



โครงการ การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การพิสูจน์ทราบเอกลักษณ์ของสารระเหยง่ายในเห็ดหอมโดยใช้เทคนิค
เฮดสเปซโซลิดเฟสไมโครเอกซ์แทรกชัน-แก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเม-
ตรีร่วมกับเคมิเมทริกซ์

Determination of Volatile Compounds in Shiitake Mushroom Using
Headspace Solid Phase Microextraction-Gas Chromatography-Mass
Spectrometry Combined with Chemometrics

ชื่อนิสิต นายวัชรพล โปธาราม

ภาควิชา เคมี

ปีการศึกษา 2558

ภาควิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การพิสูจน์ทราบเอกลักษณ์ของสารระเหยง่ายในเห็ดหอมโดยใช้เทคนิคเฮดสเปซโซลิดเฟสไมโครเอกซ์แทรกชัน-
แก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรีร่วมกับเคโมเมตริกซ์

Determination of Volatile Compounds in Shiitake Mushroom Using Headspace Solid Phase
Microextraction-Gas Chromatography-Mass Spectrometry Combined with Chemometrics



โดย

นายวัชรพล โปธาราม

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2558

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เรื่อง การพิสูจน์ทราบเอกลักษณ์ของสารระเหยง่ายในเห็ดหอมโดยใช้เทคนิคเฮดสเปซโซลิดเฟสไมโครเอกซ์-
แทรกชัน-แก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรีร่วมกับเคโมเมทริกซ์

โดย นายวัชรพล โปธาราม

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

..... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปกรณ์ วรรณศุภากุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร.ธรรมนุญ หนูจักร)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.คณศ วงษ์ระวี)

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

ภาควิชาเคมี

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.วุฒิชัย พาราสุข)

หัวหน้าภาควิชาเคมี

วัน 10 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2559

คุณภาพของการเขียนรายงานเล่มนี้อยู่ในระดับ ดีมาก ดี พอใช้

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ การพิสูจน์ทราบเอกลักษณ์ของสารระเหยง่ายในเห็ดหอมโดยใช้เทคนิคเฮดสเปซโซลิดเฟสไมโครเอกซ์แทรกชัน-แก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรีร่วมกับเคโมเมทริกซ์

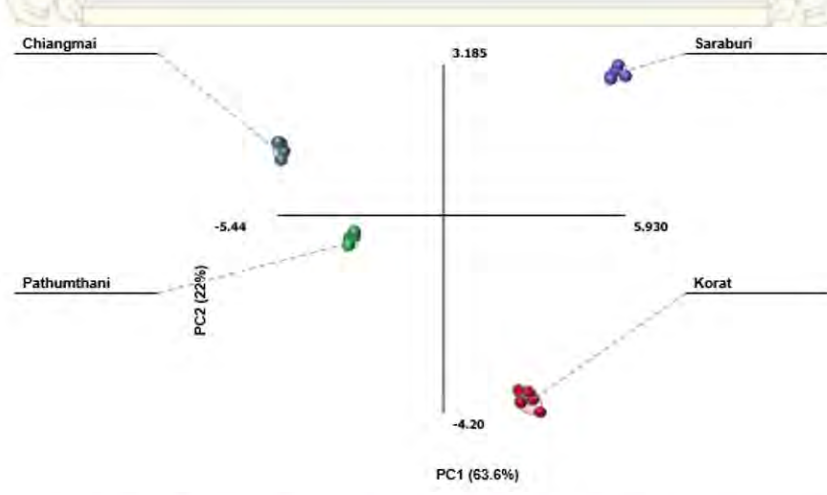
ชื่อนิติในโครงการ นายวัชรพล โปธาราม เลขประจำตัว 5533150823

ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.ธรรมนุญ หนูจักร

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2558

บทคัดย่อ

ได้พิสูจน์ทราบเอกลักษณ์ของสารระเหยง่ายในเห็ดหอมโดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี (GC-MS) ร่วมกับเทคนิคเฮดสเปซโซลิดเฟสไมโครเอกซ์แทรกชัน (HS-SPME) โดยใช้แคปิลลารีคอลัมน์ของ GC ประเภท HP-5MS ขนาด 30m x 0.25mm x 0.25µm และใช้การออกแบบการทดลองชนิด central composite design (CCD) ออกแบบการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมเห็ดหอมตัวอย่างด้วย HS-SPME พบว่าสภาวะที่เหมาะสมของ HS-SPME คือ อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดเท่ากับ 75 องศาเซลเซียส ระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดเท่ากับ 50 นาที และระยะเวลาในการปลดปล่อยสารในเครื่อง GC-MS เท่ากับ 10 นาที จากการพิสูจน์ทราบเอกลักษณ์ของสารระเหยง่ายในเห็ดหอมโดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NIST สามารถพิสูจน์ทราบเอกลักษณ์ของสารระเหยง่ายได้ทั้งหมด 32 ชนิด โดยเมื่อใช้วิธีเคโมเมทริกซ์ชนิดการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (PCA) พบว่าสามารถจำแนกกลุ่มของเห็ดหอมที่มาจากแหล่งเพาะปลูกที่แตกต่างกันได้เป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ จังหวัด ได้แก่ จังหวัดปทุมธานี สระบุรี เชียงใหม่ และนครราชสีมา ด้วยรูปแบบ PCA ที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงบ่งชี้ได้ว่าสามารถใช้วิธี HS-SPME-GC-MS ร่วมกับวิธีเคโมเมทริกซ์ในการพิสูจน์ทราบเห็ดหอมที่มาจากแหล่งเพาะปลูกที่แตกต่างกันได้



คำสำคัญ: เห็ดหอม, สารระเหยง่าย, เฮดสเปซโซลิดเฟสไมโครเอกซ์แทรกชัน, แก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี, เคโมเมทริกซ์

Title Determination of Volatile Compounds in Shiitake Mushroom Using Headspace Solid Phase Microextraction-Gas Chromatography-Mass Spectrometry Combined with Chemometrics

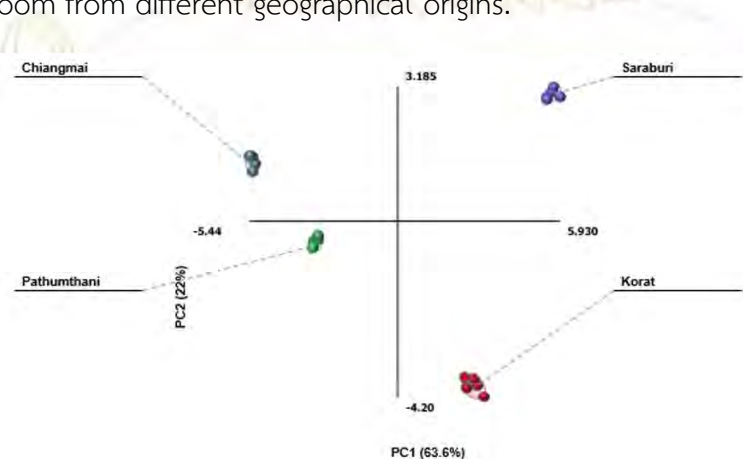
Student name Watcharaphon Photaram ID 5533150823

Advisor name Associate Professor Thumnoon Nhujak, Ph.D.

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic year 2015

Abstract

Volatile compounds in shiitake mushroom were determined by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) combined with headspace solid phase microextraction (HS-SPME) using a capillary column of HP-5MS (30m × 0.25mm × 0.25 μ m). Using an experimental design called central composite design, the following optimal HS-SPME conditions were obtained: extraction temperature of 75 °C, extraction time of 50 min and desorption time of 10 min. Thirty-two volatile compounds were identified by comparing their mass spectra with those in the NIST database. Using principal components analysis (PCA), shiitake mushrooms were classified into four groups with different patterns of PCA, in consistent with their geographical origins: Pathumthani, Saraburi, Chiangmai and Nakhonratchasima. This indicates that HS-SPME-GC-MS combined with chemometrics can be used to identify the volatile compounds in shiitake mushroom from different geographical origins.



Keywords: Shiitake Mushroom, Volatile compounds, Headspace solid phase microextraction, Gas chromatography-mass spectrometry, Chemometrics

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ธรรมนุญ หนูจักร อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการที่ท่านได้ใส่ใจดูแล ช่วยเหลือ และให้คำแนะนำในการแก้ไขปัญหาต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นตลอดระยะเวลาในการทำวิจัย รวมทั้งท่านได้ให้คำปรึกษาในการเขียนรายงานฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปกรณ์ วรานุศุภากุล ที่กรุณาสละเวลาเพื่อตรวจทานแก้ไข และให้เกียรติเป็นประธานกรรมการในการสอบงานวิจัยในครั้งนี้

อีกทั้งข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.คณิศ วงษ์ระวี ที่ท่านได้ให้คำปรึกษา และคำแนะนำเพิ่มเติมเกี่ยวกับเนื้อหาที่เกี่ยวข้องให้งานวิจัยนี้ อีกทั้งท่านยังได้กรุณาสละเวลาเพื่อตรวจทาน แก้ไข และให้เกียรติเป็นกรรมการในการสอบงานวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณภูวดล ธรรมราชฤทธิ์ ที่คอยให้คำปรึกษาชี้แนะ ให้ความรู้ในการใช้เครื่องมือ และให้ความช่วยเหลือทุกด้านที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุนการดำเนินงานวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบพระคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์ และสารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ ตลอดจนบุคลากรฝ่ายต่าง ๆ ที่คอยให้ความช่วยเหลือโดยตลอดมา

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญรูป.....	ช
สารบัญตาราง	ญ
คำอธิบายและคำย่อ	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	11
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	2
1.3 ทฤษฎีและความรู้พื้นฐาน	4
1.4 วัตถุประสงค์และขอบเขตของการวิจัย	17
1.5 ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย	17
บทที่ 2 การทดลอง	18
2.1 การหาอัตราส่วนของสารที่เข้าคอลัมน์ (splitless and split ratio).....	18
2.2 การหาภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมหีตหอมตัวอย่างด้วยเทคนิคเฮดสเปซโดยใช้การออกแบบ การทดลองชนิด central composite design (CCD).....	20
2.3 การหาโครมาโทแกรมของหีตหอมตัวอย่างจาก 4 แหล่งเพาะปลูก.....	21
2.4 การประเมินผลโดยวิธีเคโมเมทริกซ์.....	22

บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง	23
3.1 การหาอัตราส่วนของสารที่เข้าคอลัมน์ (splitless and split ratio).....	23
3.2 การหาภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมเห็ดหอมตัวอย่างด้วยเทคนิคสเตสเปซโดยใช้การออกแบบการทดลองชนิด central composite design (CCD).....	26
3.3 โคโรมาโทแกรมของเห็ดหอมตัวอย่าง 4 จังหวัด.....	30
3.4 การประมวลผลด้วยเคโมเมทริกซ์.....	34
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง	37
เอกสารอ้างอิง	38
ภาคผนวก	40
ประวัติผู้วิจัย	56



ภาควิชาเคมี
 คณะวิทยาศาสตร์
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1-1 ส่วนประกอบอุปกรณ์โซลิตเฟสไมโครเอกซ์แทรกชัน.....	4
รูปที่ 1-2 ขั้นตอนการสกัดสาร	5
รูปที่ 1-3 ขั้นตอนการปลดปล่อยสาร.....	5
รูปที่ 1-4 แผนภาพแสดงขั้นตอน ความสัมพันธ์ของตัวแปร และผลการทดลองในการทดลองทั่วไป	6
รูปที่ 1-5 แผนภาพแสดงการทดลองแบบ COST เมื่อกำหนดให้ความเข้มข้นคงที่	7
รูปที่ 1-6 แผนภาพแสดงการทดลองแบบ COST เมื่อกำหนดให้ pH คงที่.....	7
รูปที่ 1-7 แผนภาพแสดงค่าของตัวแปรอิสระที่เหมาะสม และค่าตัวแปรที่ได้จากวิธี COST.....	8
รูปที่ 1-8 แสดงการออกแบบการทดลองแบบ CCD ที่ประกอบไปด้วยจำนวนการทดลองจาก full factorial, star และการทดลองซ้ำ (replication)	10
รูปที่ 1-9 รูปแบบของเมทริกซ์ และเวกเตอร์ที่เปลี่ยนรูปมาจากสมการเชิงเส้น	12
รูปที่ 1-10 กราฟพื้นที่ตอบสนอง (ซ้าย) contour plot (ขวา) โดยมีเครื่องหมาย x เป็นจุดที่บ่งบอกค่าของตัวแปร x_1 และ x_2 ที่ให้ค่าการตอบสนองสูงที่สุด.....	13
รูปที่ 1-11 รูปแสดงการวิเคราะห์ด้วยเมทริกซ์ของการวิเคราะห์ข้อมูลแบบ PCA.....	15
รูปที่ 1-12 การจัดกลุ่มข้อมูลด้วย PCA	15
รูปที่ 1-13 loading plot ของ PCA	16
รูปที่ 1-14 score plot ของ PCA.....	16
รูปที่ 3-1 ก) โครมาโทแกรมของเห็ดหอมตัวอย่างด้วยสภาวะ splitless.....	23
รูปที่ 3-1 ข) โครมาโทแกรมของเห็ดหอมตัวอย่างด้วยสภาวะ split ratio 10:1	24
รูปที่ 3-1 ค) โครมาโทแกรมของเห็ดหอมตัวอย่างด้วยสภาวะ split ratio 25:1	24
รูปที่ 3-1 ง) โครมาโทแกรมของเห็ดหอมตัวอย่างด้วยสภาวะ split ratio 50:1.....	25
รูปที่ 3-1 จ) โครมาโทแกรมของเห็ดหอมตัวอย่างด้วยสภาวะ split ratio 100:1	25
รูปที่ 3-2 ก) กราฟพื้นที่ตอบสนอง (ซ้าย) contour plot (ขวา) ของ 1, 2, 4, 6-tetrathiepane	27
ระหว่างตัวแปรอิสระอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด และระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด	27

รูปที่ 3-2 ข) กราฟพื้นที่ที่ตอบสนอง (ซ้าย) contour plot (ขวา) ของ 1, 2, 4, 6-tetrathiepane 28
 ระหว่างตัวแปรอิสระอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด และระยะเวลาในการปลดปล่อยสารในเครื่อง GC-MS..... 28

รูปที่ 3-2 ค) กราฟพื้นที่ที่ตอบสนอง (ซ้าย) contour plot (ขวา) ของ 1, 2, 4, 6-tetrathiepane 28
 ระหว่างตัวแปรอิสระระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด และระยะเวลาในการปลดปล่อยสารในเครื่อง GC-MS..... 28

รูปที่ 3-3 ก) แผนภาพแสดงช่วงของค่าตัวแปรอิสระอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด 29

รูปที่ 3-3 ข) แผนภาพแสดงช่วงของค่าตัวแปรอิสระระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด..... 29

รูปที่ 3-3 ค) แผนภาพแสดงช่วงของค่าตัวแปรอิสระระยะเวลาในการปลดปล่อยสารในเครื่อง GC-MS..... 29

รูปที่ 3-4 ข) โครมาโทแกรมของเห็ดหอมที่มาจากจังหวัดสระบุรี..... 32

รูปที่ 3-4 ก) โครมาโทแกรมของเห็ดหอมที่มาจากจังหวัดปทุมธานี 32

รูปที่ 3-4 ค) โครมาโทแกรมของเห็ดหอมที่มาจากจังหวัดเชียงใหม่ 33

รูปที่ 3-4 ง) โครมาโทแกรมของเห็ดหอมที่มาจากจังหวัดนครราชสีมา 33

รูปที่ 3-8 กราฟแสดงผล PCA ในการจัดกลุ่มเห็ดหอมจากทั้ง 4 จังหวัด..... 34

รูปที่ 3-9 กราฟแสดงผล PCA ของสารระเหยง่ายที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะของเห็ดหอมแต่ละแหล่งเพาะปลูก . 35
 (ชื่อสารระเหยง่ายเป็นข้อมูลที่เทียบได้จาก NIST Library)..... 35

รูปที่ 3-10 ก) แผนภูมิเปรียบเทียบสารระเหยง่ายที่เป็นสารระเหยหลัก (ตัวแทน) ของเห็ดหอมจากจังหวัด
 เชียงใหม่ 35

รูปที่ 3-10 ข) แผนภูมิเปรียบเทียบสารระเหยง่ายที่เป็นสารระเหยหลักของเห็ดหอมจากจังหวัดปทุมธานี 36

รูปที่ 3-10 ค) แผนภูมิเปรียบเทียบสารระเหยง่ายที่เป็นสารระเหยหลักของเห็ดหอมจากจังหวัดสระบุรี 36

รูปที่ 3-10 ค) แผนภูมิเปรียบเทียบสารระเหยง่ายที่เป็นสารระเหยหลักของเห็ดหอมจากจังหวัดนครราชสีมา 36

รูปภาพที่ A-1 รูปภาพแสดงโครมาโทแกรมของเห็ดหอมที่มาจากจังหวัดปทุมธานี 48

รูปภาพที่ A-2 รูปภาพแสดงโครมาโทแกรมของเห็ดหอมที่มาจากจังหวัดสระบุรี 50

รูปภาพที่ A-3 รูปภาพแสดงโครมาโทแกรมของเห็ดหอมที่มาจากจังหวัดเชียงใหม่ 52

รูปภาพที่ A-4 รูปภาพแสดงโครมาโทแกรมของเห็ดหอมที่มาจากจังหวัดนครราชสีมา 54

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2-1 ตารางแสดงรูปแบบการทดลองที่ออกแบบโดยใช้การออกแบบชนิด CCD	20
ตารางที่ 3-1 ตารางแสดงสารระเหยที่เป็นองค์ประกอบหลัก 13 สาร ในเห็ดหอม และโครงสร้าง	30
ตารางที่ A-1 ตารางแสดงพื้นที่ได้ฟักของเห็ดหอมตัวอย่างจากจังหวัดปทุมธานี	40
ตารางที่ A-2 ตารางแสดงพื้นที่ได้ฟักของเห็ดหอมตัวอย่างจากจังหวัดสระบุรี	42
ตารางที่ A-3 ตารางแสดงพื้นที่ได้ฟักของเห็ดหอมตัวอย่างจากจังหวัดเชียงใหม่	44
ตารางที่ A-4 ตารางแสดงพื้นที่ได้ฟักของเห็ดหอมตัวอย่างจากจังหวัดนครราชสีมา	46

ภาควิชาเคมี
 คณะวิทยาศาสตร์
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำอธิบายและคำย่อ

คำย่อ

HS-SPME	=	headspace–solid phase microextraction
GC-MS	=	gas chromatography–mass spectrometry
GC-FID	=	gas chromatography with flame ionization detector
MLR	=	multiple linear regression
DOE	=	Design of Experiment
CCD	=	central composite design
PCA	=	principal component analysis
PDMS	=	polydimethylsiloxane
PA	=	polyacrylate
CW	=	carbowax
DVB	=	divinylbenzene

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เห็ดหอม (Shiitake) ชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Lentinus edodes* เป็นสายพันธุ์เห็ดที่ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลาย และมีมูลค่าสูงในหลายประเทศ เช่น ญี่ปุ่น จีน และไต้หวัน เป็นต้น รวมทั้งในประเทศไทย เห็ดหอมก็ได้รับความนิยมอย่างมากเช่นกัน เนื่องจากเมื่อนำเห็ดหอมมาประกอบเป็นอาหารจะได้กลิ่นหอมที่มีเอกลักษณ์เฉพาะตัว และมีรสชาติดี เห็ดหอมยังเป็นเห็ดที่มีคุณค่าทางอาหารมากมาย เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน กรดอะมิโนที่จำเป็น และวิตามินหลายชนิด โดยเฉพาะวิตามินดี นอกจากนี้ยังใช้เห็ดหอมเป็นสรรพคุณทางยาด้วย เช่น เสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (immune function) ป้องกันเชื้อ AIDS รักษาโรคมะเร็ง อากาศภูมิแพ้ และโรคหัวใจ เป็นต้น^[1] ด้วยเหตุผลดังกล่าวนี้เห็ดหอมจึงมีการเพาะปลูกเป็นเห็ดเศรษฐกิจอย่างแพร่หลายในประเทศแถบเอเชีย โดยในประเทศไทยเห็ดหอมจะมีแหล่งเพาะปลูกสำคัญส่วนใหญ่อยู่ทางภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดเชียงราย จังหวัดเชียงใหม่ จังหวัดพะเยา ภาคอีสาน ได้แก่ จังหวัดนครราชสีมา จังหวัดขอนแก่น และภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดปทุมธานี จังหวัดสระบุรี

เห็ดหอมเป็นเห็ดที่มีกลิ่นหอมเป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัวที่เกิดจากองค์ประกอบของสารระเหยง่าย (volatile compounds) หลายชนิด โดยที่เห็ดหอมจากแต่ละแหล่งเพาะปลูกจะมีองค์ประกอบของสารระเหยที่ไม่เหมือนกัน ทำให้กลิ่นของเห็ดหอมจากแต่ละแหล่งเพาะปลูกไม่เหมือนกัน แต่เห็ดหอมที่ปลูกในแต่ละภาคของประเทศไทยจะมีลักษณะของดอกเห็ดที่เหมือนกัน ทำให้การระบุแหล่งที่มาโดยการสังเกตด้วยลักษณะทางกายภาพจะมีความถูกต้องน้อย ดังนั้นการสกัดสารระเหยง่ายจากเห็ดหอม และตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี เป็นวิธีที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารอินทรีย์ที่ระเหยง่ายในเห็ดหอม ซึ่งจะทำให้สามารถบ่งบอกเอกลักษณ์สารระเหยง่ายของเห็ดหอมจากแต่ละแหล่งเพาะปลูก แล้วนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบ และจัดกลุ่มของเห็ดหอมจะช่วยบ่งบอกแหล่งที่มาของเห็ดหอมได้

จากการศึกษาเกี่ยวกับการเปรียบเทียบสารระเหยง่ายในเห็ดหอมที่มาจากแต่ละแหล่งเพาะปลูกสำหรับใช้บอกแหล่งที่มาของเห็ดหอมพบว่ายังไม่เป็นที่แพร่หลาย ดังนั้น ในการวิจัยนี้สนใจที่จะศึกษา และเปรียบเทียบสารระเหยง่ายในเห็ดหอมที่มาจากแต่ละจังหวัด โดยเลือกใช้เทคนิคเฮดสเปซ-โซลิดเฟสไมโครเอกซ์แทรกชัน (headspace-solid phase microextraction, HS-SPME) ซึ่งเป็นเทคนิคที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารระเหยบริเวณเฮดสเปซได้ดี จากนั้นตรวจวัดสารระเหยง่ายโดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ทำให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องน่าเชื่อถือ และยังสามารถนำวิธีเคโมเมตริกซ์ (chemometrics) ซึ่งเป็นวิธีที่เกี่ยวข้องข้องกับสถิติหลายตัวแปร

(multivariate statistical analysis)^[2] มาช่วยในการออกแบบการทดลอง การประมวลผลการทดลอง และการจัดกลุ่มข้อมูล เนื่องจากผลการวิเคราะห์ที่ได้จาก GC-MS มีจำนวนมาก และซับซ้อน การนำเทคนิค เคมีเมทริกซ์มาประยุกต์ใช้ จะทำให้สามารถระบุแหล่งที่มาของเห็ดหอมได้อย่างถูกต้องมากยิ่งขึ้น

1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากงานวิจัยที่ผ่านมาศึกษาเกี่ยวกับสารระเหยง่ายในเห็ดหอมพบว่า Chen และ Ho^[3] ได้ศึกษาสารประกอบซัลเฟอร์ในเห็ดหอม โดยการสกัดด้วยสารผสม *n*-Hexane และ ether อัตราส่วน 9 : 1 แล้ววิเคราะห์โดยเทคนิค GC-MS พบว่าเห็ดหอมประกอบด้วยสารระเหยง่ายที่มีองค์ประกอบของซัลเฟอร์ชนิดที่เป็นวง และไม่เป็นวงทั้งหมด 18 ชนิด โดยมี 13 ชนิดที่ได้รับการยืนยันว่าเป็นสารระเหยง่ายที่เป็นองค์ประกอบของเห็ดหอม ตัวอย่างของสารประกอบซัลเฟอร์ที่เป็นวง เช่น lenthionine (C₂H₄S₅, 1, 2, 3, 5, 6-pentathiepane), 1, 2, 4, 5-tetrathiane (C₂H₄S₄), 1, 2, 3, 5-tetrathiane (C₂H₄S₄), และ 1, 2, 4-trithiolane (C₂H₄S₃) เป็นต้น ตัวอย่างของสารประกอบซัลเฟอร์ที่ไม่เป็นวง เช่น ethyl disulfide, dimethyl trisulfide และ 1-(methylthio)dimethyl disulfide เป็นต้น

หลังจากนั้น Chen และคณะ^[4] ได้ศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับสารระเหยง่ายในเห็ดหอม และได้ระบุว่าเห็ดหอมยังประกอบด้วยสารประกอบที่มีคาร์บอน 8 อะตอม ได้แก่ octen-3-ol และ 2-octen-1-ol โดยที่สารประกอบที่มีคาร์บอน 8 อะตอม เกิดจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ในเห็ดหอม ที่เกิดปฏิกิริยาจาก linoleic acid การเกิดสารประกอบที่มีคาร์บอน 8 อะตอม ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ได้แก่ (1) การเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ โดยมี linoleic acid สารตั้งต้น และ (2) การเกิดปฏิกิริยาการเกิดพอลิเมอร์ของ methylene disulfide

การทำเห็ดหอมแห้งในอุตสาหกรรมอาหารทำเพื่อถนอมอาหาร และเพื่อปรับปรุงให้เห็ดหอมมีกลิ่นเฉพาะตัวมากขึ้น ดังนั้น Hong และคณะ^[5] ได้ศึกษาเพิ่มเติมเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของสารระเหยง่ายระหว่างเห็ดหอมสด และเห็ดหอมแห้ง โดยการสกัดด้วยการกลั่นด้วยไอน้ำ และวิเคราะห์โดยเทคนิค GC-MS พบว่าสารระเหยง่ายที่แตกต่างกันในเห็ดหอมสด และเห็ดหอมแห้ง คือ 1-octen-3-ol ซึ่งจะเป็นสารระเหยง่ายที่เป็นองค์ประกอบหลักในเห็ดหอมสดโดยคิดเป็น 74.7% ของผลรวมพื้นที่ใต้พีคทั้งหมด และ 1, 2, 4-trithiolane จะเป็นสารระเหยง่ายที่เป็นองค์ประกอบหลักในเห็ดหอมแห้งโดยคิดเป็น 66.3% ของผลรวมพื้นที่ใต้พีคทั้งหมด

