ ซึ่งน่าจะให้ขีดจำกัดของการตรวจสอบ (detection limit) ที่ดีกว่าการใช้ GC/MS หากแต่ต้องมีสารมาตรฐาน 2-acetyl-1-pyrroline เพื่อใช้ในการเทียบ retention time อย่างไรก็ตามข้อจำกัดของการวิเคราะห์อีกประการหนึ่งคือ คอลัมน์ที่ใช้ควรจะมีความจำเพาะเจาะจงกับ 2-acetyl-1-pyrroline ซึ่งในที่นี้ใช้ Amine bonded fused silica capillary column ซึ่งอาจมีราคาแพงกว่าเล็กน้อยแต่ให้ผลการวิเคราะห์ดีกว่าคอลัมน์ DB-1, DB-5 หรือ Carbowax

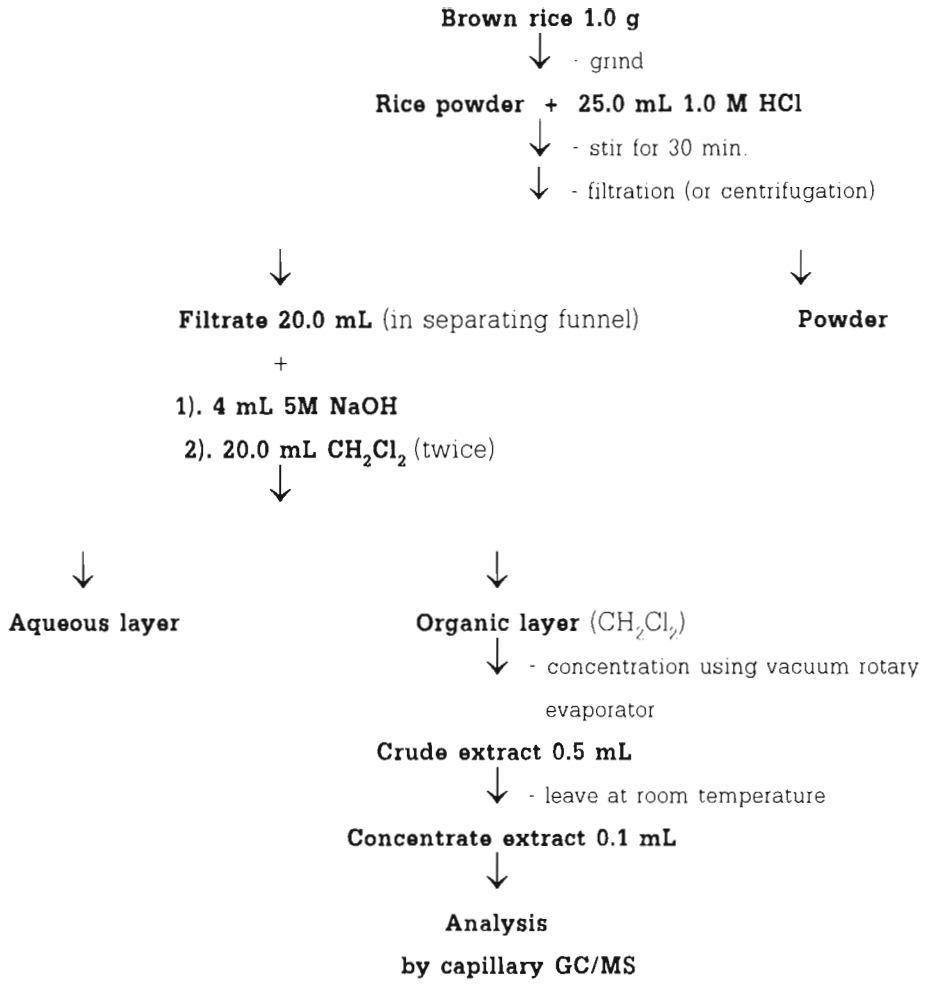


Figure 1.12 แผนภาพแสดงขั้นตอนการสกัด 2-acetyl-1-pyrroline ด้วยสารละลายกรด

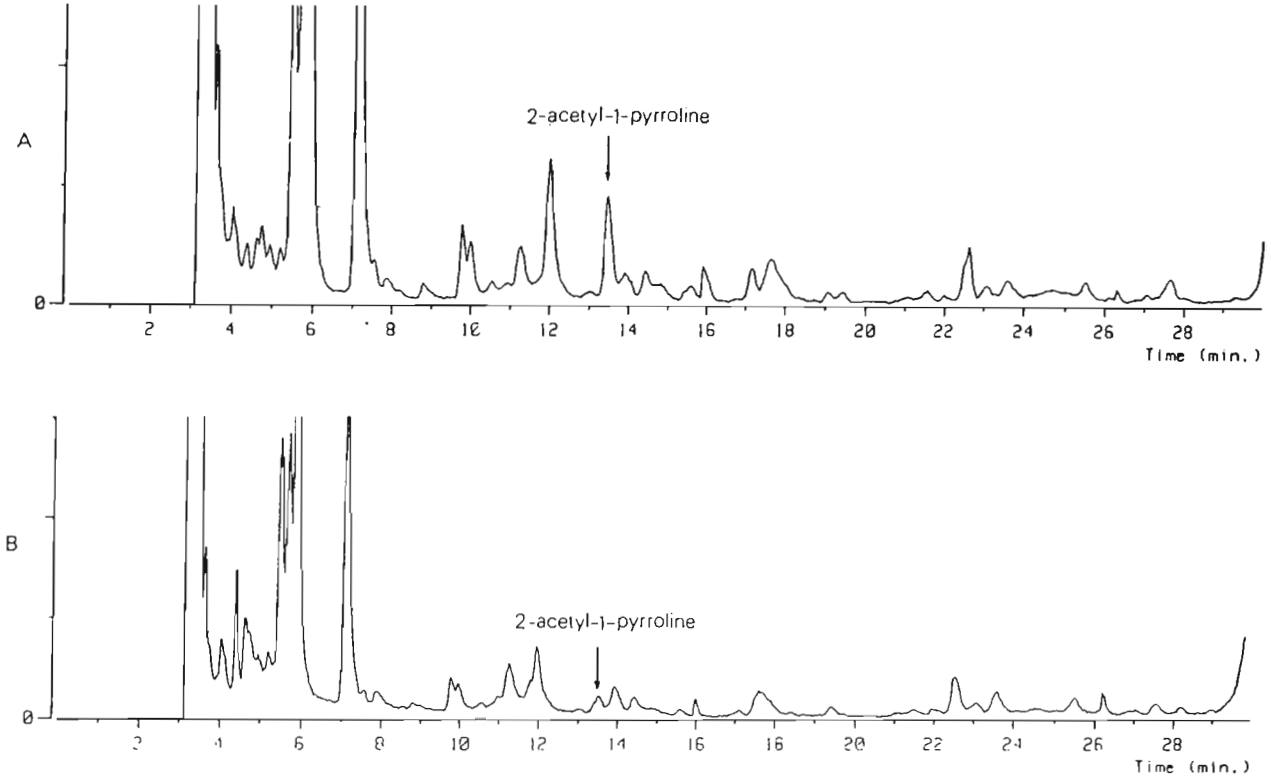


Figure 1.13 Reconstructed total ion chromatogram obtained by capillary GC/MS of extract of 3 g. (A) and 1 g. (B) of Khao Dawk Mali 105 brown seed using acidic extraction