เทคนิคเฮดสเปซ-โซลิดเฟสไมโครเอกซ์แทรกชัน (HS-SPME) ได้พัฒนาขึ้นโดย Arthur และ Pawliszyn^[6] ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถตรวจวัดสารระเหยง่ายในอาหาร และเครื่องดื่มได้ โดยเป็นเทคนิคในการสกัดสารระเหยง่ายในตัวอย่าง และเก็บสารตัวอย่างที่ได้รับความนิยมมากในด้านเคมีวิเคราะห์ เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ทำได้ง่าย ประหยัดเวลา และไม่ต้องใช้สารละลายอินทรีย์ในการสกัดสาร อีกทั้งยังเป็นเทคนิคที่ใช้ได้กับสารตัวอย่างที่มีคุณสมบัติเป็นสารระเหยง่ายที่อยู่ในรูปของแข็ง ของเหลว และแก๊ส^[7]

โดยเทคนิค HS-SPME ได้ประสบความสำเร็จในการวิเคราะห์องค์ประกอบสารระเหยง่ายในอาหาร เช่น Yang และคณะ^[8] ได้ใช้เทคนิค HS-SPME ร่วมกับ GC-FID วิเคราะห์กลิ่นของกาแฟคั่วบด น้ำผลไม้ และรสชาติของเนยในน้ำมันพืช Miller และคณะ^[9] ใช้เทคนิค HS-SPME ร่วมกับ GC-MS เพื่อวิเคราะห์กลิ่นของอบเชยตามแหล่งเพาะปลูก Jia และคณะ^[10] ศึกษากลิ่นของน้ำส้มโดยใช้เทคนิค HS-SPME และ Ruiz และคณะ^[11] ศึกษาสารระเหยง่ายที่ให้กลิ่นให้ผลิตภัณฑ์ประเภทเนื้อโดยใช้เทคนิค HS-SPME ร่วมกับ GC-MS

เนื่องจากข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์สารระเหยง่ายจะมีข้อมูลที่ซับซ้อน และมีจำนวนมาก ดังนั้นการพิจารณา และการประมวลผลข้อมูลจะอาศัยเทคนิคทางเคโมเมทริกซ์ มาช่วยในการจำแนกข้อมูล ซึ่งเคโมเมทริกซ์เป็นเทคนิคที่อาศัยหลักการทางสถิติที่เกี่ยวข้องกับหลายตัวแปร เพื่อใช้ในการจัดแบ่งกลุ่มตามความเหมือน และความต่างกันของสารตัวอย่างจากข้อมูลของสารเคมีที่ตรวจวัดได้จาก GC-MS

ตัวอย่างงานวิจัยที่ใช้เทคนิคทาง GC-MS ร่วมกับเคโมเมทริกซ์ เช่น Román และคณะ^[12] ได้ใช้เทคนิค HS-SPME-GC-MS เพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารระเหยง่ายในเห็ดร่วมกับการใช้วิธีเคโมเมทริกซ์ในการออกแบบการทดลอง พบว่าสารระเหยที่เป็นองค์ประกอบสำคัญในเห็ด ได้แก่ (1) สารกลุ่มแอลกอฮอล์ เช่น 1-butanol, 1-pentanol, 1-octen-3-ol และ 1-heptanol เป็นต้น (2) สารกลุ่มคาร์บอกซิลิก เช่น acetic acid, propanoic acid, 2-Methyl butanoic acid, pentanoic acid และ butanoic acid เป็นต้น อีกทั้ง Carlo และคณะ^[13] ศึกษาความแตกต่างขององค์ประกอบในสารระเหยง่ายของกาแฟคั่วบด และเครื่องดื่มกาแฟ โดยใช้เทคนิค SPME-GC ร่วมกับการใช้วิธีเคโมเมทริกซ์ชนิด PCA ในการประมวลผลการทดลอง เป็นต้น

Pillonel และคณะ^[14] ได้ศึกษาความแตกต่างกลิ่นของชีสชนิดแอมเม็นทอล (emmental cheese) เพื่อหาความแตกต่างของสารระเหยง่ายที่ให้กลิ่น และสารระเหยที่เป็นเอกลักษณ์ของชีสที่มาจากประเทศในยุโรปที่แตกต่างกันโดยใช้เทคนิค GC-MS/FID และนำข้อมูลของสารระเหยที่ได้มาประมวลผลด้วยวิธีเคโมเมทริกซ์ชนิด PCA ทำให้สามารถแยกชีสชนิดแอมเม็นทอลที่มาจากแหล่งผลิตที่แตกต่างกันได้

Freitas และคณะ^[15] ได้ศึกษาสารระเหยง่ายที่ให้กลิ่นของกาแฟที่ใช้กระบวนการคั่ว และกระบวนการผลิตที่เหมือนกัน แต่มาจากแหล่งผลิตที่แตกต่างกันทั้งหมด 8 แหล่ง โดยใช้เทคนิค GC-MS แล้วนำข้อมูลของสารระเหยง่ายที่ได้จากการวิเคราะห์มาประมวลผลด้วยวิธีเคโมเมทริกซ์ชนิด PCA เพื่อบอกความแตกต่างของกาแฟที่มาจากแหล่งผลิตที่แตกต่างกันได้

นอกจากนี้ Cynkar และคณะ^[16] ยังได้ศึกษาองค์ประกอบของสารระเหยที่ให้กลิ่นของเครื่องดื่มไวน์ชนิดเทมปรานิลโย (Tempranillo wine) จากประเทศสเปน และประเทศออสเตรเลีย โดยใช้เทคนิค mass spectrometry-electronic nose (MS-EN) เพื่อบ่งบอกถึงคุณภาพของไวน์ และได้ใช้วิธีเคโมเมทริกซ์ชนิด principal components analysis (PCA), partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) และ stepwise linear discriminant analysis (SLDA) ในการจำแนกแหล่งผลิตของไวน์

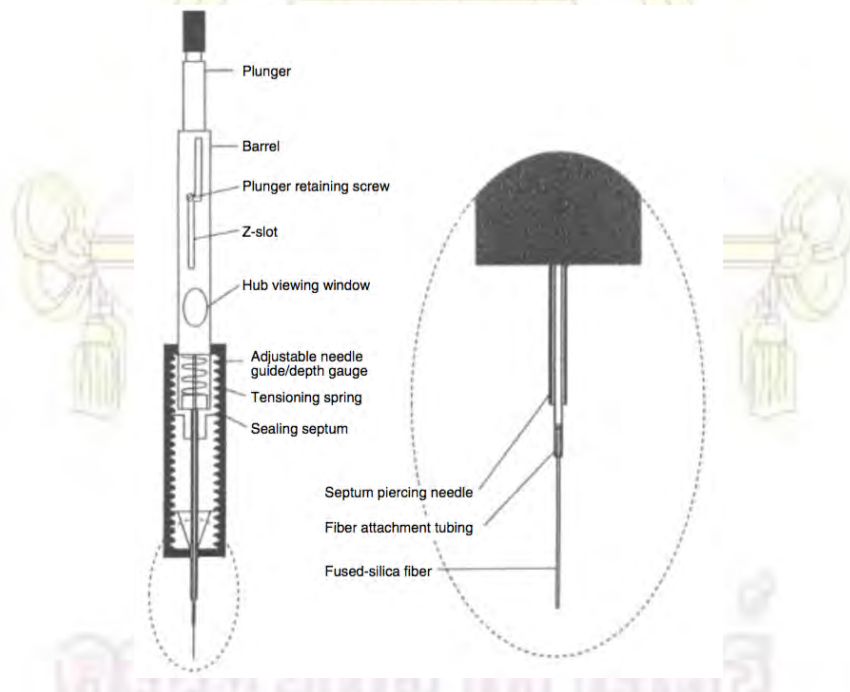
1.3 ทฤษฎีและความรู้พื้นฐาน

1.3.1 เทคนิคเฮดสเปซ-โซลิดเฟสไมโครเอกซ์แทรกชัน (HS-SPME)

ในปี ค.ศ. 1990 โดย Arthur C.L. และ Pawliszyn J.^[17] ได้พัฒนาเทคนิค HS-SPME ขึ้นซึ่งเป็นเทคนิคการสกัดสารระเหยง่ายในตัวอย่าง (ของแข็ง ของเหลว หรือแก๊ส) ที่บรรจุอยู่ในขวดเก็บตัวอย่างให้ออกมาอยู่ในเฮดสเปซ (headspace, HS) เพื่อให้ไฟเบอร์ของ SPME ดูดซับสารระเหยง่ายจากเฮดสเปซ แล้วจึงปล่อยสารระเหยง่ายดังกล่าวเข้าสู่ส่วนปล่อยสารของเครื่อง GC ดังนั้นหลักการของ HS-SPME ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน^[18] คือ (1) Extraction Step โดยพอลิเมอร์ที่เคลือบอยู่บนไฟเบอร์จะทำหน้าที่ดูดซับสารระเหยง่ายจากตัวอย่างบริเวณเฮดสเปซในขวดเก็บตัวอย่าง (2) Desorption Step นำไฟเบอร์ที่ดูดซับสารตัวอย่างมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS เพื่อปลดปล่อยสารตัวอย่างออกจากไฟเบอร์ที่บริเวณส่วนฉีดสารของเครื่อง GC-MS

ข้อดีของการเตรียมสารโดยเทคนิค HS-SPME คือ เป็นเทคนิคที่ง่าย มีประสิทธิภาพสูง และไม่ต้องใช้ตัวทำละลายในการสกัดสาร

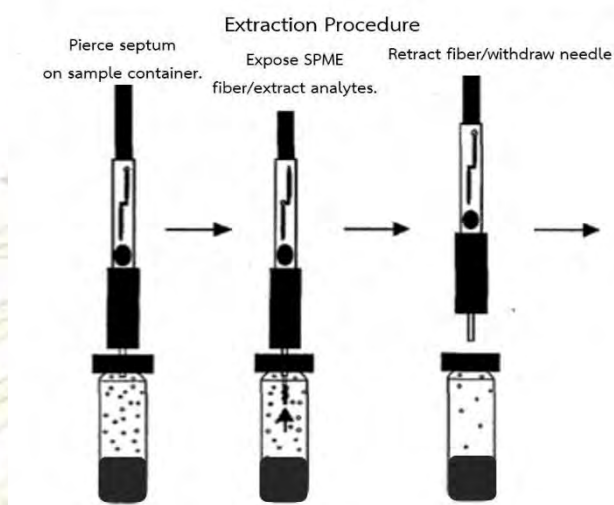
ข้อด้อยของการเตรียมสารโดยเทคนิค HS-SPME คือ เป็นอุปกรณ์ที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ มีราคาแพง การใช้งานต้องระมัดระวัง เนื่องจากไฟเบอร์ค่อนข้างเปราะ และหักง่าย และในตัวอย่างที่เป็นของแข็งผลของสารรบกวน (matrix effect) จะส่งผลต่อการวิเคราะห์ค่อนข้างมาก^[19]



รูปที่ 1-1 ส่วนประกอบอุปกรณ์โซลิดเฟสไมโครเอกซ์แทรกชัน^[20]

หลักการทำงานของ SPME ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนการสกัดสาร และขั้นตอนการปลดปล่อยสาร

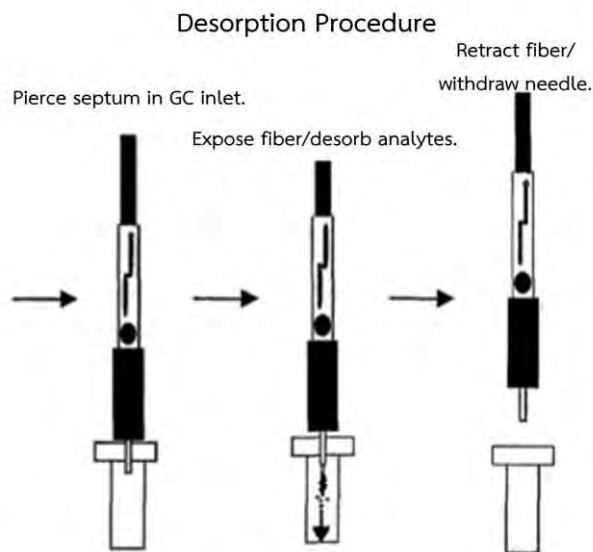
ขั้นตอนการสกัดสารประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ดังรูปที่ 1-2



รูปที่ 1-2 ขั้นตอนการสกัดสาร^[21]

- 1) เจาะเข็ม SPME ผ่าน septum ของขวดบรรจุสารตัวอย่าง
- 2) ปล่อยให้ไฟเบอร์ออกมาจาก septum piercing needle ลงไปในบริเวณเฮดสเปซเพื่อให้เกิดการดูดซับของสารระเหยง่ายบนไฟเบอร์
- 3) เก็บไฟเบอร์เข้าไปใน septum piercing needle และดึงเข็ม SPME ออกจากขวดบรรจุสารตัวอย่างเพื่อเข้าสู่ขั้นตอนการปลดปล่อยสาร

ขั้นตอนการปลดปล่อยสารประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ดังรูปที่ 1-3

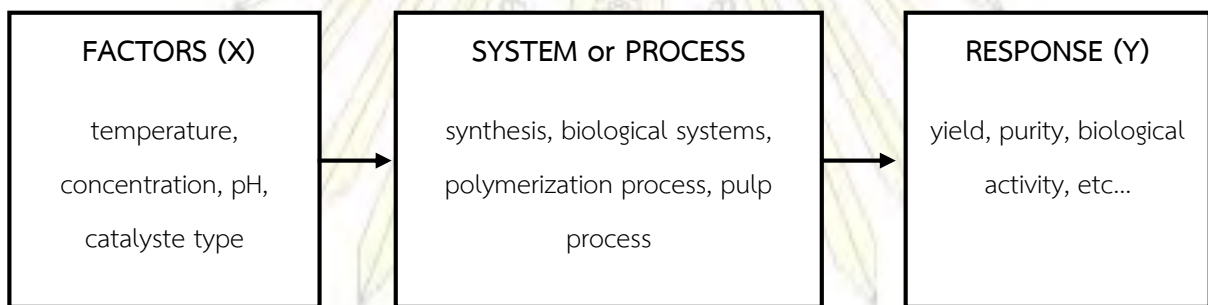


รูปที่ 1-3 ขั้นตอนการปลดปล่อยสาร^[21]

- 1) เจาะเข็ม SPME ผ่าน septum ผ่านเข้าไปยังส่วนฉีดยาของเครื่อง GC-MS
- 2) ปลดปล่อยไฟเบอร์ออกมาจาก septum piercing needle เพื่อปลดปล่อยสารที่ต้องการวิเคราะห์ให้เข้าสู่ส่วนฉีดยาของเครื่อง GC-MS
- 3) เมื่อครบกำหนดเวลาที่ปลดปล่อยสารออกจากไฟเบอร์ทั้งหมด ให้เก็บไฟเบอร์เข้าไปใน septum piercing needle และนำเข็ม SPME ออกจากส่วนฉีดยาของเครื่อง GC-MS

1.3.2 การออกแบบการทดลอง (Design of Experiment, DOE)

การทดลอง คือ กระบวนการ หรือวิธีศึกษาเพื่อให้ได้ผลลัพธ์เป็นข้อมูล ซึ่งการทดลองทางเคมีทั่วไป นักวิจัยจะต้องทดลองโดยแบ่งออกเป็น 3 ส่วน ดังรูปที่ 1-4 ได้แก่ กำหนดตัวแปรอิสระที่มีผลกระทบต่อ การทดลอง หลังจากนั้นกำหนดปริมาณ หรือค่าของตัวแปรอิสระนั้นเพื่อนำไปใช้ในการทดลอง และตรวจวัดผลของ ตัวแปรเหล่านั้นจากผลการทดลอง หรือค่าการตอบสนองทั้งในเชิงปริมาณ (Quantitative Analysis) และเชิง คุณภาพ (Qualitative Analysis) โดยบันทึกผลการทดลองในรูปแบบของตัวเลข หรือสเปกตรัม

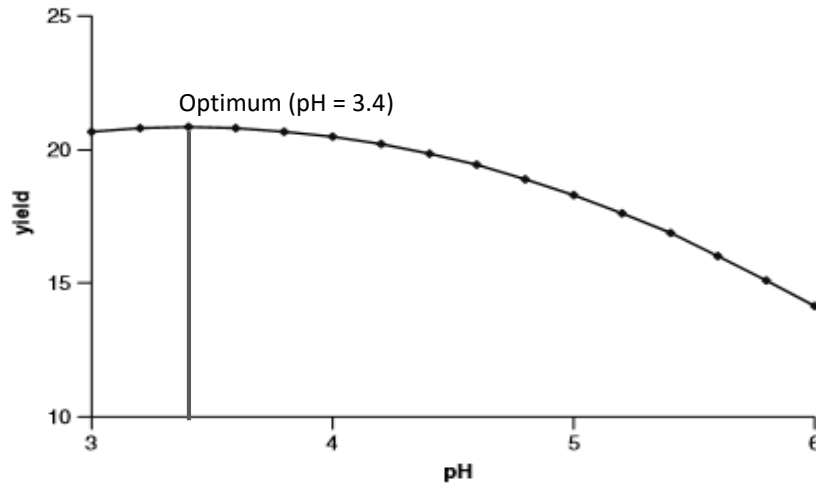


รูปที่ 1-4 แผนภาพแสดงขั้นตอน ความสัมพันธ์ของตัวแปร และผลการทดลองในการทดลองทั่วไป^[22]

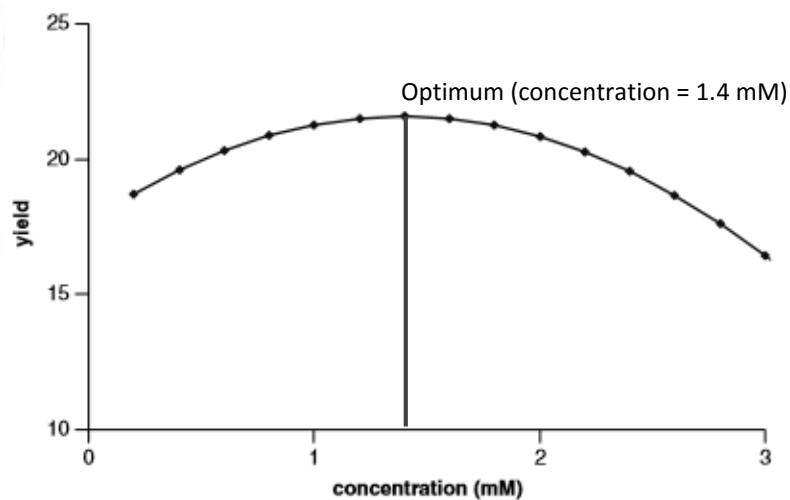
การทดลองโดยทั่วไปนักวิจัยจะทำการทดลองโดยกำหนดค่าตัวแปรอิสระทีละ 1 ค่า (variable) อย่าง ไม่เป็นระบบเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของระบบที่มีความซับซ้อน และให้ตัวแปรอิสระตัวอื่น ๆ เป็นค่าคงที่ จากนั้นจึงหาค่าตัวแปรอิสระตัวอื่น ๆ ต่อไป เรียกการทดลองแบบนี้ว่า การเปลี่ยนค่าตัวแปรอิสระเดี่ยวในแต่ละ การทดลอง (change one separate factor at a time, COST)^[22] ซึ่งจะเป็นการทดลอง และเปรียบเทียบ ผลการทดลองที่ได้กับผลการทดลองเดิม การทำการทดลองแบบนี้โดยปราศจากการออกแบบการทดลองที่ดีจะ เปรียบเสมือนการลองผิดลองถูกไปทีละขั้น

ตัวอย่างเช่น การสังเคราะห์สาร A โดยมีตัวแปรอิสระ 2 ตัว ในการทดลอง คือ pH และความเข้มข้น ของสารตัวทำปฏิกิริยา (reagent) โดยใช้วิธี COST ในการหาค่าตัวแปรที่เหมาะสม จะได้ว่า ปริมาณสาร A ที่ สังเคราะห์ได้ (%yield) โดยการเปลี่ยนแปลงค่า pH และกำหนดค่าความเข้มข้นของสารตัวทำปฏิกิริยาคงที่ไว้ ที่ 2 mM จะพบว่าค่า pH ที่เหมาะสมที่ให้ปริมาณสาร A มากที่สุดคือ pH เท่ากับ 3.4 จากนั้นทดลองโดย กำหนดให้ค่า pH คงที่ที่ 3.4 และเปลี่ยนค่าความเข้มข้นของสารตัวทำปฏิกิริยา พบว่าความเข้มข้นของสารตัว ทำปฏิกิริยาเท่ากับ 1.4 mM ให้ปริมาณสาร A สูงที่สุด เพราะฉะนั้นจากการหาค่าตัวแปรที่เหมาะสมด้วยวิธี

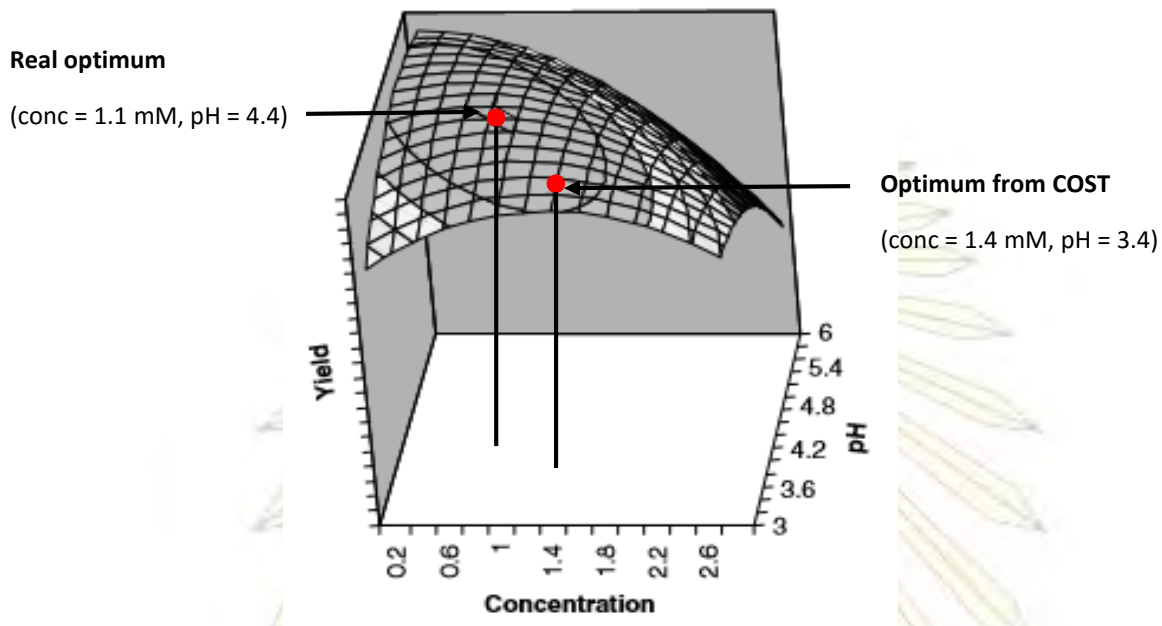
COST จะได้ปริมาณสาร A สูงที่สุดเมื่อ pH เท่ากับ 3.4 และความเข้มข้นของสารตัวทำปฏิกิริยาเท่ากับ 1.4 mM ดังรูปที่ 1-5 และรูปที่ 1-6 แต่เมื่อพิจารณาโดยเปลี่ยนตัวแปรทั้งสองควบคู่กันไปพบว่าค่าที่ทำให้ได้ปริมาณสาร A สูงที่สุดเมื่อค่า pH เท่ากับ 4.4 และความเข้มข้นของสารตัวทำปฏิกิริยาเท่ากับ 1.1 mM ดังรูปที่ 1-7



รูปที่ 1-5 แผนภาพแสดงการทดลองแบบ COST เมื่อกำหนดให้ความเข้มข้นคงที่^[23]



รูปที่ 1-6 แผนภาพแสดงการทดลองแบบ COST เมื่อกำหนดให้ pH คงที่^[23]



รูปที่ 1-7 แผนภาพแสดงค่าของตัวแปรอิสระที่เหมาะสม และค่าตัวแปรที่ได้จากวิธี COST^[23]

จากตัวอย่างการทดลองดังกล่าวจะพบว่า การหาค่าตัวแปรที่เหมาะสมจากวิธี COST นั้นไม่ใช่ค่าที่เหมาะสมของการทดลอง ซึ่งเมื่อกำหนดค่าคงที่เริ่มต้นของตัวแปรอิสระใหม่ ค่าของตัวแปรที่เหมาะสมก็จะแตกต่างกันไปจากการทดลองครั้งก่อน ทำให้ไม่สามารถหาข้อสรุปสถานะที่เหมาะสมของการทดลองที่แท้จริงได้ การหาค่าตัวแปรที่เหมาะสมด้วยวิธี COST จะถูกต้องก็ต่อเมื่อตัวแปรดังกล่าวไม่มีความสัมพันธ์ซึ่งกันและกันอย่างสมบูรณ์ ซึ่งเกิดขึ้นได้ยากในการทดลองทางเคมีโดยทั่วไป

ในปี ค.ศ. 1920 นักสถิติและนักวิทยาศาสตร์ชาวอังกฤษชื่อ Fisher R.A.^[22] ได้คิดค้นการออกแบบการทดลองที่เหมาะสมขึ้น (design of experiment, DOE) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อออกแบบการทดลองโดยปรับเปลี่ยนตัวแปรอิสระที่มีทั้งหมดพร้อม ๆ กันเพื่อให้ได้ผลการทดลองที่ดีที่สุด มีจำนวนการทดลองที่น้อยที่สุด และได้ผลการทดลองที่น่าเชื่อถือ อีกทั้งยังทำให้แปรผลการทดลองได้ง่าย ถูกต้อง และแม่นยำ โดยพิจารณาถึงความสัมพันธ์ของตัวแปรแต่ละตัว และลักษณะการดำเนินไปของแต่ละปฏิกิริยา ซึ่งการออกแบบการทดลองนั้นสามารถจำแนกตามวัตถุประสงค์ในการทดลองเป็น 3 ขั้นตอน ดังนี้

- 1.3.2.1 การออกแบบการทดลองของตัวแปรที่ถูกคัดเลือก (screening design) คือ การออกแบบการทดลองเพื่อพิจารณาปัจจัยที่มีความสำคัญต่อความสำเร็จในการทดลอง
- 1.3.2.2 การทำนายผลการทดลองในเชิงปริมาณ (quantitative modeling) คือ การสร้างสมการทางคณิตศาสตร์เพื่อทำนายผลการทดลองในเชิงปริมาณโดยอาศัยการสร้างกราฟมาตรฐาน

- 1.3.2.3 การหาค่าของตัวแปรที่เหมาะสม (optimization) คือ กระบวนการในกำหนดค่าตัวแปร เพื่อทำการทดลองให้ได้ผลการทดลองที่ดีที่สุด

1.3.3 การออกแบบการทดลองของตัวแปรที่ถูกคัดเลือก (Screening design)

การออกแบบการทดลองที่เป็นพื้นฐาน ได้แก่ ฟูลแฟคทอเรียล (full factorial design) เฟคชันนัลแฟคทอเรียล (fractional factorial design) และเซ็นทรัลคอมโพสิสต์ (central composite design) ซึ่งในการวิจัยครั้งนี้เลือกการออกแบบการทดลองแบบเซ็นทรัลคอมโพสิสต์ (central composite design)^[24]

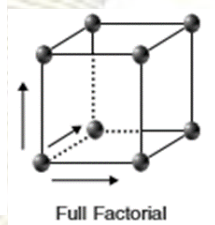
1.3.3.1 เซ็นทรัลคอมโพสิสต์ (Central composite design, CCD)

การออกแบบการทดลองทางเคมีทั่วไปนั้นตัวแปรอิสระบางตัวไม่ส่งผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการทดลองจึงไม่จำเป็นต้องนำมาพิจารณาในการวิเคราะห์ ดังนั้นจึงสามารถใช้ระบบออกแบบการทดลองที่มีประสิทธิภาพได้ ซึ่งเมื่อจำนวนตัวแปรอิสระถูกจำกัดก็สามารถใช้วิธีการออกแบบการทดลองที่เรียกว่า central composite design (CCD) ซึ่งเป็นที่นิยมในการใช้ออกแบบการทดลองทางเคมีทั่วไป

หลักการของ CCD สามารถอธิบายได้ด้วยตัวอย่างการออกแบบการทดลองที่ตัวแปรอิสระถูกกำหนดไว้จำนวน 3 ตัว ($f=3$) และตัวแปรอิสระแต่ละตัวถูกควบคุมให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไป 2 ระดับค่า ($l=2$) ดังรูปที่ 1-8 ซึ่งการแบบการทดลองแบบ CCD อธิบายได้ด้วยการจำลองการออกแบบการทดลองในกล่องลูกบาศก์ และแกนของกล่องลูกบาศก์มีความสัมพันธ์กับตัวแปรอิสระแต่ละตัว จากนั้นกำหนดรหัสให้กับตัวแปรอิสระทุกตัว โดยให้ค่ากลางของตัวแปรอิสระมีรหัสเป็น 0 ค่าสูงสุดมีรหัสเป็น 1 และค่าต่ำสุดมีรหัสเป็น -1 จะได้ว่าจำนวนการทดลองตามสมการฟูลแฟคทอเรียล (full factorial design)^[23] เท่ากับ $2^3 = 8$ การทดลอง จำนวนการทดลองที่เกิดจากออกแบบการทดลองแบบ star^[23] คือ 7 การทดลอง และจำนวนการทดลองที่เกิดจากการทดลองซ้ำ (replication) คือ 5 การทดลอง ดังนั้นจำนวนการทดลองทั้งหมดของ CCD คือ $8+7+5 = 20$ การทดลอง

Full factorial

1	1	1
1	1	-1
1	-1	1
1	-1	-1
-1	1	1
-1	1	-1
-1	-1	1
-1	-1	-1



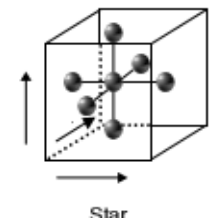
Full Factorial

Central composite

1	1	1
1	1	-1
1	-1	1
1	-1	-1
-1	1	1
-1	1	-1
-1	-1	1
-1	-1	-1
<hr/>		
0	0	-1
0	0	1
0	1	0
0	-1	0
1	0	0
-1	0	0
<hr/>		
0	0	0
0	0	0
0	0	0
0	0	0
0	0	0
0	0	0
0	0	0
0	0	0

Star

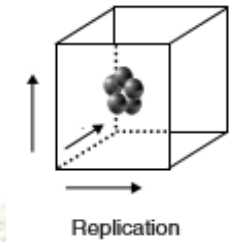
0	0	-1
0	0	1
0	1	0
0	-1	0
1	0	0
-1	0	0
0	0	0



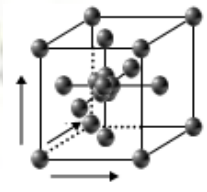
Star

Replication in centre

0	0	0
0	0	0
0	0	0
0	0	0
0	0	0
0	0	0



Replication



Central Composite

รูปที่ 1-8 แสดงการออกแบบการทดลองแบบ CCD ที่ประกอบไปด้วยจำนวนการทดลองจาก full factorial, star และการทดลองซ้ำ (replication)^[23]

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.3.4 สมการทางคณิตศาสตร์ในเชิงปริมาณ (Quantitative modeling)

หลังจากออกแบบการทดลอง และได้ผลการทดลองแล้ว ขั้นตอนต่อไป คือ พิจารณาผลการทดลองที่ได้ทั้งหมด สมการทางคณิตศาสตร์สามารถสร้างได้จากค่าตอบสนองเพื่อช่วยในการวิเคราะห์ และจากการออกแบบการทดลองที่เป็นระบบจะช่วยให้สามารถสร้างสมการทางคณิตศาสตร์สำหรับวิเคราะห์ผลการทดลองที่มีความถูกต้องสูง โดยสามารถเขียนสมการเชิงเส้นของการทดลองที่มี 3 ตัวแปรอิสระได้ดังนี้

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3$$

ผลตอบสนอง (response)
 ค่าตัดแกน (intercept or average)
 ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linear terms)
 ความสัมพันธ์กำลังสอง (quadratic terms)
 ความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร (interaction terms)

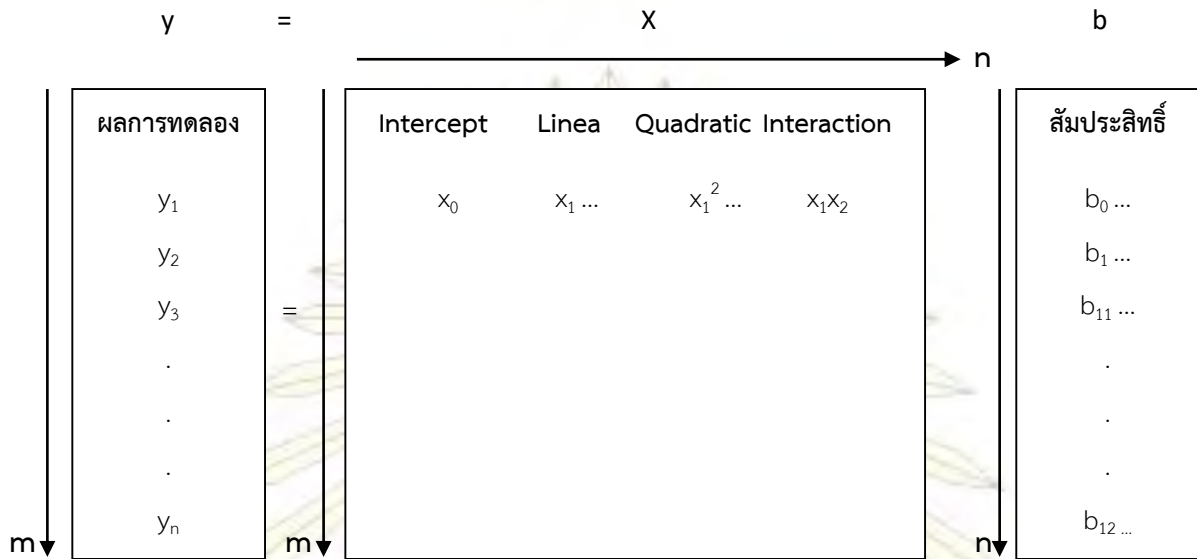
จากสมการเชิงเส้นตรงของระบบที่มีตัวแปรอิสระ 3 ตัว จะสามารถสร้างได้ทั้งหมด 11 พารามิเตอร์ จากสมการเชิงเส้นจะทราบเพียงค่าตอบสนอง (y) และค่าของตัวแปรอิสระ (x_1, x_2, x_3) ซึ่งค่าสัมประสิทธิ์ (b) ที่ไม่ทราบได้โดยตรงจากการทดลองซึ่งสามารถหาค่าสัมประสิทธิ์ได้จากวิธี multiple linear regression (MLR) โดยวิธีการนี้จะเปลี่ยนค่าของผลการทดลอง และค่าตัวแปรอิสระให้อยู่ในรูปของเมทริกซ์ และเวกเตอร์ดังสมการ

$$y = X \cdot b$$

โดยที่	$y_{(m \times 1)}$ คือ	ค่าตอบสนองของ m การทดลอง
	$b_{(n \times 1)}$ คือ	สัมประสิทธิ์ของ n พารามิเตอร์ในสมการเชิงเส้น
	$X_{(m \times n)}$ คือ	ค่าของ n พารามิเตอร์ในสมการเชิงเส้นของ m การทดลอง

โดยโครงสร้าง และมิติของสมการ $y = X \cdot b$ ของตัวอย่างสมการเชิงเส้นที่ถูกเปลี่ยนมาอยู่ในรูปเมทริกซ์นั้นแสดงได้ดังรูปที่ 1-9

ภาควิชาเคมี
 คณะวิทยาศาสตร์
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

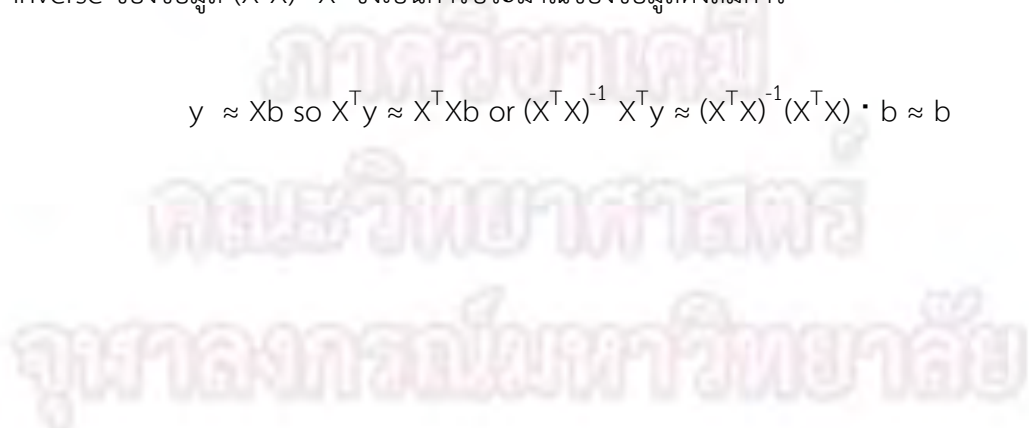


รูปที่ 1-9 รูปแบบของเมทริกซ์ และเวกเตอร์ที่เปลี่ยนรูปมาจากสมการเชิงเส้น^[23]

จากรูปแบบของเมทริกซ์ และเวกเตอร์ค่าสัมประสิทธิ์สามารถหาได้โดยหลักของการวิเคราะห์เชิงเส้นหลายตัวแปร (multiple linear regression, MLR) ค่าสัมประสิทธิ์ก็สามารถหาได้ดังนี้

- (ก) ข้อมูลเป็นเมทริกซ์สมมูล (square matrix) คือ เมทริกซ์ที่มีจำนวนแถวเท่ากับจำนวนคอลัมน์ จะสามารถหาค่าสัมประสิทธิ์ (b) ได้โดยตรงจากหลักการ MLR เมื่อทราบค่าตอบสนอง (y) และค่าของพารามิเตอร์ในสมการเชิงเส้น (X) จะได้ว่า $b = X^{-1} \cdot y$ และเมื่อพิจารณาการทำนายค่าตอบสนองจากค่าสัมประสิทธิ์ที่คำนวณได้จากสมการ $\hat{y} = X \cdot b$ จะได้ว่าค่าตอบสนองอ้างอิง (ที่ได้จากการคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์) มีค่าเท่ากับค่าตอบสนองที่ถูกทำนายขึ้นโดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ นั่นคือ $\hat{y} = y$
- (ข) ข้อมูลไม่เป็นเมทริกซ์สมมูล จะได้ว่า $b = (X^T X)^{-1} X^T y$ โดยที่ X^T คือ การเปลี่ยนตำแหน่งของเมทริกซ์ (transpose) โดยถ้าพิจารณาค่าตอบสนองจากค่าสัมประสิทธิ์ที่คำนวณได้จากสมการ $\hat{y} = X \cdot b$ จะได้ว่า ค่าตอบสนองอ้างอิง (ที่ได้จากการคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์) มีค่าไม่เท่ากับค่าตอบสนองที่ทำนายขึ้นโดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ นั่นคือ $\hat{y} \neq y$ เนื่องจากค่าสัมประสิทธิ์ (b) คำนวณจาก pseudo-inverse ของข้อมูล $(X^T X)^{-1} X^T$ ซึ่งเป็นการประมาณของข้อมูลดังสมการ

$$y \approx Xb \text{ so } X^T y \approx X^T Xb \text{ or } (X^T X)^{-1} X^T y \approx (X^T X)^{-1} (X^T X) \cdot b \approx b$$



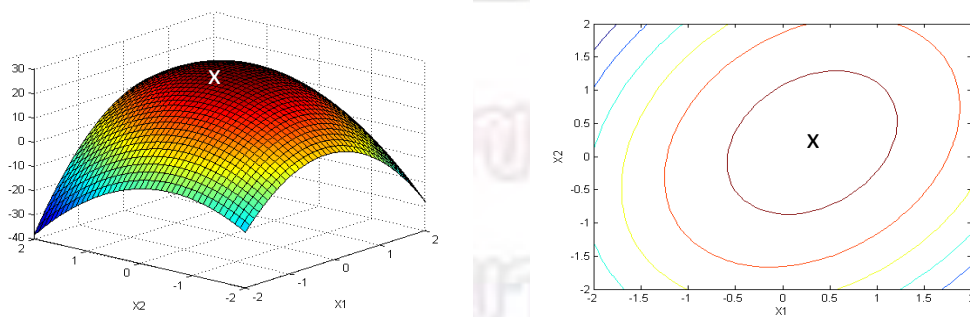
ดังนั้นค่าสัมประสิทธิ์ที่ได้จากการคำนวณจะทำให้สมการเชิงเส้นจะมีความถูกต้อง เนื่องจากค่าสัมประสิทธิ์ที่ได้จะคำนวณมากจากทุกการทดลอง ไม่ได้มาจากการทดลองใดการทดลองหนึ่ง นอกจากนั้นค่าสัมประสิทธิ์ยังบอกถึงความสำคัญของตัวแปรอิสระได้โดยดูจากค่าสัมบูรณ์ (absolute value) ของตัวแปรนั้น ๆ โดยตัวแปรที่มีค่าสัมประสิทธิ์สัมบูรณ์สูง จะได้ว่าตัวแปรอิสระนั้นมีผลกระทบ หรือความสำคัญต่อค่าตอบสนองสูงด้วยเช่นกัน อีกทั้งเครื่องหมายของค่าสัมประสิทธิ์ยังบ่งบอกถึงความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระและค่าตอบสนองด้วย โดยถ้าค่าสัมประสิทธิ์ของตัวแปรอิสระใด ๆ มีค่าเป็นบวก แสดงถึงการแปรผันตรงระหว่างค่าตอบสนอง และตัวแปรอิสระนั้น ๆ และถ้าค่าสัมประสิทธิ์ของตัวแปรอิสระใด ๆ มีค่าเป็นลบ แสดงถึงการแปรผกผันระหว่างค่าตอบสนอง และตัวแปรอิสระนั้น ๆ อีกทั้งสมการเชิงเส้นยังสามารถใช้ทำนายค่าการตอบสนองเมื่อเปลี่ยนแปลงตัวแปรอิสระได้โดยไม่ต้องทำการทดลองเพิ่ม และจะเห็นได้ว่าจากสมการเชิงเส้นที่สมบูรณ์จะสามารถวิเคราะห์ผลการทดลองได้ง่าย และแม่นยำมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการวิเคราะห์จากการทดลอง หรือค่าตอบสนองโดยตรง

1.3.5 การหาค่าของตัวแปรที่เหมาะสม (Optimization)

การหาค่าที่เหมาะสมของตัวแปรอิสระเพื่อให้ผลการตอบสนองที่ดีที่สุด สามารถทำได้หลายวิธีซึ่งวิธีหนึ่งที่เป็นวิธีที่ง่าย และไม่ต้องใช้โปรแกรมการคำนวณที่ซับซ้อน คือ วิธีการสร้างพื้นที่ตอบสนอง (response surface modeling) โดยหลังจากที่ได้ค่าสัมประสิทธิ์ของสมการเชิงเส้นของการทดลองจนเป็นสมการสมบูรณ์แล้ว จะสามารถแทนค่าตัวแปรอิสระลงไปในสมการเพื่อให้ได้ค่าตอบสนองที่คำนวณขึ้นตามสมการดังนี้

$$\hat{y} = b_0 + b_1x_1 + \dots + b_{11}x_{11} + \dots + b_{12}x_1x_2 + \dots$$

หลังจากที่ได้ค่าตอบสนอง ค่าของตัวแปรอิสระ และค่าสัมประสิทธิ์แล้ว สามารถนำมาสร้างกราฟพื้นที่ตอบสนองได้ดังรูปที่ 1-10 ซึ่งเห็นได้ว่าจะสามารถสังเกตเห็นสภาวะที่เหมาะสมที่ให้ค่าตอบสนองสูงที่สุดได้ง่ายจากกราฟพื้นที่ตอบสนองนี้ โดยวิธีดังกล่าวเป็นที่นิยมอย่างมากสำหรับนักเคมีวิเคราะห์ในการหาสภาวะที่เหมาะสม เช่น การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกสารด้วยเทคนิค HPLC หรือ GC เป็นต้น



รูปที่ 1-10 กราฟพื้นที่ตอบสนอง (ซ้าย) contour plot (ขวา) โดยมีเครื่องหมาย x เป็นจุดที่บ่งบอกค่าของตัวแปร x_1 และ x_2 ที่ให้ค่าการตอบสนองสูงที่สุด

1.3.6 เคมีเมทริกซ์

เคมีเมทริกซ์ คือ วิธีการประมวลผลข้อมูลที่นิยมใช้มากในทางเคมีวิเคราะห์ เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับใช้จัดกลุ่มผลการทดลองที่มีปริมาณมาก และกรองข้อมูลที่สำคัญออกมาโดยใช้ความรู้พื้นฐานสถิติ การนำเสนอข้อมูลของเคมีเมทริกซ์สามารถแบ่งออกได้ 2 วิธี ได้แก่ unsupervised method และ supervised method^[23]

1.3.6.1 Unsupervised method

เป็นหลักการที่สามารถประยุกต์ใช้ทางเคมีได้โดยตรง โดยเป็นหลักการวิเคราะห์ข้อมูลเชิงสำรวจซึ่งสามารถใช้จัดกลุ่มของตัวอย่าง แบ่งออกได้ 2 วิธี ได้แก่ hierarchiral cluster analysis (HCA) และ principal component analysis (PCA)

1.3.6.2 Supervised method

หลักการของการวิเคราะห์ข้อมูลแบบ Supervised นั้น จะต้องกลุ่มของข้อมูลก่อนแล้ว จากนั้นจึงจะสามารถจัดกลุ่มของข้อมูลในระดับของคลาส (class) ได้ อีกทั้งยังเป็นวิธีการทำนาย และจัดกลุ่มของข้อมูลที่ยังไม่ทราบกลุ่มได้อีกด้วย

1.3.7 Principal component analysis (PCA)

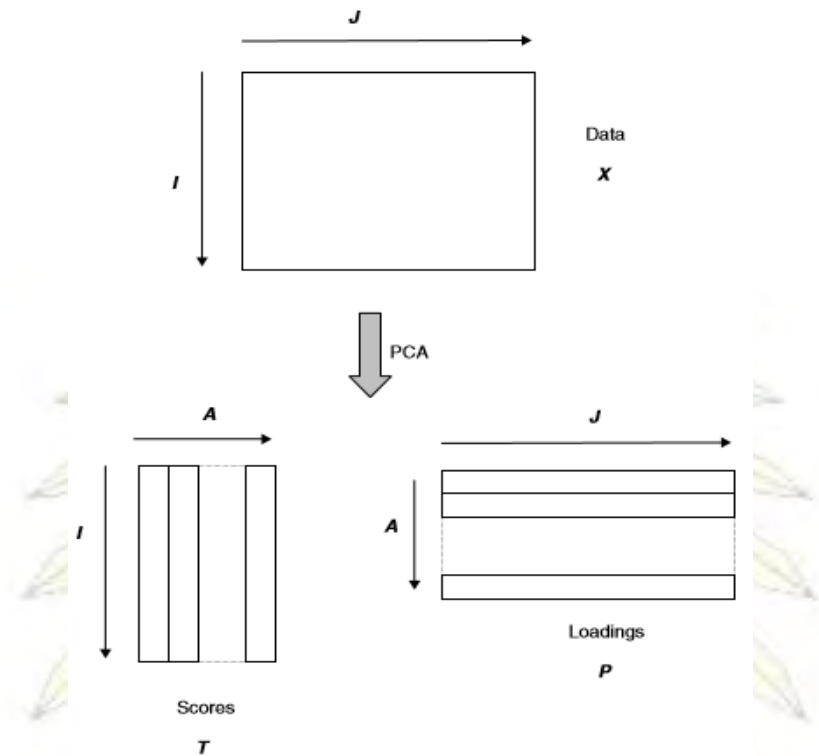
เป็นวิธีการศึกษาความสัมพันธ์ของข้อมูลเพื่อหาสิ่งที่คล้ายคลึง และแตกต่างกันของชุดข้อมูล วิธีนี้สามารถลดปริมาณตัวแปรเมื่อข้อมูลนั้นมีความสัมพันธ์กัน โดยPCA จะประมวลผลข้อมูลในรูปแบบทางคณิตศาสตร์ คือ เมทริกซ์ โดยที่มีรูปแบบของสมการคือ

$$X = T \cdot P + E$$

โดยที่ T เรียกว่า score คือ ข้อมูลที่อยู่ในแนวแถว

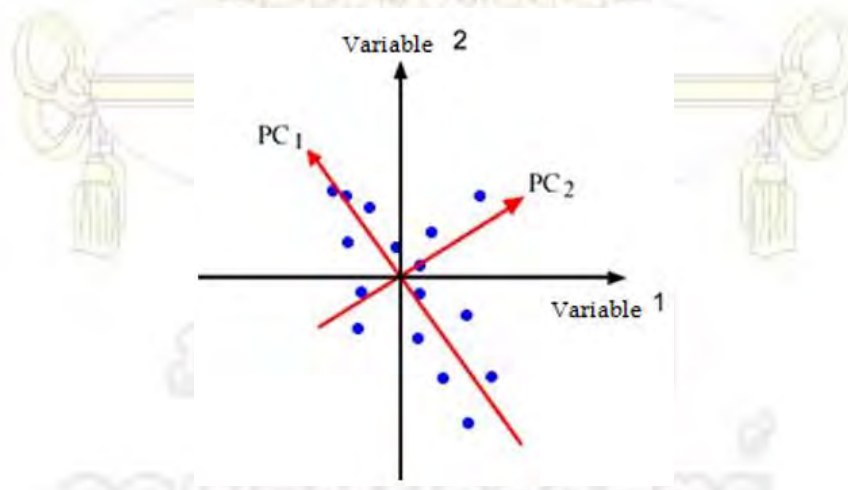
P เรียกว่า loading คือ ข้อมูลที่อยู่ในแนวคอลัมน์

และจำนวนคอลัมน์ในเมทริกซ์ T จะมีจำนวนเท่ากับจำนวนแถวในเมทริกซ์ P ดังรูปที่ 1-11



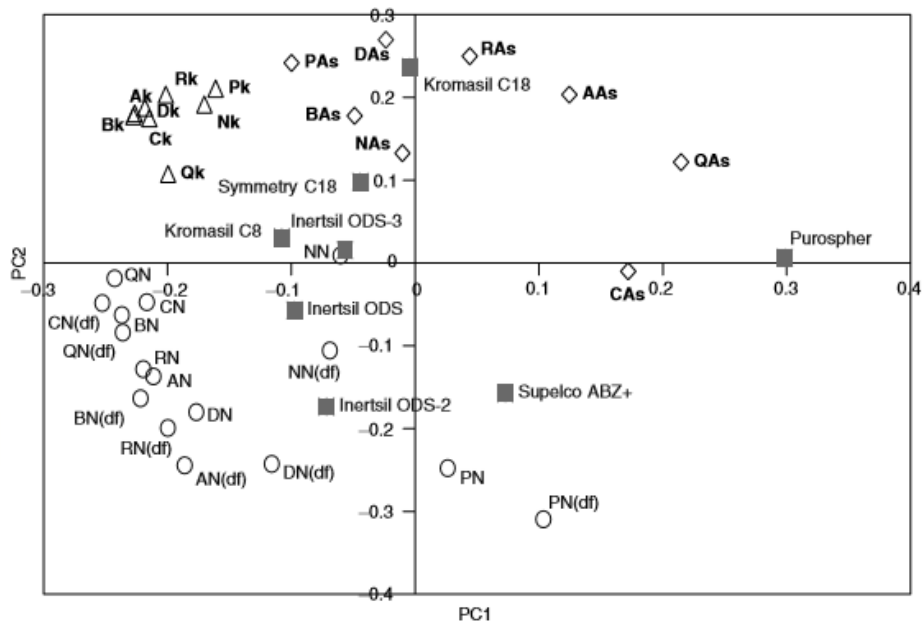
รูปที่ 1-11 รูปแสดงการวิเคราะห์ด้วยเมทริกซ์ของการวิเคราะห์ข้อมูลแบบ PCA^[22]

สำหรับการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้สิ่งที่จำเป็น คือ ชุดข้อมูลที่อยู่ในแนวคอลัมน์เรียกว่าตัวแปร (variable) เป็นปริมาณของสารชนิดต่าง ๆ ที่ตรวจวัดได้ และข้อมูลที่อยู่ในแนวแถวเรียกว่าตัวอย่าง (sample) ซึ่งเป็นชนิดของตัวอย่างที่ใช้ศึกษา และต้องใช้แกน PC_1 และ PC_2 ที่ลากผ่านจุดสำคัญขององค์ประกอบหลักในการอธิบายจุดสำคัญในกราฟ ดังรูปที่ 1-12

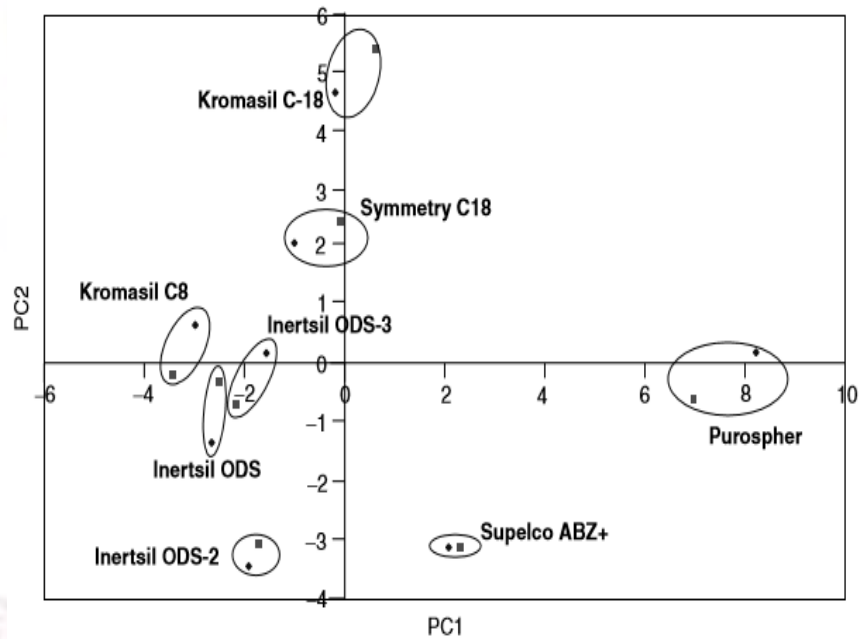


รูปที่ 1-12 การจัดกลุ่มข้อมูลด้วย PCA^[24]

การประมวลผลด้วย PCA ข้อมูลจากการประมวลผลของตัวอย่างจะแทนด้วยจุดหนึ่งจุด ดังนั้นข้อมูลที่มีองค์ประกอบคล้ายกันจะมีตำแหน่งใกล้เคียงกัน และข้อมูลที่แตกต่างกันจะมีตำแหน่งที่กระจายตัวออกไป ซึ่งสามารถแบ่งกราฟผลของ PCA ออกได้ 2 แบบ ได้แก่ loading plot และ score plot ดังรูปที่ 1-13 และรูปที่ 1-14 ตามลำดับ



รูปที่ 1-13 loading plot ของ PCA^[22]



รูปที่ 1-14 score plot ของ PCA^[22]

1.4 วัตถุประสงค์และขอบเขตของการวิจัย

วัตถุประสงค์

เพื่อจำแนกตัวอย่างเห็ดหอมตามแหล่งเพาะปลูกโดยเปรียบเทียบจากสารระเหยง่าย จากการวิเคราะห์ โดยเทคนิค HS-SPME- GC-MS ร่วมกับวิธีเคโมเมทริกซ์

ขอบเขตงานวิจัยประกอบด้วย

- หาสภาวะที่เหมาะสมของการวิเคราะห์สารระเหยง่ายในตัวอย่างเห็ดหอมโดยเทคนิค HS-SPME- GC-MS และออกแบบการทดลองโดยใช้วิธีเคโมเมทริกซ์ชนิด CCD
- วิเคราะห์ตัวอย่างเห็ดหอมจาก 4 แหล่งเพาะปลูก ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ ปทุมธานี สระบุรี และ นครราชสีมา โดยเทคนิค HS-SPME-GC-MS
- ประมวลผลการทดลอง และจัดกลุ่มข้อมูลเห็ดหอมโดยวิธีเคโมเมทริกซ์ชนิด PCA

1.5 ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย

ได้วิธีการจำแนกเห็ดหอมตามแหล่งเพาะปลูกโดยเทคนิค HS-SPME- GC-MS ร่วมกับวิธีเคโมเมทริกซ์

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

การทดลอง

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์ประกอบด้วย
 - 1.1 เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีของ Agilent รุ่น 7890A
 - 1.2 ตัวตรวจวัดแมสสเปกโตรมิเตอร์ของ Agilent รุ่น 7000
2. คอลัมน์ที่มีรูขนาดเล็ก (capillary column) ของ HP-5MS (30m × 0.25mm × 0.25µm)
3. อุปกรณ์โซลิดเฟสไมโครเอ็กซ์แทรกชัน (solid phase microextraction) ของ Supelco (50/30 µm DVB/CAR/PDMS)
4. ขวด (vial) ขนาด 20 มิลลิลิตร
5. ฝาอะลูมิเนียม (crimp)
6. เครื่องหนีงฝาอะลูมิเนียม (crimper)
7. เครื่องให้ความร้อน (hot plate)

สารเคมี

1. แก๊สฮีเลียม
2. แก๊สไนโตรเจน
3. ตัวอย่างเห็ดหอมจาก 4 จังหวัด ได้แก่ ปทุมธานีโดยการซื้อเห็ดจากร้านสะดวกซื้อ สรรบุรี เชียงใหม่ และนครราชสีมาโดยการซื้อเห็ดจากแหล่งเพาะปลูกโดยตรง

2.1 การหาอัตราส่วนของสารที่เข้าคอลัมน์ (splitless and split ratio)

2.1.1 กำหนดสภาวะของเครื่อง GC-MS

อุณหภูมิของเตาอบ (oven temperature)	: 40 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิของส่วนฉีดสาร (injection temperature)	: 250 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิของแหล่งกำเนิดไอออน (ion source temperature)	: 230 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิของ quadrupole (MS quadrupole temperature)	: 150 องศาเซลเซียส
อัตราการไหลของแก๊สไนโตรเจน (nitrogen flow)	: 1.50 มิลลิลิตรต่อนาที
อัตราการไหลของแก๊สฮีเลียม (quench flow)	: 2.25 มิลลิลิตรต่อนาที

- อัตราการไหลของแก๊สตัวพา (carrier gas flow) : 35.0 เซนติเมตรต่อนาที
- 2.1.2 กำหนดสภาวะอุณหภูมิของเครื่อง GC-MS
- อุณหภูมิเริ่มต้น (initial temperature) : 40 องศาเซลเซียส
- อุณหภูมิมกกลาง (intermediate temperature) : 150 องศาเซลเซียส
- อุณหภูมิสุดท้าย (final temperature) : 280 องศาเซลเซียส
- เวลาเริ่มต้น (initial time) : 5 นาที
- เวลากลาง (intermediate time) : 1 นาที
- เวลาสุดท้าย (final time) : 3 นาที
- อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 1 (rate temperature 1) : 2.25 องศาเซลเซียสต่อนาที
- อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 2 (rate temperature 2) : 40 องศาเซลเซียสต่อนาที
- 2.1.3 ชั่งเห็ดหอมตัวอย่างที่หั่นเป็นชิ้นเล็ก 1.000 ± 0.001 กรัม ลงในขวดบรรจุ (vial) ขนาด 20 มิลลิลิตร จากนั้นปิดขวดด้วยฝาอะลูมิเนียมแล้วนำไปให้ความร้อนด้วยเครื่องให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที โดยระหว่างให้ความร้อนใช้อุปกรณ์ HS-SPME สำหรับดูดซับสารระเหยง่าย และปลดปล่อยสารในส่วนปลดปล่อยสารของเครื่อง GC-MS เป็นเวลา 10 นาที
- 2.1.4 ตั้งสภาวะของเครื่อง GC-MS เป็น splitless และทดลองฉีดสารระเหยง่ายในตัวอย่างเห็ดหอมเข้าเครื่อง GC-MS จากนั้นพิจารณาโครมาโทแกรมที่ได้
- 2.1.5 ตั้งสภาวะของเครื่อง GC-MS เป็น split ratio และทดลองฉีดสารระเหยง่ายในตัวอย่างเห็ดหอมเข้าเครื่อง GC-MS โดยเริ่มทดลองจากค่า split ratio 10:1 25:1 50:1 และ 100:1 จากนั้นพิจารณาโครมาโทแกรมของแต่ละอัตราส่วนแล้วนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกัน

split ratio คำนวณได้จากสูตร

$$\text{split ratio} = \frac{(\text{อัตราการไหลเข้าของแก๊สตัวพา} + \text{อัตราการไหลออกของแก๊สตัวพา})}{\text{อัตราการไหลเข้าของแก๊สตัวพา}}$$

- 2.1.6 เลือกอัตราส่วนของสารที่ฉีดเข้าคอล์มน์ที่ให้โครมาโทแกรมที่มีลักษณะของพีกแยกออกจากกันได้มากที่สุด และเห็นพีกชัดเจน เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 การหาภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมหีตหอมตัวอย่างด้วยเทคนิคเฮตสเปซโดยใช้การออกแบบการทดลองชนิด central composite design (CCD)

- 2.2.1 กำหนดสภาวะของเครื่อง GC-MS ดังการทดลองที่ 2.1.1 และกำหนดสภาวะอุณหภูมิของ เครื่อง GC-MS ดังการทดลองที่ 2.1.2
- 2.2.2 ชั่งหีตหอมตัวอย่างที่หั่นเป็นชิ้นเล็ก 1.000 ± 0.001 กรัม ลงในขวดบรรจุ (vial) ขนาด 20 มิลลิลิตร จากนั้นปิดขวดด้วยฝาอะลูมิเนียม
- 2.2.3 ออกแบบการทดลองในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมหีตหอมตัวอย่าง ได้แก่
- 2.2.3.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเตรียมหีตหอมตัวอย่างโดยใช้เทคนิคเฮตสเปซ (Extraction Temperature)
- 2.2.3.2 เวลาที่เหมาะสมในการเตรียมหีตหอมตัวอย่างโดยใช้เทคนิคเฮตสเปซ (Extraction Time)
- 2.2.3.3 เวลาที่เหมาะสมในการปล่อยสารในส่วนฉีดสารของเครื่อง GC-MS (Desorption Time) โดยใช้การออกแบบการทดลองชนิด CCD และทำการทดลองดังนี้

ตารางที่ 2-1 ตารางแสดงรูปแบบการทดลองที่ออกแบบโดยใช้การออกแบบชนิด CCD

การทดลอง	X ₁ อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด	X ₂ ระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด	X ₃ ระยะเวลาในการปลดปล่อยสารในเครื่อง GC-MS
1	80	60	15
2	80	60	15
3	80	60	15
4	80	60	5
5	80	30	15
6	80	30	5
7	60	60	15
8	60	60	5
9	60	30	15
10	60	30	5
11	60	30	5
12	60	30	5
13	86.8	45	10

14	53.2	45	10
15	70	70.2	10
16	70	19.8	10
17	70	45	18.4
18	70	45	1.6
19	70	45	10
20	70	45	10
21	70	45	10

2.2.4 คำนวณ %Normalization และ %Relative Standard Deviation (%RSD)

$$\text{โดย } \% \text{Normalization} = \frac{\text{พื้นที่ใต้พีคของสารนั้นๆ}}{\text{พื้นที่ใต้พีคของสารทั้งหมด}}$$

2.2.5 สร้างพื้นที่ตอบสนอง (response surface modeling) เพื่อหาภาวะที่เหมาะสม (optimized condition) ในการเตรียมเห็ดหอมตัวอย่างด้วยเทคนิคเฮดสเปซ

2.3 การหาโครมาโทแกรมของเห็ดหอมตัวอย่างจาก 4 แหล่งเพาะปลูก

2.3.1 กำหนดสภาวะของเครื่อง GC-MS ดังการทดลองที่ 2.1.1 และกำหนดสภาวะอุณหภูมิของ เครื่อง GC-MS ดังการทดลองที่ 2.1.2

2.3.2 ชั่งเห็ดหอมตัวอย่างที่หั่นเป็นชิ้นเล็ก 1.000 ± 0.001 กรัม ลงในขวดบรรจุ (vial) ขนาด 20 มิลลิลิตร จากนั้นปิดขวดด้วยฝาอะลูมิเนียมแล้วนำไปให้ความร้อนด้วยเครื่องให้ความร้อนที่อุณหภูมิ และเวลาที่ได้จากผลการทดลองที่ 2.2.5 โดยระหว่างให้ความร้อนใช้อุปกรณ์ SPME สำหรับดูดซับสารระเหยง่าย

2.3.3 เมื่อครบกำหนดเวลา นำอุปกรณ์ SPME ไปปลดปล่อยสารระเหยง่ายในส่วน ปลดปล่อยสารของเครื่อง GC-MS โดยใช้ระยะเวลาที่ได้จากผลการทดลองที่ 2.2.5

2.3.4 รวบรวม คำนวณ %Normalization และ %Relative standard deviation (%RSD) ของเห็ดหอมตัวอย่างทั้งหมด

2.4 การประมวลผลโดยวิธีเคโมเมตริกซ์

- 2.4.1 นำโครมาโทแกรมของสารระเหยง่ายในเห็ดหอมตัวอย่างมาเปรียบเทียบ และเลือกพีกที่สำคัญในเห็ดหอมจากแต่ละแหล่งโดยเทียบข้อมูลสารจาก NIST Library
- 2.4.2 นำพื้นที่ใต้พีกของสารระเหยง่ายที่สำคัญมาคำนวณ %Normalization
- 2.4.3 นำข้อมูลที่ได้ไปประมวลผลด้วยวิธีเคโมเมตริกซ์ชนิด PCA โดยใช้โปรแกรม Excel add-in Multibase package (Numerical Dynamics, Japan) เพื่อจัดกลุ่มเห็ดหอมที่มาจากแหล่งเพาะปลูกที่ต่างกัน



ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

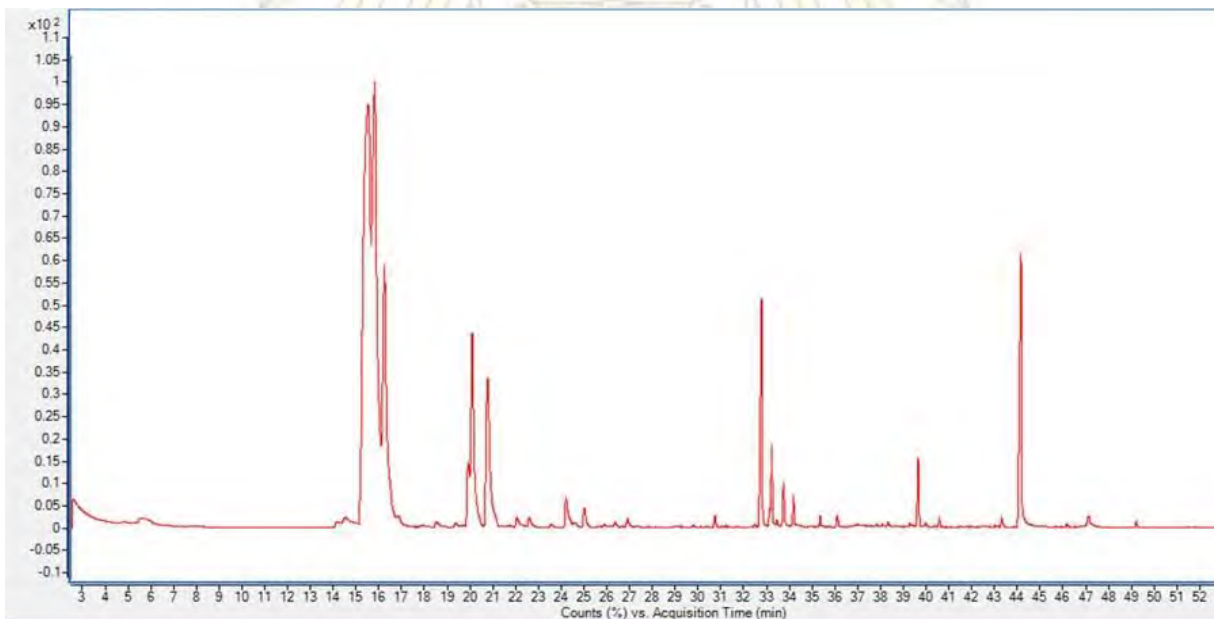
บทที่ 3

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

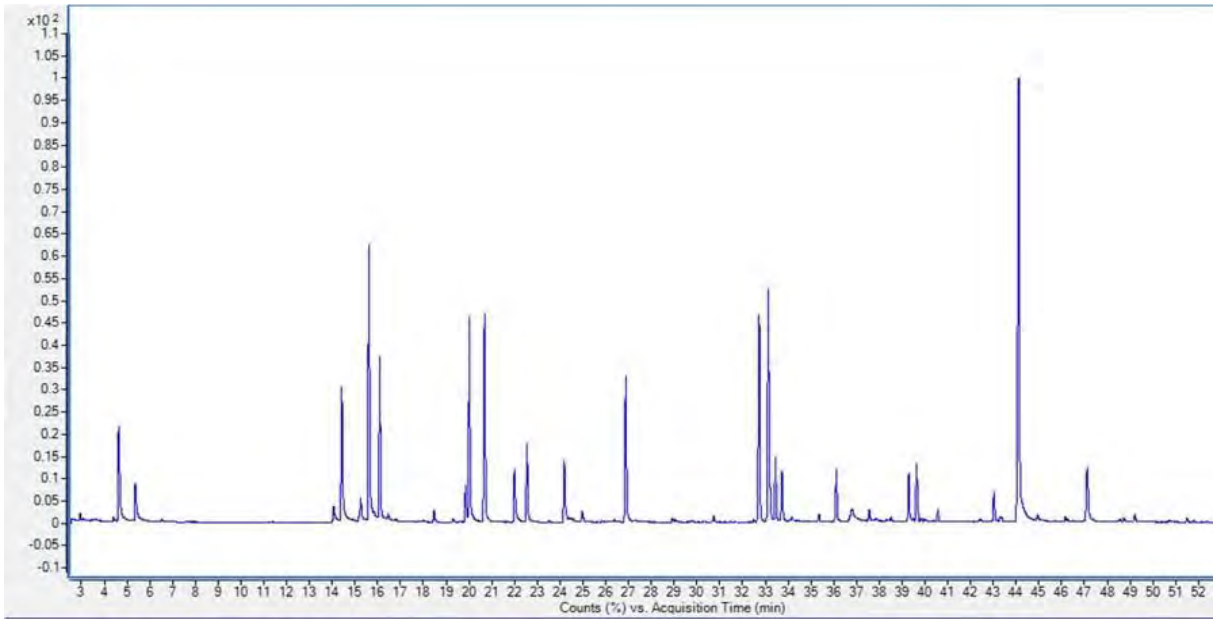
3.1 การหาอัตราส่วนของสารที่เข้าคอลัมน์ (splitless and split ratio)

วิเคราะห์ตัวอย่างเห็ดหอมน้ำหนัก 1.000 ± 0.001 กรัม โดยเตรียมตัวอย่างเห็ดหอมด้วยเทคนิค HS-SPME โดยใช้การทดลองที่ 2.1 และสภาวะของ HS-SPME ดังนี้ อุณหภูมิเฮดสเปซ 80 องศาเซลเซียส เวลาที่ใช้ในการดูดซับ 45 นาที และเวลาที่ใช้ในการปลดปล่อยสารระเหยง่ายในเครื่อง GC-MS 10 นาที โดยเปลี่ยนอัตราส่วนสารที่เข้าคอลัมน์ด้วยสภาวะ splitless และ split ratio อัตราส่วน 10:1 25:1 50:1 และ 100:1

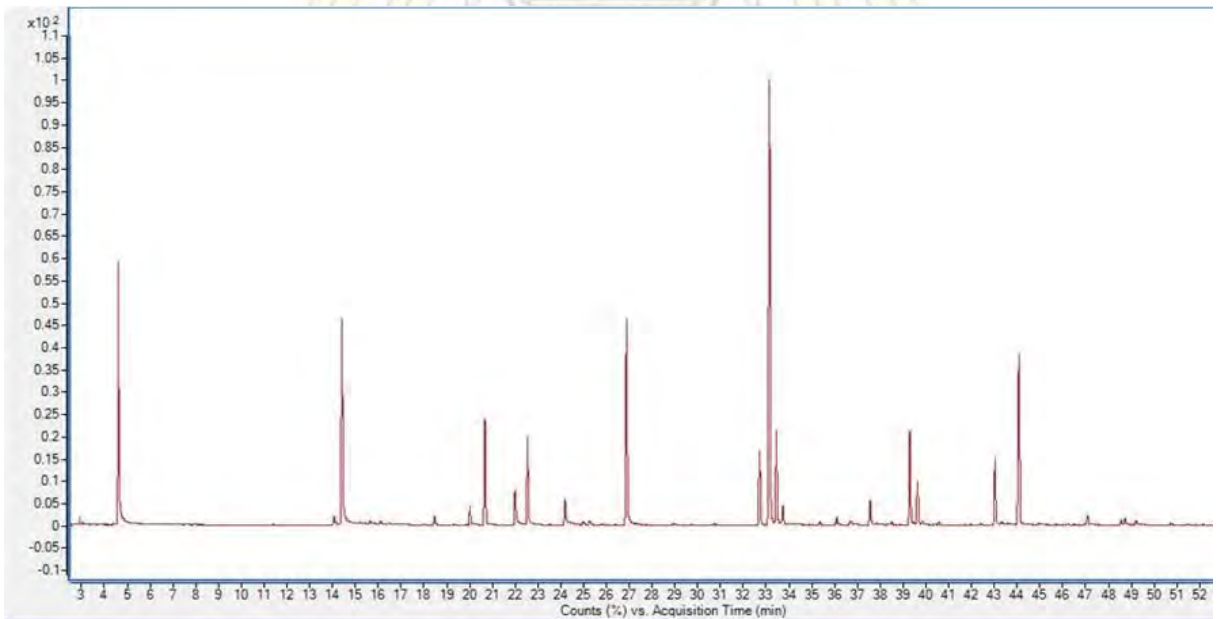
จากโครมาโทแกรมที่วิเคราะห์ด้วยสภาวะ splitless ซึ่งเป็นสภาวะที่สารระเหยง่ายทั้งหมดจะถูกพาเข้าสู่คอลัมน์ พบว่าโครมาโทแกรมของสารไม่สามารถแยกออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์ และพื้นที่ใต้พีคของสารซ้อนทับกัน เนื่องจากมีปริมาณของสารระเหยง่ายที่ถูกพาเข้าสู่คอลัมน์มากแสดงดังรูปที่ 3-1 ก)