สรุปและข้อเสนอแนะ

สารระเหยที่เป็นองค์ประกอบของสารสกัดจากเมล็ดข้าวกล้องพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่สกัดโดยวิธีการสกัดด้วยไอน้ำแบบง่ายพบว่าเป็นสารประเภท "branched chain hydrocarbons" เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งอาจคาดได้ว่าสาร hydrocarbons เหล่านี้เกิดมาจากการ hydrolysis ของแป้ง (starch) นอกจากนี้มีสารประเภท aldehyde, ester, alcohol, organic acid, nitrogenous compound และอนุพันธุ์ของ benzene รวมอยู่บ้าง กลุ่มองค์ประกอบประเภทหลังนี้พบว่าเป็นสารประเภทที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่มากนัก ดังจะเห็นได้จากพีคที่ปรากฏในช่วง retention time ช่วงต้นๆ ของ reconstructed total ion chromatogram (RIC) องค์ประกอบสารระเหยเหล่านี้เมื่อทำการทดลองต่อมาพบว่ามีหลายองค์ประกอบเกี่ยวข้องกับความหอมของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

วิธีการสกัดสารระเหยจากเมล็ดข้าวหอมพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยไอน้ำแบบง่าย (simple steam distillation) โดยผ่านไอน้ำไปยังเมล็ดข้าวภายใต้ความดันต่ำ ซึ่งไม่ทำให้เมล็ดข้าวร้อนเกินไปจนสุก องค์ประกอบสารระเหยที่พบในสารสกัดที่สกัดด้วยวิธีนี้จึงแตกต่างไปจากองค์ประกอบสารระเหยที่พบในวิธีการสกัดที่ผสมข้าวตัวอย่างกับน้ำและให้ความร้อนจนข้าวสุก เหมือนอย่างการสกัดด้วยไอน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์แบบต่อเนื่อง (continuous steam distillation/solvent extraction) สารระเหยที่พบในสารสกัดด้วยไอน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์แบบต่อเนื่องนั้น ประกอบด้วยประเภทของสารซึ่งมีความหลากหลายมากกว่า และจำนวนร้อยละของสารประเภท hydrocarbons มีน้อยลงกว่าในสารสกัดประเภทแรก ทั้งนี้เนื่องมาจากการเกิดปฏิกิริยา oxidation ของสาร hydrocarbons ดังกล่าวไปเป็นสารประเภท alcohols นอกจากนี้ยังพบสารอนุพันธุ์ของ phenols และ furans ในสารสกัดประเภทหลังนี้ด้วย

2-acetyl-1-pyrroline ซึ่งเป็นสารหอมที่มีรายงานก่อนหน้านี้พบเป็นองค์ประกอบของพันธุ์ข้าวหอมหลายพันธุ์ และในการวิจัยนี้พบว่า 2-acetyl-1-pyrroline เป็นองค์ประกอบของสารสกัดจากข้าวกล้องพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่สกัดด้วยวิธีการสกัดด้วยไอน้ำแบบง่ายและสารสกัดด้วยไอน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์แบบต่อเนื่อง ในปริมาณที่ค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับองค์ประกอบอื่น ในการวิจัยนี้ได้ทำการสังเคราะห์สารดังกล่าวขึ้นเพื่อเป็นสารอ้างอิงในการเปรียบเทียบ retention time และ mass spectrum กับองค์ประกอบในสารสกัดจากเมล็ดข้าวขาวดอกมะลิ 105 ตลอดจนเพื่อนำมาทดสอบกลิ่นโดยวิธีการดม เนื่องจาก 2-acetyl-1-pyrroline เป็นสารระเหยที่มีจุดเดือดต่ำมาก การทำสารนี้ให้บริสุทธิ์ในกระบวนการสังเคราะห์จึงเปลี่ยนมาใช้วิธีการสกัดด้วยสารละลายกรดแทนการกลั่นหรือการแยกด้วย gas chromatograph เช่นที่ผู้วิจัยกลุ่มอื่นได้ทดลองมา ซึ่งพบว่าได้สารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ที่มีความบริสุทธิ์สูงเช่นกัน