รูปที่ 3-1 ก) โครมาโทแกรมของเห็ดหอมตัวอย่างด้วยสภาวะ splitless

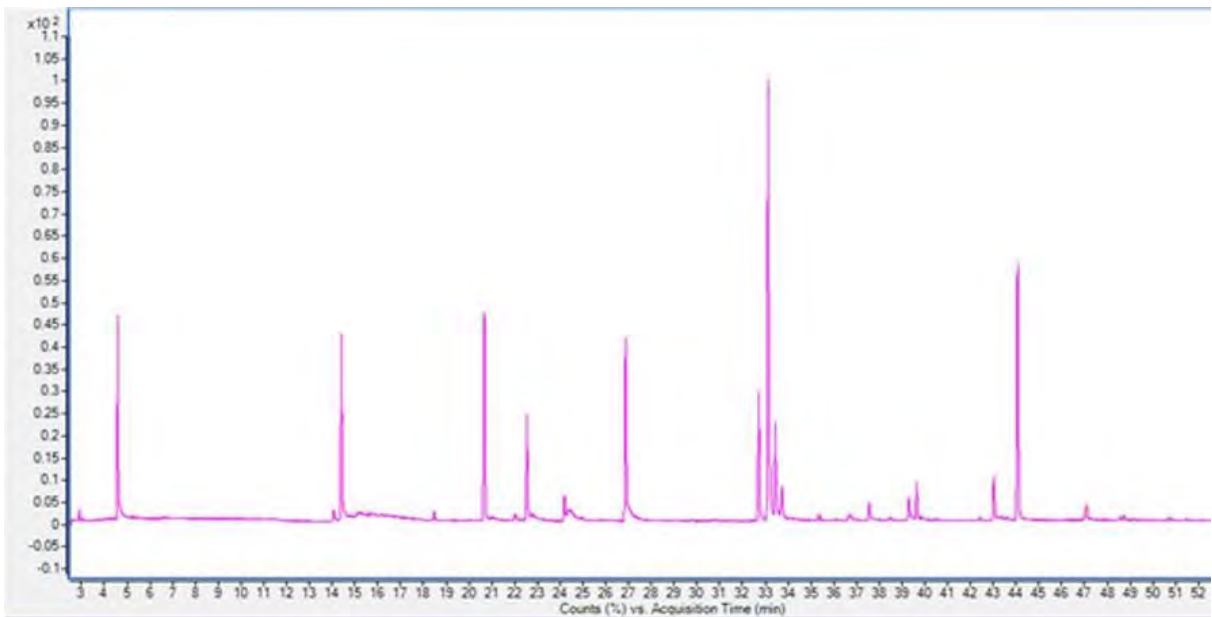


รูปที่ 3-1 ข) โครมาโทแกรมของเห็ดหอมตัวอย่างด้วยสภาวะ split ratio 10:1

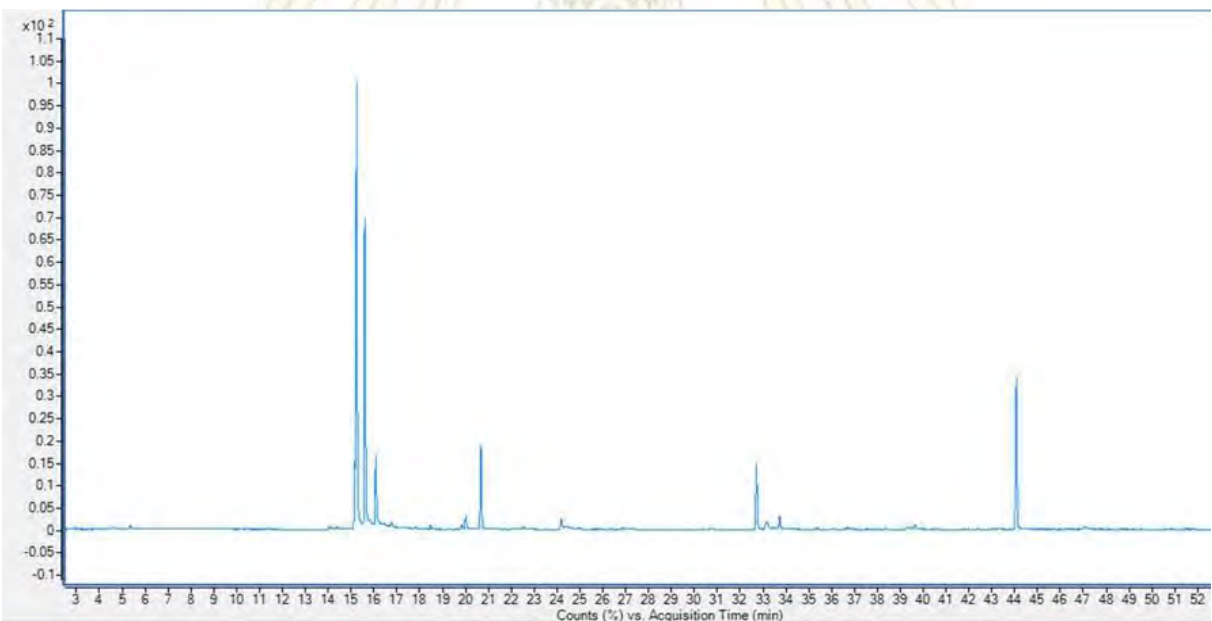


รูปที่ 3-1 ค) โครมาโทแกรมของเห็ดหอมตัวอย่างด้วยสภาวะ split ratio 25:1

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3-1 ง) โครมาโทแกรมของเห็ดหอมตัวอย่างด้วยสภาวะ split ratio 50:1



รูปที่ 3-1 จ) โครมาโทแกรมของเห็ดหอมตัวอย่างด้วยสภาวะ split ratio 100:1

จากโครมาโทแกรมที่วิเคราะห์ด้วย split ratio พบว่า อัตราส่วนที่ทำให้สารแยกออกจากกันได้ดีที่สุด คือ อัตราส่วน 10:1 ดังแสดงในรูปที่ 3-1 ข) หมายความว่าถ้าฉีดสารเข้าเครื่อง GC-MS 10 ส่วน จะมีสารที่เข้าคอลัมน์ 1 ส่วน ซึ่งการที่สารเข้าสู่คอลัมน์มากเกินไปจะทำให้แยกสารออกจากกันได้ไม่สมบูรณ์ และถ้าหากมีสารเข้าสู่คอลัมน์น้อยเกินไปจะทำให้ตรวจวัดสารได้ไม่ถูกต้องครบถ้วน

3.2 การหาภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมเห็ดหอมตัวอย่างด้วยเทคนิคเฮดสเปซโดยใช้การออกแบบการทดลองชนิด central composite design (CCD)

จากการหาภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างเห็ดหอมด้วยเทคนิคเฮดสเปซโดยใช้การออกแบบการทดลองชนิด central composite design (CCD) ในการทดลองที่ 2.2 ได้เลือกผลการทดลอง และกราฟพื้นที่ตอบสนองตอบของ 1, 2, 4, 6-tetrathiepane ซึ่งเป็นหนึ่งในสารองค์ประกอบหลักที่ได้รายงานไว้ในงานวิจัยก่อนหน้า^[3] โดยเมื่อพิจารณากราฟตอบสนองทั้ง 3 แบบ ได้แก่ (1) กราฟพื้นที่ตอบสนองระหว่างตัวแปรอิสระ extraction temperature และ extraction time (2) กราฟพื้นที่ตอบสนองระหว่างตัวแปรอิสระ extraction temperature และ desorption time (3) กราฟพื้นที่ตอบสนองระหว่างตัวแปรอิสระ extraction time และ desorption time ดังรูปที่ 3-2 ก-ค)

เมื่อพิจารณาสมการเชิงเส้นที่ใช้ในการคำนวณพื้นที่ตอบสนอง เพื่อพิจารณาความสัมพันธ์ของตัวแปรอิสระแต่ละตัวจะได้ว่า

- 3.2.1 ความสัมพันธ์ของตัวแปรอิสระอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด (x_1) และระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด (x_2) จะมีความสัมพันธ์ดังสมการ

$$y = 0.8939 + (0.1115)x_1 + (0.1285)x_2 + (0.0388)x_1x_2 + (-0.2606)x_1^2 + (-0.1485)x_2^2 \quad (1)$$

จากสมการที่ (1) สามารถอธิบายได้ว่า ถ้าพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์ของ x_1 และ x_2 จะพบว่าเมื่อค่าของตัวแปรอิสระ x_1 และ x_2 เพิ่มขึ้นจะทำให้ค่าตอบสนอง (y) มีค่าเพิ่มขึ้นด้วย แต่ตัวแปรอิสระ x_1 และ x_2 ความสัมพันธ์ต่อกันน้อยมากเนื่องจากค่าสัมประสิทธิ์ของ x_1x_2 มีค่าน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับค่าสัมประสิทธิ์ของ x_1 และ x_2 และพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์ของ x_1^2 และ x_2^2 เมื่อนำสมการไปสร้างกราฟพื้นที่ตอบสนองจะได้กราฟพื้นที่ตอบสนองที่ให้ค่าเป็นจุดสูงสุด

- 3.2.2 ความสัมพันธ์ของตัวแปรอิสระอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด (x_1) และระยะเวลาในการปลดปล่อยสารในเครื่อง GC-MS (x_3) จะมีความสัมพันธ์ดังสมการ

$$y = 0.8939 + (0.1115)x_1 + (-0.0620)x_3 + (0.0392)x_1x_3 + (-0.2606)x_1^2 + (-0.0246)x_3^2 \quad (2)$$

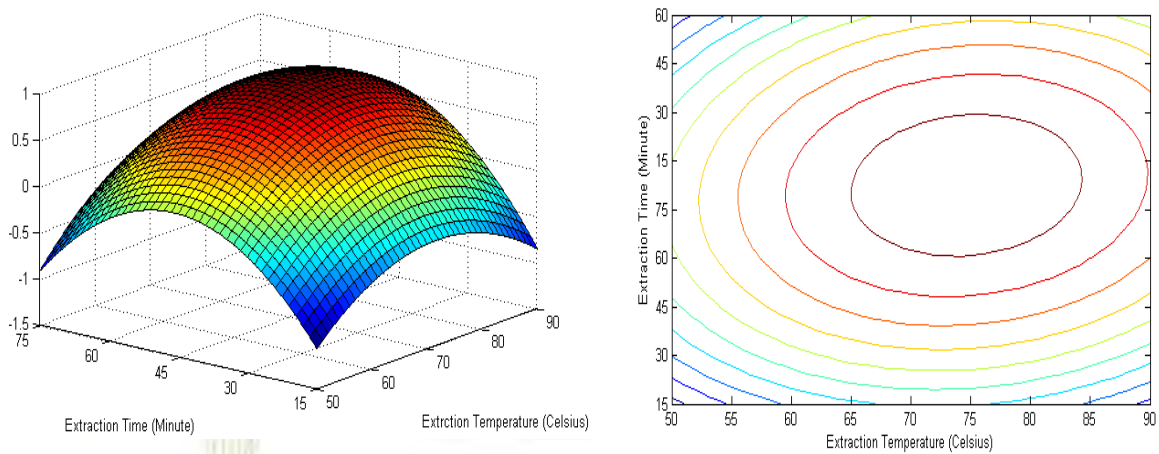
จากสมการที่ (2) สามารถอธิบายได้ว่า ถ้าพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์ของ x_1 และ x_3 จะพบว่าเมื่อค่าของตัวแปรอิสระ x_1 เพิ่มขึ้นจะทำให้ค่าตอบสนอง (y) มีค่าเพิ่มขึ้น แต่ถ้าค่าของตัวแปรอิสระ x_3 เพิ่มขึ้นจะทำให้ค่าตอบสนอง (y) มีค่าลดลงแต่มีผลกระทบค่อนข้างน้อย และตัวแปรอิสระ x_1 และ x_3 มีความสัมพันธ์ต่อกันน้อยมากเนื่องจากค่าสัมประสิทธิ์ของ x_1x_3 มีค่าน้อยมากเมื่อ

เปรียบเทียบกับค่าสัมประสิทธิ์ของ x_1 และ x_3 และพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์ของ x_1^2 และ x_3^2 เมื่อนำสมการไปสร้างกราฟพื้นที่ตอบสนองจะได้กราฟพื้นที่ตอบสนองที่ให้ค่าเป็นจุดสูงสุด

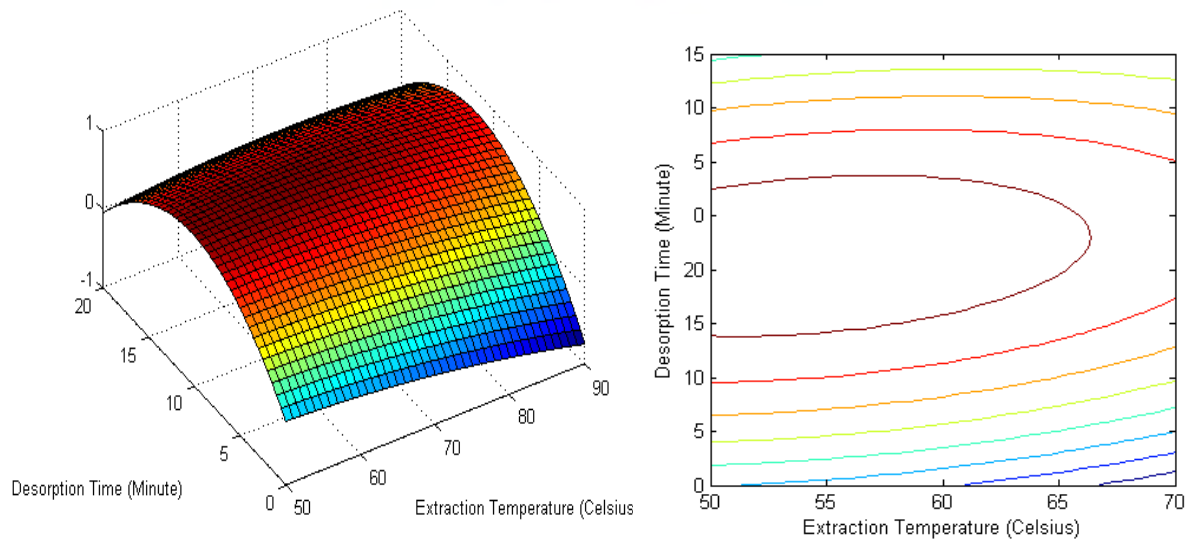
3.2.3 ระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด (x_2) และระยะเวลาในการปลดปล่อยสารในเครื่อง GC-MS (x_3) จะมีความสัมพันธ์ดังสมการ

$$y = 0.8939 + (0.1285)x_2 + (-0.0620)x_3 + (0.1031)x_2x_3 + (-0.1485)x_2^2 + (-0.0246)x_3^2 \quad (3)$$

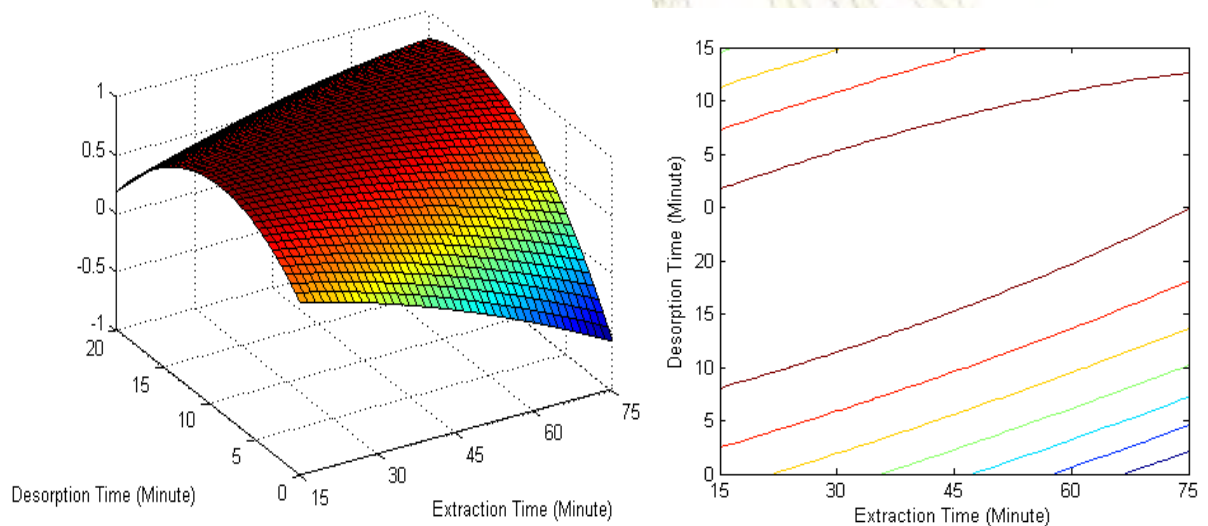
จากสมการที่ (3) สามารถอธิบายได้ว่า ถ้าพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์ของ x_2 และ x_3 จะพบว่าเมื่อค่าของตัวแปรอิสระ x_2 เพิ่มขึ้นจะทำให้ค่าตอบสนอง (y) มีค่าเพิ่มขึ้น แต่ถ้าค่าของตัวแปรอิสระ x_3 เพิ่มขึ้นจะทำให้ค่าตอบสนอง (y) มีค่าลดลงแต่มีผลกระทบค่อนข้างน้อย และตัวแปรอิสระ x_2 และ x_3 มีความสัมพันธ์ต่อกันค่อนข้างมากเนื่องจากค่าสัมประสิทธิ์ของ x_1x_3 มีค่าใกล้เคียงกับค่าสัมประสิทธิ์ของ x_2 และมากกว่าค่าสัมประสิทธิ์ของ x_3 และพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์ของ x_2^2 และ x_3^2 เมื่อนำสมการไปสร้างกราฟพื้นที่ตอบสนองจะได้กราฟพื้นที่ตอบสนองที่ให้ค่าเป็นจุดสูงสุด



รูปที่ 3-2 ก) กราฟพื้นที่ตอบสนอง (ซ้าย) contour plot (ขวา) ของ 1, 2, 4, 6-tetrathiepane ระหว่างตัวแปรอิสระอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด และระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด

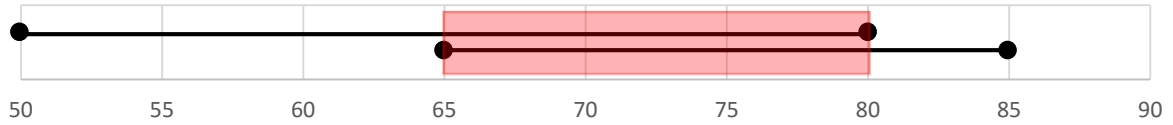


รูปที่ 3-2 ข) กราฟพื้นที่ตอบสนอง (ซ้าย) contour plot (ขวา) ของ 1, 2, 4, 6-tetrathiepane ระหว่างตัวแปรอิสระอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด และระยะเวลาในการปลดปล่อยสารในเครื่อง GC-MS

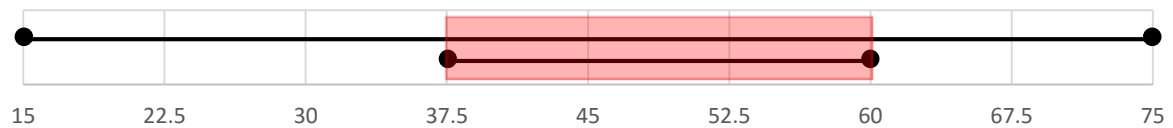


รูปที่ 3-2 ค) กราฟพื้นที่ตอบสนอง (ซ้าย) contour plot (ขวา) ของ 1, 2, 4, 6-tetrathiepane ระหว่างตัวแปรอิสระระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด และระยะเวลาในการปลดปล่อยสารในเครื่อง GC-MS

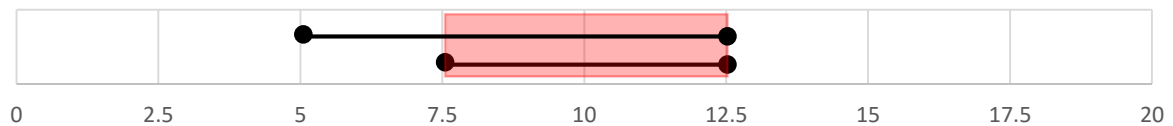
จากนั้นพบว่าค่าของตัวแปรอิสระแต่ละตัวที่ให้ค่าตอบสนองสูงสุดจะมีช่วงที่ซ้อนทับกันในแต่ละกราฟพื้นที่ตอบสนอง ดังรูปที่ 3-3 ก)-ค) จึงได้เลือกค่ากลางของแต่ละช่วงของตัวแปรอิสระเป็นสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างให้ดห้อมด้วยเทคนิคเฮดสเปซ



รูปที่ 3-3 ก) แผนภาพแสดงช่วงของค่าตัวแปรอิสระอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด



รูปที่ 3-3 ข) แผนภาพแสดงช่วงของค่าตัวแปรอิสระระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด



รูปที่ 3-3 ค) แผนภาพแสดงช่วงของค่าตัวแปรอิสระระยะเวลาในการปลดปล่อยสารในเครื่อง GC-MS

จะได้ว่าค่าของตัวแปรอิสระที่เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างให้ดห้อมด้วยเทคนิคเฮดสเปซเป็นดังนี้

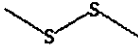
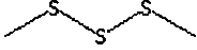

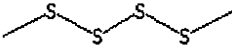
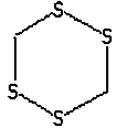
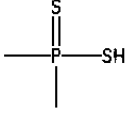

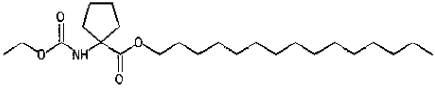
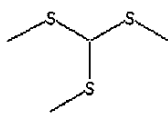
อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด	=	75	องศาเซลเซียส
ระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด	=	50	นาที
ระยะเวลาในการปลดปล่อยสารในเครื่อง GC-MS	=	10	นาที

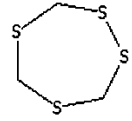
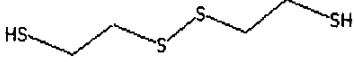
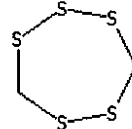
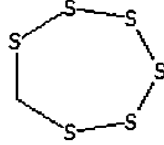
ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 โครมาโทแกรมของเห็ดหอมตัวอย่าง 4 จังหวัด

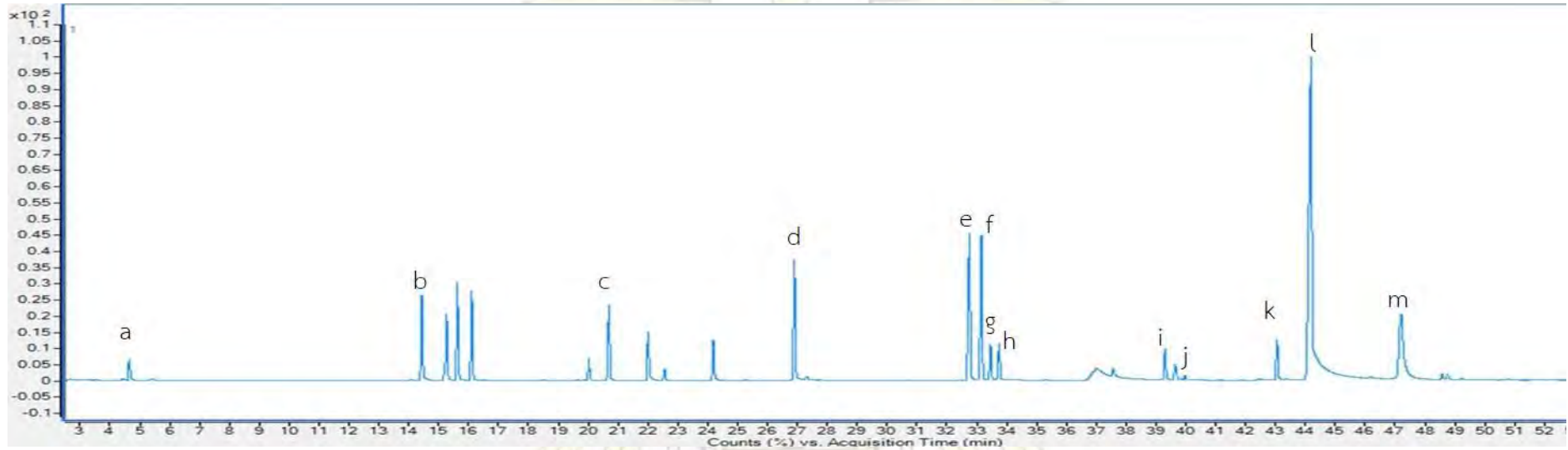
จากการทดลองหาโครมาโทแกรมของเห็ดหอมตัวอย่างในการทดลองที่ 2.3 ได้เตรียมเห็ดหอมตัวอย่างจาก 4 จังหวัด ได้แก่ ปทุมธานี สระบุรี นครราชสีมา และเชียงใหม่ โดยทดลองตัวอย่างละ 5 ซ้ำ โดยเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิค HS-SPME โดยใช้สภาวะของ HS-SPME ที่ได้จากผลการทดลองที่ 3.2 คือ อุณหภูมิเฮดสเปซที่ใช้ในการสกัด 75 องศาเซลเซียส ระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด 50 นาที และเวลาที่ใช้ในการปลดปล่อยสารในเครื่อง GC-MS เป็นเวลา 10 นาที โดยใช้สภาวะของเครื่อง GC-MS ตามบทที่ 2 จะได้โครมาโทแกรมของสารระเหยง่ายในเห็ดหอมที่เป็นสารระเหยหลัก 13 สาร ดังตารางที่ 3-1 และมีลักษณะของโครมาโทแกรมของสารระเหยทั้งหมดดังรูปที่ 3-4 ก)-ง)

ตารางที่ 3-1 ตารางแสดงสารระเหยที่เป็นองค์ประกอบหลัก 13 สาร ในเห็ดหอม และโครงสร้าง

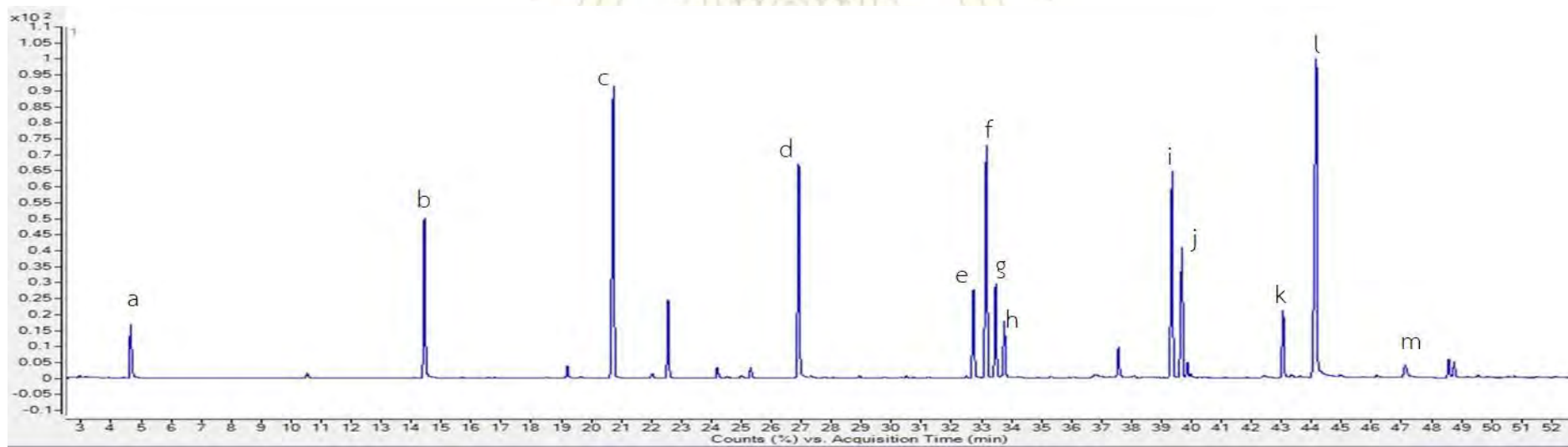
ชื่อสาร	โครงสร้าง
a) dimethyl disulfide	
b) dimethyl trisulfid	
c) 1, 2, 4-trithiolane	
d) dimethyl tetrasulfide	
e) 1, 2, 4, 5-tetrathiane	
f) dimethyldithiophosphenic acid	
g) methyl(methylthio)methyl disulfide	
h) 1-aminocyclopentanecarboxylic acid	
i) tris(methylthiol)-methane	

j) 1, 2, 4, 6-tetrathiepane	
k) bis(2-sulthdrylethyl)-disulfide	
l) lenthionine	
m) hexathiepane	

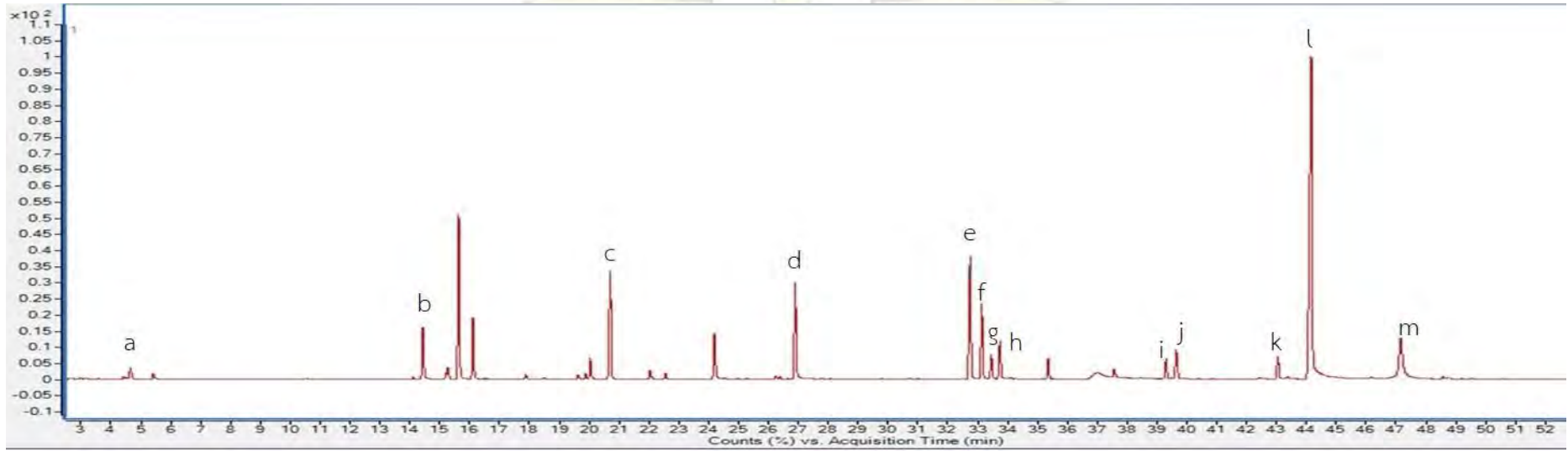
ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



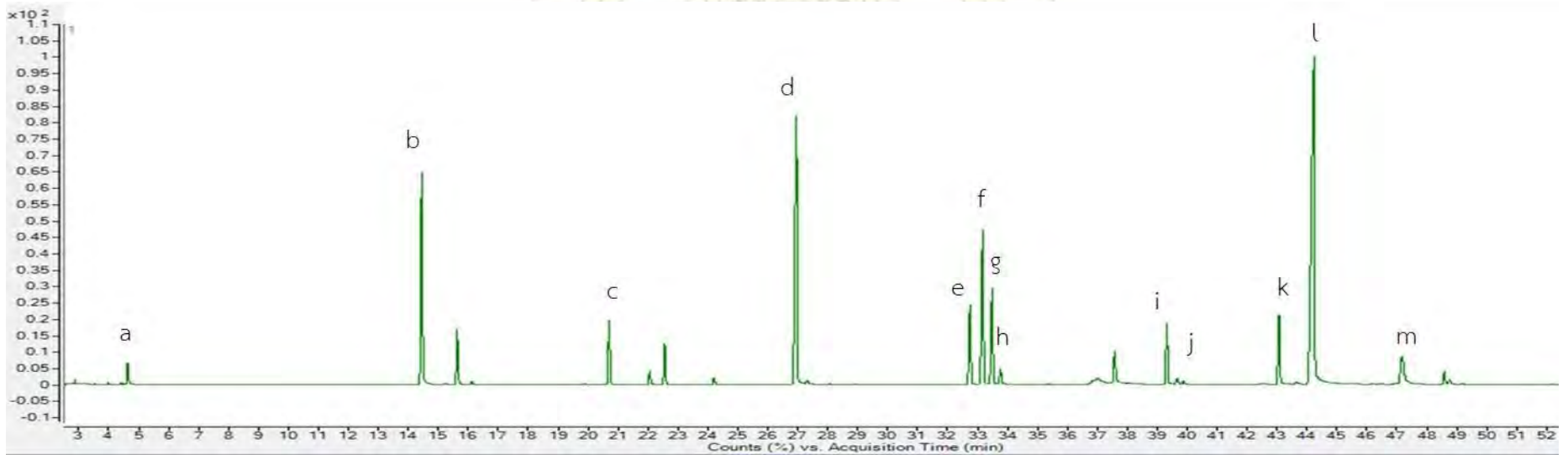
รูปที่ 3-4 ก) โครมาโทแกรมของเห็ดหอมที่มาจากจังหวัดปทุมธานี



รูปที่ 3-4 ข) โครมาโทแกรมของเห็ดหอมที่มาจากจังหวัดสระบุรี



รูปที่ 3-4 ค) โครมาโทแกรมของเห็ดหอมที่มาจากจังหวัดเชียงใหม่

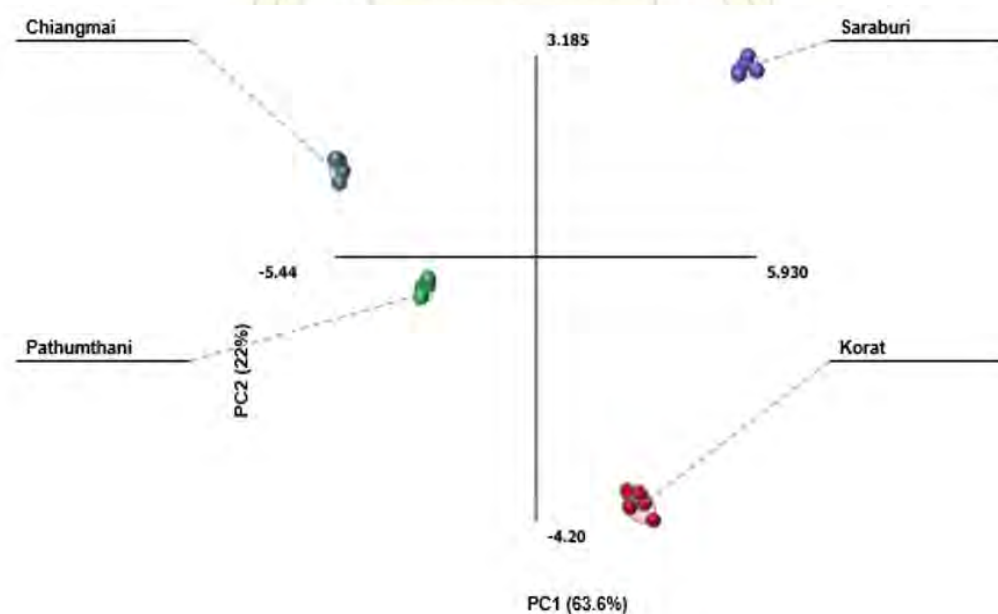


รูปที่ 3-4 ง) โครมาโทแกรมของเห็ดหอมที่มาจากจังหวัดนครราชสีมา

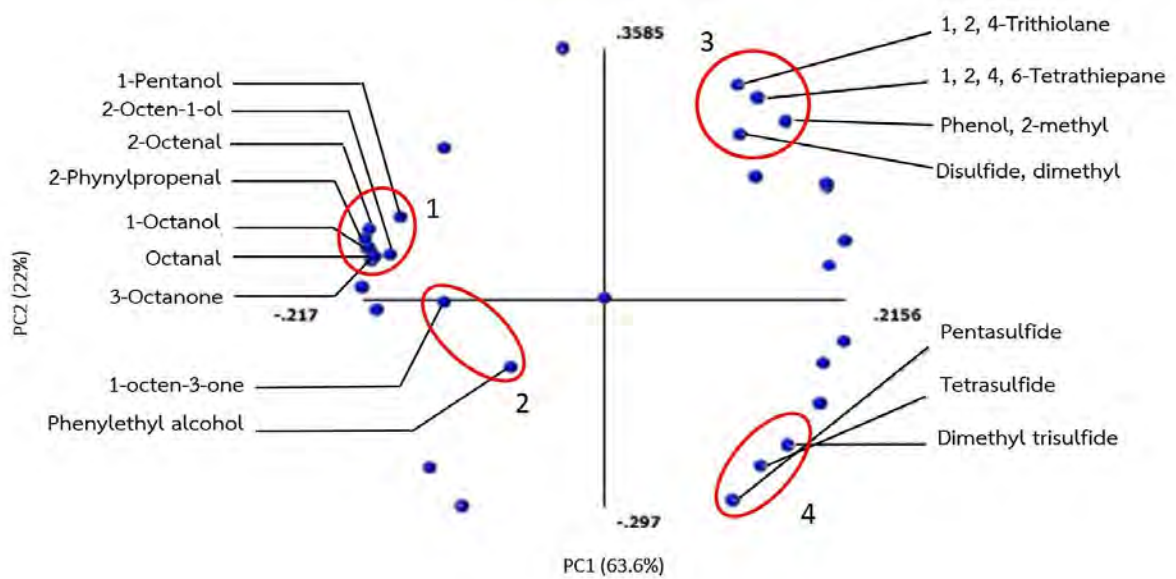
3.4 การประมวลผลด้วยเคโมเมทริกซ์

จากการวิเคราะห์โครมาโทแกรมของเห็ดหอมตัวอย่าง 4 จังหวัด จากผลการทดลองที่ 3.3 โดยนำพื้นที่ใต้พีคมาคำนวณ %Normalization คำนวณค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) และนำไปประมวลผลด้วยวิธีเคโมเมทริกซ์ชนิด PCA จะสามารถแบ่งเห็ดหอมตัวอย่างได้ทั้งหมด 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่มาจากจังหวัดปทุมธานี สระบุรี เชียงใหม่ และนครราชสีมา โดยใช้วิธีการทดลองที่ 2.4 จะสามารถแสดงโดย PCA ได้ดังรูปที่ 3-8

จากรูปที่ 3-9 สารระเหยง่ายในกลุ่มที่ 1 จะอยู่ในตำแหน่งเดียวกับเห็ดหอมที่มาจากจังหวัดเชียงใหม่ โดยมีสารระเหยง่ายที่เป็นสารระเหยหลัก ได้แก่ 1-pentanol, 2-octen-ol, 2-octenal, 2-phenylpropenal, octanal และ 3-octanone สารระเหยง่ายในกลุ่มที่ 2 จะอยู่ในตำแหน่งเดียวกับเห็ดหอมที่มาจากจังหวัดปทุมธานี โดยมีสารระเหยง่ายที่เป็นสารระเหยหลัก ได้แก่ 1-octen-3-one และ phenylethyl alcohol สารระเหยง่ายในกลุ่มที่ 3 จะอยู่ในตำแหน่งเดียวกับเห็ดหอมที่มาจากจังหวัดสระบุรี โดยมีสารระเหยง่ายที่เป็นสารระเหยหลัก ได้แก่ 1, 2, 4-trithiolane, 1, 2, 4, 6-tetrathiepane, 2-methyl phenol และ dimethyl disulfide สารระเหยง่ายในกลุ่มที่ 4 จะอยู่ในตำแหน่งเดียวกับเห็ดหอมที่มาจากจังหวัดนครราชสีมา โดยมีสารระเหยง่ายที่เป็นสารระเหยหลัก ได้แก่ pentasulfide, tetrasulfide และ dimethyl trisulfide

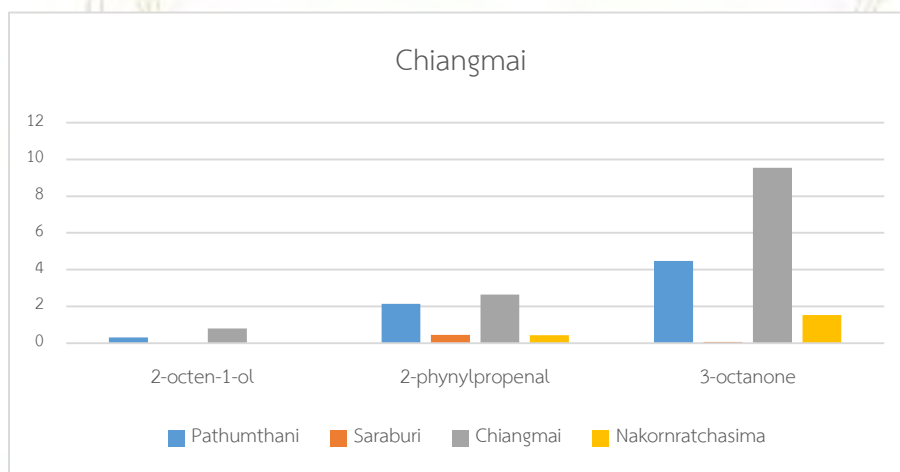


รูปที่ 3-8 กราฟแสดงผล PCA ในการจัดกลุ่มเห็ดหอมจากทั้ง 4 จังหวัด

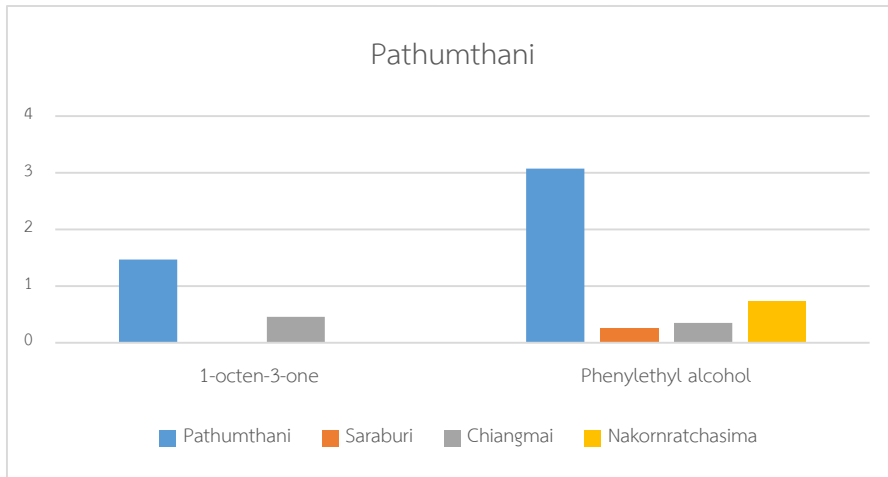


รูปที่ 3-9 กราฟแสดงผล PCA ของสารระเหยง่ายที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะของเห็ดหอมแต่ละแหล่งเพาะปลูก (ชื่อสารระเหยง่ายเป็นข้อมูลที่เทียบได้จาก NIST Library)

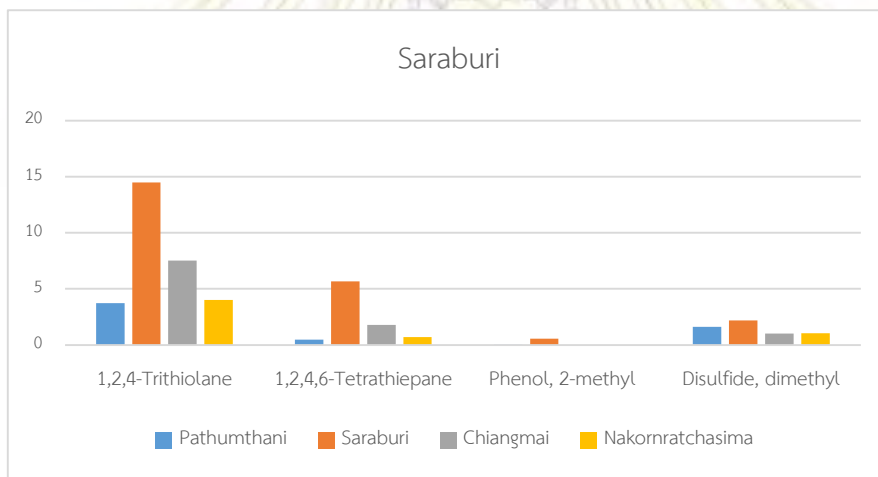
โดยเมื่อพิจารณาจากแผนภูมิเปรียบเทียบปริมาณของสารระเหยง่ายที่เป็นสารระเหยหลักในแต่ละจังหวัดพบว่าข้อมูลที่ได้อธิบายโดยวิธีเคมิตริกซ์ชนิด PCA ในรูปที่ 3-8 และ 3-9 สามารถแสดงให้เห็นว่าข้อมูลสารระเหยง่ายที่เป็นสารระเหยหลักของแต่ละแหล่งเพาะปลูกมีปริมาณที่มากกว่าแหล่งเพาะปลูกอื่น (ดังรูปที่ 3-10 ก)-ง)



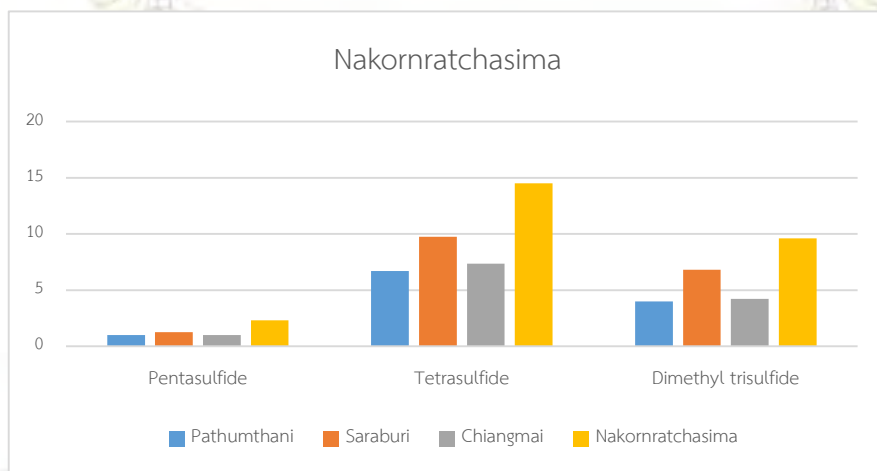
รูปที่ 3-10 ก) แผนภูมิเปรียบเทียบสารระเหยง่ายที่เป็นสารระเหยหลัก (ตัวแทน) ของเห็ดหอมจากจังหวัดเชียงใหม่กับจังหวัดอื่น ๆ



รูปที่ 3-10 ข) แผนภูมิเปรียบเทียบสารระเหยง่ายที่เป็นสารระเหยหลักของ
 เห็ดหอมจากจังหวัดปทุมธานีกับจังหวัดอื่น ๆ



รูปที่ 3-10 ค) แผนภูมิเปรียบเทียบสารระเหยง่ายที่เป็นสารระเหยหลักของ
 เห็ดหอมจากจังหวัดสระบุรีกับจังหวัดอื่น ๆ



รูปที่ 3-10 ค) แผนภูมิเปรียบเทียบสารระเหยง่ายที่เป็นสารระเหยหลักของ
 เห็ดหอมจากจังหวัดนครราชสีมากับจังหวัดอื่น ๆ

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

จากการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างเห็ดหอมด้วยเทคนิคสเปซโดยใช้การออกแบบการทดลองชนิด central composite design (CCD) ได้เลือกผลการทดลอง และกราฟพื้นที่ตอบสนองตอบสนองของ 1, 2, 4, 6-tetrathiepane ซึ่งเป็นหนึ่งในสารองค์ประกอบหลักที่ได้รายงานไว้ในงานวิจัยก่อนหน้านี้^[3] โดยเมื่อพิจารณากราฟตอบสนอง พบว่า extraction temperature เท่ากับ 75 องศาเซลเซียส extraction time เท่ากับ 50 นาที และ desorption time เท่ากับ 10 นาที

จากการการพิสูจน์ทราบเอกลักษณ์ของสารระเหยง่ายในเห็ดหอมโดยใช้เทคนิคสเปซโซลิดเฟสไมโครเอกซ์แทรกชัน-แก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรีร่วมกับเคโมเมทริกซ์ โดยศึกษารูปแบบโครมาโทแกรมของเห็ดหอมตัวอย่างจาก 4 จังหวัด และพิสูจน์ทราบเอกลักษณ์ของสารระเหยง่ายในเห็ดหอมโดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NIST สามารถพิสูจน์ทราบเอกลักษณ์ของสารระเหยง่ายได้ทั้งหมด 32 ชนิด และสารระเหยง่ายที่เป็นสารระเหยง่ายหลักที่มี และพบในเห็ดหอมทุกตัวอย่างมีทั้งหมด 13 สาร ได้แก่ (a) dimethyl disulfide (b) dimethyl trisulfide (c) 1, 2, 4-trithiolane (d) tetrasulfide (e) 1, 2, 4, 5-tetrathiane (f) dimethyldithiophosphonic acid (g) methyl(methylthio)methyl disulfide (h) 1-aminocyclopentanecarboxylic acid (i) tris(methylthiol)-methane (j) 1, 2, 4, 6-tetrathiepane (k) bis(2-sulthydrylethyl)-disulfide (l) lenthionine และ (m) hexathiepane

จากนั้นนำไปประมวลผลข้อมูลด้วยเคโมเมทริกซ์ สามารถจัดกลุ่มของเห็ดหอมที่มาจากแหล่งเพาะปลูกที่แตกต่างกันได้เป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ จังหวัด ได้แก่ เห็ดหอมกลุ่มที่มาจากจังหวัดปทุมธานี สระบุรี เชียงใหม่ และนครราชสีมา ดังรูปที่ 3-8 เห็ดหอมที่จากต่างแหล่งที่เพาะปลูกที่แตกต่างกันจะมีแก๊สโครมาโทแกรมของสารระเหยง่ายบางชนิดที่แตกต่างกัน เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของสารระเหยง่ายในเห็ดหอมโดยใช้วิธีเคโมเมทริกซ์ชนิด PCA จะสามารถวิเคราะห์สารระเหยง่ายที่องค์ประกอบหลักในเห็ดหอมที่มาจากแต่ละแหล่งเพาะปลูกได้ดังรูปที่ 3-9 โดยเห็ดหอมที่มาจากจังหวัดเชียงใหม่ จะมีสารระเหยง่ายที่เป็นสารระเหยหลัก ได้แก่ 1-pentanol, 2-octen-ol, 2-octenal, 2-phenylpropenal, octanal และ 3-octanone เห็ดหอมที่มาจากจังหวัดปทุมธานี จะมีสารระเหยง่ายที่เป็นสารระเหยหลัก ได้แก่ 1-octen-3-one และ phenylethyl alcohol เห็ดหอมที่มาจากจังหวัดสระบุรี จะมีสารระเหยง่ายที่เป็นสารระเหยหลัก ได้แก่ 1, 2, 4-trithiolane, 1, 2, 4, 6-tetrathiepane, 2-methyl phenol และ disulfide, dimethyl และเห็ดหอมที่มาจากจังหวัดนครราชสีมา จะมีสารระเหยง่ายที่เป็นสารระเหยหลัก ได้แก่ pentasulfide, tetrasulfide และ dimethyl trisulfide

เอกสารอ้างอิง

1. Bisen, P.S.; Baghel, R.K.; Sanodiya, B.S.; Thakur, G.S.; Prasad, G.B. *Lentinus edodes*: A Macrofungus with Pharmacological Activities. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 2419-2430.
2. Mónica, P.M.; Patricia, S.; Paz, M.; Concepción, C. Application of multivariate analysis to the effects of additives on chemical and sensory quality of stored coffee brew. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 11845-11853.
3. Chen, C.C. and Ho, C.T. Identification of Sulfurous Compounds of Shiitake Mushroom (*Lentinus edodes* Sing.). *J. Agric. Food Chem.* **1986**, *34*, 38-51.
4. Chen, C.C.; Liu, S.E.; Wu, C.M.; Ho, C.T. Enzymic Formation of Volatile Compounds in Shiitake Mushroom (*Lentinus edodes* Sing). *ACS. SYM. SER.* **1986**, *926*, 163-175.
5. Hong, J.S.; Lee, K.R.; Kim, Y.H.; Kim, M.K.; Kim, Y.S.; Yeo, K.Y. Volatile Flavour Compounds of Korean Shiitake Mushroom (*Lentinus edodes*). *Korean J. Food. Sci. Technol.* **1988**, *20*, 606-612.
6. Arthur, C.L. and Pawliszyn, J. Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers. *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 2145-2148.
7. Mark, O. Analysis of Laminated Documents Using Solid-Phase Microextraction. *J. Am. Inst. Consev.* **2005**, *44*, 13-26.
8. Yang, X. and Peppard, T. Solid-Phase Microextraction for Flavor Analysis. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 1925-1930.
9. Miller, K.G.; Poole, C.F.; Pawlowski, T.M.P. Classification of the Botanical Origin of Cinnamon by Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography. *Chromatographia*, **1996**, *42*, 639-646.
10. Jia, M.; Zhang, H.; Min, D.B. Optimization of Solid-Phase Microextraction Analysis for Headspace Flavor Compounds of Orange Juice. *J. Agric. Food. Chem.* **1998**, *46*, 2744-2747.
11. Ruiz, J.; Cava, R.; Ventanas, J.; Jensen, M.T. Headspace Solid Phase Microextraction for the Analysis of Volatiles in a Meat Products: Dry-Cured Iberian Ham. *J Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 4688-4694.