ผลจากการทดลองเปรียบเทียบสารระเหย ที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดด้วยไอน้ำของข้าวกล้องพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่สกัดแล้วทำการวิเคราะห์หาองค์ประกอบทันทีในขณะที่สารสกัดมีความหอมอยู่ กับสารสกัดเดียวกันที่ปล่อยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนความหอมหมดไปจึงทำการวิเคราะห์องค์ประกอบ และสารสกัดที่ได้จากการสกัดข้าวตัวอย่างเดียวกันที่ทิ้งไว้เป็นเวลานาน 5 เดือน (ข้าวเก่า) พบว่าสามารถบอกองค์ประกอบสารระเหยที่หายไปเมื่อความหอมหมดไปได้โดยการเปรียบเทียบองค์ประกอบทั้งหมดที่วิเคราะห์แบบ total analysis ด้วยเทคนิค capillary GC/MS ของสารสกัดแต่ละลักษณะ ได้แก่ butylcyclopropane, butyl acetate, diethyl carbonate, 7-octen-4-ol, 2-(2-propoxyethoxy)ethanol, hexanal, nonanal, 1,4-dimethylbenzene, isocyanatomethylbenzene, 2-acetyl-1-pyrroline, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methylphenol

องค์ประกอบสารระเหยที่หายไปเหล่านี้คาดว่ามีบางองค์ประกอบที่น่าจะเป็นสารให้ความหอมของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เมื่อนำองค์ประกอบสารระเหยเหล่านี้มาทำการทดสอบกลิ่นโดยวิธีการดม พบว่ามีเพียง 2-acetyl-1-pyrroline สารเดียวเท่านั้นที่มีผู้ทดสอบจำนวนหนึ่ง (ร้อยละ 12) ตอบว่ามีกลิ่นเหมือนหรือใกล้เคียงกับกลิ่นของ

"ข้าวสุกพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105" ซึ่งเป็นการสนับสนุนผลการทดลองของผู้วิจัยก่อนหน้านี้ (Buttery, *et al.*, 1986) อย่างไรก็ตามผู้ทดสอบส่วนใหญ่คิดเป็นร้อยละ 67 ของจำนวนผู้ทดสอบทั้งหมดมีความเห็นว่าสารนี้มีกลิ่นเหมือนกลิ่นของ "ใบเตย" แต่เมื่อนำสาร 2-acetyl-1-pyrroline ที่ความเข้มข้นเท่ากันมาผสมกับข้าวสุกพันธุ์ กข 7 แล้วนำมาทดสอบกลิ่น ปรากฏว่าผู้ทดสอบเป็นจำนวนถึงร้อยละ 76 ให้สารนี้มีกลิ่นเหมือนกลิ่นของ "ข้าวสุกพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105" และในการทดลองก่อนหน้านี้ เมื่อนำสารสกัดของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ปล่อยทิ้งไว้จนความหอมหมดไป และนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบ ปรากฏว่าไม่พบ 2-acetyl-1-pyrroline เมื่อนำสารสกัดของข้าวเก่าหรือข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 5 เดือนมาทำการสกัด พบว่าสารสกัดไม่มีกลิ่นหอมที่เป็นกลิ่นเฉพาะของความหอมของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และไม่พบ 2-acetyl-1-pyrroline เป็นองค์ประกอบในสารสกัดเช่นกัน (หรืออาจมีน้อยมากเกินขีดจำกัดของเทคนิคการวิเคราะห์) ซึ่งเป็นการแสดงให้เห็นว่า "กลิ่นของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105" นั้นเป็นกลิ่นที่ได้มาจากการผสมผสานกันระหว่างสารระเหยที่เป็นองค์ประกอบทั้งหมดในเมล็ดข้าว โดยมี 2-acetyl-1-pyrroline เป็นสารหลักที่ทำให้เกิด "กลิ่นหอม" ดังนั้นการตรวจสอบความหอมของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ทั้งในเชิงคุณภาพและปริมาณอาจทำได้โดยตรวจวัดระดับปริมาณของ 2-acetyl-1-pyrroline ในเมล็ดข้าว โดยอาศัยเทคนิคการสกัดและการวิเคราะห์สารสกัดด้วย capillary gas chromatograph หรือ capillary GC/MS ดังที่กล่าวมา

ในแง่ของการพัฒนาวิธีการสกัดสารหอม (2-acetyl-1-pyrroline) ของข้าวหอมพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งแต่เดิมนิยมใช้วิธีการสกัดด้วยไอน้ำและนำ distillate ที่ได้มาสกัดต่อด้วยตัวทำละลายอินทรีย์นั้น พบว่าเป็นเทคนิคที่ให้ประสิทธิภาพในการสกัดต่ำ เนื่องจากต้องใช้ปริมาณข้าวตัวอย่างมากและสิ้นเปลืองตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในการสกัด เทคนิคการสกัดด้วยไอน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์แบบต่อเนื่อง (continuous steam distillation/solvent extraction) จึงได้ถูกดัดแปลงมาใช้ในงานวิจัยนี้โดยมีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาวิธีการสกัดสารหอมจากเมล็ดข้าวเพื่อให้ได้วิธีที่มีประสิทธิภาพสูงมากขึ้นโดยใช้ปริมาณตัวอย่างข้าวน้อยกว่าและประหยัดตัวทำละลายอินทรีย์กว่าวิธีการสกัดด้วยไอน้ำแบบธรรมดา ซึ่งพบว่าการสกัดด้วยไอน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์แบบต่อเนื่องนั้นสามารถลดปริมาณตัวอย่างข้าวที่ใช้ทำการทดลองลงได้กว่า 10 เท่าของปริมาณที่ต้องใช้ในวิธีการสกัดด้วยไอน้ำแบบธรรมดา และมีปริมาณสาร 2-acetyl-1-pyrroline ในสารสกัดในระดับที่สามารถวิเคราะห์ด้วย capillary gas chromatograph หรือ capillary GC/MS ได้ ในขณะเดียวกันพบว่าในการวิเคราะห์สารสกัดด้วย gas chromatograph หากใช้คอลัมน์ในการแยกองค์ประกอบที่เหมาะสมกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ เช่น ใช้ Amine bonded column ในการวิเคราะห์ 2-acetyl-1-pyrroline ซึ่งเป็นสารที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ จะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการวิเคราะห์สารดังกล่าวได้

เทคนิคการสกัดสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline อีกวิธีหนึ่งที่ได้พัฒนาขึ้น คือ การสกัดโดยใช้สารละลายกรด ซึ่งพบว่าเป็นเทคนิคที่ให้ประสิทธิภาพสูงที่สุด เนื่องจากประหยัดทั้งเวลาและค่าใช้จ่าย ทั้งยังใช้ปริมาณตัวอย่างข้าวในการสกัดน้อยเพียงในหน่วยกรัม หรือน้อยที่สุดเพียง 1 กรัมเท่านั้น ก็สามารถสกัด 2-acetyl-1-pyrroline ออกมาในปริมาณที่สามารถนำมาวิเคราะห์ด้วย capillary gas chromatograph หรือ capillary GC/MS ได้โดยใช้ Amine column หรือคอลัมน์อื่นที่เหมาะสม ซึ่งน่าจะเป็นประโยชน์อย่างมากในกรณีที่มีตัวอย่างข้าวที่ต้องการตรวจวัดความหอมในปริมาณไม่มากนัก

ดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้นว่ากลิ่นหอมของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เป็นกลิ่นที่ได้มาจากกลิ่นของสาร 2-acetyl-1-pyrroline เป็นหลัก ผสมผสานรวมกับกลิ่นของสารระเหยอื่นๆ ที่มีอยู่ในเมล็ดข้าวขาวดอกมะลิ 105 นั้น การตรวจพบสาร 2-acetyl-1-pyrroline ในพืชอื่น ที่มีกลิ่นหอมใกล้เคียงกับกลิ่นหอมของข้าวขาวดอกมะลิ 105 เช่น ใบเตย และดอกชมนาด จึงนับเป็นการสนับสนุนคุณสมบัติของสารนี้ในการให้ความหอมได้เป็นอย่างดี

ปริมาณของสาร 2-acetyl-1-pyrroline พบว่ามีปรากฏในข้าวกล้องในปริมาณที่สูงกว่าในข้าวสารที่ผ่านการขัดสีแล้ว ซึ่งอาจเป็นเหตุผลมาจากการมีสมบัติที่ค่อนข้างเป็นเบสของสารดังกล่าว จึงทำให้มีเสถียรภาพอยู่ในเมล็ดข้าวโดยเกิดเป็นสารประกอบในรูปเกลือกับกรดอินทรีย์ที่มีอยู่ในเยื่อหุ้มเมล็ดข้าวนั้น อย่างไรก็ตามไม่พบ 2-acetyl-1-pyrroline เป็นองค์ประกอบในสารสกัดจากใบและกาบใบของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 โดยการวิเคราะห์สารสกัดด้วย capillary GC/MS

การตรวจวัดปริมาณความหอมของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ในกรณีที่ปริมาณตัวอย่างเมล็ดข้าวมีจำนวนจำกัด ซึ่งทำได้โดยการสกัดด้วยสารละลายกรด และวิเคราะห์สารสกัดด้วยเทคนิค capillary gas chromatography หรือ capillary GC/MS นั้น เทคนิค capillary gas chromatography จะให้ความไว (sensitivity) ในการวิเคราะห์ที่สูงกว่า capillary GC/MS หากแต่การตรวจสอบ (identification) 2-acetyl-1-pyrroline ในสารสกัดต้องอาศัยการเปรียบเทียบ retention time กับสารมาตรฐานหรือสารสังเคราะห์ หากใช้เทคนิค capillary GC/MS ในการวิเคราะห์ อาจตรวจสอบสารได้โดยใช้วิธีเปรียบเทียบ mass spectrum กับ mass spectrum ของ 2-acetyl-1-pyrroline ในเอกสารอ้างอิงได้ เนื่องจากได้ทำการทดลองแบบ total analysis ในการวิจัยนี้แล้ว พบว่าไม่มีองค์ประกอบสารระเหยใดที่ให้ mass spectrum (EI : electron impact) ใกล้เคียงกับของ 2-acetyl-1-pyrroline

เทคนิคการวิเคราะห์ไม่ว่าจะเป็น capillary gas chromatography หรือ capillary GC/MS เป็นเทคนิคการวิเคราะห์ที่จัดว่าอยู่ในระดับสูง มีความซับซ้อนขององค์ประกอบ และมีราคาแพงมากโดยเฉพาะ capillary GC/MS หากแต่เป็นที่นิยมเนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพและมีความไวในการวิเคราะห์สูงเหมาะสำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีความซับซ้อนขององค์ประกอบมาก (complex samples) และมีปริมาณสารน้อย ในการวิเคราะห์ความหอมของเมล็ดข้าวขาวดอกมะลิ 105 หากการวิเคราะห์จำกัดอยู่แค่เพียงการวิเคราะห์สารตัวเดียว ที่เป็นสารให้ความหอม คือ 2-acetyl-1-pyrroline เทคนิคการวิเคราะห์น่าจะได้มีการปรับปรุงให้ง่ายและสะดวกขึ้นเช่นเดียวกัน โดยอาจพัฒนาให้สามารถวิเคราะห์ได้ด้วยเครื่องมือหรืออุปกรณ์ที่ง่ายขึ้นโดยใช้ปฏิกิริยาทางเคมี ของสารดังกล่าวมาประยุกต์ใช้ ซึ่งหากได้มีการศึกษาวิจัยจนสามารถพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์สารดังกล่าว ให้สะดวกและรวดเร็วขึ้นได้อีกระดับหนึ่ง ก็น่าจะเป็นประโยชน์อย่างมากในการพัฒนาการปรับปรุงพันธุ์ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ในอนาคต นอกจากนี้งานวิจัยในเชิงการพัฒนาสารหอมเลียนแบบ 2-acetyl-1-pyrroline เพื่อประโยชน์ในทางการค้าก็เป็นอีกแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจอย่างยิ่ง โดยสารที่พัฒนาขึ้นใหม่น่าจะเป็นสารที่มีกลิ่นหอมใกล้เคียงกันกับ 2-acetyl-1-pyrroline แต่มีเสถียรภาพสูงกว่าและต้นทุนการผลิตต่ำกว่า สามารถนำมาเพิ่มคุณภาพความหอมของข้าวได้ ในการทดลองนี้พบว่า 2-(1-hydroxyethyl) pyrrolidine ซึ่งเป็นสารตัวกลางในปฏิกิริยาการสังเคราะห์ 2-acetyl-1-pyrroline ก็เป็นสารหนึ่งที่น่าจะมีศักยภาพที่ดีในการพัฒนาเป็นสารหอมเพื่อเพิ่มความหอมแก่ข้าวได้เช่นกัน

สุดท้ายขอกล่าวถึงข้อบกพร่องของงานวิจัยนี้ ในส่วนขององค์ประกอบที่ไม่ทราบโครงสร้างทางเคมีที่แน่นอน (Unknown) ซึ่งองค์ประกอบที่ไม่ทราบโครงสร้างทางเคมีเหล่านี้บางองค์ประกอบอาจคาดคะเนได้ว่ามีความสำคัญและมีบทบาทในการให้ความหอมในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 อย่างไรก็ตามเมื่อได้ทำการศึกษาในรายละเอียดของ mass spectra ขององค์ประกอบดังกล่าวพบว่าส่วนใหญ่เป็นสารประเภท hydrocarbons ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง และเป็นสารกลุ่มที่ไม่เคยมีรายงานว่ามีบทบาทเกี่ยวข้องกับความหอม

นอกจากนี้การวิเคราะห์สารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ในเชิงปริมาณนั้นไม่ได้กล่าวรายละเอียดไว้ในเอกสารฉบับนี้ ซึ่งการวิเคราะห์เชิงปริมาณนี้กระทำได้โดยใช้เทคนิค capillary GC หรือ capillary GC/MS เช่นกัน โดยวิเคราะห์เปรียบเทียบ peak area กับ internal standard ในงานวิจัยนี้ใช้ 2-acetylpyrrole เป็น internal standard ส่วนเทคนิคในการเตรียม internal standard และการวิเคราะห์นั้น ใช้เทคนิคพื้นฐานทั่วๆ ไป ซึ่งสามารถประยุกต์ได้หลายวิธีขึ้นกับความถนัดของแต่ละกลุ่มผู้วิจัย

ภาคผนวก

การเตรียมสารละลาย silicone antifoam

นำ silicone antifoam เข้มข้นปริมาตร 20 mL มาละลายในน้ำกลั่น 200 mL แล้วให้ความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 90-100 °C พร้อมทั้งคนสารละลายอย่างสม่ำเสมอตลอดเวลา จนปริมาตรสารละลายลดลงเหลือ 100 mL จึงนำออกจากความร้อน ทิ้งให้เย็น และเก็บในที่อุณหภูมิต่ำหรือในตู้เย็นก่อนนำมาใช้ในการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

1. Ballard, R.W. and G. Holguin. 1977. Volatile Components of Unprocessed Rice (*Oryza sativa* L.). J. Agric. Food Chem. 25(1): 99-103.
2. Buchi, G. and H. Wuest. 1971. Synthesis of 2-Acetyl-1,4,5,6-tetrahydropyridine, a Constituent of Bread Aroma. J. Org. Chem. 36(4): 609-610.
3. Buttery, R.G., B.O. Juliano and L.C. Ling. 1983. Identification of Rice Aroma Compound 2-Acetyl-1-pyrroline in Pandan Leaves. Chemistry and Industry. p 478.
4. Buttery, R.G., C. Xu and L.C. Ling. 1985. Volatile Compounds of Wheat Leaves (and Stems): Possible Insect Attractants. J. Agric. Food Chem. 33(1): 115-117.
5. Buttery, R.G., J.G. Turnbaugh and L.C. Ling. 1988. Contribution of Volatiles to Rice Aroma. J. Agric. Food Chem. 36(5): 1006-1009.
6. Buttery, R.G., J.S. Donald and L.C. Ling. 1994. Studies on Flavor Volatiles of Some Sweet Corn Products. J. Agric. Food Chem. 42(3): 791-795.
7. Buttery, R.G., and L.C. Ling. 1982. 2-Acetyl-1-pyrroline : An Important Aroma Component of Cooked Rice. Chem. Ind. (London). p. 958-9.
8. Buttery, R.G., L.C. Ling, B.O. Juliano and J.G. Turnbaugh. 1983. Cooked Rice Aroma and 2-Acetyl-1-pyrroline. J. Agric. Food Chem. 31(4): 823.
9. Buttery, R.G., L.C. Ling and T.R. Mon. 1986. Quantitative Analysis of 2-Acetyl-1-pyrroline in Rice. J. Agric. Food Chem. 34(1): 112-114.
10. Buttery, R.G., R.M. Seifert, J.G. Turnbaugh, D.G. Guadagni and L.C. Ling. 1981. Odor Threshold of Thiamin Odor Compound 1-Methylbicyclo[3.3.0]-2,4-dithia-8-oxaoctane. J. Agric. Food Chem. 29(1): 183-185.
11. Maga, J.A. 1978. Cereal Volatiles, A Review. J. Agric. Food Chem. 26(1): 175-178.
12. Neto, G.C., Y. KoNo, H. Hyakutake, M. Watanabe, Y. Suzuki and A. Sakurai. 1991. Isolation and Identification of (-)- Jasmonic Acid from Wild Rice, *Oryza officinalis*, as an Antifungal Substance. Agric. Biol. Chem. 55(12): 3097-3098.
13. Paule, C.M. and J.J. Powers. 1989. Sensory and Chemical Examination of Aromatic and Nanaromatic Rices. J. Food Sci. 54(2): 343-346.
14. Tanchotikul, U. and T. C.-Y. Hsieh. 1991. An improved Method for Quantification of 2-Acetyl-1-pyrroline, a "Popcorn"-like Aroma, in Aromatic Rice by High-Resolution Gas Chromatography/ Mass Spectrometry/Selected Ion Monitoring. J. Agric. Food Chem. 39(5): 944-947.
15. Tsugita, T., T. Kurata and M. Fujimaki. 1978. Volatile Components in the Steam Distillate of Rice Barn : Identification of Neutral and Basic Compounds. Agric. Biol. Chem. 42(3): 643-651.
16. Yajima, I., T. Yanai, M. Nakamura, H. Sakakibara and K. Hayashi. 1979. Volatile Flavor Components of Cooked Kaorimai (Sented Rice, *O. sativa japonica*). Agric. Biol. Chem. 43(12): 2425-2429.
17. Yajima, I., T. Yanai, M. Nakamura, H. Sakakibara and T. Habu. 1978. Volatile Flavor Components of Cooked Rice. Agric. Biol. Chem. 42(6): 1229-1233.

งานสารสนเทศ
ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ศช.)
อาคารสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)
73/1 ถนนพระราม 6 กรุงเทพฯ 10400
โทรศัพท์: (66-2) 644 8150-4
โทรสาร: (66-2) 644 8107-8
http://www.biotec.or.th

ISBN 974-757

30