12. Román, I.S.; Alonsa, M.L.; Bartolomé, L.; Alonso, R.M.; Fañanás, R. Analytical Strategies Based on Multiple Headspace Extraction for the Quantitative Analysis of Aroma Components in Mushrooms. *Talanta*. **2014**, *123*, 207-217.
13. Carlo, P.B.; Ombretta, M.P.; Gloria, M.P.; Alfredo, C.V. Characterization of Roasted Coffee and Coffee Beverages by Solid Phase Microextraction-Gas Chromatography and Principal Component Analysis. *J. Agric. Food. Chem.* **1997**, *45*, 4680-4686.
14. Pillonel, L.; Ampuero, S.; Tabacchi, R.; Bosset, J.O. Analytical Methods for the Determination of the Geographic Origin of Emmental Cheese: Volatile Compounds by GC/MS-FID and Electronic Nose. *Eur. Food. Res. Technol.* **2003**, *216*, 179-183.
15. Freitas, A.M.C. and Moscab, A.I. Coffee Geographic Origin - an Aid to Coffee Differentiation. *Food. Res. Int.* **1999**, *32*, 565-573.
16. Cynkar, W.; Damberg, R.; Smith, P.; Cozzolino, D. Classification of Tempranillo Wines According to Geographic Origin: Combination of Mass Spectrometry Based Electronic Nose and Chemometrics. *Anal. Chim. Acta.* **2010**, *660*, 227-231.
17. Zhouyao, Z.; Janusz, P. Headspace Solid-Phase Microextraction. *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 1843-1852.
18. Mark, O. Analysis of Laminated Documents Using Solid-Phase Microextraction. *J. Am. Inst. Conserv.* **2005**, *44*, 13-26.
19. Zhouyao, Z.; Janusz, P. Solid-Phase Microextraction. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 844-853.
20. Vas, G.; K, Vekey. (2004). *Solid-phase Microextraction: a Powerful Sample Preparation Tool Prior to Mass Spectrometric Analysis*.
21. Mark, O. (2005). *Analysis of Laminated Documents Using Solid-Phase Microextraction*.
22. Trygg, J. and Wold, S. (2002). *Homepage of Chemometrics*.
23. Brereton, R.G. (2003). *Chemometrics Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant*.
24. Santos, H. T. L. D.; Oliveira, A. M. D.; Melo, P. G. D.; Freitas, W.; and Freitas, A. P. R. D. (2012). *Multivariate Analysis in Management, Engineering and the Sciences*.
25. Hilton, T.L.S. (n.d.) *Chemometrics: Theory and Application*.

ภาคผนวก

ตารางที่ A-1 ตารางแสดงพื้นที่ใต้พีคของเห็ดหอมตัวอย่างจากจังหวัดปทุมธานี โดยวิเคราะห์ตัวอย่างซ้ำ 5 ครั้ง (ข้อสารระเหยง่ายเป็นข้อมูลที่เทียบจาก NIST Library)

No.	Compounds	RT (min)	Shiitake_Mushroom_Pathumthani										Avg %Normalization	%RSD
			Peak Area 1	%Normalization	Peak Area 2	%Normalization	Peak Area 3	%Normalization	Peak Area 4	%Normalization	Peak Area 5	%Normalization		
1 = a	dimethyl disulfide	4.64	1311263	1.62	4055380	1.59	3970899	1.64	4569156	1.60	5046667	1.64	1.62	1.41
2	1-pentanol	5.39	158110	0.10	303156	0.12	241582	0.11	297150	0.10	338496	0.11	0.11	6.51
3	benzaldehyde	14.08	156566	0.08	271433	0.10	188425	0.08	222502	0.08	276951	0.09	0.09	9.93
4 = b	dimethyl trisulfide	14.43	4344761	3.88	9939984	3.88	9786405	3.78	11451448	4.01	13416749	4.36	3.98	5.68
5	1-octen-3-one	15.17	3573853	1.62	3275488	1.38	1474144	1.52	3912340	1.37	4492765	1.46	1.47	7.07
6	1-octen-3-ol	15.28	16727836	3.88	11389550	4.45	5769900	4.52	11480005	4.02	13816790	4.49	4.27	6.99
7	3-octanone	15.62	10781362	4.73	16475307	4.43	12475277	4.45	12991572	4.55	12862847	4.18	4.47	4.45
8	3-octanol	3.09	6981651	3.71	10336748	3.74	7159502	3.13	11732171	4.11	10801099	3.51	3.64	9.82
9	octanal	16.47	92068	0.05	91426	0.04	65364	0.04	114229	0.04	123089	0.04	0.04	11.81
10	benzeneacetaldehyde	18.49	56634	0.03	159771	0.04	95847	0.04	114229	0.04	123089	0.04	0.04	12.30
11	2-methyl phenol	19.20	47490	0.03	55570	0.02	51792	0.02	57069	0.02	69368	0.02	0.02	8.45
12	2-octenal	19.32	71880	0.02	79722	0.02	42384	0.02	57114	0.02	61545	0.02	0.02	0.00
13	2-octen-1-ol	19.86	617070	0.33	500563	0.25	206075	0.29	885274	0.31	984716	0.32	0.30	10.38
14	1-octanol	20.02	2656591	1.11	2823558	1.10	2016391	0.88	2813096	0.99	3015691	0.98	1.01	9.45
15 = c	1,2,4-trithiolane	20.69	6337759	3.37	9200054	3.56	9516326	4.16	10194930	3.57	12339717	4.01	3.73	8.99
16	phenylethyl alcohol	22.00	3783720	2.60	8859937	3.46	7183050	3.14	9452442	3.31	8831667	2.87	3.08	11.21
17	(chloromethylthio)(methylthio)-methane	22.55	798275	0.72	1967917	0.77	1907457	0.83	2256021	0.79	2554106	0.83	0.79	5.98

ตารางที่ A-1 (ต่อ)

18	2-phenylpropenal	24.19	3864169	2.05	6789940	2.15	5105121	2.23	6120937	2.14	6585285	2.14	2.14	2.97
19 = d	tetrasulfide	26.89	5905483	7.14	15887861	6.20	16840190	6.86	18340395	6.42	21294474	6.92	6.71	5.72
20 = e	1,2,4,5-tetrathiane	32.75	18956772	7.77	19588159	7.65	23620872	7.83	22340947	7.82	24525571	7.97	7.81	1.48
21 = f	dimethyldithiophosphenic acid	33.13	5633645	8.99	15185768	8.93	21762944	8.51	25701504	9.00	26556547	8.63	8.81	2.55
22 = g	methyl(methylthio)methyl disulfide	33.45	2201741	1.97	5312549	2.07	4718260	2.06	5209895	1.82	6185244	2.01	1.99	5.07
23 = h	1-aminocyclopentanecarboxylic acid	33.74	3026930	1.61	4339357	1.69	4754240	1.58	4826171	1.69	5754431	1.87	1.69	6.71
24	pentasulfide	37.57	267012	0.88	2603512	1.02	1607687	0.96	3154390	1.10	3261870	1.06	1.00	8.73
25 = i	tris(methylthio)-methane	39.30	1823180	1.59	4502423	1.56	4400027	1.63	4491376	1.57	4677399	1.52	1.57	2.56
26 = j	1,2,4,6-tetrathiepane	39.65	827688	0.44	1086740	0.43	1655375	0.52	1342190	0.47	1353984	0.44	0.46	8.00
27	(methylsulfinyl)(methylthio)-methane	39.86	63578	0.06	170167	0.06	185612	0.05	147152	0.05	184634	0.06	0.06	9.04
28 = k	bis(2-sulthydrylethyl)-disulfide	43.05	827787	2.55	2734490	2.58	5547497	2.43	6041252	2.12	7354594	2.39	2.41	7.64
29 = l	lenthionine	44.18	72513262	29.10	76932504	28.54	71538520	28.58	81845013	28.66	86209978	28.02	28.58	1.35
30 = m	hexathiepane	47.17	13615752	7.23	20066896	7.44	3093505	7.34	21417920	7.50	22186872	7.21	7.34	1.72
31	3(methylthio)-benzenamine	48.58	151815	0.41	576829	0.40	731051	0.35	1056617	0.37	1261667	0.41	0.39	6.92
32	1-chloro-2-(2-chlorovinyl)disulfanyl methyl)disulfanyl)ethene	48.76	109136	0.34	509388	0.32	1025199	0.40	944781	0.33	1169350	0.38	0.35	9.66



ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์

ตารางที่ A-2 ตารางแสดงพื้นที่ใต้พีคของเห็ดหอมตัวอย่างจากจังหวัดสระบุรี โดยวิเคราะห์ตัวอย่างซ้ำ 5 ครั้ง (ข้อสารระเหยง่ายเป็นข้อมูลที่เทียบจาก NIST Library)

No.	Compounds	RT (min)	Shiitake_Mushroom_Saraburi										Avg %Normalization	%RSD
			Peak Area 1	%Normalization	Peak Area 2	%Normalization	Peak Area 3	%Normalization	Peak Area 4	%Normalization	Peak Area 5	%Normalization		
1 = a	dimethyl disulfide	4.65	6195702	1.96	5836403	2.36	5974628	2.44	7076640	2.23	5683620	1.94	2.18	10.38
2	1-pentanol	-	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0.00	0.00
3	benzaldehyde	14.11	101803	0.03	90278	0.04	79571	0.03	109150	0.03	93328	0.03	0.03	5.77
4 = b	dimethyl trisulfide	14.44	20551175	6.49	16867753	6.81	15652602	6.38	21475428	6.75	22232062	7.59	6.80	6.97
5	1-octen-3-one	-	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0.00	0.00
6	1-octen-3-ol	-	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0.00	0.00
7	3-octanone	15.63	172731	0.05	156745	0.06	153655	0.06	173104	0.05	182909	0.06	0.06	7.66
8	3-octanol	16.10	34902	0.01	29962	0.01	27212	0.01	31098	0.01	38653	0.01	0.01	11.21
9	octanal	-	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0.00	0.00
10	benzeneacetaldehyde	18.50	162854	0.05	134428	0.05	133095	0.05	190667	0.06	157142	0.05	0.05	5.77
11	2-methyl phenol	19.20	1592650	0.50	1329855	0.54	1391928	0.57	1814974	0.57	1602388	0.55	0.55	5.03
12	2-octenal	-	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0.00	0.00
13	2-octen-1-ol	-	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0.00	0.00
14	1-octanol	20.08	33508	0.01	29093	0.01	28804	0.01	41408	0.01	37290	0.01	0.01	8.06
15 = c	1,2,4-trithiolane	20.74	46845520	14.79	35647727	14.39	35269409	14.38	44375924	13.95	43612953	14.89	14.48	2.59
16	phenylethyl alcohol	22.02	782343	0.25	590013	0.24	647155	0.26	849686	0.27	830303	0.28	0.26	6.84
17	(chloromethylthio)(methylthio)-methane	22.56	9839099	3.11	7614861	3.07	7464758	3.04	9102479	2.86	8952655	3.06	3.03	3.17
18	2-phenylpropenal	24.20	1442630	0.46	1197523	0.48	1058863	0.43	1502148	0.47	1058500	0.36	0.44	11.00
19 = d	tetrasulfide	26.92	28787820	9.09	23497051	9.48	23214162	9.46	30944296	9.73	31988661	10.92	9.74	7.20

ตารางที่ A-2 (ต่อ)

20 = e	1,2,4,5-tetrathiane	32.74	14061759	4.44	9937806	4.01	9861201	4.02	14382144	4.52	10041051	3.43	4.08	10.66
21 = f	dimethyldithiophosphenic acid	33.17	34815433	10.99	25307938	10.21	26358920	10.75	39738566	12.50	31325806	10.70	11.03	7.86
22 = g	methyl(methylthio)methyl disulfide	33.48	12859937	4.06	9538786	3.85	9442993	3.85	11196463	3.52	11881132	4.06	3.87	5.70
23 = h	1-aminocyclopentanecarboxylic acid	33.77	8075145	2.55	6191483	2.50	6118296	2.49	7464539	2.35	6920260	2.36	2.45	3.67
24	pentasulfide	37.57	3565782	1.13	3441965	1.39	3212886	1.31	4010028	1.26	3439235	1.17	1.25	8.39
25 = i	tris(methylthiol)-methane	39.36	30156052	9.52	22952077	9.26	22724528	9.26	29345553	9.23	28373977	9.69	9.39	2.16
26 = j	1,2,4,6-tetrathiepane	39.68	17443342	5.51	15071577	6.08	14866431	6.06	16030322	5.04	16636505	5.68	5.67	7.60
27	(methylsulfinyl)(methylthio)-methane	39.86	1648593	0.52	1433578	0.58	1424180	0.58	1676341	0.53	1764238	0.60	0.56	6.41
28 = k	bis(2-sulthydrylethyl)-disulfide	43.06	9147929	2.89	7034487	2.84	7093954	2.89	9988836	3.14	9391881	3.21	2.99	5.60
29 = l	lenthionine	44.16	60465011	19.09	47840497	19.31	47358268	19.31	59532162	18.72	50012389	17.08	18.70	5.02
30 = m	hexathiepane	47.13	3433424	1.08	2474818	1.00	2418743	0.99	3100566	0.98	2689441	0.92	0.99	6.02
31	3(methylthio)-benzenamine	48.57	2380432	0.75	1854504	0.75	1828556	0.75	2070692	0.65	2124012	0.73	0.72	5.83
32	1-chloro-2-(2-chlorovinyl)disulfanyl methyl(disulfanyl)ethene	48.76	2073993	0.65	1663036	0.67	1513821	0.62	1781939	0.56	1765757	0.60	0.62	7.06

ตารางที่ A-3 ตารางแสดงพื้นที่ใต้พีคของเห็ดหอมตัวอย่างจากจังหวัดเชียงใหม่ โดยวิเคราะห์ตัวอย่างซ้ำ 5 ครั้ง (ข้อสารระเหยง่ายเป็นข้อมูลที่เทียบจาก NIST Library)

No.	Compounds	RT (min)	Shiitake_Mushroom_Chiangmai										Avg %Normalization	%RSD
			Peak Area 1	%Normalization	Peak Area 2	%Normalization	Peak Area 3	%Normalization	Peak Area 4	%Normalization	Peak Area 5	%Normalization		
1 = a	dimethyl disulfide	4.65	1713674	1.03	1768316	0.96	1881415	0.94	1889836	1.09	1980632	1.11	1.03	7.33
2	1-pentanol	5.40	891097	0.54	985744	0.54	922805	0.46	856338	0.49	1012594	0.57	0.52	8.14
3	benzaldehyde	14.11	241498	0.15	246700	0.13	285540	0.14	263427	0.15	264033	0.15	0.14	4.57
4 = b	dimethyl trisulfide	14.44	6297307	3.80	8369707	4.55	8443374	4.21	7182501	4.13	7817139	4.38	4.21	6.70
5	1-octen-3-one	15.20	871256	0.53	767254	0.42	961413	0.48	750641	0.43	750641	0.42	0.45	10.28
6	1-octen-3-ol	15.28	7382145	4.45	8075219	4.39	7600264	3.79	6365311	3.66	7648991	4.28	4.11	8.86
7	3-octanone	15.64	16180071	9.76	16941423	9.21	20325072	10.13	17098010	9.83	15760933	8.82	9.55	5.49
8	3-octanol	16.11	6327488	3.82	7765898	4.22	8503218	4.24	6185138	3.56	7130844	3.99	3.96	7.24
9	octanal	16.49	58191	0.04	63170	0.03	74662	0.04	67321	0.04	68303	0.04	0.04	5.24
10	benzeneacetaldehyde	18.51	327014	0.20	341018	0.19	368879	0.18	279329	0.16	309288	0.17	0.18	7.67
11	2-methyl phenol	-	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0.00	0.00
12	2-octenal	19.34	58908	0.04	71239	0.04	76893	0.04	57271	0.03	71794	0.04	0.04	7.80
13	2-octen-1-ol	19.88	1296919	0.78	1442636	0.78	1618728	0.81	1448062	0.83	1435334	0.80	0.80	2.55
14	1-octanol	20.04	1628145	0.98	1965748	1.07	2376746	1.18	1827959	1.05	1880114	1.05	1.07	6.86
15 = c	1,2,4-trithiolane	20.71	12667060	7.64	13207524	7.18	14746940	7.35	12656365	7.28	14466389	8.10	7.51	4.95
16	phenylethyl alcohol	22.04	530315	0.32	667647	0.36	787281	0.39	602979	0.35	582638	0.33	0.35	8.39
17	(chloromethylthio)(methylthio)-methane	22.56	820398	0.49	864347	0.47	968989	0.48	757646	0.44	904282	0.51	0.48	5.70
18	2-phenylpropenal	24.19	4334386	2.61	4247373	2.31	5451474	2.72	4699658	2.70	5106195	2.86	2.64	7.76
19 = d	tetrasulfide	26.90	12265407	7.40	14080601	7.65	15449493	7.70	10875764	6.25	13874339	7.77	7.35	8.58

ตารางที่ A-3 (ต่อ)

20 = e	1,2,4,5-tetrathiane	32.75	14206525	8.57	14662118	7.97	15480163	7.71	15006073	8.63	15651138	8.76	8.33	5.51
21 = f	dimethyldithiophosphenic acid	33.14	8713148	5.25	9583746	5.21	10407202	5.19	9946251	5.72	8585416	4.81	5.23	6.20
22 = g	methyl(methylthio)methyl disulfide	33.46	2822836	1.70	3657918	1.99	3910613	1.95	3029490	1.74	3490097	1.95	1.87	7.17
23 = h	1-aminocyclopentanecarboxylic acid	33.75	4287179	2.59	4654465	2.53	4631594	2.31	4483086	2.58	4503757	2.52	2.50	4.53
24	pentasulfide	37.57	1769942	1.07	1698742	0.92	2184521	1.09	1464432	0.84	1814487	1.02	0.99	10.46
25 = i	tris(methylthiol)-methane	39.31	2415083	1.46	2831642	1.54	2846155	1.42	2749564	1.58	2521405	1.41	1.48	5.09
26 = j	1,2,4,6-tetrathiepane	39.65	2756972	1.66	3386652	1.84	3759085	1.87	3462787	1.99	2876967	1.61	1.80	8.72
27	(methylsulfinyl)(methylthio)-methane	39.86	57689	0.03	59962	0.03	70202	0.03	60629	0.03	70821	0.04	0.04	7.31
28 = k	bis(2-sulthydrylethyl)-disulfide	43.05	2120359	1.28	2442460	1.33	2505244	1.25	2702353	1.55	2566154	1.44	1.37	9.17
29 = l	lenthionine	44.17	44028999	26.55	49770819	27.05	52253703	26.03	46114958	26.51	45066626	25.23	26.27	2.62
30 = m	hexathiepane	47.16	8316210	5.02	8927690	4.85	11307687	5.63	10636648	6.11	10004797	5.60	5.44	9.39
31	3(methylthio)-benzenamine	48.58	298264	0.18	313260	0.17	332871	0.17	282062	0.16	288455	0.16	0.17	4.49
32	1-chloro-2-(2-chlorovinyl)disulfanyl methyl(disulfanyl)ethene	48.76	141985	0.09	141159	0.08	183611	0.09	147098	0.08	145171	0.08	0.08	6.51

ตารางที่ A-4 ตารางแสดงพื้นที่ใต้พีกของเห็ดหอมตัวอย่างจากจังหวัดนครราชสีมา โดยวิเคราะห์ตัวอย่างซ้ำ 5 ครั้ง (ข้อมูลระเหยง่ายเป็นข้อมูลที่เทียบจาก NIST Library)

No.	Compounds	RT (min)	Shiitake_Mushroom_Korat										Avg %Normalization	%RSD
			Peak Area 1	%Normalization	Peak Area 2	%Normalization	Peak Area 3	%Normalization	Peak Area 4	%Normalization	Peak Area 5	%Normalization		
1 = a	dimethyl disulfide	4.63	3136548	0.98	3135322	0.99	3373660	1.10	3179110	1.05	3118765	1.04	1.03	4.43
2	1-pentanol	-	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0.00	0.00
3	benzaldehyde	14.11	253942	0.08	191100	0.06	243836	0.08	211989	0.07	209232	0.07	0.07	11.00
4 = b	dimethyl trisulfide	14.45	32139905	10.08	34067150	10.78	29586084	9.60	26283349	8.68	26649889	8.92	9.61	8.92
5	1-octen-3-one	-	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0.00	0.00
6	1-octen-3-ol	-	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0.00	0.00
7	3-octanone	15.63	5631543	1.77	4493500	1.42	4899261	1.59	3957113	1.31	4675149	1.56	1.53	11.42
8	3-octanol	-	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0.00	0.00
9	octanal	-	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0.00	0.00
10	benzeneacetaldehyde	-	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0.00	0.00
11	2-methyl phenol	-	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0.00	0.00
12	2-octenal	-	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0.00	0.00
13	2-octen-1-ol	-	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0.00	0.00
14	1-octanol	-	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0.00	0.00
15 = c	1,2,4-trithiolane	20.70	13904632	4.36	10844217	3.43	12221272	3.97	12419456	4.10	12550427	4.20	4.01	8.83
16	phenylethyl alcohol	22.05	2729378	0.86	2263159	0.72	2191253	0.71	1945553	0.64	2150204	0.72	0.73	10.66
17	(chloromethylthio)(methylthio)-methane	22.55	5871395	1.84	5957659	1.89	6074478	1.97	5487052	1.81	4544183	1.52	1.81	9.45
18	2-phenylpropenal	24.20	1544768	0.48	1185832	0.38	1124723	0.37	1414055	0.47	1364687	0.46	0.43	12.87
19 = d	tetrasulfide	26.89	49132579	15.40	51767216	16.38	43563832	14.14	43494068	14.36	36739597	12.29	14.51	10.55

ตารางที่ A-4 (ต่อ)

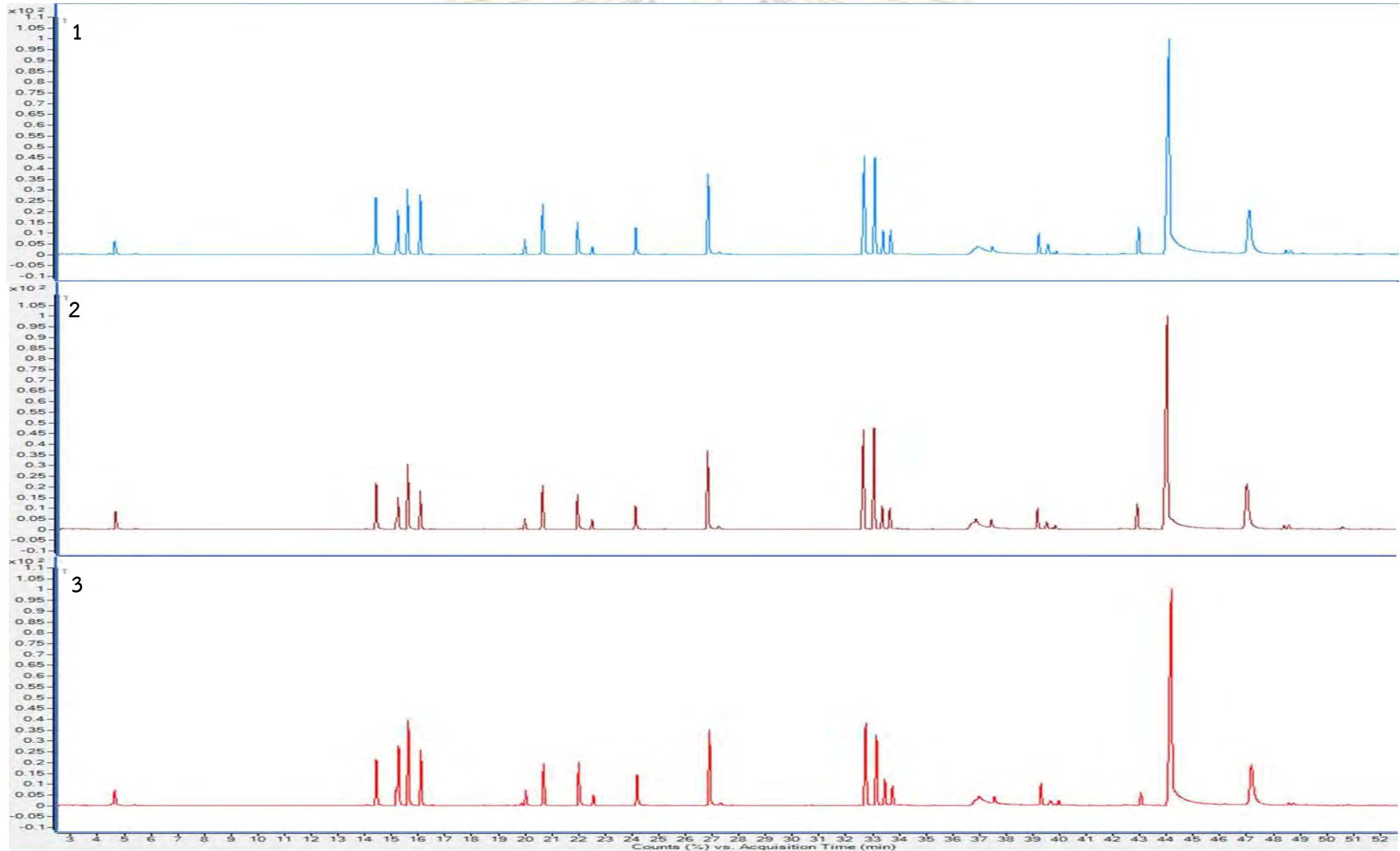
20 = e	1,2,4,5-tetrathiane	32.76	15110352	4.74	13827301	4.38	16537185	5.37	14778430	4.88	16302290	5.45	4.96	9.06
21 = f	dimethyldithiophosphenic acid	33.18	31368810	9.83	32776955	10.37	34182367	11.09	33986057	11.22	33768014	11.30	10.76	5.91
22 = g	methyl(methylthio)methyl disulfide	33.49	14345796	4.50	15323578	4.85	15453419	5.02	12622004	4.17	14171002	4.74	4.65	7.11
23 = h	1-aminocyclopentanecarboxylic acid	33.77	2944623	0.92	3108287	0.98	3573167	1.16	3799886	1.25	3117273	1.04	1.07	12.49
24	pentasulfide	37.58	7609155	2.39	7378177	2.33	7523486	2.44	7576035	2.50	5809883	1.94	2.32	9.48
25 = i	tris(methylthiol)-methane	39.32	12365393	3.88	12907506	4.08	10301069	3.34	13149648	4.34	13006276	4.35	4.00	10.41
26 = j	1,2,4,6-tetrathiepane	39.65	2044486	0.64	2009703	0.64	2230848	0.72	2165766	0.71	2277549	0.76	0.70	7.92
27	(methylsulfinyl)(methylthio)-methane	39.87	671271	0.21	551159	0.17	637600	0.21	534068	0.18	560720	0.19	0.19	8.82
28 = k	bis(2-sulthydrylethyl)-disulfide	43.06	5555163	1.74	5244839	1.66	4952914	1.61	5544536	1.83	4917326	1.65	1.70	5.26
29 = l	lenthionine	44.23	91102017	28.56	87983138	27.84	88318012	28.67	88342070	29.16	91582608	30.64	28.97	3.60
30 = m	hexathiepane	47.17	18093838	5.67	17602844	5.57	17655385	5.73	18906441	6.24	18447741	6.17	5.88	5.22
31	3(methylthio)-benzenamine	48.59	2253766	0.71	2008997	0.64	2095935	0.68	1898144	0.63	1968712	0.66	0.66	4.94
32	1-chloro-2-(2-chlorovinyl)disulfanyl methyl(disulfanyl)ethene	48.76	1169227	0.37	1374982	0.44	1337532	0.43	1223367	0.40	981468	0.33	0.39	11.68

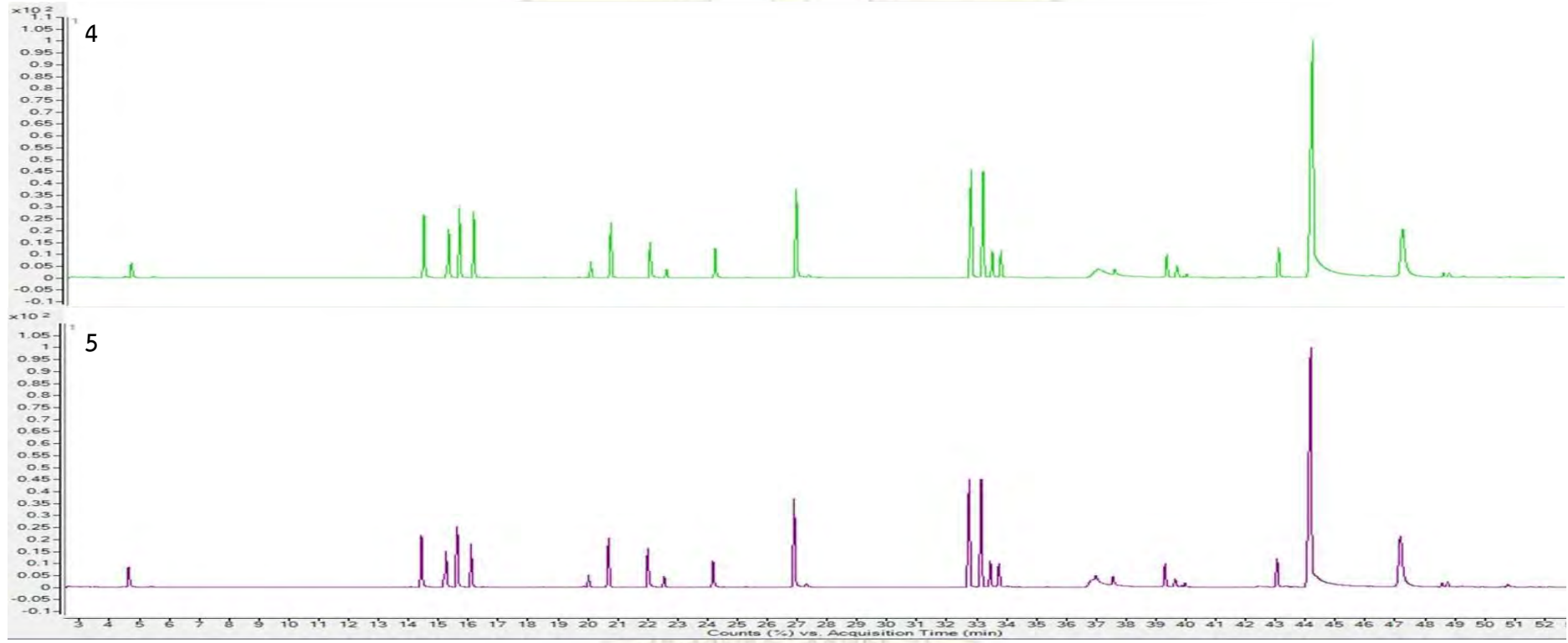


ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์



รูปภาพที่ A-1 รูปภาพแสดงโครมาโทแกรมของเห็ดหอมที่มาจากจังหวัดปทุมธานีโดยทำการทดลอง 5 ซ้ำ

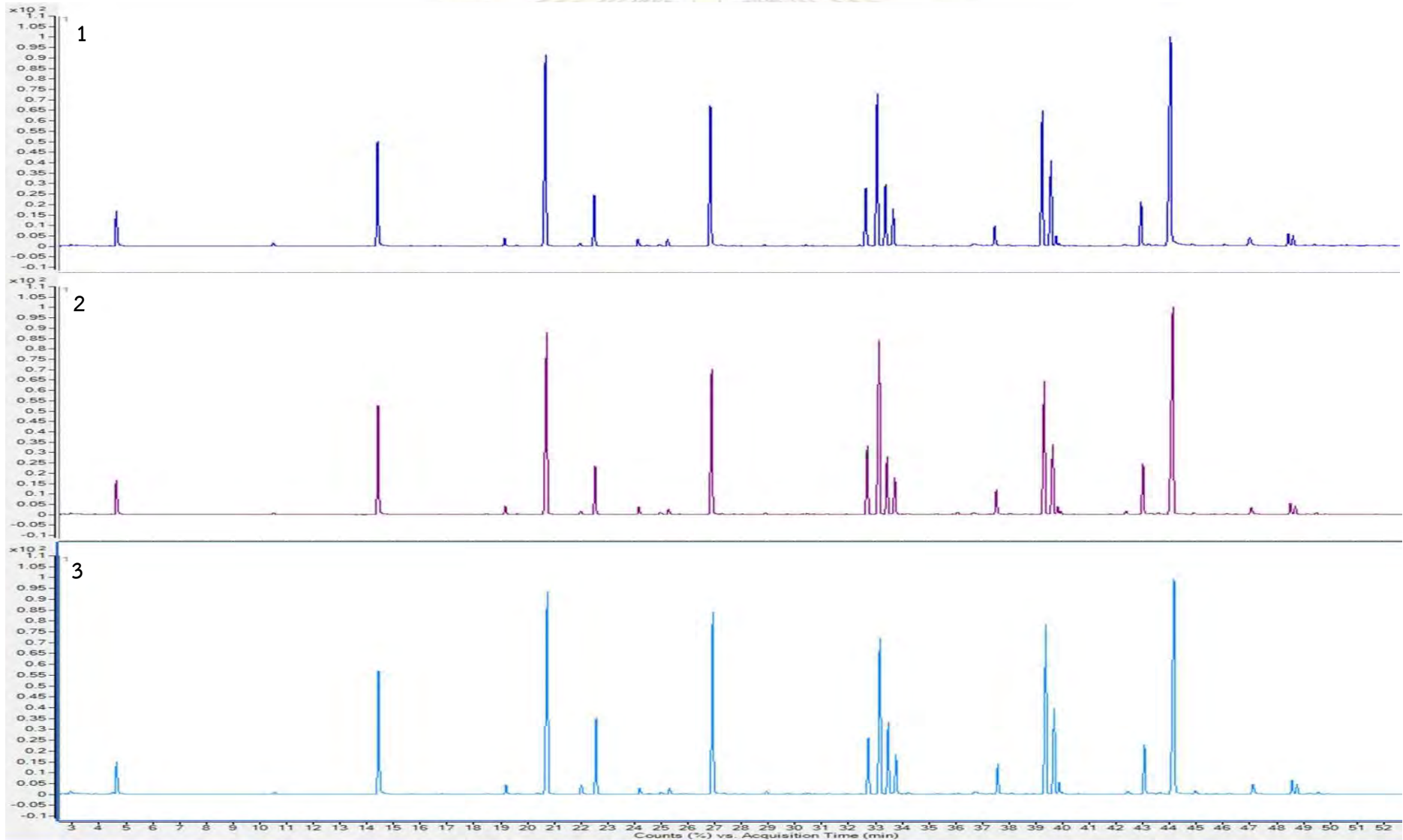


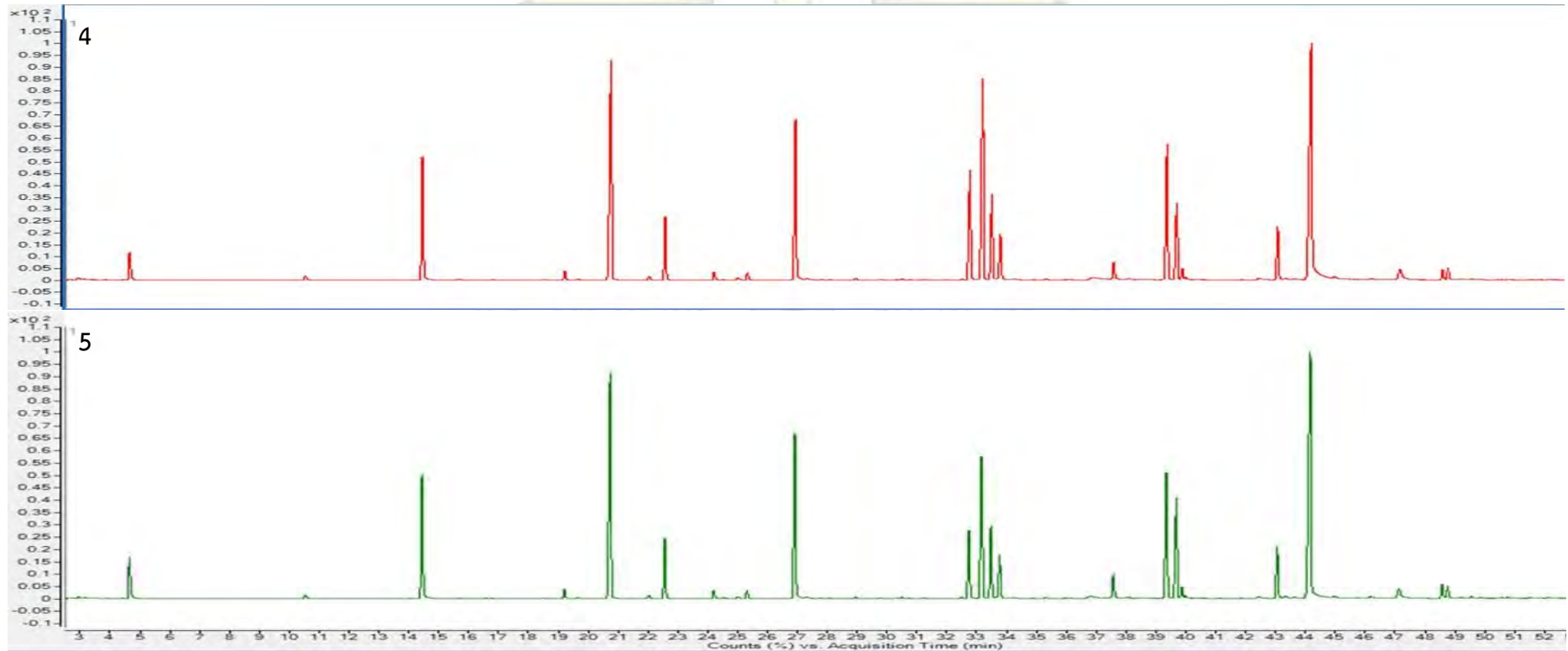


ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์



รูปภาพที่ A-2 รูปภาพแสดงโครมาโทแกรมของเห็ดหอมที่มาจากจังหวัดสระบุรีโดยทำการทดลอง 5 ซ้ำ

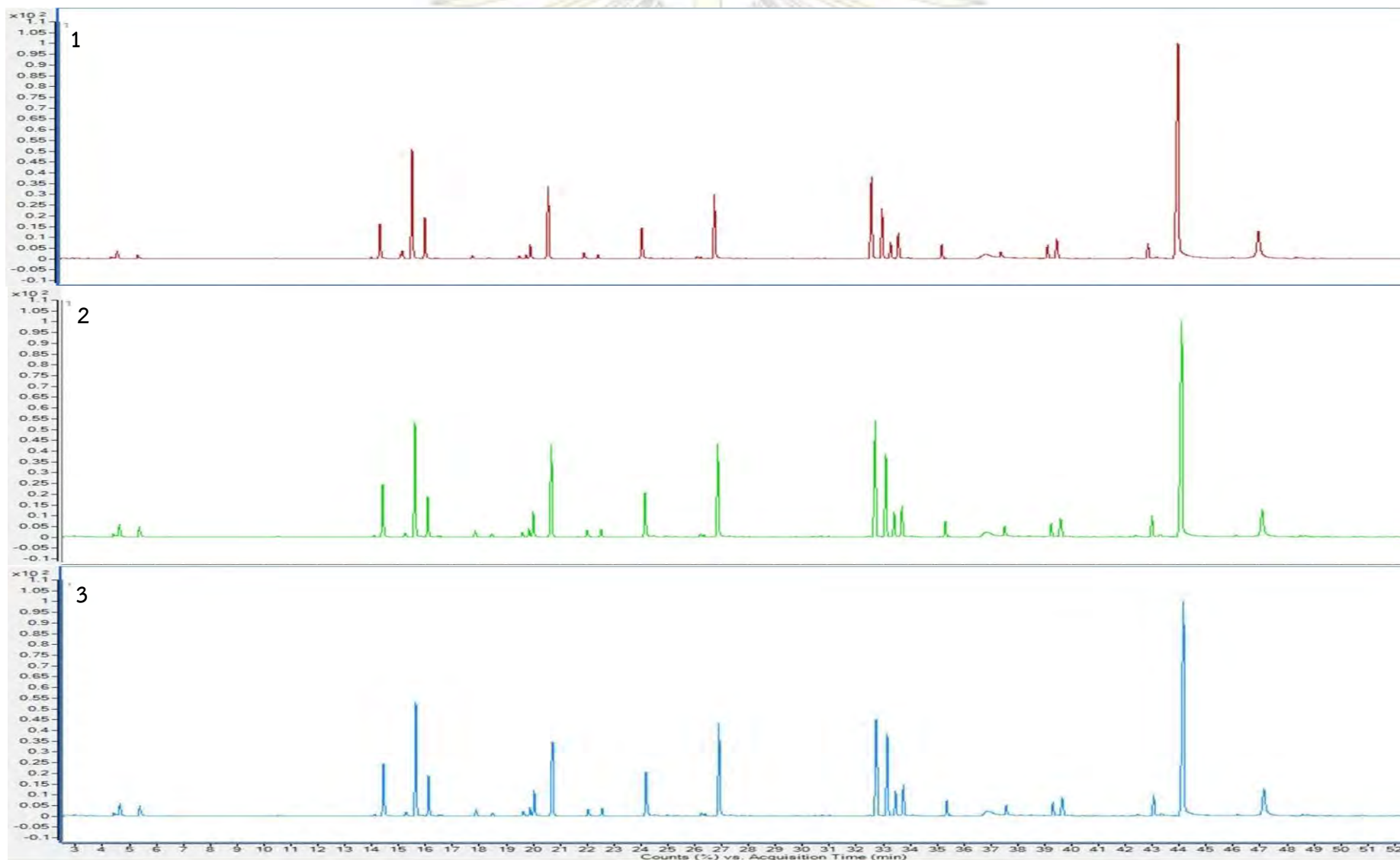


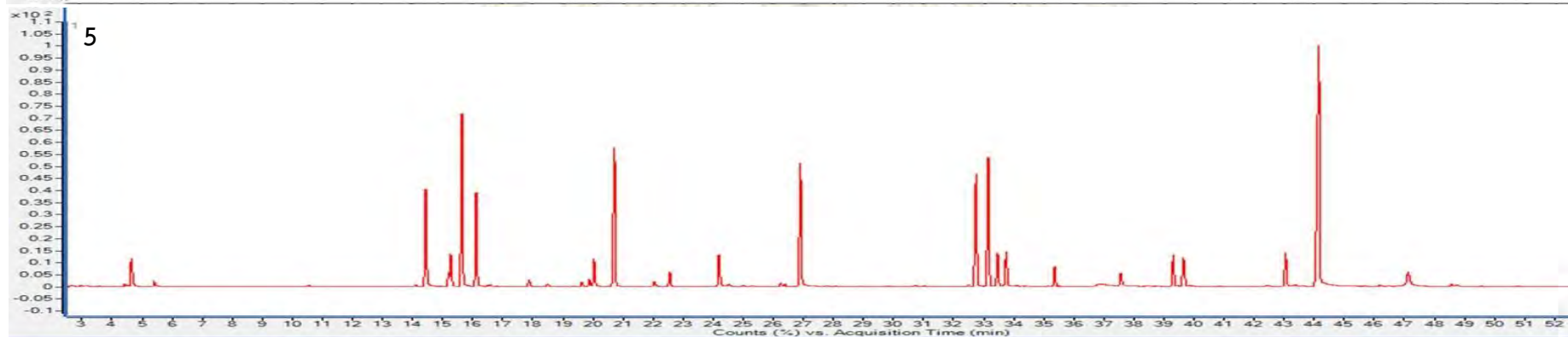
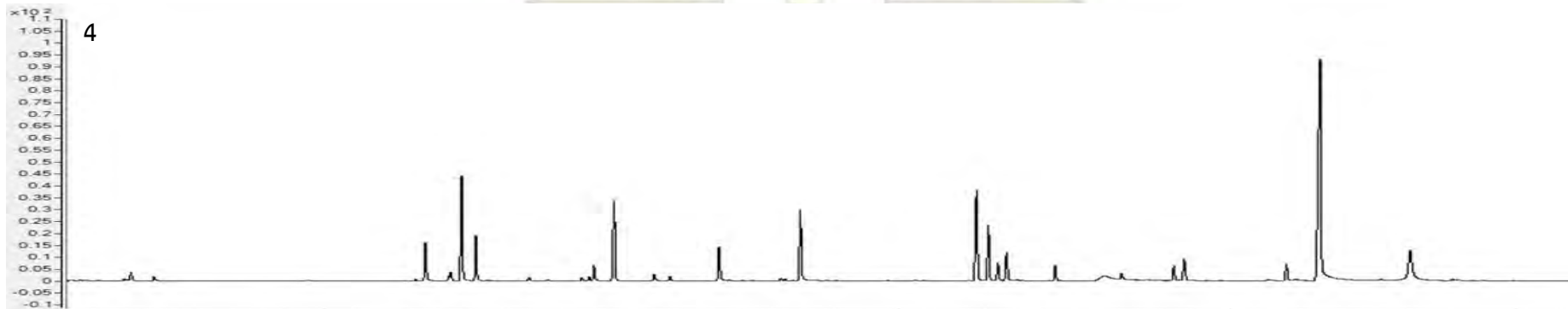


ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์



รูปภาพที่ A-3 รูปภาพแสดงโครมาโทแกรมของเห็ดหอมที่มาจากจังหวัดเชียงใหม่โดยทำการทดลอง 5 ซ้ำ

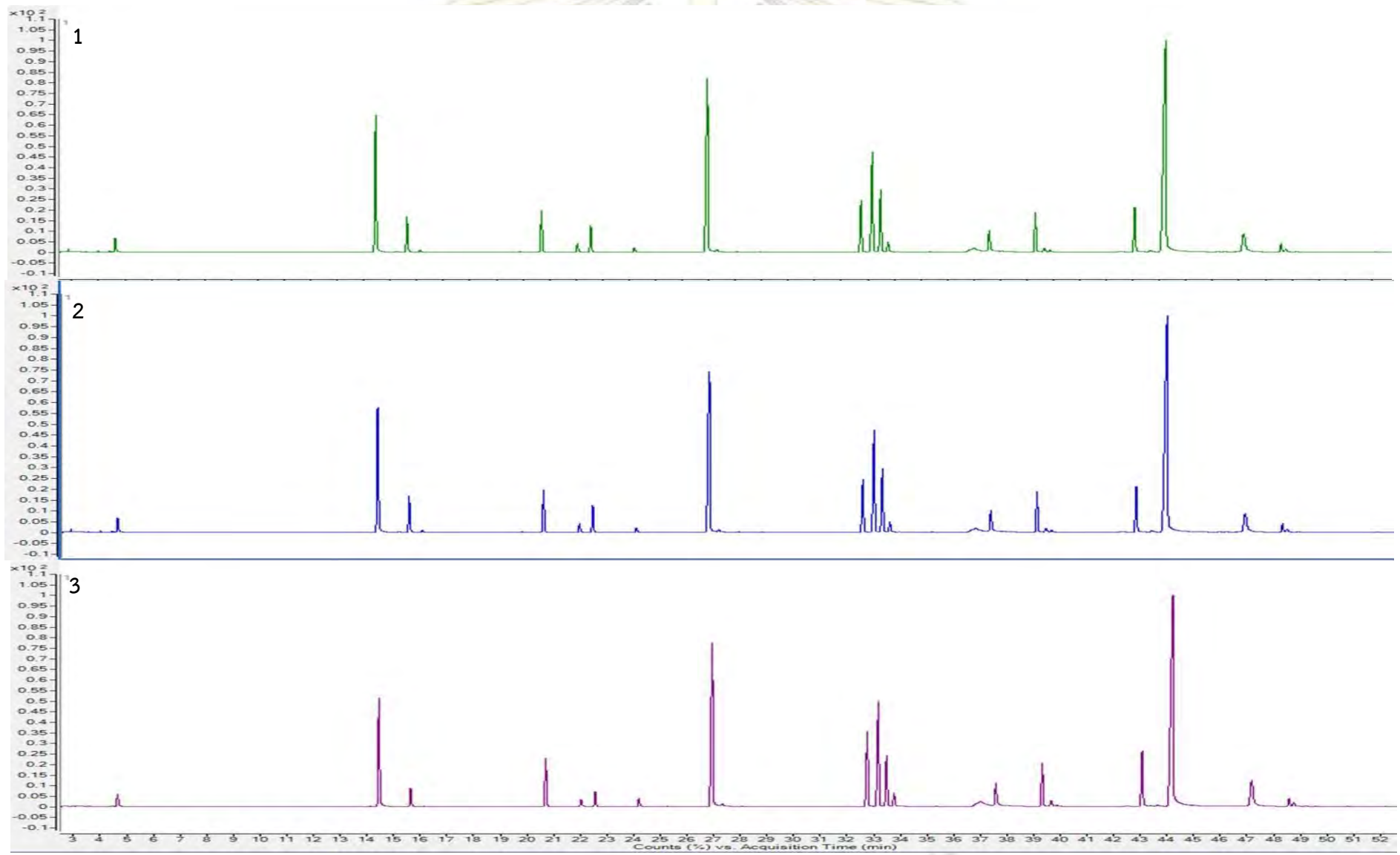


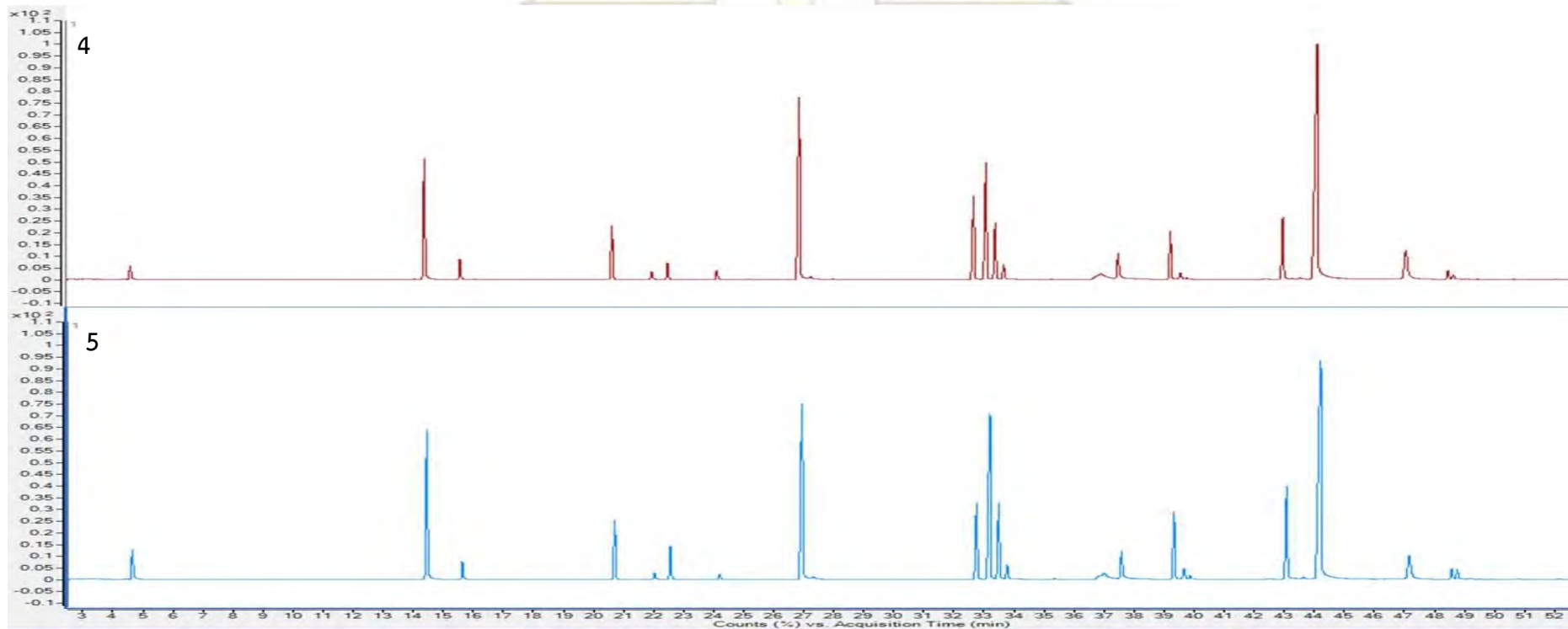


ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์



รูปภาพที่ A-4 รูปภาพแสดงโครมาโทแกรมของเห็ดหอมที่มาจากจังหวัดนครราชสีมาโดยทำการทดลอง 5 ซ้ำ





ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์

ประวัติผู้วิจัย

นายวัชรพล โปธาราม เกิดวันที่ 26 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2537 ณ กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษา
มัธยมศึกษาตอนปลาย สายสามัญ (แผนกวิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์) จากโรงเรียนพระโขนงพิทยาลัย
กรุงเทพมหานคร เมื่อปีการศึกษา 2554 เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาตรี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2555 ที่อยู่ปัจจุบัน 200/185 ถนนเทพารักษ์ ตำบลแพรกษา
อำเภอเมืองสมุทรปราการ จังหวัดสมุทรปราการ 10280



ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย