

การเปรียบเทียบสารระเหยง่ายในน้ำมะนาวคั้นสด 4 พันธุ์ โดยใช้เทคนิคเฮดสเปซ-แก๊สโครมาโทกราฟี-
แมสสเปกโตรเมตรีและเคโมเมทริก



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2559
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

COMPARISON OF VOLATILE COMPOUNDS IN FRESH-
SQUEEZED JUICE FROM 4 LIME CULTIVARS USING HEADSPACE-GAS CHROMATOGRAPHY-
MASS SPECTROMETRY AND CHEMOMETRIC TECHNIQUES

Miss Natthamon Suwannaprom



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Food Technology

Department of Food Technology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2016

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเปรียบเทียบสารระเหยง่ายในน้ำมันงาคั่วรส 4 พันธุ์ โดยใช้เทคนิคเฮดสเปซ-แก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตร เมทรีและเคโมเมทริก
โดย	นางสาวนันทมน สุวรรณพรหม
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อาจารย์ ดร.พนิดา งามเชื้อชาติ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ศาสตราจารย์ ดร.สุวิมล กิริติพิบูล ดร.สุมิตรา บุญบำรุง

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวงนิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(อาจารย์ ดร.อินทาวุธ สรรพวรสถิตย์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์ ดร.พนิดา งามเชื้อชาติ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ศาสตราจารย์ ดร.สุวิมล กิริติพิบูล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ดร.สุมิตรา บุญบำรุง)

.....กรรมการ

(อาจารย์ ดร.ศานต์ เศรษฐชัยมงคล)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ดร.กัณณพนต์ โล่ห์เพชรรัตน์)

นัทธมน สุวรรณพรหม : การเปรียบเทียบสารระเหยง่ายในน้ำมะนาวคั้นสด 4 พันธุ์ โดยใช้เทคนิคเฮดสเปซ-แก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมตรีและเคมีเมทริก (COMPARISON OF VOLATILE COMPOUNDS IN FRESH-SQUEEZED JUICE FROM 4 LIME CULTIVARS USING HEADSPACE-GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY AND CHEMOMETRIC TECHNIQUES) อ.ที่ปริกษานิพนธ์หลัก: อ. ดร.พนิดา งามเชื้อชิต, อ.ที่ปริกษานิพนธ์ร่วม: ศ. ดร.สุวิมล กิริติพิบูล, ดร.สุมิตรา บุญบำรุง, 82 หน้า.

มะนาว (lime) เป็นพืชตระกูลส้ม (Citrus) ที่นิยมใช้ในการประกอบอาหารและเครื่องดื่ม เนื่องจากมีรสเปรี้ยวและกลิ่นที่มีเอกลักษณ์ มะนาวพันธุ์ที่นิยมบริโภคและปลูกในประเทศไทย ได้แก่ มะนาวพันธุ์แป้น ซึ่งสามารถปลูกได้ง่าย น้ำมีกลิ่นหอม และมะนาวพันธุ์ตาฮิติ ซึ่งเป็นมะนาวไร้เมล็ด ทนทานต่อโรค งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิเคราะห์และเปรียบเทียบสารระเหยง่ายและลักษณะเชิงประสาทสัมผัสด้านกลิ่นที่สำคัญของน้ำมะนาวคั้นสด 4 พันธุ์ ได้แก่ แป้นรำไพ แป้นพวง แป้นพิจิตร และตาฮิติ โดยใช้เทคนิคเฮดสเปซ-แก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมทรีร่วมกับเทคนิคทางเคมีเมทริก โดยพบว่าสารระเหยที่วิเคราะห์ได้มีทั้งหมด 29 ชนิด น้ำมะนาวพันธุ์แป้นรำไพมีปริมาณสารระเหยที่วิเคราะห์ได้สูงที่สุด (91.68 ppm) ตามด้วยแป้นพวง (87.34 ppm), ตาฮิติ (66.90 ppm) และแป้นพิจิตร (12.16 ppm) ตามลำดับ สารที่มีปริมาณมากที่สุดในทุกพันธุ์ คือ D-limonene จากการวิเคราะห์ข้อมูลสารระเหยง่ายในน้ำมะนาวด้วย Principal component analysis (PCA) และ Hierarchical cluster analysis (HCA) พบว่า มะนาวพันธุ์แป้นรำไพมีความคล้ายคลึงกับพันธุ์แป้นพวงมากกว่าพันธุ์ตาฮิติและพันธุ์พิจิตร โดยพบว่าสารระเหย β -myrcene มากในมะนาวพันธุ์แป้นรำไพ, caryophyllene มากในมะนาวตาฮิติ และ β -Ocimene และ α -Farnesene มากในมะนาวแป้นพิจิตร ซึ่งสารระเหยเหล่านี้อาจใช้เป็นไบโอมาร์คเกอร์ในมะนาวพันธุ์นั้นๆ ได้ จากการพิจารณาค่า odor activity value (OAV) ของสารระเหยง่ายให้กลิ่นสำคัญที่เป็นลักษณะเฉพาะในน้ำมะนาวพบว่า น้ำมะนาวพันธุ์แป้นรำไพและแป้นพวง คือ decanal และ terpinen-4-ol ในน้ำมะนาวตาฮิติคือ caryophyllene และในน้ำมะนาวแป้นพิจิตรคือ β -Ocimene จากการทดสอบประสาทสัมผัสเชิงพรรณนาพบว่า น้ำมะนาวพันธุ์แป้นรำไพ, แป้นพวง, และตาฮิติมีลักษณะกลิ่น citrus, กลิ่น lemon, กลิ่น green, กลิ่น juicy, กลิ่น peely, และกลิ่น floral ลักษณะกลิ่นของน้ำมะนาวพันธุ์แป้นรำไพและแป้นพวงไม่แตกต่างกันและมีความเข้มข้นของลักษณะกลิ่นดังกล่าวสูงที่สุด ตามด้วยน้ำมะนาวตาฮิติซึ่งมีความเข้มข้นของกลิ่นรองลงมา พันธุ์แป้นพิจิตรมีลักษณะกลิ่น oxidized, กลิ่น lime และกลิ่น ripe มากที่สุด นอกจากนี้ จากการทดสอบการยอมรับของผู้บริโภคโดยใช้ 9-point hedonic scale พบว่า พันธุ์แป้นพวงมีคะแนนการยอมรับของผู้บริโภคสูงสุดทั้งทางด้านกลิ่น รส และความชอบโดยรวม ($p < 0.05$) ตามด้วย พันธุ์แป้นรำไพ, ตาฮิติและแป้นพิจิตร ตามลำดับ

ภาควิชา เทคโนโลยีทางอาหาร

ลายมือชื่อนิสิต

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางอาหาร

ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาหลัก

ปีการศึกษา 2559

ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาร่วม

ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาร่วม

5772279723 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY

KEYWORDS: AROMA / SENSORY / PCA / ACCEPTANCE / ATTRIBUTES / CITRUS

NATTHAMON SUWANNAPROM: COMPARISON OF VOLATILE COMPOUNDS IN FRESH-SQUEEZED JUICE FROM 4 LIME CULTIVARS USING HEADSPACE-GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY AND CHEMOMETRIC TECHNIQUES. ADVISOR: PANITA NGAMCHUACHIT, Ph.D., CO-ADVISOR: PROF.SUWIMON KEERATIPIBUL, Ph.D., SUMITRA BOONBUMRUNG, Ph.D., 82 pp.

Limes are commonly used in foods and beverages because of its unique taste and aroma. Lime cultivars consumed in Thailand are “Pan”, an easily grown and scented cultivar, and “Tahiti”, a seedless and resistant to disease cultivar. This research aimed to analyze and compare the volatiles and sensory attributes of fresh-squeezed lime juices from 4 cultivars including “Pan Rumpai”, “Pan Puang”, “Pan Pijit” and “Tahiti” using headspace/gas chromatography-mass spectrometry (HS/GC-MS) and chemometric techniques. From the results, a total of 29 volatile compounds have been identified by GC-MS, and their relative amounts have been calculated by adding internal standard to the samples. “Pan Rumpai” juice has the highest amount of volatile compounds (91.68 ppm), followed by “Pan Puang” (87.34 ppm), Tahiti (66.90 ppm) and “Pan Pijit” (12.16 ppm) juices. The highest quantity of volatile compound in all cultivars is D-limonene. According to Principal component analysis (PCA) and Hierarchical cluster analysis (HCA) of volatile compounds in lime juice, “Pan Rumpai” is more similar to “Pan Puang” than “Tahiti” and “Pan Pijit”. Moreover, β -myrcene is mostly found in “Pan Rumpai”, caryophyllene is mostly found in “Tahiti” and “ β -Ocimene” and “ α -Farnessene” are mostly found in “Pan Pijit”. Then, those volatile compounds could be potential biomarkers of each lime cultivar, respectively. From the determination of odor activity value (OAV), the volatiles contributing to a unique characteristics of each lime cultivar are decanal and terpinen-4-ol for “Pan Rampai” and “Pan Puang”, caryophyllene for “Tahiti”, and β -Ocimene for “Pan Pijit”. From Descriptive analysis, the aroma characteristics of “Pan Rampai”, “Pan Puang”, “Tahiti” are citrus, lemon, green, juicy, peely, and floral. The sensory profile of “Pan Rampai”, “Pan Puang” is similar and shows highest aroma intensity among lime cultivars, followed by “Tahiti”. “Pan Pijit” had more oxidized, lime and ripe aroma attributes. From the consumer acceptance test using 9-point hedonic scale, lime juice from “Puang” cultivar was highly accepted from customer in aroma, taste, and overall preference ($p \leq 0.05$), followed by “Pan Rampai”, “Tahiti”, and “Pan Pijit”, respectively.

Department: Food Technology

Student's Signature

Field of Study: Food Technology

Advisor's Signature

Academic Year: 2016

Co-Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความกรุณาอย่างยิ่งของอาจารย์ ดร.พนิตา งามเชื้อจิต อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ศาสตราจารย์ ดร. สุวิมล กิรติพิบูล และ ดร.สุมิตรา บุญบำรุง อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ที่กรุณาสละเวลามาให้คำปรึกษา แนะนำ และช่วยเหลือในทุกๆ ด้าน ทั้งด้านวิชาการ การปฏิบัติ การทำงานและการดำเนินชีวิต รวมถึงช่วยปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น จึงขอขอบพระคุณ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. อินทาวุธ สรรพวรสถิตย์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร. ศานต์ เศรษฐชัยมงคล และ ดร. กัณณพนต์ โล่ห์เพชรรัตน์ ที่ให้ความกรุณาเป็นกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ รวมทั้งช่วยชี้แนะปรับปรุงวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ GERSTEL, Singapore และภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือการวิเคราะห์

ขอขอบพระคุณ คุณชาญณรงค์ พวงสั้น หัวหน้ากลุ่มส่งเสริมและพัฒนาการผลิต สำนักงานเกษตรจังหวัดเพชรบุรี , คุณอิสระ สิริชัย และ คุณศุภฤกษ์ นฤเบศร์ไกรศรี เจ้าของสวนวสา ที่ให้ความอนุเคราะห์มะนาวทั้ง 4 สายพันธุ์ รวมถึงให้ความรู้และคำแนะนำต่องานวิจัย

ขอขอบพระคุณ ศูนย์วิจัยและพัฒนา เครื่องเบทาโกร และโรงเรียนการเรือน มหาวิทยาลัยสวนดุสิต ที่ให้ความอนุเคราะห์ให้ความร่วมมือในการทดสอบเชิงประสาทสัมผัส

ขอขอบพระคุณ Center of Molecular Sensory Science จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์สนับสนุนทุนวิจัย

ขอขอบคุณรุ่นพี่ เพื่อน และรุ่นน้อง นิสิตปริญญาตรี นิสิตปริญญาโท ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่คอยให้กำลังใจ ให้ความช่วยเหลือตลอดระยะเวลาการทำวิจัย

สุดท้ายนี้ ขอขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่คอยให้ความช่วยเหลือและให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูปภาพ.....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 วารสารปริทัศน์.....	4
2.1 มะนาว.....	4
2.1.1 พันธุ์มะนาวในประเทศไทย.....	4
2.1.2 การเพาะปลูกมะนาวในประเทศไทย.....	6
2.1.3 สันฐานวิทยาของผลไม้ตระกูลส้ม.....	8
2.1.4 สารระเหยง่ายให้กลิ่นในผลไม้ตระกูลส้ม.....	9
2.1.5 ปัจจัยที่ส่งผลต่อสารระเหยง่ายที่วิเคราะห์ได้ในน้ำผลไม้ตระกูลส้ม.....	11
2.1.5.1 แหล่งเพาะปลูก.....	11
2.1.5.2 พันธุ์ (cultivar).....	12
2.1.5.3 อุณหภูมิและระยะเวลาการเก็บรักษา.....	13
2.2 การวิเคราะห์สารระเหยง่าย.....	14
2.2.1 การสกัดสารระเหยง่าย.....	14
2.2.1.1 Headspace-Solid Phase Microextraction (HS-SPME).....	14
2.2.1.2 Dynamic Headspace extraction (DHE) หรือ purge and trap.....	15
2.2.2 การวิเคราะห์สารระเหยง่ายด้วย GC-MS.....	15

2.3 Odor Activity value (OAV).....	18
2.4 การทดสอบทางด้านประสาทสัมผัส.....	18
2.4.1 การวิเคราะห์หาลักษณะทางประสาทสัมผัสเชิงพรรณนา (descriptive analysis)....	19
2.4.2 การทดสอบการยอมรับ (acceptance test).....	19
2.5 การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยเคโมเมตริก.....	20
2.5.1 การปรับค่าเบื้องต้น (Data Pretreatment).....	20
2.5.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (principal components analysis; PCA).....	21
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	23
3.1 วัตถุประสงค์และอุปกรณ์	23
3.1.1 วัตถุประสงค์	23
3.1.2 อุปกรณ์	23
3.2 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง.....	24
3.2.1 การเตรียมตัวอย่างมะนาว มะนาวที่ใช้ในการทดลองมี 4 พันธุ์ ได้แก่.....	24
3.2.2 การวัดสมบัติทางกายภาพและเคมี.....	24
3.2.2.1 การวัดสี.....	24
3.2.2.2 การหาปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในน้ำทั้งหมด (SSC).....	24
3.2.2.3 การหาค่าความเป็นกรดต่าง (pH) และ ปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้ (TA).....	25
3.2.3 การวิเคราะห์ผลของอุณหภูมิและระยะเวลาการเก็บรักษาต่อองค์ประกอบและปริมาณของสารระเหยง่ายในน้ำมะนาวคั้นสด	25
3.2.3.1 การสกัดสารระเหยง่ายในน้ำมะนาวด้วยวิธี Headspace Solid Phase Microextraction (HS-SPME)	25
3.2.3.2 การหาชนิดและปริมาณสารระเหยให้กลิ่นของน้ำมะนาวที่เก็บไว้ในอุณหภูมิและระยะเวลาที่ต่างกันด้วยเทคนิค GC-MS.....	26

3.2.4 การวิเคราะห์ผลของพันธุ์ต่อองค์ประกอบและปริมาณของสารระเหยง่ายในน้ำ มะนาวคั้นสด.....	27
3.2.4.1 การสกัดสารระเหยให้กลิ่นของน้ำมะนาวด้วยวิธี Dynamic Headspace.....	27
3.2.4.2 การหาชนิดและปริมาณสารระเหยให้กลิ่นของน้ำมะนาวแต่ละพันธุ์ด้วย เทคนิค GC-MS.....	28
3.2.5 การหาค่า odor activity values (OAV)	29
3.2.6 การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสเชิงพรรณนา	30
3.2.7 การทดสอบการยอมรับของผู้บริโภค	31
3.2.8 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	31
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์.....	32
4.1 สมบัติทางกายภาพและเคมีของน้ำมะนาว	32
4.2 ผลของอุณหภูมิและระยะเวลาการเก็บรักษาต่อองค์ประกอบและปริมาณของสารระเหย ง่ายในน้ำมะนาวคั้นสด.....	33
4.3 ผลของพันธุ์ต่อองค์ประกอบและปริมาณของสารระเหยง่ายในน้ำมะนาวคั้นสด.....	41
4.3.1 การวิเคราะห์สารระเหยง่ายในน้ำมะนาว 4 พันธุ์ด้วย GC-MS.....	41
4.3.2 การวิเคราะห์สารระเหยง่ายในน้ำมะนาวคั้นสด 4 พันธุ์ด้วยวิธีเคโมเมทริก	49
4.3.3 การวิเคราะห์สารระเหยง่ายให้กลิ่นสำคัญในน้ำมะนาวคั้นสด 4 พันธุ์.....	53
4.3.4 การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสเชิงพรรณนา	56
4.3.5 การทดสอบการยอมรับของผู้บริโภค	56
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	60
5.1 สรุปผลการทดลอง	60
5.2 ข้อเสนอแนะ	61
รายการอ้างอิง	62
ภาคผนวก.....	67

ภาคผนวก ก วิธีการวิเคราะห์	68
ภาคผนวก ข ผลการทดลองเพิ่มเติม	70
ภาคผนวก ค ตัวอย่างการคำนวณ.....	75
ภาคผนวก ง แบบสอบถามการยอมรับของผู้บริโภค.....	78
ภาคผนวก จ คำอธิบายลักษณะกลิ่นเพิ่มเติม	80
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	82



สารบัญตาราง

เรื่อง	หน้า
ตารางที่ 2.1 พันธุ์มะนาวที่นิยมเพาะปลูกในประเทศไทย	5
ตารางที่ 2.2 การปรับข้อมูลเบื้องต้นสำหรับวิเคราะห์ด้วยเคโมเมตริก	20
ตารางที่ 2.3 วิธีการวิเคราะห์การจัดกลุ่ม.....	22
ตารางที่ 4.1 สมบัติทางกายภาพและทางเคมีของน้ำมะนาว	32
ตารางที่ 4.2 ปริมาณสารระเหยง่ายที่พบในน้ำมะนาวคั้นสดและน้ำมะนาวที่เก็บรักษาที่สภาวะ ต่างๆ.....	36
ตารางที่ 4.3 ชนิด, ปริมาณสารระเหยง่ายให้กลิ่นและค่า odor activity value ของน้ำมะนาวแต่ ละพันธุ์จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS.....	46
ตารางที่ ข.1 ลักษณะเฉพาะ, นิยาม, และตัวอย่างอ้างอิงของกลิ่นในน้ำมะนาวคั้นสด.....	73
ตารางที่ ข.2 ค่าเฉลี่ยของลักษณะกลิ่นจากการทดสอบทางประสาทสัมผัสเชิงพรรณนาของ มะนาว 4 พันธุ์	74
ตารางที่ ข.3 ค่าเฉลี่ยคะแนนความชอบจากการทดสอบการยอมรับของผู้บริโภค	74
ตารางที่ จ.2 ลักษณะเฉพาะด้านกลิ่นและนิยามที่ปรากฏเพิ่มเติมในวิทยานิพนธ์	81

สารบัญรูปภาพ

เรื่อง	หน้า
รูปที่ 2.1 พันธุ์มะนาวที่นิยมเพาะปลูกในประเทศไทย.....	6
รูปที่ 2.2 ภาพตัดตามขวางของผลไม้ตระกูลส้ม	9
รูปที่ 2.3 ตัวอย่างสารระเหยง่ายให้กลิ่นกลุ่ม terpene ที่พบในฝักและผลไม้	10
รูปที่ 2.4 เทคนิค HS-SPME	14
รูปที่ 2.5 เทคนิค Dynamic Headspace	15
รูปที่ 2.6 Quadrupole mass analyzer.....	17
รูปที่ 2.7 โครงสร้างเครื่อง GC-MS	17
รูปที่ 3.1 Dynamic Headspace.....	27
รูปที่ 3.2 Gas chromatography – Mass spectrometer.....	29
รูปที่ 4.1 ปฏิกิริยา acid catalyzed hydration ของ α -pinene.....	34
รูปที่ 4.2 Principal component analysis (PCA) ของสารระเหยง่ายในน้ำมะนาวคั้นสด (A) และน้ำมะนาวที่เก็บรักษาที่สภาวะต่างๆ (B).....	39
รูปที่ 4.3 Mean centering ของ β -pinene ในน้ำมะนาวคั้นสด และน้ำมะนาวที่เก็บรักษาที่สภาวะต่างๆ.....	40
รูปที่ 4.4 ตัวแทนโครมาโทแกรมของน้ำมะนาวคั้นสด 4 พันธุ์.....	44
รูปที่ 4.5 จำนวนชนิดของสารระเหยง่ายที่พบในน้ำมะนาวพันธุ์ต่างๆ.....	45
รูปที่ 4.6 เดนโดแกรมของ HCA ของน้ำมะนาวคั้นสด 4 พันธุ์.....	49
รูปที่ 4.7 Principal component analysis (PCA) ของน้ำมะนาวพันธุ์ต่างๆ (A) และสารระเหยง่าย (B).....	51
รูปที่ 4.8 Mean centering ของ β -myrcene (A) caryophyllene (B) β -ocimene (C), α -farnesene (D).....	52
รูปที่ 4.9 Heat map ของสารระเหยง่ายที่มี OAV ≥ 1	55

รูปที่ 4.10 กราฟใยแมงมุมคุณลักษณะด้านกลิ่น (aroma) ของมะนาว 4 พันธุ์.....	57
รูปที่ 4.11 Principal component analysis (PCA) ของน้ำมะนาวพันธุ์ต่างๆ (A) และลักษณะด้านกลิ่นของมะนาว 4 พันธุ์ (B).....	58
รูปที่ 4.12 คะแนนความชอบเฉลี่ยของผู้บริโภค (n=117) น้ำมะนาวคั้นสด 4 พันธุ์.....	59
รูปที่ ข.1 โครมาโทแกรมของน้ำมะนาวคั้นสด (A) และน้ำมะนาวที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 35°C เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง (B) และ 6 ชั่วโมง (C).....	71
รูปที่ ข.2 โครมาโทแกรมของน้ำมะนาวที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง (A), 12 ชั่วโมง (B), และ 24 ชั่วโมง (C).....	72



บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

มะนาวเป็นผลไม้ตระกูลส้มที่ได้รับความนิยมในการบริโภคอย่างแพร่หลาย มะนาวมีความสำคัญเชิงเศรษฐกิจต่อประเทศไทยและเป็นที่นิยมในการบริโภคทั้งในระดับครัวเรือนและระดับอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่มเนื่องจากมีกลิ่นและรสเปรี้ยวที่เป็นเอกลักษณ์ นอกจากนี้ในน้ำมะนาวคั้นสด 100 กรัมโดยน้ำหนักแห้ง ยังมีวิตามินซีสูงถึง 210 มิลลิกรัม ซึ่งมีปริมาณมากกว่าปริมาณวิตามินซีที่สามารถดูดซึมได้ต่อวันและมีสารประกอบฟีนอลซึ่งเป็นทั้งสารต้านอนุมูลอิสระและเป็นสารหลักในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและรา (Kuljarachanan, Devahastin, & Chiewchan, 2009; Mahmud et al., 2009) จากข้อมูลของสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร ปี พ.ศ.2554 ประเทศไทยมีพื้นที่การผลิตมะนาว 96,056 ไร่ ผลผลิตโดยรวม 120,141 ตันต่อปี ซึ่งส่วนใหญ่เป็นการผลิตเพื่อบริโภคภายในประเทศ โดยพันธุ์มะนาวที่นิยมปลูกในประเทศไทยนั้นสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ 1) มะนาวพันธุ์ชะววย ซึ่งออกดอกได้ง่ายตลอดทั้งปี และออกดอกได้หลายรุ่นในฤดูกาลเดียวกัน ได้แก่ พันธุ์แป้นรำไพ แป้นพวง แป้นพิจิตร เป็นต้น 2) มะนาวพันธุ์ธรรมดาหรือพันธุ์ทั่วไป เช่น พันธุ์ตาฮิติหรือมะนาวน้ำหอมทุลเกล้า เป็นมะนาวพันธุ์จากต่างประเทศ ไม่มีเมล็ด ให้ผลโตมาก เปลือกหนา ให้น้ำมาก และต้านทานต่อโรคแคงเกอร์ได้ดี (กองบรรณาธิการเทคโนโลยีชาวบ้าน, 2557)

กลิ่นและรสชาติของมะนาวนั้นแตกต่างกันขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ได้แก่ สภาพแวดล้อม ฤดูกาลเพาะปลูก และพันธุ์ ปัจจุบันมีการศึกษาสารระเหยง่ายให้กลิ่นในน้ำและเปลือกของผลไม้ตระกูลส้มหลายชนิดเช่น เลมอน เกรปฟรุ้ต ส้ม ส้มโอ เป็นต้น และในมะนาวพันธุ์ต่างประเทศหลายพันธุ์ ได้แก่ *Citrus australasica*, *Citrus limon* (L.) Burm และ *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle จากงานวิจัยพบว่า สารระเหยง่ายที่มีปริมาณมากที่สุด คือ limonene และยังพบสารระเหยง่ายอื่นๆ ได้แก่ γ -terpinene, β -pinene และ β -bisabolene ร่วมด้วย (Allegro, Belliardo, & Cabella, 2006; Delort et al., 2015; Rouseff & Perez-Cacho, 2007; Yadav, Chauhan, Rekha, Rao, & Ramteke, 2004) อย่างไรก็ตาม ข้อมูลผลงานวิจัยสารระเหยง่ายให้กลิ่นในมะนาวที่

นิยมปลูกในประเทศไทย ได้แก่ มะนาวพันธุ์แป้นและพันธุ์ตาฮิตินั้นยังไม่มีรายงาน ด้วยเหตุดังกล่าว ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาวิเคราะห์และเปรียบเทียบสารระเหยง่ายและลักษณะเชิงประสาทสัมผัสด้านกลิ่นที่สำคัญของน้ำมะนาวคั้นสด 4 พันธุ์ โดยใช้เทคนิค headspace/gas chromatography–mass spectrometry (HS/GC-MS) ร่วมกับเทคนิคทางเคโมเมตริก

โดยศึกษาและวิเคราะห์สารระเหยง่ายในน้ำมะนาว ด้วยวิธี dynamic headspace หรือ purge and trap (P&T) ซึ่งเป็นวิธีสกัดที่สะดวก รวดเร็ว เหมาะสมกับตัวอย่างที่เป็นผลไม้ (Soria, García-Sarrió, & Sanz, 2015) ร่วมกับการใช้เทคนิค gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) ซึ่งเป็นเทคนิคในการวิเคราะห์สารจากน้ำหนักมวลของสาร และสามารถระบุชนิดของสารได้จากการประมวลผลและเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของแมสสเปกตรัมที่รวบรวมไว้ และศึกษาร่วมกับการประเมินลักษณะทางประสาทสัมผัสเชิงพรรณนา (descriptive analysis) โดยผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝน เพื่อให้ได้ข้อมูลลักษณะกลิ่นเฉพาะ และการทดสอบการยอมรับของผู้บริโภค โดยรวมต่อมะนาวแต่ละพันธุ์ และทำการประมวลผลข้อมูลโดยใช้เคโมเมตริกเพื่อแปลผลข้อมูลและแสดงผล โดยใช้การวิเคราะห์สถิติหลายตัวแปร (Multivariate Statistics) ได้แก่ การวิเคราะห์ผลเชิงสำรวจ (unsupervised pattern recognition) เช่น การวิเคราะห์จัดกลุ่ม (hierarchical cluster analysis; HCA) และ การวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (principal component analysis; PCA) เพื่อจัดกลุ่มความเหมือนและความต่างของตัวอย่าง

สมมุติฐานงานวิจัย

สามารถวิเคราะห์และเปรียบเทียบสารระเหยง่าย และลักษณะเชิงประสาทสัมผัสด้านกลิ่นที่สำคัญของน้ำมะนาว โดยใช้เทคนิค HS/GC-MS ร่วมกับเทคนิคทางเคโมเมตริก รวมทั้งศึกษาสารระเหยง่ายที่มีแนวโน้มเป็นสารระเหยง่ายให้กลิ่น (potential biomarker) ของมะนาวและการยอมรับของผู้บริโภคต่อมะนาวแต่ละพันธุ์ได้

วัตถุประสงค์งานวิจัย

1. วิเคราะห์และเปรียบเทียบชนิดและปริมาณสารระเหยง่ายและลักษณะเชิงประสาทสัมผัสด้านกลิ่นของมะนาวพันธุ์แป้นรำไพ แป้นพวง แป้นพิจิตรและตาฮิติ
2. ศึกษาสารระเหยง่ายที่มีแนวโน้มเป็นสารระเหยง่ายให้กลิ่น (potential biomarker) ของมะนาวพันธุ์แป้นรำไพ แป้นพวง แป้นพิจิตรและตาฮิติ
3. ศึกษาการยอมรับของผู้บริโภคต่อมะนาวพันธุ์แป้นรำไพ แป้นพวง แป้นพิจิตรและตาฮิติ

ขอบเขตงานวิจัย

1. วิเคราะห์และเปรียบเทียบสารระเหยง่ายและลักษณะเชิงประสาทสัมผัสด้านกลิ่นของน้ำมะนาวคั้นสดพันธุ์แป้นรำไพ แป้นพวง แป้นพิจิตร และตาฮิติ โดยวิธี HS/GC-MS และการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสเชิงพรรณนา (descriptive analysis)
2. ศึกษาสารระเหยง่ายที่มีแนวโน้มเป็นสารระเหยง่ายให้กลิ่น (potential biomarker) ของมะนาวพันธุ์แป้นรำไพ แป้นพวง แป้นพิจิตร และตาฮิติโดยใช้เทคนิคทางเคโมเมตริก
3. ศึกษาการยอมรับของผู้บริโภคต่อมะนาวพันธุ์แป้นรำไพ แป้นพวง แป้นพิจิตร และตาฮิติ โดยวิธีการทดสอบการยอมรับของผู้บริโภค (consumer acceptance test)

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

2.1 มะนาว

มะนาวจัดอยู่ในผลไม้ตระกูล (Rutaceae) มีถิ่นกำเนิดจากแถบเอเชียกลางและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยชาวอาหรับได้นำมะนาวจากอินเดียไปเพาะปลูกในปาเลสไตน์ เปอร์เซีย อียิปต์ และยุโรป และในคริสต์ศตวรรษที่ 16 ได้มีการแพร่พันธุ์ไปยังหมู่เกาะอินเดียตะวันตกและอเมริกาโดยนักสำรวจชาวสเปนและโปรตุเกส ในประเทศไทยนั้นการปลูกมะนาวมีมาตั้งแต่ก่อนกรุงรัตนโกสินทร์ โดยนิยมปลูกมะนาวไว้ใช้บริโภคในครัวเรือนในปัจจุบันความต้องการมะนาวนั้นมีเพิ่มขึ้น เนื่องจากความต้องการทั้งเพื่อบริโภคในครัวเรือนและใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม จึงมีการขยายพื้นที่เพาะปลูกมะนาว โดยแหล่งปลูกสำคัญของประเทศไทยในปัจจุบัน ได้แก่ จังหวัดเพชรบุรี, อุดรธานี, ราชบุรี และนครปฐม (นนทรีย์, 2532) จากข้อมูลของสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร ปี พ.ศ.2554 ประเทศไทยมีพื้นที่การผลิตมะนาว 96,056 ไร่ ผลผลิตโดยรวม 120,141 ตันต่อปี ซึ่งส่วนใหญ่เป็นการผลิตเพื่อบริโภคภายในประเทศ (กองบรรณาธิการเทคโนโลยีชาวบ้าน, 2557)

2.1.1 พันธุ์มะนาวในประเทศไทย

ในปัจจุบันพันธุ์มะนาวที่ปลูกในประเทศไทยแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม (กองบรรณาธิการเทคโนโลยีชาวบ้าน, 2557; นนทรีย์, 2532) ได้แก่ **มะนาวพันธุ์ชะววย** มีการออกดอกง่ายตลอดทั้งปีและออกดอกได้หลายรุ่นในฤดูกาลเดียวกัน โดยสามารถกระตุ้นให้ออกดอกนอกฤดูได้ง่าย มะนาวพันธุ์ชะววยส่วนใหญ่คือมะนาวพันธุ์แป้น (*Citrus aurantifolia* (Christm&Panz) Swingle) โดยพันธุ์ที่นิยมปลูกเพื่อบริโภคในประเทศ ได้แก่ พันธุ์แป้นรำไพ, แป้นพวง, และแป้นพิจิตร เป็นต้น (รูปที่ 2.1) **มะนาวพันธุ์ธรรมดาหรือพันธุ์ทั่วไป** เช่น มะนาวน้ำหอม และมะนาวไร่เมล็ด เป็นต้น มะนาวในกลุ่มนี้จะมีผลขนาดใหญ่ กระตุ้นให้ออกดอกยากกว่ามะนาวพันธุ์แป้น และมีจำนวนผลผลิตน้อยกว่า (ตารางที่ 2.1) อย่างไรก็ตาม พันธุ์มะนาวที่พบในประเทศไทยนั้นมีทั้งพันธุ์ดั้งเดิมและพันธุ์ใหม่ที่เกิดจากการกลายพันธุ์ การคัดพันธุ์และตั้งชื่อใหม่ ดังนั้น ปัจจุบันจึงมีพันธุ์มะนาวหลากหลายตามพื้นที่เพาะปลูก

ตารางที่ 2.1 พันธุ์มะนาวที่นิยมเพาะปลูกในประเทศไทย

พันธุ์ชะววย	
แป้นรำไพ (<i>Citrus aurantifolia</i> (Christm&Panz) Swingle)	เป็นมะนาวที่มีผลดก ลูกค่อนข้างใหญ่ เปลือกบาง ติดดอกง่าย หนโรคได้ดีพอสมควร ปลูกในวงบ่อซีเมนต์ได้ดี จุดเด่นคือน้ำมีกลิ่นหอม ให้ปริมาณน้ำมาก เมล็ดน้อย ทรงผลแป้น ติดผลดก เป็นที่ต้องการของตลาด สามารถเก็บผลจำหน่ายหลังติดผลอ่อนราว 3 เดือนครึ่ง ถึง 4 เดือนเท่านั้น แต่มีจุดอ่อนคือไม่ทนต่อโรคแคงเกอร์ (Canker) ซึ่งเป็นโรคที่มีจุดกลมขนาดเท่าหัวเข็มหมุดบนใบ ก้านและผล
แป้นพวง (<i>Citrus aurantifolia</i> (Christm&Panz) Swingle)	เป็นมะนาวที่เจริญเติบโตเร็ว ให้ผลขนาดกลาง มีลักษณะแป้น เปลือกบาง ให้ปริมาณน้ำมาก ผลดกเป็นพวง ให้ลูกตลอดปี
แป้นพิจิตร (<i>Citrus aurantifolia</i> (Christm&Panz) Swingle)	เป็นมะนาวที่คัดเลือกโดยศูนย์วิจัยพืชสวนพิจิตร จังหวัดพิจิตร เป็นลูกผสมพันธุ์ระหว่างมะนาวพันธุ์แป้นกับมะนาวพันธุ์น้ำหอมจนได้พันธุ์ที่มีความต้านทานต่อโรคสูงกว่ามะนาวพันธุ์แป้นและให้ผลผลิตมีคุณภาพดีใกล้เคียงกับมะนาวพันธุ์แป้น รูปทรงผลแป้น น้ำหนักผลประมาณ 95 กรัม และออกผลตลอดทั้งปี
พันธุ์ธรรมดา	
ตาฮิติ (<i>Citrus latifolia</i> Tanaka)	เป็นมะนาวพันธุ์ต่างประเทศที่ไม่มีเมล็ด ให้ผลขนาดใหญ่ เปลือกหนา ให้น้ำมาก เหมาะทั้งการทำน้ำมะนาวพร้อมดื่มและบริโภคผลสด และค่อนข้างทนทานต่อโรคแคงเกอร์

ที่มา : (กองบรรณาธิการเทคโนโลยีชาวบ้าน, 2557; นนทรีย์, 2532)



แป้นพิจิตร

แป้นรำไพ

แป้นพวง

ตาสีดี

รูปที่ 2.1 พันธุ์มะนาวที่นิยมเพาะปลูกในประเทศไทย

2.1.2 การเพาะปลูกมะนาวในประเทศไทย

โดยทั่วไป ต้นมะนาวจะมีความสมบูรณ์และสามารถออกดอกติดผลได้เต็มที่เมื่อมีอายุ 3 ปี โดยสามารถออกดอกติดผลได้ตลอดปี โดยพบว่า เมื่อต้นมะนาวผ่านความแห้งแล้งในช่วงฤดูร้อน ใบมะนาวที่แก่จัดจะเริ่มผลัดใบ เมื่อเข้าสู่ต้นฤดูฝนต้นมะนาวจะได้รับน้ำและปุ๋ย ซึ่งจะกระตุ้นให้ต้นมะนาวแตกกิ่งใหม่และออกดอกได้เองตามธรรมชาติ โดยจะทยอยออกเป็นช่วงๆ ตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์ไปถึงระยะที่ฝนเริ่มตกชุก โดยระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการเก็บเกี่ยวของผลมะนาวหลังจากติดดอกคือ 4-5 เดือน จึงทำให้มีมะนาวออกสู่ตลาดมากในช่วงเดือนกรกฎาคมถึงกันยายน ต้นมะนาวสามารถเจริญเติบโตได้ในทุกภาคของประเทศไทย และปลูกได้ดีในสภาพดินเกือบทุกชนิด แต่ต้องมีการระบายน้ำที่ดี ไม่มีน้ำขัง เพราะจะเป็นสาเหตุให้ต้นมะนาวตายได้ โดยดินที่ปลูกควรมีลักษณะโปร่ง ร่วนซุย มีอินทรีย์วัตถุในดินสูง มีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ประมาณ 5.6-6 (นนทรีย์, 2532)

แหล่งเพาะปลูกเป็นหนึ่งในปัจจัยที่ส่งผลต่อสารระเหยง่ายในน้ำมะนาว โดยแหล่งเพาะปลูกที่แตกต่างกันส่งผลให้สภาพแวดล้อม ภูมิประเทศ ภูมิอากาศ และปริมาณน้ำฝนแตกต่างกัน (Nasser Al-Jabri & Hossain, 2014) ในการทดลอง จึงควรมีเกณฑ์เพื่อลดความแปรปรวนที่เกิดจากแหล่งเพาะปลูก

ค่า generalized monsoon index (GMI) เป็นค่าดัชนีความแห้งแล้งทางด้านการเกษตร ที่แสดงถึงผลกระทบที่เกิดแก่พืชที่กำลังเจริญเติบโต อันมีสาเหตุเนื่องมาจากการ

ขาดแคลนความชื้น ดังนั้นการวิเคราะห์ค่า GMI จึงทำให้สามารถทราบสภาวะโดยทั่วไปของพืชใช้น้ำฝนที่ปลูกในฤดูมรสุม โดย GMI จะมีค่าขึ้นอยู่กับปริมาณฝนรายเดือนในระหว่างช่วงฤดูมรสุมนั้นๆ

ค่า GMI ดังกล่าวคำนวณได้จาก

$$GMI = 0.125 P_6 + 0.125 P_7 + 0.5 P_8 + 0.25 P_9$$

โดย P_i : ฝนรายเดือน (มิลลิเมตร) ของเดือนที่ i (เช่น P_6 หมายถึง ฝนของเดือนมิถุนายน)

ค่า GMI ในแต่ละเดือนคำนวณจากสมการดังกล่าว และสะสมทุกสิ้นเดือนที่ทำการประเมิน ดังนี้

1. สิ้นเดือนมิถุนายน $GMI_6 = 0.125 P_6$
2. สิ้นเดือนกรกฎาคม $GMI_7 = 0.125 P_6 + 0.125 P_7$
3. สิ้นเดือนสิงหาคม $GMI_8 = 0.125 P_6 + 0.125 P_7 + 0.5 P_8$
4. สิ้นเดือนกันยายน $GMI_9 = 0.125 P_6 + 0.125 P_7 + 0.5 P_8 + 0.25 P_9$

ค่า GMI ที่คำนวณได้จะมีหน่วยเป็นมิลลิเมตร อย่างไรก็ตามค่า GMI นี้สามารถทำให้อยู่ในรูปอื่นได้เช่น ร้อยละของค่า GMI ปกติ เปอร์เซ็นไทล์ของลำดับที่ของ GMI เป็นต้น และเพื่อความสะดวกในการกำหนดเกณฑ์มาตรฐานที่ใช้ในการพิจารณาสภาวะของพืช GMI จะอยู่ในรูปของ percentile rank ซึ่งมีค่าระหว่าง 0 - 100 วิธีการหาค่า percentile rank ของ GMI นั้นหาได้โดยการนำค่าอนุกรมเวลาของ GMI ของแต่ละบริเวณมาเรียงลำดับจากน้อยไปหามากและคำนวณค่า percentile rank ของ GMI จาก

$$GMI_{pct} = (r \times 100)/(n + 1)$$

โดย GMI_{pct} คือ percentile rank ของ GMI

r คือ ลำดับที่ของค่าข้อมูลดิบ GMI ของปีนั้น ๆ

n คือ จำนวนปีของข้อมูลของแต่ละสถานี

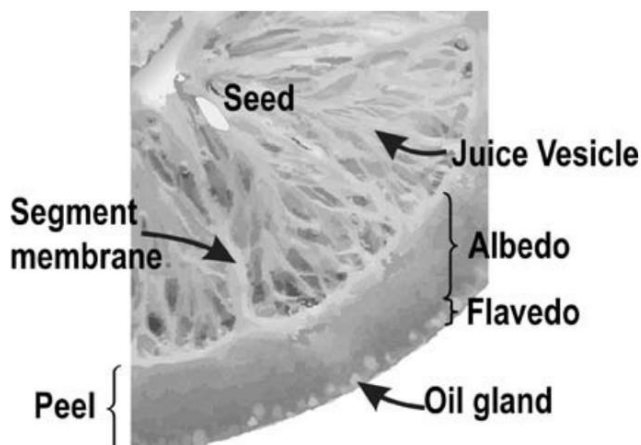
เกณฑ์ GMI_{pct} ที่ใช้พิจารณาสภาวะของพืช มีดังนี้คือ

เกณฑ์ GMI_{pct}	สภาวะของพืช
0 - 20	แล้งจัด
21 - 30	แล้ง
31 - 40	ค่อนข้างแล้ง
41 - 60	ปกติ
61 - 90	ความชื้นสูงกว่าปกติ
91 - 100	ความชื้นเกินความต้องการ

เกณฑ์ดังกล่าวนี้เป็นเพียงเกณฑ์พื้นฐานในการพิจารณาสภาวะของพืช ส่วนรายละเอียดหรือข้อมูลอื่น ๆ ที่จะเป็นประโยชน์ต่อการประเมิน เช่น การกระจายของฝน (ฝนราย 10 วัน ฯลฯ) ปฏิทินการเพาะปลูกพืชในแต่ละท้องถิ่น เป็นต้น สามารถจะนำมาใช้ประกอบการพิจารณาด้วย (Meteorological department, 2015)

2.1.3 สัณฐานวิทยาของผลไม้ตระกูลส้ม

มะนาว จัดเป็นผลไม้ประเภทเฮสเพอริเดียม (hesperidium) หรือผลไม้ที่เปลือกนอกมีลักษณะเหนียวและมีกลิ่นหอม ส่วนด้านในมีถุงน้ำแยกเป็นส่วนๆ อยู่ในกลุ่มผลเดี่ยว (simple fruit) สามารถแบ่งโครงสร้างได้เป็น 2 ส่วน (รูปที่ 2.2) ได้แก่ (Rouseff & Perez-Cacho, 2007) **เอกโซคาร์ป** (exocarp) หรือเปลือก ซึ่งประกอบด้วยชั้นฟลาวิโด (Flavedo) หรือชั้นเปลือกส่วนนอกสุด มีลักษณะค่อนข้างแข็งและเหนียว เป็นบริเวณที่พบสารสี (pigment) มีต่อมน้ำมันมากโดยพบต่อมน้ำมัน 8,000 ถึง 12,000 ต่อผลในผลไม้ตระกูลส้ม ระยะบริบูรณ์ (maturity) และชั้นอัลบิโด (Albedo) ซึ่งเป็นส่วนของชั้นเปลือกด้านในอยู่บริเวณใต้ชั้นฟลาวิโดมีลักษณะคล้ายฟองน้ำสีขาวและเป็นบริเวณที่ไม่พบต่อมน้ำมัน **เอนโดคาร์ป** (endocarp) เป็นส่วนของเนื้อผลไม้ที่อยู่ภายในซึ่งเป็นส่วนที่ใช้รับประทานได้ โดยแบ่งเป็นสัดส่วนรูปร่างคล้ายลิ้มภายในบรรจุถุงน้ำขนาดเล็กจำนวนมากมีองค์ประกอบหลัก ได้แก่ น้ำ, น้ำตาล, เพกติน, ไขมัน, เทอร์พีน, กรดอะมิโน, สารประกอบฟีนอล, แคโรทีนอยด์ และแร่ธาตุ

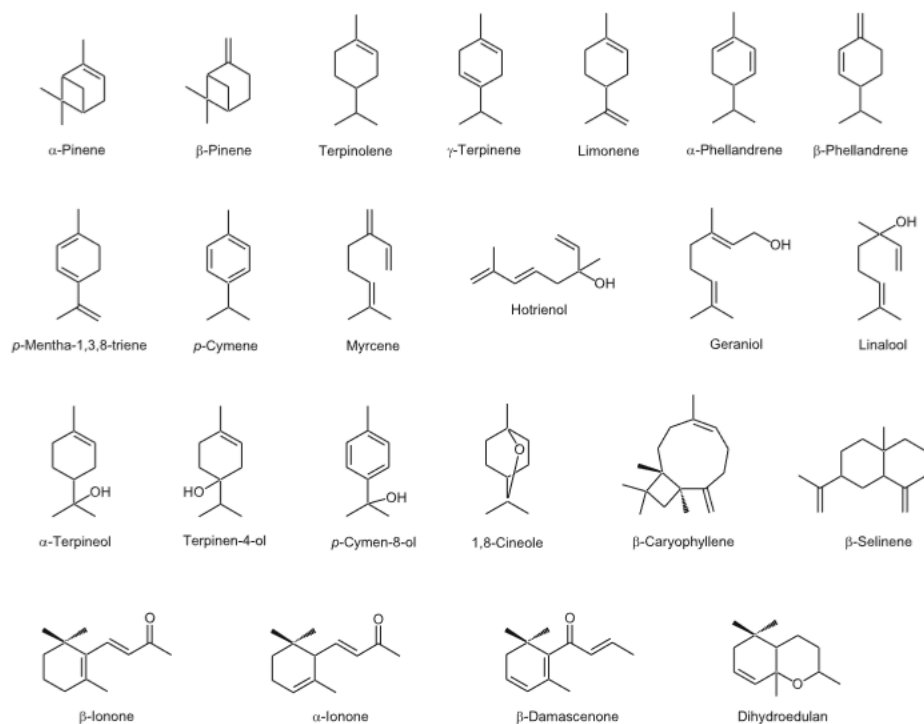


รูปที่ 2.2 ภาพตัดตามขวางของผลไม้ตระกูลส้ม

(Rouseff & Perez-Cacho, 2007)

2.1.4 สารระเหยง่ายให้กลิ่นในผลไม้ตระกูลส้ม

กลิ่นที่เป็นเอกลักษณ์ในผลไม้ตระกูลส้มเกิดจากสารระเหยง่ายหลายชนิดที่อยู่ภายในต่อมน้ำมัน (oil gland) และภายในถุงสำหรับบรรจุน้ำ (juice sac) ซึ่งสารเหล่านี้ให้กลิ่นที่เป็นเอกลักษณ์แก่ผลไม้ตระกูลส้ม เช่น กลิ่นดอกไม้ (floral), กลิ่นผลไม้ (fruity), กลิ่นผลไม้ตระกูลส้ม (citrus), กลิ่นเขียว (green), กลิ่นไขมัน (fatty), กลิ่นโลหะ (metallic), กลิ่นสมุนไพร (herbal), และกลิ่นเห็ด (mushroom) เป็นต้น (Danuta & Anna, 2011) โดยสารระเหยง่ายนี้มีองค์ประกอบหลักคือ คาร์บอน (carbon), ไฮโดรเจน (hydrogen) และออกซิเจน (oxygen) โดยสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ **กลุ่มสารไฮโดรคาร์บอน (Hydrocarbon)** ส่วนใหญ่เป็นกลุ่มเทอร์พีน (terpenes) ได้แก่ monoterpenes (คาร์บอน 10 อะตอม) sesquiterpenes (คาร์บอน 15 อะตอม) (รูปที่ 2.3), และ diterpene (คาร์บอน 20 อะตอม) หรือสารระเหยง่ายบางตัวอาจมีซิลเฟอร์หรือไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ และ**กลุ่มสารประกอบที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ (oxygenated compounds)** สารประกอบกลุ่มนี้เกิดการเปลี่ยนแปลงมาจากสารประกอบกลุ่มเทอร์พีนภายหลังผ่านปฏิกิริยา acid catalyzed hydration เมื่อถูกกระตุ้นด้วยอากาศและแสงภายใต้สภาวะกรด (pH<6) และมีน้ำเป็นองค์ประกอบ (Clark Jr & Chamblee, 1992; Petersen, Tønder, & Poll, 1998)



รูปที่ 2.3 ตัวอย่างสารระเหยง่ายให้กลิ่นกลุ่ม terpene ที่พบในผักและผลไม้

(Christensen, Edelenbos, & Kreutzmann, 2007)

จากผลการศึกษาวิจัยสารระเหยง่ายให้กลิ่นในผลไม้ตระกูลส้มหลายพันธุ์พบว่า สารระเหยง่ายส่วนใหญ่คือสารกลุ่มเทอร์พีน ซึ่งเป็นสารประกอบในกลุ่มไขมันที่เป็นส่วนประกอบหลักในน้ำมันหอมระเหย (essential oil) ของผลไม้ตระกูลส้ม จากการศึกษาสารระเหยง่ายจากเปลือกเลมอนจากการสกัดโดยวิธีบีบเย็น (cold pressing) สามารถสกัดสารระเหยง่ายได้ 0.4-4% โดยมวลน้ำหนักเปียก สารระเหยง่ายที่พบมากที่สุด คือ limonene (60-90%), รองลงมาคือ α, β -pinene (<12%), γ -terpinene (<9%) และ citral (geraniol และ neral (<3%)) ซึ่งเป็นสารไฮโดรคาร์บอนกลุ่ม monoterpene ส่วนสารระเหยง่ายจากน้ำมันหอมระเหยที่ใบและกิ่งมะนาวสกัดได้เพียง 0.16-0.23% โดยสารระเหยง่ายที่พบในใบและกิ่งมะนาวนี้ คือ limonene (30%), citral (25%), และ neryl acetate (4%) (Danuta & Anna, 2011) สารระเหยง่ายให้กลิ่นในน้ำมันมะนาวนั้นสารที่พบมากที่สุดคือ limonene รองลงมาคือ γ -terpinene, α -pinene, terpinolene และ α -myrcene ตามลำดับ (Akakabe, Sakamoto, Ikeda, & Tanaka, 2008; Allegrone et al., 2006) อย่างไรก็ตาม

จำนวนชนิดของสารระเหยง่ายที่พบนั้นยังขึ้นกับสภาวะแวดล้อมและปฏิกิริยาอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง เช่น limonene สามารถเกิดออกซิเดชันได้ง่ายในอากาศ ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์เป็น carveol, carvone, และ limonene oxide ได้ (Karlberg, Magnusson, & Nilsson, 1992) อีกทั้ง limonene ยังสามารถทำปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชัน (dehydrogenation) ภายใต้ภาวะที่มีซิลเฟอร์ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์เป็น p-cymene (Rouseff & Perez-Cacho, 2007; Weitkamp, 1959) นอกจากนี้ α -pinene และ limonene ยังอาจเกิดปฏิกิริยา Markovnikov addition กับ trifluoroacetic acid (formic acid) และเกิดปฏิกิริยา ไฮโดรไลซิส (hydrolysis) กับ acetate ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็น terpineol ได้อีกด้วย (Yuasa & Yuasa, 2006)

2.1.5 ปัจจัยที่ส่งผลต่อสารระเหยง่ายที่วิเคราะห์ได้ในน้ำผลไม้ตระกูลส้ม

2.1.5.1 แหล่งเพาะปลูก

จากการศึกษาวิจัยสารระเหยง่ายในเลมอนพันธุ์ *Citrus limon* Burm จากประเทศ ตุรกีและอินเดียซึ่ง พบว่าสารระเหยง่ายซึ่งสกัดด้วยวิธีกลั่นด้วยไอน้ำโดยให้ความร้อน 100°C เป็นเวลา 5 ชั่วโมง และกำจัดน้ำด้วยโซเดียมซัลเฟต (sodium sulfate) จากนั้น วิเคราะห์ด้วย GC-MS โดยใช้ คอลัมน์ชนิด Rtx-5 (ความยาว 30 เมตร x เส้นผ่านศูนย์กลาง ภายใน 0.25 มิลลิเมตร x ความหนาของฟิล์ม 0.25 ไมโครเมตร) และใช้แก๊สฮีเลียมเป็นแก๊ส-ตัวพา พบสารระเหยง่ายในเลมอนต่างแหล่งเพาะปลูก 22 ชนิด ซึ่งแม้จะพบสารระเหยง่าย ชนิดเดียวกัน แต่ปริมาณสารระเหยง่ายแตกต่างกัน สารระเหยง่ายที่มีปริมาณมากของเลมอน จากตุรกี ได้แก่ DL-limonene 78.93%, β -pinene 5.08%, L- α -terpineol 4.62%, β -myrcene 1.75%, α -pinene 1.47% และ β -linalool 0.95% ในขณะที่สารระเหยง่าย ที่มีปริมาณมากของเลมอนอินเดีย ได้แก่ DL-limonene 53.57%, L- α -terpineol 15.15%, β -pinene 7.44%, α -terpinolene 4.33%, terpinen-4-ol 3.55%, cymene 2.88% และ geranial 2.38% ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปริมาณของสารระเหยง่ายในเลมอนนั้นขึ้นอยู่กับ แหล่งเพาะปลูก ซึ่งรวมถึงภูมิประเทศที่เพาะปลูกและสภาพแวดล้อม ได้แก่ อุณหภูมิ, ปริมาณน้ำฝน, ปริมาณแสงแดดที่ได้รับ เป็นต้น (Nasser Al-Jabri & Hossain, 2014)

2.1.5.2 พันธุ์ (cultivar)

จากการศึกษาองค์ประกอบของสารระเหยง่ายในน้ำเลมอน 4 พันธุ์ ได้แก่ ‘Verdello Siracusano’, ‘Interdonato’, ‘Primo Fiore Capo d’Oriando’, และ ‘Femminello Siracusano’ โดยใช้การสกัดสารระเหยง่ายด้วยวิธี HS-SPME/GC-MS โดยใช้ไฟเบอร์ชนิด divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) ที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 30 นาที เติมเกลือ NaCl 24% บ่มที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นดูดซับสารในช่องว่างเหนือตัวอย่างด้วย SPME ไฟเบอร์ เป็นระยะเวลา 30 นาที และวิเคราะห์สารระเหยง่ายที่ดูดซับได้ด้วย gas chromatography-flame ionization detector (GC-FID) แบบ splitless mode ด้วยคอลัมน์ 2 ชนิด ได้แก่ DB-1 และ DB-1701 โดยใช้แก๊สฮีเลียมเป็นแก๊สตัวพา จากการวิเคราะห์พบว่า สารระเหยง่ายทั้งหมดมีปริมาณ 35 ชนิด โดยมี monoterpene hydrocarbons 10 ชนิด sesquiterpene hydrocarbons 4 ชนิด monoterpene alcohols 7 ชนิด aldehydes 7 ชนิด esters 5 ชนิด และสารกลุ่มอื่น 2 ชนิด จึงได้ว่า สารระเหยง่ายส่วนใหญ่ในมะนาวทุกพันธุ์ ประกอบด้วย monoterpene hydrocarbons และ sesquiterpene hydrocarbons ตามลำดับ โดย ‘Verdello Siracusano’ มีปริมาณสารระเหยง่ายเหล่านี้สูงสุด โดยมี monoterpene hydrocarbons 45.294 ppm และมี sesquiterpene hydrocarbons 2.594 ppm ในขณะที่พันธุ์อื่นๆ มีปริมาณ monoterpene hydrocarbons 1.853 – 6.544 ppm และ sesquiterpene hydrocarbons 0.017 – 2.594 ppm สารระเหยง่ายที่มีปริมาณมากที่สุดในทุกพันธุ์ คือ limonene โดยพบใน ‘Verdello Siracusano’ 34.597 ppm, ‘Interdonato’ 5.449 ppm, ‘Primo Fiore Capo d’Oriando’ 3.839 ppm, และ ‘Femminello Siracusano’ 1.421 ppm จากการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (principal component analysis: PCA) พบว่า ‘Verdello Siracusano’ มีความแตกต่างจากพันธุ์อื่น โดยมีปริมาณ limonene สูงที่สุด (Allegrone et al., 2006)

จากการศึกษาองค์ประกอบของสารระเหยง่ายในน้ำของส้มแมนดาริน, ส้มคลีเมนทีน และส้มลูกผสม 65 พันธุ์ โดยใช้วิธี headspace-solid phase microextraction /gas chromatography (HS-SPME/GC-MS) ด้วย DVB/CAR/PDMS กำหนดขนาดตัวอย่างต่อพื้นที่เหนือตัวอย่างในอัตราส่วน 1:1 ที่อุณหภูมิ 40°C เป็น 120 นาที และวิเคราะห์สาร-

ระเหยง่ายที่ดูดซับได้ด้วย GC-FID แบบ splitless mode ด้วยคอลัมน์ 2 ชนิด ได้แก่ Rtx-1 และ Rtx-wax ที่อุณหภูมิ 60°C จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิในอัตรา 2°C/นาที จนถึง 230°C ควบคุมอุณหภูมิไว้ 35 นาที โดยใช้แก๊สฮีเลียมเป็นแก๊สตัวพา วิเคราะห์ร่วมกับ GC-MS แบบ splitless mode ด้วยคอลัมน์ 2 ชนิด ได้แก่ Rtx-1 และ Rtx-wax ที่อุณหภูมิ 60°C จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิในอัตรา 2°C/นาที จนถึง 230°C ควบคุมอุณหภูมิไว้ 35 นาที โดยใช้แก๊สฮีเลียมเป็นแก๊สตัวพา พบว่า สามารถวิเคราะห์สารระเหยง่ายได้ 44 ชนิด และสามารถแบ่งกลุ่มสัมพันธ์ตามความคล้ายของสารระเหยง่ายในน้ำส้ม ได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ 1) สารระเหยง่ายจากกลุ่มสัมพันธ์แมนดาริน มีปริมาณ 48% ของตัวอย่างทั้งหมด โดยพบ limonene 52.8-81.3% และ γ -terpinene 11.2-36.7% ของสารระเหยง่ายสำคัญทั้งหมด นอกจากนี้ยังพบ methyl-N-methylantranilate, thymol, β -pinene, γ -terpinene และ α -sinensal ซึ่งเป็นสารระเหยง่ายให้กลิ่นสำคัญในสัมพันธ์แมนดารินอีกด้วย 2) สารระเหยง่ายจากกลุ่มสัมพันธ์แมนทีนมีปริมาณ 45% ของตัวอย่างทั้งหมด โดยพบ limonene ประมาณ 90% และ γ -terpinene น้อยกว่า 1.2% 3) สารระเหยง่ายจากกลุ่มอื่นๆ มีปริมาณ 7% ของตัวอย่างทั้งหมด ซึ่งมีปริมาณ p-cymene (0.8-3.3%) และ terpinen-4-ol (0.3-3.0%) สูงกว่ากลุ่มอื่นๆ (Barboni et al., 2009)

2.1.5.3 อุณหภูมิและระยะเวลาการเก็บรักษา

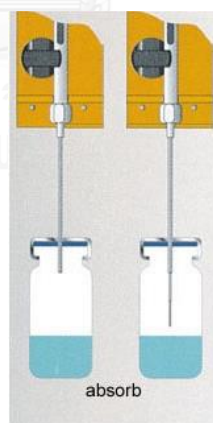
จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารระเหยง่ายในน้ำส้มทางการค้า พบว่า การเก็บรักษาน้ำส้มที่อุณหภูมิ 5°C ช่วยลดการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารระเหยง่ายและลักษณะทางประสาทสัมผัสเมื่อเปรียบเทียบกับที่เก็บที่อุณหภูมิห้อง เช่น น้ำส้มที่เก็บที่ 5°C เป็นระยะเวลา 4 เดือน ได้รับคะแนนการยอมรับจากผู้บริโภคในระดับดี ส่วนน้ำส้มที่เก็บที่ 25°C เป็นระยะเวลา 40 วัน ไม่ได้รับการยอมรับจากผู้บริโภค นอกจากนี้ น้ำส้มที่เก็บที่ 40°C และ 50°C เป็นระยะเวลา 5 วัน มีกลิ่น oxidized เพิ่มขึ้นและกลิ่น citrus ลดลง เนื่องจากเกิดการแตกตัวของ limonene ได้เป็นสารประกอบออกซิเจน ซึ่งเกิดได้ดีที่อุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิห้อง (Petersen et al., 1998) กล่าวได้ว่า อุณหภูมิและระยะเวลาในการเก็บรักษาผลไม้ตระกูลส้มนั้นส่งผลต่อเปลี่ยนแปลงปริมาณของสารระเหยง่ายและการยอมรับของผู้บริโภคอีกด้วย

2.2 การวิเคราะห์สารระเหยง่าย

2.2.1 การสกัดสารระเหยง่าย

2.2.1.1 Headspace-Solid Phase Microextraction (HS-SPME)

การสกัดสารระเหยง่ายด้วยวิธี HS-SPME นิยมใช้ร่วมกับ GC-MS เพื่อหา ลักษณะเฉพาะของสารระเหยง่ายในตัวอย่างอาหาร โดยข้อดีการสกัดสารระเหยง่ายด้วย HS-SPME คือ ราคาไม่แพง เป็นเทคนิคที่ไม่ใช้ตัวทำละลาย ไม่ใช้อุณหภูมิสูง ใช้เพียง ไฟเบอร์ที่ถูกเคลือบด้วยสารที่มีความสามารถในการดูดซับสารระเหยง่ายจากบริเวณ ช่องว่างเหนือตัวอย่าง (headspace) หรืออาจดูดซับสารระเหยง่ายจากชั้นของเหลว (liquid phase) ได้เช่นกัน การสกัดสารระเหยง่ายด้วยวิธีนี้ต้องคำนึงถึงไฟเบอร์ที่ใช้ใน การดูดซับ (ชนิดของไฟเบอร์, ความหนา, และความยาว) (Pripdeevech, 2011), สภาพที่ใช้ในการดูดซับ (ระยะเวลาและอุณหภูมิ) , และการเติมสารอื่นลงในตัวอย่างอีก ด้วย เช่น การเติมเกลือเพื่อลดการเปลี่ยนแปลงด้วยเอนไซม์ของของน้ำผลไม้ (Barboni et al., 2009; Cajka & Hajslova, 2011) ซึ่งปัจจัยเหล่านี้ส่งผลโดยตรงต่อการวิเคราะห์ องค์ประกอบและปริมาณของสารระเหยง่ายในตัวอย่างที่สนใจ

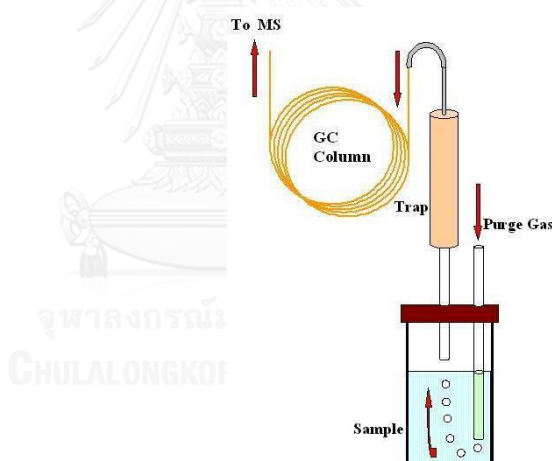


รูปที่ 2.4 เทคนิค HS-SPME

(ที่มา: <https://www.ssi.shimadzu.com>)

2.2.1.2 Dynamic Headspace extraction (DHE) หรือ purge and trap

การสกัดสารระเหยง่ายด้วยวิธี DHE เป็นวิธีวิเคราะห์สำหรับตัวอย่างชนิดของเหลวหรือของแข็ง โดยการผ่านแก๊สเฉื่อยเข้าไปในตัวอย่างเพื่อดึงสารระเหยง่ายออกจากตัวอย่างแล้วดูดซับสารระเหยง่ายดังกล่าวด้วยตัวดูดซับ (absorbent) จากนั้นนำไปวิเคราะห์ร่วมกับ GC-MS โดยแก๊สเฉื่อยที่นิยมใช้ได้แก่ แก๊สฮีเลียม และแก๊สไนโตรเจน ตัวดูดซับที่ใช้มีหลายชนิด เช่น Porapak, Chromosorbs หรือ Tenax series (พอลิเมอร์ของ 2,6-diphenyl-p-phenyleneoxide) โดย Tenax series เหมาะสมกับการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีแอลกอฮอล์ เช่น ไวน์ เป็นต้น โดยทั่วไปวิธี DHE นิยมใช้สำหรับตัวอย่างประเภทผลไม้, น้ำผลไม้ และเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ (Roberto, García, Hevia, & Valles, 2005)



รูปที่ 2.5 เทคนิค Dynamic Headspace
(ที่มา: <http://departments.agri.huji.ac.il>)

2.2.2 การวิเคราะห์สารระเหยง่ายด้วย GC-MS

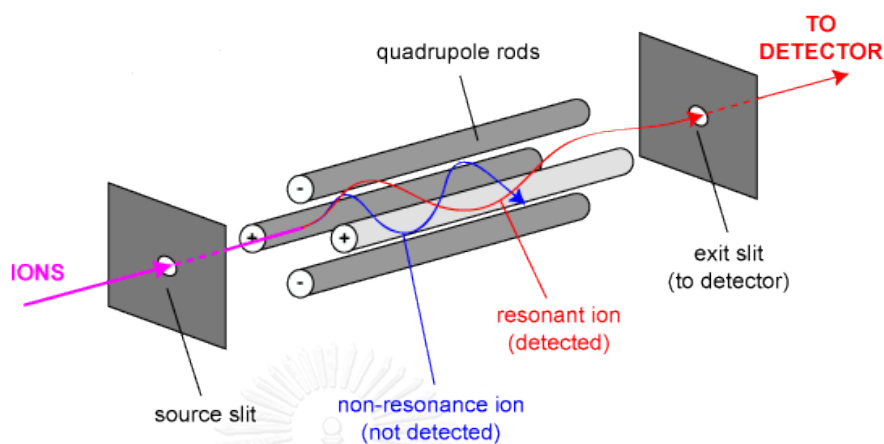
เทคนิคการวิเคราะห์โดยใช้ headspace มักใช้ร่วมกับการวิเคราะห์ด้วย GC-MS ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถวิเคราะห์ได้ทั้งทางคุณภาพและปริมาณเนื่องจากเป็นเครื่องมือที่มีความละเอียดสูง มีความถูกต้องและแม่นยำในการวิเคราะห์สารระเหยง่ายโดย GC-MS สามารถแบ่งออกเป็น 3 ส่วน (Hajšlová & Čajka, 2007) คือ

1) **Injector** เป็นบริเวณที่นำตัวอย่างเข้าสู่เครื่อง GC โดยทั่วไป ใช้อุณหภูมิเริ่มต้นสูงกว่าอุณหภูมิห้องเพื่อปล่อยสารระเหยง่ายออกจากตัวดูดซับ (desorption) โดย 3 รูปแบบ ได้แก่ split/splitless mode คือการกำหนดอัตราส่วนในการทิ้งตัวอย่างและตัวทำละลาย, on-column คือการใส่ตัวอย่างทั้งหมดลงใน column ทำให้ไม่เกิดการสูญเสียสารระเหยง่าย ในขณะที่วิเคราะห์และ programmable-temperature vaporizer (PTV) คือการตั้งโปรแกรมอุณหภูมิหลังจากใส่ตัวอย่างในเครื่อง GC เพื่อป้องกันการระเหยในขณะฉีด

2) **GC-Column** เป็นส่วนที่มีการแยกองค์ประกอบสารระเหยง่ายแต่ละตัวออกจากกัน ซึ่งสารที่ต่างชนิดกันมีความสามารถในการกระจายตัวที่แตกต่างกันระหว่างวัฏภาค ได้แก่ วัฏภาคคงที่ (stationary phase) และ วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) (แก๊สเฉื่อย เช่น แก๊สฮีเลียม แก๊สอาร์กอน และแก๊สไนโตรเจน) โดยสารระเหยง่ายที่แยกได้นั้นขึ้นอยู่กับชนิดของคอลัมน์ที่ใช้ เช่น DB-5 column มีความเป็นขั้วต่ำ เนื่องจากประกอบด้วย phenyl 5% ส่วน dimethyl arylene siloxane 95% ดังนั้น สารระเหยง่ายที่เคลื่อนที่เร็วจึงเป็นกลุ่มที่มีความเป็นขั้วสูง ในขณะที่สารระเหยง่ายกลุ่มที่เคลื่อนที่ช้าเป็นสารระเหยง่ายกลุ่มที่มีความเป็นขั้วต่ำ

3) **Detector** เมื่อสารระเหยง่ายเคลื่อนที่มายัง detector ซึ่งทำหน้าที่รับและแปลงข้อมูลเป็นรูปแบบสัญญาณไฟฟ้าและรายงานผลเป็นชนิดและปริมาณไอออนที่ตรวจจับได้ของสารระเหยง่ายนั้นๆ เมื่อสารระเหยง่ายออกจาก GC-Column เข้าสู่ detector จะเข้าสู่ส่วนผลิตไอออน โดยเปลี่ยนสารระเหยง่ายให้เป็นไอออน วิธีที่เป็นที่นิยมคือ **electron ionization (EI)** โมเลกุลของสารเชิงเดี่ยวเมื่อได้รับพลังงานจากลำแสงอิเล็กตรอนที่มีพลังงานสูงถึง 70 อิเล็กตรอนโวลต์ จะเกิดการแตกตัวอยู่ในรูปประจุ เรียกว่า “molecular ion, M^+ หรือ M ” โดยรูปแบบการแตกตัวของแต่ละโมเลกุลมีลักษณะเฉพาะ เรียกว่า “mass spectrum” โดยจะแสดงการแตกตัวในรูป mass-to-charge ratio (m/z) หลังจากนั้น ไอออนของสารระเหยง่ายจะเข้าสู่**ส่วนวิเคราะห์มวล (mass analyzer)** โดยมีหลายประเภท เช่น quadrupole mass analyzer (รูปที่ 2.6) ประกอบด้วยแท่งโลหะ 4 แท่งซึ่งมีขั้วกระแสไฟฟ้าต่างกัน สามารถวิเคราะห์มวลได้โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า นอกจากนี้ quadrupole สามารถวิเคราะห์ได้ 2 แบบ ได้แก่ 1) full scan โดยใช้สำหรับช่วง m/z ประมาณ 50-500 และ 2) selected ion monitoring (SIM mode) ซึ่งมีความไวต่อการ

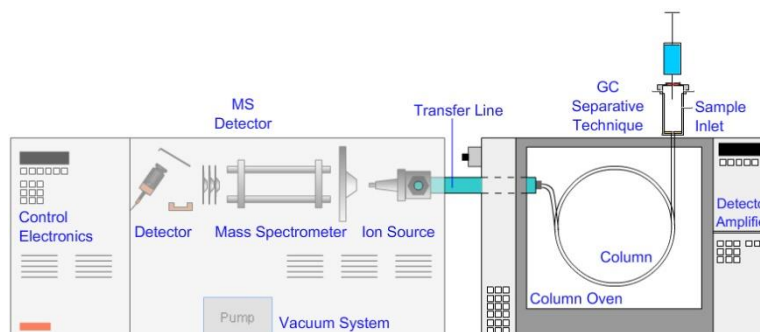
วิเคราะห์ช่วง m/z น้อยๆ จากนั้น ไอออนจะเข้าสู่ **detector** ซึ่งทำหน้าที่ขยายและตรวจวัดสัญญาณเพื่อวิเคราะห์ปริมาณไอออน (Hajšlová & Čajka, 2007)



รูปที่ 2.6 Quadrupole mass analyzer

(ที่มา: <http://www.bris.ac.uk/nerclsmsf/techniques/gcms.html>)

ในการหาปริมาณสารระเหยง่าย สามารถทำได้หลายวิธี เช่น internal standardization โดยการเติมสารมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นลงไปในตัวอย่างก่อนทำการสกัด โดยสารที่จะใช้เป็น internal standard ต้องมีลักษณะคุณสมบัติคล้ายกับสารที่จะวิเคราะห์, ถูกชะออกจากคอลัมน์ทั้งหมด, ให้พีคที่แยกพีคของสารระเหยง่ายของตัวอย่างไม่ซ้ำหรือเหลื่อมทับกัน, และต้องไม่ทำปฏิกิริยากับสารอื่นๆ ในตัวอย่าง สารมาตรฐานนั้นจะถูกวิเคราะห์พร้อมกับสารระเหยง่ายในตัวอย่าง และปรากฏเป็นพีคในโครมาโทแกรม จากนั้นจึงคำนวณความเข้มข้นของสารระเหยง่ายอื่นๆ จากพื้นที่ใต้กราฟ



รูปที่ 2.7 โครงสร้างเครื่อง GC-MS

(ที่มา: www.chromacademy.com)

2.3 Odor Activity value (OAV)

Odor Activity value คือค่าที่บ่งบอกสารระเหยที่มีแนวโน้มเป็นสารให้กลิ่นสำคัญสามารถคำนวณได้จากอัตราส่วนระหว่างความเข้มข้นของสารระเหยง่ายกับ odor detection threshold สารระเหยง่ายที่มีค่า OAV ≥ 1 จะเป็นสารระเหยง่ายให้กลิ่นในตัวอย่างนั้นๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งหากสารระเหยง่ายมีค่า OAV สูงมาก กล่าวได้ว่าเป็นสารระเหยง่ายให้กลิ่นสำคัญ ซึ่งมีผลต่อลักษณะกลิ่นโดยรวมของตัวอย่าง โดยค่า odor detection threshold ของสารระเหยง่ายในอากาศ, ในน้ำ, ในน้ำมัน, ในน้ำส้ม หรือในแป้ง มีความแตกต่างกัน เนื่องจากโมเลกุลของสารระเหยง่ายจับกับเมทริกซ์ของตัวอย่างอาหาร โดยไขมัน โปรตีน และคาร์โบไฮเดรตจะมีอัตราการปลดปล่อยสารระเหยง่ายได้ต่างกันขึ้นกับ ความไม่ชอบน้ำของสารระเหยง่าย (hydrophobicity), อัตราการแพร่ (diffusion), สัมประสิทธิ์การแบ่งส่วน (partition coefficient), และคุณสมบัติด้านการไหลของเหลว (rheological properties) (Plotto, Margaría, Goodner, Goodrich, & Baldwin, 2004) ดังนั้น การคำนวณค่า OAV จึงต้องเลือกเมทริกซ์ที่เหมาะสม เพื่อให้ได้ผลที่ถูกต้องและแม่นยำ อย่างไรก็ตาม ค่า odor threshold ของแต่ละบุคคลนั้นมีความแตกต่างกันตามประสบการณ์และความสามารถในการรับรู้และจดจำกลิ่นของแต่ละบุคคล ดังนั้น การเลือกค่า odor threshold เพื่อคำนวณ ควรเลือกค่า odor threshold ที่ผู้ทดสอบที่มีประสบการณ์หรือได้รับการฝึกฝนสามารถทดสอบกลิ่นนั้นๆ ได้ (Averbeck & Schieberle, 2009)

$$\text{Odor Activity Value (OAV)} = \frac{\text{Concentration of compounds}}{\text{Odor detection threshold}}$$

2.4 การทดสอบทางด้านประสาทสัมผัส

การวิเคราะห์เชิงประสาทสัมผัสนั้นประกอบไปด้วยเทคนิคทางวิทยาศาสตร์ต่างๆที่ใช้ในการกระตุ้น ตรวจวัดการตอบสนองเชิงประสาทสัมผัสของมนุษย์ รวมไปถึงการวิเคราะห์ทางสถิติและการแปลผล โดยผลที่ได้จะสามารถสะท้อนลักษณะของตัวอย่างที่สนใจได้ การวิเคราะห์เชิงประสาทสัมผัสนี้ใช้การตอบสนองของมนุษย์ผ่านการมองเห็น การได้กลิ่น การสัมผัส การรับรู้รสชาติ และการได้ยิน (Stone & Sidel, 2004)

2.4.1 การวิเคราะห์หาลักษณะทางประสาทสัมผัสเชิงพรรณนา (descriptive analysis)

เป็นการทดสอบที่ได้รับความนิยมอย่างมากเป็นอันดับต้นๆในวิธีการวิเคราะห์เชิงประสาทสัมผัสทั้งหมด โดยเป็นการทดสอบที่มุ่งเน้นเพื่อประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์หรือตัวอย่างนั้นๆ โดยสามารถแยกแยะลักษณะทางประสาทสัมผัสที่มีความสำคัญในผลิตภัณฑ์ที่สนใจ และแสดงระดับความเข้มของลักษณะทางประสาทสัมผัสดังกล่าว ว่ามีมากน้อยเพียงใดในผลิตภัณฑ์อีกด้วย ผู้ทดสอบสำหรับการประเมินคุณภาพเชิงประสาทสัมผัสนี้เป็นผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝนจำนวนระหว่าง 8 ถึง 12 คน โดยฝึกฝนการให้คะแนนลักษณะต่างๆของผลิตภัณฑ์ตามความหมายที่เข้าใจตรงกันในกลุ่มผู้ทดสอบเป็นอย่างดี อาจมีการเปรียบเทียบกับตัวอย่างอ้างอิงร่วมด้วย รวมไปถึงการนำอภิปรายและสรุปความเห็นของกลุ่มผู้ทดสอบ โดยผู้ทดสอบจะได้รับการฝึกฝนจนกระทั่งมีความถูกต้องแม่นยำในการแยกแยะลักษณะต่างๆของผลิตภัณฑ์ดังกล่าวได้ด้วยตนเอง หลังจากนั้นผู้ทดสอบจะทำการประเมินผลิตภัณฑ์จริงที่จัดเตรียมมาในภาชนะบรรจุตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่ระบุตัวเลขเฉพาะ โดยเสิร์ฟพร้อมกับสิ่งทำความสะอาดช่องปาก เช่น น้ำ, แครกเกอร์ เป็นต้น และถ้วยบัวตัวอย่าง ซึ่งจัดเตรียมไว้ภายในบูธ (booth) ส่วนบุคคลโดยระดับความเข้มของลักษณะเฉพาะต่างๆ จะถูกบันทึกลงบนสเกลในแบบสอบถามของผู้ทดสอบแต่ละบุคคล (Lawless & Heymann, 2010a; Marsili, 2007)

2.4.2 การทดสอบการยอมรับ (acceptance test)

การทดสอบนี้มักประเมินภายหลังจากการพัฒนาผลิตภัณฑ์ให้ตรงกับความต้องการของผู้บริโภคและมักทำเพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นเพื่อทำการวิเคราะห์ทางการตลาดต่อไป โดยเป็นวิธีทดสอบที่มุ่งเน้นศึกษาความชอบและการยอมรับของผู้บริโภคซึ่งเป็นผู้ทดสอบที่ไม่ได้ผ่านการฝึกฝน โดยผู้บริโภคจะได้รับตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่ระบุตัวเลขเฉพาะ ในการทดสอบผู้บริโภคจะบันทึก ข้อมูลเชิงคุณภาพ เช่น เพศ, อายุ, รายได้, ความถี่ในการบริโภค เป็นต้น ข้อมูลเชิงปริมาณ ได้แก่ คะแนนความชอบ ลงบนสเกล เช่น 9-point hedonic scale ซึ่งจะแสดงความชอบมากที่สุด (9) ไปจนถึงไม่ชอบมากที่สุด (1) เป็นต้น ซึ่งหัวใจสำคัญในการทำการทดสอบการยอมรับของผู้บริโภคนี้อาจเป็นการเลือกกลุ่มผู้บริโภคให้สอดคล้องกับกลุ่มเป้าหมายของผลิตภัณฑ์ โดยสามารถทำได้ทั้งการทดสอบตัวอย่างชนิดเดียวหรือหลายตัวอย่าง ความชอบของผู้บริโภคต่อผลิตภัณฑ์นั้นสามารถพิจารณาได้โดยอ้อมจากคะแนนการยอมรับของผู้บริโภค วัตถุประสงค์ของการทดสอบการยอมรับของผู้บริโภคนี้อาจ

เพื่อประเมินความรู้สึกของผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์นั้นๆ หรือการยอมรับเมื่อเทียบกับผลิตภัณฑ์อื่นๆ ในด้าน ลักษณะปรากฏ, กลิ่น, รสชาติ, ความรู้สึกในช่องปาก (mouthfeel), เนื้อสัมผัส, และ ความชอบโดยรวม (Lawless & Heymann, 2010b)

2.5 การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยเคโมเมตริก

2.5.1 การปรับค่าเบื้องต้น (Data Pretreatment)

ข้อมูลจากการวิเคราะห์จะถูกปรับค่าให้อยู่ในรูปของข้อมูลเมตริกโดยการใช้คณิตศาสตร์ขั้นสูง จากนั้น ข้อมูลจะถูกปรับด้วยการ scaling หรือ centering ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธี (ตารางที่ 2.2) โดย ขั้นตอนการปรับค่าเบื้องต้นมีความสำคัญมาก เนื่องจากสามารถลดความแปรปรวนของข้อมูลลง และช่วยรักษาเสถียรภาพของเครื่องวิเคราะห์โดยลดระยะเวลาในการใช้งานลงได้ (Jolliffe, 2002)

ตารางที่ 2.2 การปรับข้อมูลเบื้องต้นสำหรับวิเคราะห์ด้วยเคโมเมตริก

การปรับข้อมูลเบื้องต้น		รายละเอียด
scaling	Constant row sum	ทำได้โดยการคำนวณอัตราส่วนระหว่างค่าของตัวแปร แต่ละค่าและผลรวมของตัวแปรทั้งหมดในตัวอย่งนั้น
	Range transformation	ทำได้โดยการปรับค่าตัวแปรที่ต่ำที่สุดให้เป็น 0 และปรับค่าความแปรปรวนสูงที่สุดให้เป็น 1 และปรับค่าตัวแปรที่เหลือให้อยู่ในช่วง 0 – 1
centering	Mean centering	ทำได้โดยการหาอัตราส่วนระหว่างค่าของตัวแปร แต่ละค่าและค่าเฉลี่ยของตัวแปรทั้งหมดในตัวอย่งนั้น
	Median centering	ทำได้โดยการหาอัตราส่วนระหว่างค่าของตัวแปร แต่ละค่าและค่ามัธยฐานของตัวแปรทั้งหมดในตัวอย่งนั้น

2.5.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (principal components analysis; PCA)

PCA คือกระบวนการทางสถิติเพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรหลายตัว โดยทำการรวมตัวแปรให้เหลือเพียงองค์ประกอบหลัก (principal component; PC) ที่สำคัญเท่านั้น โดยสร้างตัวแปรใหม่ หรือตัวแปรองค์ประกอบหลัก ตัวแปรที่อยู่คนละองค์ประกอบหลักจะไม่มีความสัมพันธ์กัน (orthogonal (uncorrelated) components) โดยเลือกพิจารณาองค์ประกอบหลักที่มีค่าร้อยละของความแปรปรวนสูง (Jolliffe, 2002) กระบวนการนี้จะแสดงค่า “factor loadings” คือค่าความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรเดิมและองค์ประกอบหลัก และค่า “factor score” คือค่าของแต่ละตัวอย่างที่สนใจซึ่งแสดงความสัมพันธ์กับตัวแปรองค์ประกอบหลัก โดยค่านี้นับจากค่าตัวแปรเดิมของแต่ละตัวอย่าง การแปลผลการวิเคราะห์องค์ประกอบหลักทำได้โดย พิจารณาค่า factor loading เลือกตัวแปรที่มีความสัมพันธ์มากที่สุดกับแต่ละองค์ประกอบหลัก และสำหรับค่า score loading แสดงตัวอย่างที่อยู่ใกล้กันจะมีความเหมือนกัน มากกว่าตัวอย่างที่อยู่ไกลกัน โดยลักษณะของตัวอย่างที่สนใจนั้นจะอธิบายได้จากตัวแปรที่อยู่บนองค์ประกอบหลักที่ตัวอย่งนั้นอยู่การวิเคราะห์จัดกลุ่ม (cluster analysis; CA) (Norusis, 2010)

CA คือการวิเคราะห์ข้อมูลโดยจัดกลุ่มตามความคล้ายคลึงกันของเมทริกที่สนใจ ซึ่งพิจารณาจากระยะทางและความสัมพันธ์ของข้อมูล 2 กลุ่ม โดยมีการวัดระยะทางระหว่างกลุ่มข้อมูลหลายวิธี ดังแสดงในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 วิธีการวิเคราะห์การจัดกลุ่ม

หลักการจัดกลุ่ม	รายละเอียด
Nearest neighbor (single linkage)	เป็นวิธีการจัดกลุ่มโดยพิจารณาจากระยะห่างระหว่างแต่ละกลุ่มที่สั้นที่สุด โดยจัดให้กลุ่มที่มีระยะห่างสั้นที่สุดอยู่ภายในกลุ่มเดียวกัน
Furthest neighbor (complete linkage)	เป็นวิธีการจัดกลุ่มโดยพิจารณาจากระยะห่างระหว่างแต่ละกลุ่มที่ยาวที่สุด โดยจัดให้กลุ่มที่มีระยะห่างยาวที่สุดอยู่ต่างกลุ่มกัน
UPGMA (average-linkage-between-groups method)	เป็นวิธีจัดกลุ่มโดยพิจารณาระยะห่างเฉลี่ยของทุกคู่ตัวอย่างระหว่างกลุ่ม โดยจัดให้กลุ่มคู่ที่มีระยะห่างเฉลี่ยระหว่างสองกลุ่มสั้นกว่ากลุ่มอื่นๆ อยู่ในกลุ่มเดียวกัน
Average linkage within groups	เป็นวิธีจัดกลุ่มโดยพิจารณาระยะห่างเฉลี่ยของทุกตัวอย่างภายในกลุ่ม แล้วจึงพิจารณาระยะห่างระหว่างกลุ่มจากระยะห่างค่าเฉลี่ยของทุกตัวอย่างภายในกลุ่มแต่ละกลุ่ม โดยจัดให้กลุ่มคู่ที่มีระยะห่างเฉลี่ยระหว่างสองกลุ่มสั้นกว่ากลุ่มอื่นๆ อยู่ในกลุ่มเดียวกัน
Ward's method	เป็นวิธีจัดกลุ่มโดยพิจารณาจาก square Euclidean distance หรือ ผลรวมของระยะห่างระหว่างตัวอย่างภายในกลุ่มยกกำลังสอง โดยจัดกลุ่มคู่ที่เมื่อรวมกลุ่มกันแล้วทำให้ค่า square Euclidean distance เพิ่มขึ้นน้อยที่สุด
Centroid method	เป็นวิธีจัดกลุ่มโดยพิจารณาจากค่ากลางของแต่ละกลุ่ม โดยจัดให้กลุ่มคู่ที่มีระยะห่างระหว่างค่ากลางของทั้งสองกลุ่มต่ำอยู่ในกลุ่มเดียวกัน
Median method	เป็นวิธีจัดกลุ่มโดยพิจารณาจากค่ามัธยฐานของแต่ละกลุ่ม โดยจัดให้กลุ่มคู่ที่มีระยะห่างระหว่างค่ามัธยฐานของทั้งสองกลุ่มต่ำอยู่ในกลุ่มเดียวกัน

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุุดิบและอุปกรณ์

3.1.1 วัสดุุดิบ

- มะนาว 4 พันธุ์ ได้แก่
Citrus aurantifolia (Christm & Panz) Swingle cv. Rumpai หรือ แป้นรำไพ
Citrus aurantifolia (Christm & Panz) Swingle cv. Puang หรือ แป้นพวง
Citrus aurantifolia (Christm & Panz) Swingle cv. Pijit หรือ แป้นพิจิตร
Citrus latifolia Tanaka หรือ ตาฮิติ
 ซึ่งถูกเก็บเกี่ยวในระยะเวลาการเก็บเกี่ยวทางการค้า (commercial maturity)
- 2-methyl-3-heptanone (Sigma-Aldrich®, Thailand) เป็น internal standard 0.1 กรัม
- Methanol (SupraSolv®, Germany) 10 มิลลิลิตร

3.1.2 อุปกรณ์

- มีดเซรามิกซ์
- ผ้าขาวบาง
- ที่คั้นน้ำมะนาวเซรามิกซ์
- colorimeter (Minolta CR-300, Tokyo, Japan)
- hand refractometer (Atago master M, Japan)
- S220 SevenCompact™ digital pH/Ion meter (Mettler toledo, USA)
- SPME ที่มีไฟเบอร์แบบ divinylbenzene/carboxan/polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS, Supelco, Bellefonte, PA)
- Tenax® TA (Gerstel, Singapore)
- automated dynamic headspace (Gerstel, Singapore)
- Agilent 7000 MS detector (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)

- Agilent 7890A Series GC (Agilent Technologies, USA)

3.2 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

3.2.1 การเตรียมตัวอย่างมะนาว มะนาวที่ใช้ในการทดลองมี 4 พันธุ์ ได้แก่

Citrus aurantifolia (Christm & Panz) Swingle cv. Rumpai หรือ แป้นรำไพ

Citrus aurantifolia (Christm & Panz) Swingle cv. Puang หรือ แป้นพวง

Citrus aurantifolia (Christm & Panz) Swingle cv. Pijit หรือ แป้นพิจิตร

Citrus latifolia Tanaka หรือ ตาฮิติ

เก็บเกี่ยวตัวอย่างผลมะนาวพันธุ์แป้นพวง แป้นรำไพ แป้นพิจิตรและตาฮิติ หลังระยะผลิดอกเป็นเวลา 5 เดือน จากแปลงเพาะปลูกในจังหวัดเพชรบุรี (มะนาวพันธุ์แป้นพวง, แป้นรำไพ และแป้นพิจิตร) และนครนายก (มะนาวพันธุ์ตาฮิติ) โดยแปลงเพาะปลูกทั้งสองนั้นมีค่า generalized monsoon index (GMI) หรือค่าดัชนีความแห้งแล้งทางการเกษตรในเดือนกันยายน พ.ศ. 2558 เท่ากับ 42 และ 38 ตามลำดับ (Meteorological department, 2015) ภายหลังจากเก็บเกี่ยวจากแปลงเพาะปลูก ผลมะนาวต้องผ่านการล้างทำความสะอาด ด้วยน้ำยาทำความสะอาดและน้ำสะอาด และซับให้แห้ง ก่อนบรรจุผลมะนาวลงในถุงพลาสติกชนิด polyvinylchloride (PVC) ที่มีรูพรุน เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 8°C

3.2.2 การวัดสมบัติทางกายภาพและเคมี

3.2.2.1 การวัดสี

สุ่มตัวอย่างผลมะนาว 5 ผล/พันธุ์/ซ้ำ นำมาวัดสีที่ผิวของผลมะนาวผลละ 3 ตำแหน่ง และคั้นน้ำมะนาว 5 ผลต่อพันธุ์เพื่อวัดสีของน้ำมะนาวด้วยระบบ Hunter Lab โดยเครื่อง chromometer (Minolta CR-300, Tokyo, Japan) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.2.2.2 การหาปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในน้ำทั้งหมด (SSC)

คั้นน้ำมะนาว 5 ผล/พันธุ์/ซ้ำ เพื่อวัดปริมาณ SSC ด้วยเครื่อง hand refractometer (Atago master M, Japan) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.2.2.3 การหาค่าความเป็นกรดต่าง (pH) และ ปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้ (TA)

สุ่มตัวอย่างผลมะนาว 5 ผล/พันธุ์/ซ้ำ คั้นน้ำมะนาว 5 ผลต่อพันธุ์เพื่อวัดค่า pH ด้วยเครื่อง S220 SevenCompact™ digital pH/Ion meter (Mettlertoledo, USA) และปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้ (titratable acidity, %TA) ด้วยการไทเทรตตามวิธี AOAC (รายละเอียดแสดงใน ภาคผนวก ก.1) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.2.3 การวิเคราะห์ผลของอุณหภูมิและระยะเวลาการเก็บรักษาต่อองค์ประกอบและ ปริมาณของสารระเหยง่ายในน้ำมะนาวคั้นสด

3.2.3.1 การสกัดสารระเหยง่ายในน้ำมะนาวด้วยวิธี Headspace Solid Phase Microextraction (HS-SPME)

เตรียมน้ำมะนาวคั้นสดโดยปอกส่วน exocarp ออกจนหมดด้วยมีด เซรามิกซ์ แล้วห่อด้วยผ้าขาวบาง จากนั้นนำไปคั้นด้วยที่คั้นแบบใช้มือบีบ ใช้มะนาว 10 ผล/พันธุ์/ซ้ำ ผสมให้เข้ากัน จากนั้น เทน้ำมะนาวปริมาณ 3 มิลลิลิตร ลงใน vial ขนาด 20 มิลลิลิตร จำนวน 6 ขวด เก็บ 3 ขวดแรกที่อุณหภูมิ 4°C เป็นระยะเวลา 6, 12, และ 24 ชั่วโมง, 2 ขวดเก็บที่อุณหภูมิ 35°C เป็นระยะเวลา 3, และ 6 ชั่วโมง, และ 1 ขวดสำหรับมะนาวคั้นสด (ตัวอย่างควบคุม) จากนั้นเติม internal standard (เตรียมได้จาก 2-methyl-3-heptanone 0.00837 กรัม ละลายใน เมทานอล 10 มิลลิลิตร) ปริมาณ 100 µl ลงใน vial แล้วตั้งทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 35°C เก็บตัวอย่างสารระเหยด้วย SPME ไฟเบอร์ชนิด DVB/CAR/PDMS (Supelco, Bellefonte, PA) เป็นระยะเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 35°C จากนั้นนำ SPME ออกจาก vial เพื่อเตรียมวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารระเหยด้วย GC-MS โดยสามารถคำนวณปริมาณสารระเหยง่ายได้จากการเติม internal standard (IS) จากสมการที่ 3.1

3.2.3.2 การหาชนิดและปริมาณสารระเหยให้กลิ่นของน้ำมะนาวที่เก็บไว้ใน อุณหภูมิต่างกันด้วยเทคนิค GC-MS

วิเคราะห์สารระเหยง่ายใน SPME ที่ได้จากข้อ 3.2.2.4.1 โดยใช้เครื่อง Agilent 7890A Series GC (Agilent Technologies, USA) ผ่านทาง injector port แบบ split/splitless โดยมี split ratio = 20 : 1 โดยมีอุณหภูมิเริ่มต้น 200°C เป็นระยะเวลา 5 นาที ผ่านกระบวนการแยกสารระเหยโดยใช้ DB-5 column (ความยาว 30 เมตร x เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.25 มิลลิเมตร x ความหนาของฟิล์ม 0.25 ไมโครเมตร) (J&W Scientific, Folsom, CA, USA) ซึ่งเป็น column แบบมีหัวเล็กน้อย โดยเริ่มการวิเคราะห์ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 3 นาที แล้วเพิ่มอุณหภูมิด้วยอัตรา 3°C/นาที จนถึง 180°C แล้วรักษาอุณหภูมิให้คงที่เป็นระยะเวลา 2 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิด้วยอัตรา 40°C/นาที จนถึง 250°C ควบคุมอุณหภูมิที่ 250°C เป็นเวลา 1 นาที โดยใช้แก๊สฮีเลียมเป็นแก๊สตัวพา ซึ่งมีอัตราการไหล 0.80 มิลลิลิตร/นาที หลังจากสารระเหยเข้าสู่ Agilent 7000 MS detector (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) สามารถวิเคราะห์ได้ที่ช่วงมวล 35 ถึง 300 การบ่งชี้ชนิดของสารระเหยใช้ส่วนวิเคราะห์มวล (mass analyzer) แบบ electron impact โดยมีพลังงานไอออนไนเซชัน 70 eV วิเคราะห์เทียบ mass spectrum กับฐานข้อมูล NIST MS Search 8.0 library (National Institute of Standard and Technology, Gaithersburg, MD, USA) หาปริมาณสารระเหยง่ายได้ด้วยการเติม internal standard (2-methyl-3-heptanone) โดยคำนวณจากสมการที่ 3.1

$$\text{Concentration (ppm)} = \frac{(0.00837 \text{ g IS})(0.1 \text{ ml IS})(\text{Compound Peak Area})}{(10 \text{ ml MeOH})(\text{IS Peak Area})(\text{ml Sample})} \times 1000 \quad \dots\dots(3.1)$$

โดย Concentration = ความเข้มข้นของสารที่สนใจ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
 Compound Peak Area = พื้นที่ใต้กราฟของสารที่สนใจ
 IS Peak Area = พื้นที่ใต้กราฟของ Internal Standard
 mg Sample = ปริมาณตัวอย่างน้ำมะนาวที่ใส่ใน vial (มิลลิกรัม)

3.2.4 การวิเคราะห์ผลของพันธุ์ต่อองค์ประกอบและปริมาณของสารระเหยง่ายในน้ำมะนาวคั้นสด

3.2.4.1 การสกัดสารระเหยให้กลิ่นของน้ำมะนาวด้วยวิธี Dynamic Headspace

เตรียมน้ำมะนาวคั้นสดโดยปอกส่วน exocarp ออกจนหมดด้วยมีดเซรามิกซ์ แล้วห่อด้วยผ้าขาวบาง จากนั้นนำไปคั้นด้วยที่คั้นแบบใช้มือบีบ ใช้มะนาว 10 ผล/พันธุ์/ซ้ำ ผสมให้เข้ากัน จากนั้น เติมน้ำมะนาวปริมาณ 3 มิลลิลิตร ลงใน vial ขนาด 10 มิลลิลิตร เติม internal standard (เตรียมได้จาก 2-methyl-3-heptanone 0.00837 กรัม ละลายใน เมทานอล 10 มิลลิลิตร) ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ลงใน vial แล้ววาง vial ไว้ใน tray ของเครื่อง Automated Dynamic Headspace (Gerstel, Singapore) (รูปที่ 3.1) ปรับอุณหภูมิเป็น 40°C เป็นเวลา 15 นาที ดูดซับสารระเหยง่ายด้วย adsorbent ชนิด Tenax TA (polymer ของ 2,6-diphenylphenylene oxide) โดยการผ่านแก๊สไนโตรเจนลงไปในตัวอย่างน้ำมะนาวด้วยอุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 10 นาที ด้วยอัตราการไหล 20 มิลลิลิตร/นาที จากนั้น ผ่านแก๊สไนโตรเจนที่มีความชื้นต่ำลงไปด้วยอุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 9 นาที ด้วยอัตราการไหล 50 มิลลิลิตร/นาที เพื่อกำจัดความชื้นใน Tenax TA



รูปที่ 3.1 Dynamic Headspace

3.2.4.2 การหาชนิดและปริมาณสารระเหยให้กลิ่นของน้ำมะนาวแต่ละพันธุ์ด้วยเทคนิค GC-MS

วิเคราะห์สารระเหยง่ายใน Tenex TA ที่ได้จากข้อ 3.2.2.5.1 โดยใช้เครื่อง Agilent 7890A Series GC (Agilent Technologies, USA) (รูปที่ 3.2) ผ่านทาง injector port แบบ split/splitless โดยมี split ratio = 5 : 1 ผ่านกระบวนการแยกสารระเหยโดยใช้ DB-5 column (ความยาว 30 เมตร x เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.25 มิลลิเมตร x ความหนาของฟิล์ม 0.25 ไมโครเมตร) (Agilent Technologies, USA) ซึ่งเป็น column แบบมีหัวเล็กน้อย โดยเริ่มการวิเคราะห์ที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 1 นาที แล้วเพิ่มอุณหภูมิด้วยอัตรา 200°C/นาที จนถึง 300°C ควบคุมอุณหภูมิที่ 300°C เป็นเวลา 5 นาที โดยใช้แก๊สไนโตรเจนเป็นแก๊สตัวพา ซึ่งมีอัตราการไหล 1.25 มิลลิลิตร/นาที หลังจากสารระเหยเข้าสู่ Agilent 5975 Inert Mass Selective Detector (Agilent Technologies, USA) สามารถวิเคราะห์ได้ที่ช่วงมวล 15 ถึง 400 การบ่งชี้ชนิดของสารระเหยใช้ส่วนวิเคราะห์มวล (mass analyzer) แบบ single quadrupole โดยเทียบ mass spectrum กับฐานข้อมูล NIST MS Search 8.0 library (National Institute of Standard and Technology, Gaithersburg, MD, USA) และเทียบกับค่า linear retention index (LRI) ที่ได้จากสาร n-alkanes (C1-C40) โดยคำนวณค่า LRI ได้จากสมการที่ 3.2

$$LRI = 100 \left(\frac{t - t_n}{t_{n+1} - t_n} + n \right) \dots\dots\dots(3.2)$$

LRI = linear retention index ของสารประกอบที่สนใจ

t = retention time ของสารประกอบที่สนใจ (นาที)

t_n = retention time ของสารมาตรฐานแอลเคนที่ถูกชะออกมาก่อนสารประกอบที่สนใจ (นาที) และมีจำนวนอะตอมคาร์บอนเท่ากับ n

t_{n+1} = retention time ของสารมาตรฐานแอลเคนที่ถูกชะออกมาหลังสารประกอบที่สนใจ (นาที) และมีจำนวนอะตอมคาร์บอนเท่ากับ n+1

n = จำนวนอะตอมคาร์บอนของสารมาตรฐานแอลเคนที่ถูกชะออกมาก่อนสารประกอบที่สนใจ



รูปที่ 3.2 Gas chromatography – Mass spectrometer

3.2.5 การหาค่า odor activity values (OAV)

ค่า odor activity values สามารถหาได้จากอัตราส่วนของความเข้มข้นของสารระเหยให้กลิ่นที่วิเคราะห์ได้ต่อความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ทำให้เกิดการรับกลิ่นของสารนั้น (odor detection threshold) สารระเหยที่มีค่า OAV สูง ($OAV \geq 1$) มีแนวโน้มว่าสารนั้นเป็นสารระเหยให้กลิ่นสำคัญของตัวอย่างที่สนใจ (Averbeck & Schieberle, 2009)

3.2.6 การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสเชิงพรรณนา

การทดสอบทางประสาทสัมผัสเชิงปริมาณของน้ำมะนาวคั้นสด 4 พันธุ์ ได้แก่ แป้นรำไพ แป้นพวง แป้นพิจิตรและตาฮิติ โดยใช้ผู้ทดสอบที่มีความเชี่ยวชาญด้านกลิ่น 8 คน จากศูนย์วิจัยและพัฒนา เครื่องเบทาโกร (ผู้ชาย 2 คน ผู้หญิง 6 คน) ผู้ทดสอบมีอายุช่วง 30-55 ปี โดยแบ่งขั้นตอนการทำงานเป็น 4 ขั้นตอน โดยใช้ระยะเวลาขั้นตอนละ 9 ชั่วโมง รวมทั้งหมดเป็น 36 ชั่วโมง ดังนี้

1. **การพัฒนาและคัดเลือกคำศัพท์** (attributes) โดยผู้ทดสอบชิมตัวอย่างน้ำมะนาวคั้นสด และอธิบายกลิ่นที่รับรู้ จากนั้นผู้ทดสอบทุกคนอภิปรายและทำความเข้าใจคำศัพท์ (attributes) ร่วมกัน เพื่อเลือกคำศัพท์ที่เหมาะสมกับตัวอย่างน้ำมะนาว
2. **การกำหนดปริมาณตัวอย่างอ้างอิง** (reference) เมื่อได้คำศัพท์ที่เหมาะสมกับตัวอย่างน้ำมะนาว ผู้ทดสอบจะกำหนดความเข้มข้นและคะแนนของตัวอย่างอ้างอิง (reference) ของกลิ่นต่างๆ ตามคำศัพท์ที่เลือกไว้
3. **การฝึกให้คะแนนก่อนทดสอบจริง** ทำการทดสอบจำลองโดยทดลองให้คะแนนน้ำมะนาวคั้นสดพันธุ์ต่างๆ จนกระทั่งการให้คะแนนมีความแม่นยำ
4. **การทดสอบจริง** เตรียมตัวอย่างน้ำมะนาวจากมะนาว 10 ผล/พันธุ์/ตัวอย่าง/ซ้ำ ตักแบ่งตัวอย่างให้ผู้ทดสอบในพลาสติกใสสีขาวมีฝาปิดด้วยละ 10 กรัม โดยเตรียมตัวอย่างสำหรับเสิร์ฟด้วยแผนการทดลองแบบสุ่มบล็อกสมบูรณ์ (Randomized block designs; RBD) โดยแต่ละถ้วยจะแสดงเลขรหัส 3 หลักของตัวอย่างน้ำมะนาวแต่ละพันธุ์เพื่อใช้ในการทดสอบกลิ่น เมื่อได้รับถาดตัวอย่างผู้ทดสอบจะดมกลิ่น และให้คะแนนตามระดับความเข้มของแต่ละคุณลักษณะกลิ่น โดยใช้สเกล 0 (ไม่มีกลิ่น) – 15 (ความเข้มกลิ่นมาก) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ การทดสอบแต่ละตัวอย่างใช้เวลาประมาณ 30 นาที ระยะเวลาในการพักระหว่างการทดสอบแต่ละตัวอย่างประมาณ 15 นาที

3.2.7 การทดสอบการยอมรับของผู้บริโภค

ทดสอบการยอมรับของผู้บริโภคต่อน้ำมะนาวพันธุ์แป้นรำไพ แป้นพวง แป้นพิจิตร และตาดิโตโดยใช้ผู้ทดสอบที่มีความสามารถด้านการปรุงอาหารจากโรงเรียนการเรือน มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิตจำนวน 117 คน (ผู้ชาย 39 คน และผู้หญิง 78 คน) โดยมีช่วงอายุ 18-22 ปี โดยเตรียมตัวอย่างน้ำมะนาวจากมะนาว 10 ผล/พันธุ์/ตัวอย่าง/ซ้ำ ตักแบ่งให้ผู้ทดสอบในพลาสติกใสสีขาวมีฝาปิดถ้วยละ 10 กรัม โดยแต่ละถ้วยจะแสดงเลขรหัส 3 หลักของตัวอย่างน้ำมะนาวแต่ละพันธุ์เพื่อใช้ในการทดสอบกลิ่น โดยเตรียมตัวอย่างด้วยแผนแบบสุ่มบล็อกสมบูรณ์ (Randomized block designs: RBD) ผู้ทดสอบจะให้คะแนนการยอมรับโดยใช้ 9-point hedonic scale (1 = ไม่ชอบมากที่สุด, 2 = ไม่ชอบมาก, 3 = ไม่ชอบปานกลาง, 4 = ไม่ชอบเล็กน้อย, 5 = บอกรับไม่ได้ว่าชอบหรือไม่ชอบ, 6 = ชอบเล็กน้อย, 7 = ชอบปานกลาง, 8 = ชอบมาก และ 9 = ชอบมากที่สุด) ในด้าน กลิ่น, สี, รสชาติ, และความชอบโดยรวม ของน้ำมะนาว 4 พันธุ์

3.2.8 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ผลการทดลองการศึกษารองประกอบสารระเหยง่ายในน้ำมะนาวแต่ละพันธุ์ และลักษณะทางประสาทสัมผัสเชิงพรรณนาของน้ำมะนาวแต่ละพันธุ์ ด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance; ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Least Significant Difference (LSD) ($\alpha = 0.05$) โดยใช้โปรแกรม SPSS version 22 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) รวมถึงวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างสารระเหยให้กลิ่น พันธุ์และผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยวิธี multivariate statistics ได้แก่ hierarchical cluster analysis (HCA) ด้วยวิธี ward's method และ principal component analysis (PCA) โดยใช้โปรแกรม Multibase 2015 (NumrricalDynamics.Com, Tokyo, Japan) และการแสดงผลในรูปแบบ heat map ร่วมกับ HCA ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี Pearson's correlation โดยใช้โปรแกรม Multi-Experiment Viewer (MeV) version 4.9 (www.tm4.org/mev)

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 สมบัติทางกายภาพและเคมีของน้ำมะนาว

สมบัติทางกายภาพและทางเคมี ได้แก่ ค่าสี (CIE L^* , a^* , b^*), ของแข็งที่ละลายได้ในน้ำทั้งหมด (soluble solid content: SSC), ปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้ (titratable acidity: %TA) และ pH นั้นเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ในการประเมินคุณภาพเบื้องต้นของผักและผลไม้สำหรับการบริโภค (Alavoine, Crochon, & Bouillon, 1990) (ตารางที่ 4.1) จากผลการวิจัยพบว่าสีของน้ำมะนาวพันธุ์แป้นรำไพและตาฮิติมีค่าความสว่าง (L^*) สูงกว่า มีสีเขียวมากกว่า (ค่า a^* ต่ำกว่า) และมีสีเหลืองมากกว่า (ค่า b^* สูงกว่า) น้ำมะนาวพันธุ์แป้นพวงและแป้นพิจิตรอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) และจากการวัดสมบัติทางเคมีพบว่า น้ำมะนาวพันธุ์ตาฮิติมีค่า SSC และ ค่า SSC/TA สูงที่สุด ค่า SSC/TA นี้ใช้เป็นดัชนีบ่งชี้ความหวานของผลไม้ (Magwaza & Opara, 2015) ตามด้วยแป้นรำไพ แป้นพวง และแป้นพิจิตร ตามลำดับ และไม่พบความแตกต่างของค่า TA ในน้ำมะนาวทั้ง 4 พันธุ์ ในขณะที่ค่า pH มีค่าต่ำที่สุดในน้ำมะนาวพันธุ์แป้นรำไพและตาฮิติ

ตารางที่ 4.1 สมบัติทางกายภาพและทางเคมีของน้ำมะนาว

	พันธุ์มะนาว								
	แป้นรำไพ			แป้นพวง		แป้นพิจิตร		ตาฮิติ	
ค่าสี									
L^*	31.75 ± 0.77	a	31.35 ± 0.24	b	30.94 ± 0.38	b	31.62 ± 0.31	ab	
a^*	-2.11 ± 0.34	b	-1.26 ± 0.12	a	-1.04 ± 0.28	a	-2.37 ± 0.13	b	
b^*	0.68 ± 0.06	b	-0.24 ± 0.10	d	0.20 ± 0.23	c	0.98 ± 0.09	a	
SSC	7.70 ± 0.48	b	7.45 ± 0.19	bc	7.02 ± 0.33	c	8.35 ± 0.25	a	
TA^{ns}	6.79 ± 0.45		6.75 ± 0.58		6.49 ± 0.21		6.61 ± 0.43		
SSC/TA	1.13 ± 0.13	ab	1.10 ± 0.11	b	1.082 ± 0.02	b	1.26 ± 0.11	a	
pH	2.36 ± 0.03	ab	2.38 ± 0.04	a	2.40 ± 0.11	a	2.28 ± 0.04	b	

^{a,b...} อักษรที่ต่างกันในแต่ละแถว หมายถึง ค่าเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

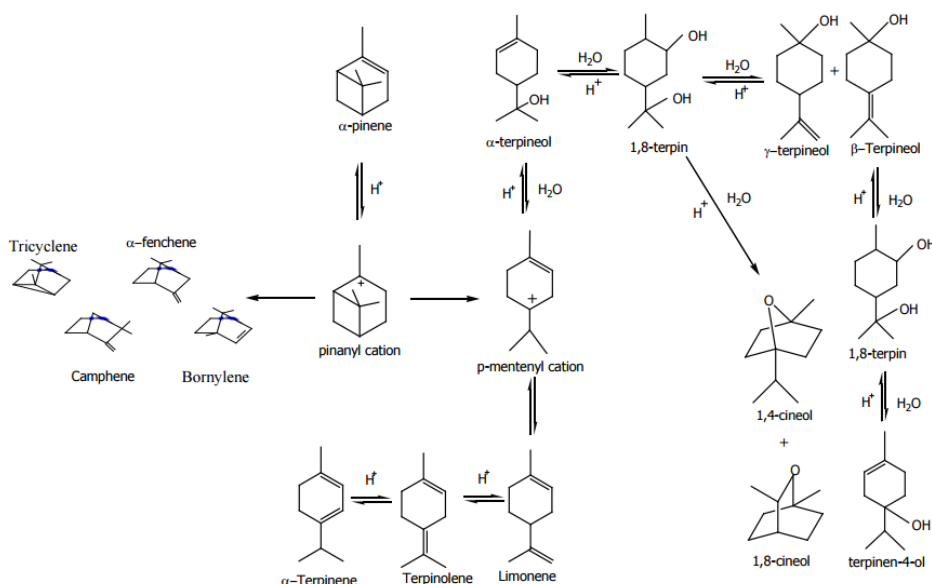
^{ns} ไม่พบความแตกต่าง (non-significant)

4.2 ผลของอุณหภูมิและระยะเวลาการเก็บรักษาต่อองค์ประกอบและปริมาณของสารระเหยง่ายในน้ำมะนาวคั้นสด

เพื่อให้ทราบถึงสภาวะการเก็บรักษาที่เหมาะสมที่สามารถรักษาองค์ประกอบและปริมาณสารระเหยง่ายให้มีความใกล้เคียงกับน้ำมะนาวคั้นสดมากที่สุด การศึกษาผลของอุณหภูมิและระยะเวลาการเก็บรักษาต่อองค์ประกอบและปริมาณของสารระเหยง่ายจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งเพื่อใช้เป็นกรอบในการออกแบบการวิเคราะห์องค์ประกอบและปริมาณสารระเหยง่ายในน้ำมะนาว โดยในการทดลองนี้เลือกใช้น้ำมะนาวพันธุ์แป้นรำไพ เนื่องจากคณะผู้วิจัยได้สัมภาษณ์ผู้เชี่ยวชาญด้านการปรุงอาหารจาก Nahm restaurant ซึ่งเป็นภัตตาคารอาหารไทยที่มีชื่อเสียงระดับโลก โดยภัตตาคารนี้เลือกใช้น้ำมะนาวพันธุ์แป้นรำไพในการปรุงอาหารเท่านั้น เนื่องจากมีรสเปรี้ยวอมหวาน มีกลิ่นหอมที่เป็นเอกลักษณ์และมีความเข้มข้นของกลิ่นสูง

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบของสารระเหยง่ายในน้ำมะนาวคั้นสด (ตัวอย่างควบคุม), น้ำมะนาวที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 35°C เป็นระยะเวลา 3 และ 6 ชั่วโมง, และน้ำมะนาวที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C เป็นระยะเวลา 6, 12, และ 24 ชั่วโมง พบว่าสารระเหยง่ายที่วิเคราะห์ได้ในน้ำมะนาว 27 ชนิด ได้แก่ monoterpene hydrocarbons 9 ชนิด, sesquiterpene hydrocarbons 13 ชนิด, สารระเหยที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ 4 ชนิดและสารระเหยอื่นๆ 1 ชนิด (ตารางที่ 4.2) พบว่า สารระเหยง่ายที่พบมากที่สุดคือน้ำมะนาวคั้นสดและน้ำมะนาวที่เก็บรักษาในทุกสภาวะ คือ limonene ซึ่งมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 543-833 ppm ตามด้วย β -pinene 150-309 ppm และ γ -terpinene 74-93 ppm ตามลำดับ น้ำมะนาวที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง มีปริมาณสารระเหยง่ายกลุ่ม monoterpene hydrocarbon ได้แก่ 4-carene, terpinolene สูงกว่า และ β -pinene ต่ำกว่าน้ำมะนาวคั้นสดอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) นอกจากนี้ยังพบสารกลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ α -terpineol ซึ่งมีลักษณะกลิ่น green และ violet สูงกว่า และ decanal ต่ำกว่าน้ำมะนาวคั้นสดอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ในขณะที่น้ำมะนาวที่เก็บรักษาที่ 4°C ตลอดการเก็บรักษา 24 ชั่วโมง พบเพียงปริมาณ 4-carene และ terpinen-4-ol ที่สูงกว่าน้ำมะนาวคั้นสด ($p \leq 0.05$) และไม่พบความแตกต่างของปริมาณสารระเหยง่าย 25 ชนิดที่เหลือ การลดลงของปริมาณ α -pinene ซึ่งเป็นสารระเหยในกลุ่ม monoterpene hydrocarbons ควบคู่กับการเพิ่มขึ้นของปริมาณ α -terpineol ซึ่งเป็นสารระเหยง่ายที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบในระหว่างการเก็บรักษานั้นเกิดจาก α -pinene แตกตัวเป็น

α -terpineol จากปฏิกิริยา acid catalyzed hydration (รูปที่ 4.1) เมื่อถูกกระตุ้นด้วยอากาศและแสงภายใต้สภาวะกรด ($\text{pH} < 6$) และมีน้ำเป็นองค์ประกอบ (Clark Jr & Chamblee, 1992; Petersen et al., 1998)



รูปที่ 4.1 ปฏิกิริยา acid catalyzed hydration ของ α -pinene

(Comelli, Avila, Volzone, & Ponzi, 2013)

จากการวิเคราะห์สารระเหยง่ายในน้ำมะนาวคั้นสดและน้ำมะนาวที่เก็บรักษาที่สภาวะต่างๆ ด้วย principal component analysis (PCA) ซึ่งเป็นลักษณะการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบหลายตัวแปร (multivariate analyses) โดยใช้ข้อมูลปริมาณสารระเหยง่ายซึ่งคำนวณจากพื้นที่ใต้กราฟของสารระเหยแต่ละชนิด PC1 และ PC2 มีค่าความแปรปรวนของข้อมูลทั้งหมด 97.8% (94.1% และ 3.7% ตามลำดับ) เมื่อพิจารณาจาก score plot (รูปที่ 4.2A) พบว่า สามารถแบ่งกลุ่มน้ำมะนาวตามสภาวะการเก็บรักษาได้ 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มน้ำมะนาวคั้นสด, กลุ่มน้ำมะนาวที่เก็บรักษาที่ 35°C นาน 6 ชั่วโมง และน้ำมะนาวที่เก็บรักษาที่สภาวะอื่นๆ ได้แก่ ที่ 35°C นาน 3 ชั่วโมง, ที่ 4°C นาน 6 ชั่วโมง และ ที่ 4°C นาน 12 ชั่วโมง จากแนวโน้มดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการเก็บรักษาน้ำมะนาวที่อุณหภูมิต่ำ (4°C) สามารถชะลอการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารระเหยง่ายในน้ำมะนาวได้ดีกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 35°C เมื่อพิจารณาจาก loading plot (รูปที่ 4.2B) พบว่า limonene และ β -pinene แยกออกจากกลุ่มสารระเหยอื่นๆ อย่างชัดเจน โดย β -pinene มีแนวโน้มพบมากใน

น้ำมันวุ้นสด ซึ่งเป็นสารระเหยที่ให้กลิ่น woody และ กลิ่น piney (Mookdasanit, Tamura, Yoshizawa, Tokunaga, & Nakanishi, 2003) แผนภาพ Mean centering (รูปที่ 4.3) ซึ่งคำนวณจากความแตกต่างระหว่างปริมาณ β -pinene ในน้ำมันวุ้นที่เก็บรักษาที่สภาวะต่างๆ และค่าเฉลี่ยของปริมาณ β -pinene ในน้ำมันวุ้นตัวอย่างแสดงให้เห็นว่า น้ำมันวุ้นสดมีปริมาณ β -pinene สูง โดยการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C นาน 6 และ 12 ชั่วโมงสามารถชะลอการลดลงของปริมาณ β -pinene ได้ โดยมีปริมาณใกล้เคียงกับน้ำมันวุ้นสดมากกว่าน้ำมันวุ้นที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 35°C นาน 3 และ 6 ชั่วโมง หรือ ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 24 ชั่วโมง ดังนั้นการวิเคราะห์สารระเหยง่ายในน้ำมันวุ้นหากไม่สามารถวิเคราะห์ได้ทันที การเก็บรักษาน้ำมันวุ้นสดไว้ที่อุณหภูมิ 4°C ไม่เกิน 12 ชั่วโมง สามารถรักษารสชาติและปริมาณสารระเหยง่ายได้ใกล้เคียงกับน้ำมันวุ้นสด



ตารางที่ 4.2 ปริมาณสารระเหยง่ายที่พบในน้ำมันมะนาวคั้นสดและน้ำมันมะนาวที่เก็บรักษาที่สภาวะต่างๆ

No.	Functional group	Volatile Compounds ¹	Concentration (ppm) ¹								
			fresh (0 h)	35°C			4°C				
				3 h	6 h	6 h	6 h	12 h	24 h		
1	monoterpene hydrocarbons	α -pinene	31.08 ab	21.67 b	34.73 a	36.06 a	26.82 ab				
2		camphene ^{ns}	2.10	1.86	2.22	2.31	1.73				
3		β -pinene	237.77 a	150.18 b	308.59 a	306.21 a	236.31 a				
4		myrcene	25.16 ab	19.46 b	30.19 a	30.4 a	23.62 ab				
5		α -phellandrene	1.43 ab	1.59 a	1.29 ab	1.39 ab	1.10 b				
6		4-carene	8.71 a	9.19 a	7.47 a	7.70 a	7.39 a				
7		limonene	654.04 ab	543.22 b	832.19 a	818.65 a	664.01 ab				
8		γ -terpinene ^{ns}	85.29	74.35	92.78	91.73	80.28				
9		terpinolene	12.60 b	17.95 a	9.54 bc	9.85 bc	9.22 bc				

¹ สารระเหยจากการเขียนข้อมูลเมสสเปกโตรเมตรี

^{ns} ไม่พบความแตกต่าง (non-significant)

^{a,b...} อักษรที่ต่างกันในแต่ละแถว หมายถึง ค่าเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 4.2 ปริมาณสารระเหยง่ายที่พบในน้ำมันมะนาวคั้นสดและน้ำมันมะนาวที่เก็บรักษาที่สภาวะต่างๆ (ต่อ)

No.	Functional group	Volatile Compounds ¹	Concentration (ppm) ¹						
			fresh (0 h)	35°C			4°C		
				3 h	6 h	6 h	6 h	12 h	24 h
10	sesquiterpene hydrocarbons	δ -elemene ^{ns}	7.10	8.16	8.60	8.63	9.78	8.92	
11		β -elemene ^{ns}	2.93	3.37	3.56	3.54	4.07	3.67	
12		α -bergamotene ^{ns}	49.25	57.7	43.27	61.86	75.77	61.25	
13		D-germacrene ^{ns}	9.51	10.84	12.08	11.58	13.66	12.25	
14		γ -gurjunene ^{ns}	1.53	1.69	2.13	1.81	2.09	2.11	
15		α -chamigrene ^{ns}	3.19	3.39	3.90	3.74	4.35	4.17	
16		germacrene B ^{ns}	12.05	12.33	14.87	13.73	15.28	15.51	
17		caryophyllene	1.89	2.44	2.83	2.60	3.08	2.59	
18		humulene ^{ns}	2.32	2.41	3.2	2.67	3.39	2.83	
19		cis- β -farnesene ^{ns}	3.97	4.41	5.47	5.05	6.23	5.21	
20		β -santalene ^{ns}	2.14	2.38	2.85	2.77	3.36	2.73	
21		γ -muurolene ^{ns}	1.36	1.45	2.07	1.37	1.86	1.77	
22		β -bisabolene ^{ns}	52.06	53.48	67.84	61.41	70.55	65.53	

¹ สารระเหยจากการเทียบจากฐานข้อมูลแมสสเปกโตรเมทรี

^{ns} ไม่พบความแตกต่าง (non-significant)

a,b- อักษรที่ต่างกันในแต่ละแถว หมายถึง ค่าเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

ตารางที่ 4.2 ปริมาณสารระเหยง่ายที่พบในน้ำมันมะนาวต้นสดและน้ำมันมะนาวที่เก็บรักษาที่สภาวะต่างๆ (ต่อ)

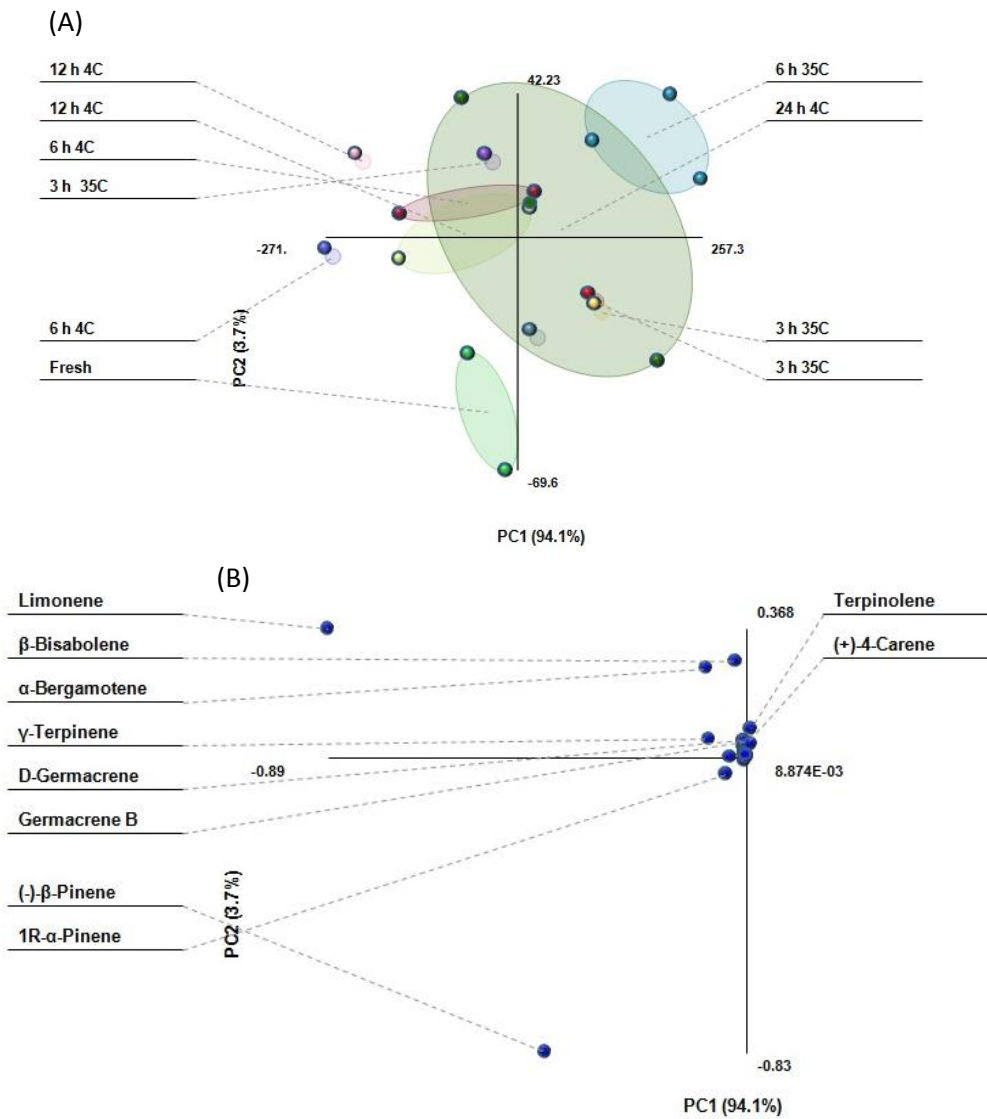
No.	Functional group	Volatile Compounds ¹	Concentration (ppm) ¹								
			Storage conditions								
			fresh (0 h)			35°C			4°C		
			3 h	6 h	6 h	6 h	12 h	24 h			
23		terpinen-4-ol	4.20 c	4.91 bc	5.26 abc	6.41 ab	6.12 ab	6.57 a			
24	oxygenated compounds	decanal	2.69 abc	1.96 cd	1.57 d	3.08 a	2.95 ab	2.13 bcd			
25		cyclododecanol	1.97 ab	1.81 b	1.95 ab	2.24 ab	2.56 a	2.13 ab			
26		α -terpineol	1.00 d	3.86 b	7.18 a	1.56 cd	1.83 cd	2.43 c			
27		4,7-dimethylundecane ^{ns}	2.02	2.87	2.49	2.99	2.96	2.83			

¹ สารระเหยจากการเทียบฐานข้อมูลแมสสเปกโตรเมทรี

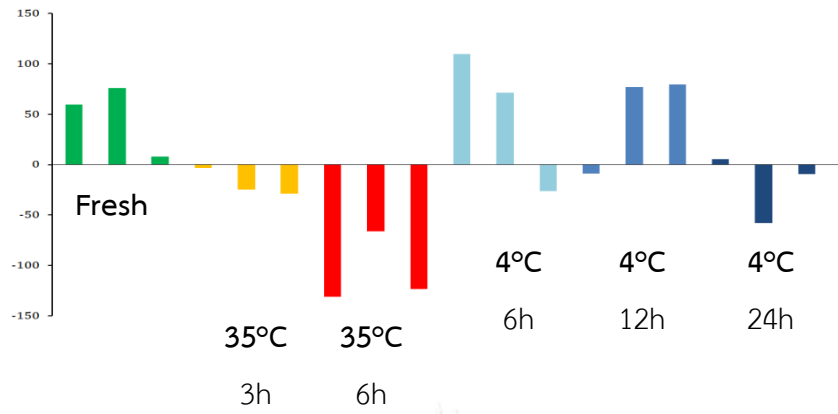
^{ns} ไม่พบความแตกต่าง (non-significant)

^{a,b...} อักษรที่ต่างกันในแต่ละแถว หมายถึง ค่าเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)





รูปที่ 4.2 Principal component analysis (PCA) ของสารระเหยง่ายในน้ำมันวาคีนสด (A)
และน้ำมันวาคีนที่เก็บรักษาที่สภาวะต่างๆ (B)



รูปที่ 4.3 Mean centering ของ β -pinene ในน้ำมันหอมระเหยสด และน้ำมันหอมระเหยที่เก็บรักษาที่สภาวะต่างๆ

4.3 ผลของพันธุ์ต่อองค์ประกอบและปริมาณของสารระเหยง่ายในน้ำมะนาวคั้นสด

4.3.1 การวิเคราะห์สารระเหยง่ายในน้ำมะนาว 4 พันธุ์ด้วย GC-MS

จากผลงานวิจัยสารระเหยง่ายในน้ำมะนาว 4 พันธุ์ ได้แก่ มะนาวพันธุ์แป้นรำไพ แป้นพวง แป้นพิจิตร และตาสีติ โดยการสกัดด้วยวิธี dynamic headspace/GC-MS ได้ผลโครมาโทแกรมดังแสดงในรูปที่ 4.4 โครมาโทแกรมของน้ำมะนาวพันธุ์แป้นรำไพและแป้นพวงมีความใกล้เคียงกันโดยมีจำนวนพีคและพื้นที่ใต้กราฟมากที่สุด โครมาโทแกรมของน้ำมะนาวพันธุ์พิจิตรมีจำนวนพีคและพื้นที่ใต้กราฟโดยรวมน้อยที่สุด ส่วนโครมาโทแกรมของน้ำมะนาวพันธุ์ตาสีตินั้นมีจำนวนพีคและพื้นที่ใต้กราฟโดยรวมอยู่ระหว่างพันธุ์แป้นพิจิตร และกลุ่มพันธุ์แป้นรำไพและแป้นพวง

โดยสารระเหยง่ายที่วิเคราะห์ได้จากโครมาโทแกรมนั้นแสดงในตารางที่ 4.3 น้ำมะนาวพันธุ์แป้นรำไพมีปริมาณสารระเหยง่ายมากที่สุด (91.68 ppm) ตามด้วยแป้นพวง (87.47 ppm), ตาสีติ (66.90 ppm) และแป้นพิจิตร (12.16 ppm) ตามลำดับ สารระเหยง่ายที่วิเคราะห์ได้ทั้งหมดมี 29 ชนิด ได้แก่ monoterpene hydrocarbons 8 ชนิด, sesquiterpene hydrocarbons 13 ชนิด, alcohols 4 ชนิด, aldehydes 3 ชนิด, และ terpene ester 1 ชนิด สารระเหยง่ายที่พบมากที่สุดคือน้ำมะนาวคั้นสดทุกตัวอย่างคือ D-limonene ซึ่งมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 10.13 - 34.48 ppm ตามด้วย γ -terpinene ซึ่งมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.28 - 16.03 ppm โดยสารระเหยง่ายที่พบในน้ำมะนาวนี้ มีองค์ประกอบคล้ายกับสารระเหยง่ายที่พบในน้ำเลมอน (Rouseff & Perez-Cacho, 2007) Allegrone และคณะรายงานว่าสารระเหยง่ายที่พบมากที่สุดคือน้ำเลมอน 4 พันธุ์ ได้แก่ ‘Verdello Siracusano’, ‘Interdonato’, ‘Primo Fiore Capo d’Orlando’, และ ‘Femminello Siracusano’ คือ limonene ตามด้วย γ -terpinene และยังพบสารระเหยง่ายอื่นๆ ในกลุ่ม monoterpene hydrocarbons, sesquiterpene hydrocarbons, alcohols, aldehydes และ esters (Allegrone et al., 2006) นอกจากนี้สารระเหยง่ายที่พบในน้ำมะนาวนั้นยังมีหลายชนิดที่คล้ายคลึงกับสารระเหยง่ายที่พบในเปลือกและใบมะนาวอีกด้วย ได้แก่ limonene, γ -terpinene, β -pinene, β -ocimene, terpinolene, α -citral, β -citral, linalool, α -bisabolene และ β -bisabolene ถึงแม้ว่าสารระเหยง่ายที่พบในน้ำ

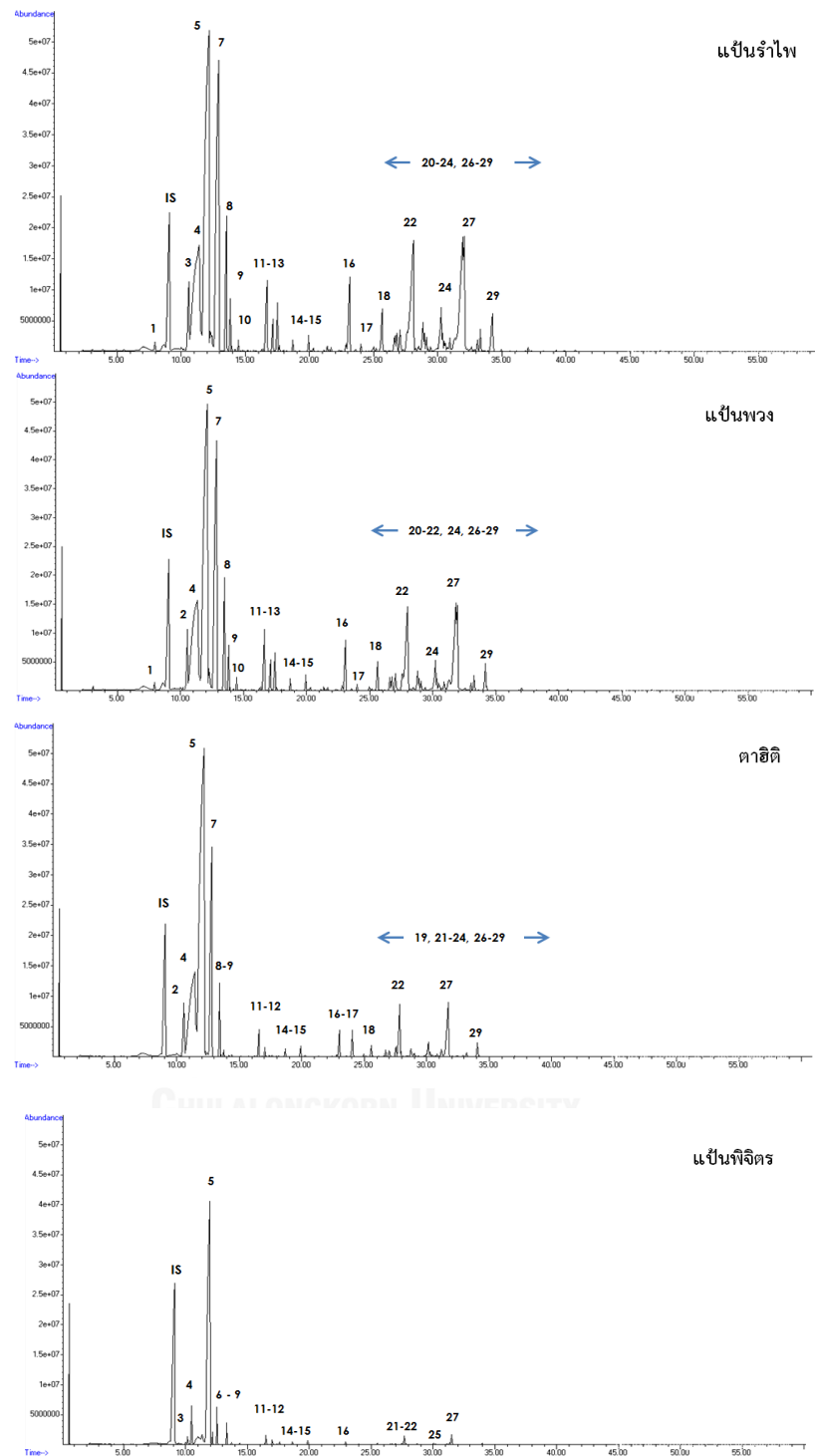
เปลือก และใบมะนาวนั้นจะเป็นสารระเหยง่ายชนิดเดียวกัน แต่อัตราส่วนของปริมาณสารระเหยง่ายในส่วนต่างๆ ของมะนาวมีค่าแตกต่างกัน เช่น ในมะนาวพันธุ์ *Citrus latifolia* Tanaka พบอัตราส่วนของ limonene ในน้ำ เปลือก และใบ เป็น 1.2: 1: 1.2 และ γ -terpinene ในน้ำ เปลือก และใบ เป็น 55: 86: 1 ตามลำดับ (Lota, de Rocca Serra, Tomi, Jacquemond, & Casanova, 2002)

จากแผนภาพในรูปที่ 4.5 พบว่าสารระเหยง่ายที่วิเคราะห์ได้มีทั้งหมด 29 ชนิด โดยมีสารระเหยง่าย 13 ชนิดที่พบในน้ำมะนาวทุกพันธุ์ สารระเหยง่ายที่พบร่วมกันในน้ำมะนาวพันธุ์แป้นรำไพและแป้นพวงมี 24 ชนิด รองลงมาคือสารระเหยง่ายในน้ำมะนาวพันธุ์แป้นพิจิตรและตาดิถีพบร่วมกัน 21 ชนิด โดยน้ำมะนาวพันธุ์แป้นพิจิตรพบสารระเหยง่ายร่วมกับน้ำมะนาวพันธุ์แป้นรำไพและแป้นพวงเพียง 14 ชนิดเท่านั้น สารระเหยง่ายที่พบเฉพาะในน้ำมะนาวพันธุ์แป้นรำไพและแป้นพวงมี 5 ชนิด ได้แก่ β -thujene, fenchol, decanal, γ -selinene, germacrene B และสารระเหยง่ายที่พบเฉพาะในน้ำมะนาวพันธุ์แป้นรำไพและตาดิถีมี 1 ชนิด ได้แก่ β -famesene นอกจากนี้สารระเหยที่พบเฉพาะในน้ำมะนาวแป้นพิจิตรมี 2 ชนิด ได้แก่ β -ocimene และ α -farnesene และสารระเหยที่พบเฉพาะในน้ำมะนาวตาดิถีมี 1 ชนิดคือ caryophyllene จึงอาจใช้ β -ocimene และ α -farnesene ในน้ำมะนาวพันธุ์แป้นพิจิตรและ caryophyllene ในน้ำมะนาวพันธุ์ตาดิถีเป็นสารที่มีแนวโน้มเป็นไบโอมาร์คเกอร์ (potential biomarker) ของน้ำมะนาวทั้ง 2 พันธุ์ได้

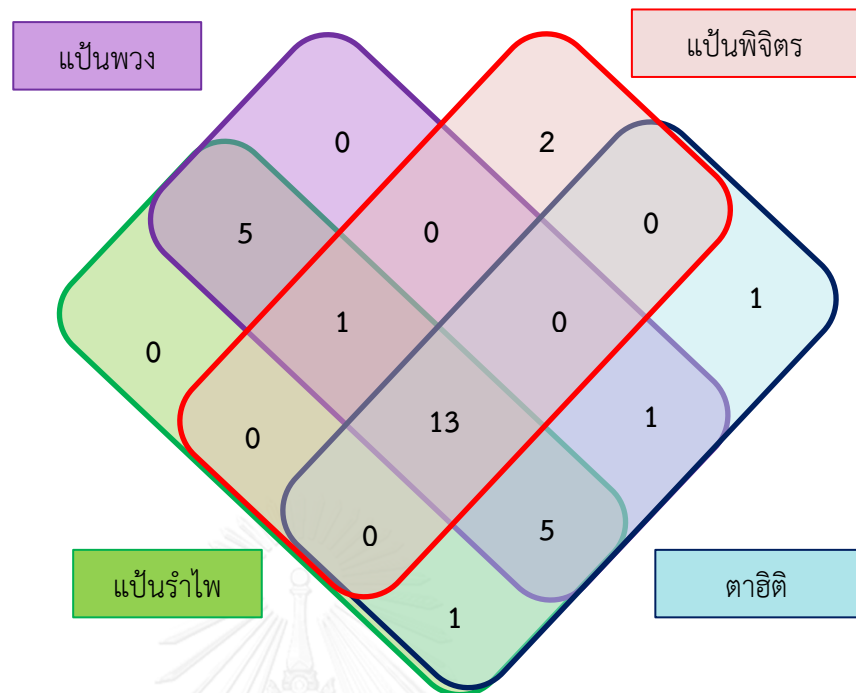
จากผลการทดลองในหัวข้อ 4.2. ผลของอุณหภูมิและระยะเวลาการเก็บรักษาต่อองค์ประกอบและปริมาณของสารระเหยง่ายในน้ำมะนาวคั้นสด ด้วยวิธี SPME/GC-MS เมื่อเปรียบเทียบชนิดและปริมาณของสารระเหยง่ายในน้ำมะนาวพันธุ์แป้นรำไพ (ตารางที่ 4.2) กับผลการทดลองที่ได้จากหัวข้อ 4.3.1. ซึ่งวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารระเหยง่ายด้วยวิธี dynamic headspace/GC-MS (ตารางที่ 4.3) พบว่า ปริมาณสารระเหยง่ายที่พบในการสกัดด้วยวิธี SPME มีปริมาณมากกว่าการสกัดด้วยวิธี dynamic headspace เช่น ปริมาณ γ -terpinene เมื่อสกัดด้วยวิธี HS-SPME/GC-MS มีปริมาณ 78.97 ppm แต่เมื่อสกัดด้วยวิธี dynamic headspace/GC-MS พบว่ามีปริมาณ 16.03 ppm ซึ่งอาจเป็นผลมาจากสารดูดซับบนไฟเบอร์ของ SPME ชนิด DVB/CAR/PDMS ซึ่งมีความสามารถในการดูดซับ

สารระเหยง่ายทั้งแบบมีขี้และไม่มีขี้ (Shirey, 2012) ซึ่งเป็นสารกลุ่มที่พบในผลไม้ตระกูลส้ม เช่น limonene, γ -terpinene, β -pinene, β -ocimene, terpinolene, linalool, α -bisabolene และ β -bisabolene เป็นต้น จึงสามารถดูดซับสารระเหยง่ายได้ดีกว่าตัวดูดซับบน Tenax TA ซึ่งเหมาะการดูดซับสารระเหยง่ายกลุ่มที่มีขี้ เช่น แอลกอฮอล์ (Hübschmann, 2009) ดังนั้น สารระเหยง่ายในน้ำมันาวที่สกัดด้วยวิธี SPME โดยใช้ไฟเบอร์แบบ DVB/CAR/PDMS จึงมีชนิดและปริมาณมากกว่าสารระเหยง่ายที่สกัดด้วยวิธี dynamic headspace ที่ใช้ Tenax TA เป็นตัวดูดซับ





รูปที่ 4.4 ตัวแทนโครมาโทแกรมของน้ำมันาวคั่นสด 4 พันธุ์



รูปที่ 4.5 จำนวนชนิดของสารระเหยง่ายที่พบในน้ำมะนาวพันธุ์ต่างๆ

ตารางที่ 4.3 ชนิด, ปริมาณสารระเหยง่ายให้กลิ่นและค่า odor activity value ของน้ำมันจากวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS

No.	Compounds ^a	LRI	Threshold value ^b (ppm)	น้ำมันรำไพ		แป้งพวง		แป้งพิจิตร		คาอิติ		Odor ^b
				Conc. (ppm)	OAV	Conc. (ppm)	OAV	Conc. (ppm)	OAV	Conc. (ppm)	OAV	
1	β -thujene	927	-	0.38	-	0.56	-	-	-	-	-	sweet, balsamic ²
2	β -pinene	994	1.5 ²	-	-	1.66	1.11	-	-	1.80	1.20	terpenic, woody ¹
3	β -myrcene	991	0.1 ³	1.96	19.60	-	-	0.42	4.20	-	-	sweet, balsamic ²
4	limonene	1019	1.2 ³	12.47	10.39	13.47	11.23	0.48	0.40	12.57	10.47	citrus, terpenic ¹
5	β -ocimene	1046	0.034 ²	-	-	-	-	0.08	2.35	-	-	green, terpenic ¹
6	D-limonene	1047	1 ³	30.47	30.47	28.35	28.35	10.13	10.13	34.48	34.48	citrus, terpenic ¹
7	γ -terpinene	1072	0.6 ³	16.03	26.72	14.75	24.58	0.28	0.47	7.87	13.12	citrus, herbaceous ²
8	terpinolene	1093	0.041 ²	2.58	62.93	2.44	59.51	0.17	4.15	1.16	28.29	lime, terpenic ¹
Monoterpene Hydrocarbon (ppm)				63.89		61.23		11.56		57.88		

^a สารระเหยได้จากการเทียบฐานข้อมูลแมสสเปกโตรเมทรี และการเปรียบเทียบค่า LRI (Linear Retention Index)

^b ข้อมูลจากงานวิจัยที่ดูถูกนำมาอ้างอิง ได้แก่ ค่า Threshold value ของสารระเหยง่ายในน้ำ และลักษณะกลิ่นของสารระเหยง่าย

[1] (Cheong, Liu, Zhou, Curran, & Yu, 2012)

[2] (Mookdasanit et al., 2003)

[3] (Padrayuttawat, Yoshizawa, Tamura, & Tokunaga, 1997)

[4] (Rodriguez et al., 2017)

[5] (Selli & Kelebek, 2011)

ตารางที่ 4.3 ชนิด, ปริมาณสารระเหยง่ายให้กลิ่นและค่า odor activity value ของน้ำมันหอมระเหยที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS (ต่อ)

No.	Compounds ^a	Group	LRI	Threshold value ^b (ppm)	เป็นรำไพ		เป็นพวง		เป็นพิจิตร		ตกฉัตร		Odor ^b	
					Conc. (ppm)	OAV	Conc. (ppm)	OAV	Conc. (ppm)	OAV	Conc. (ppm)	OAV		
9	linalool	Alcohol (4)	1104	0.007 ³	0.90	128.57	0.83	118.57	0.03	4.29	0.10	14.29	floral, woody ¹	
10	fenchol		1122	-	0.11	-	0.13	-	-	-	-	-	-	
11	terpinen-4-ol		1187	1.3 ³	1.89	1.45	1.86	1.43	0.10	0.08	0.55	0.42	0.42	floral, fresh ⁵
12	α -terpineol		1200	6.8 ³	0.54	0.08	0.57	0.08	0.05	0.01	0.16	0.02	0.02	green, violet ⁵
Alcohol (ppm)					3.44		3.39		0.18		0.81			
13	decanal	Aldehyde (3)	1209	0.03 ³	0.98	32.67	0.90	30.00	-	-	-	-	peel-like, penetrating ²	
14	β -citral		1238	1.23 ⁴	0.15	0.12	0.15	0.12	0.04	0.03	0.15	0.12	0.12	fresh, lemon ¹
15	α -citral		1268	1.23 ⁴	0.25	0.20	0.26	0.21	0.06	0.05	0.23	0.19	0.19	fresh, lemon ¹
Aldehyde (ppm)					1.38		1.31		0.10		0.38			
17	nerol acetate	ester	1357	-	0.13	-	0.14	-	-	-	-	-	fresh, rosy ¹	

^a สารระเหยได้จากการแยกฐานข้อมูลแมสสเปกโตรเมทรี และการเปรียบเทียบค่า LRI (Linear Retention Index)

^b ข้อมูลจากงานวิจัยที่ถูกลำดับมาข้างต้น ได้แก่ ค่า Threshold value ของสารระเหยง่ายในน้ำ และลักษณะกลิ่นของสารระเหยง่าย

[1] (Cheong et al., 2012)

[2] (Mookdasanit et al., 2003)

[3] (Padrayuttawat et al., 1997)

[4] (Rodriguez et al., 2017)

[5] (Selli & Kelebek, 2011)

ตารางที่ 4.3 ชนิด, ปริมาณสารระเหยง่ายให้กลิ่นและค่า odor activity value ของน้ำมันหอมระเหยที่ตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS (ต่อ)

No.	Compounds ^a	Group	LRI	Threshold value ^b (ppm)	เข้มข้นไฟ		เข้มข้น		เข้มข้น		ค่าสถิติ		Odor ^b
					Conc. (ppm)	OAV	Conc. (ppm)	OAV	Conc. (ppm)	OAV	Conc. (ppm)	OAV	
16	δ -elemene	Sesquiterpene Hydrocarbon (13)	1338	-	1.87	-	1.66	-	0.03	-	0.57	-	balsamic, mild woody ¹
18	β -elemene		1391	-	0.92	-	0.79	-	-	-	0.25	-	-
19	caryophyllene		1418	0.15 ²	-	-	-	-	-	-	0.20	1.33	spicy, woody ¹
20	α -gurjunene		1419	-	0.50	-	0.52	-	-	-	-	-	-
21	γ -elemene		1430	-	0.72	-	0.76	-	0.02	-	0.27	-	-
22	α -bergamotene		1438	-	5.65	-	5.16	-	0.11	-	1.88	-	-
23	β -famesene		1455	0.087 ²	0.54	6.21	-	-	-	-	0.24	2.67	fresh, floral ²
24	D-germacrene		1482	-	1.41	-	1.39	-	-	-	0.47	-	hay, woody ¹
25	α -famesene		1503	0.087 ²	-	-	-	-	0.02	0.00	-	-	citrus, herbaceous ¹
26	cis- α -bisabolene		1503	-	0.68	-	0.73	-	-	-	0.24	-	-
27	β -bisabolene		1513	-	8.92	-	8.90	-	0.14	-	2.65	-	-
28	γ -selinene		1541	-	0.39	-	0.39	-	-	-	-	-	-
29	germacrene B		1558	-	1.24	-	1.10	-	-	-	0.32	-	-
Sesquiterpene Hydrocarbon (ppm)					22.84		21.4		0.32		7.09		
Total (ppm)					91.68		87.47		12.16		66.9		

^a สารระเหยได้จากการแยกด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี และการเปรียบเทียบค่า LRI (Linear Retention Index)

^b ข้อมูลจากงานวิจัยที่ดูน้ำมันอ้างอิง ได้แก่ ค่า Threshold value ของสารระเหยง่ายในน้ำ และลักษณะกลิ่นของสารระเหยง่าย

[1] (Cheong et al., 2012)

[2] (Mookdasanit et al., 2003)

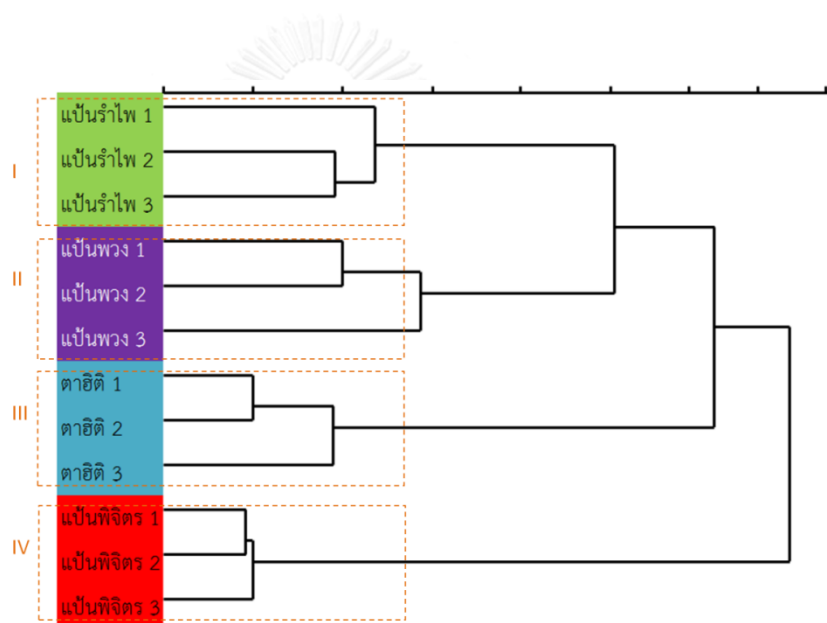
[3] (Padryuttawat et al., 1997)

[4] (Rodriguez et al., 2017)

[5] (Selli & Kelebek, 2011)

4.3.2 การวิเคราะห์สสารระเหยง่ายในน้ำมะนาวคั้นสด 4 พันธุ์ด้วยวิธีเคโมเมตริก

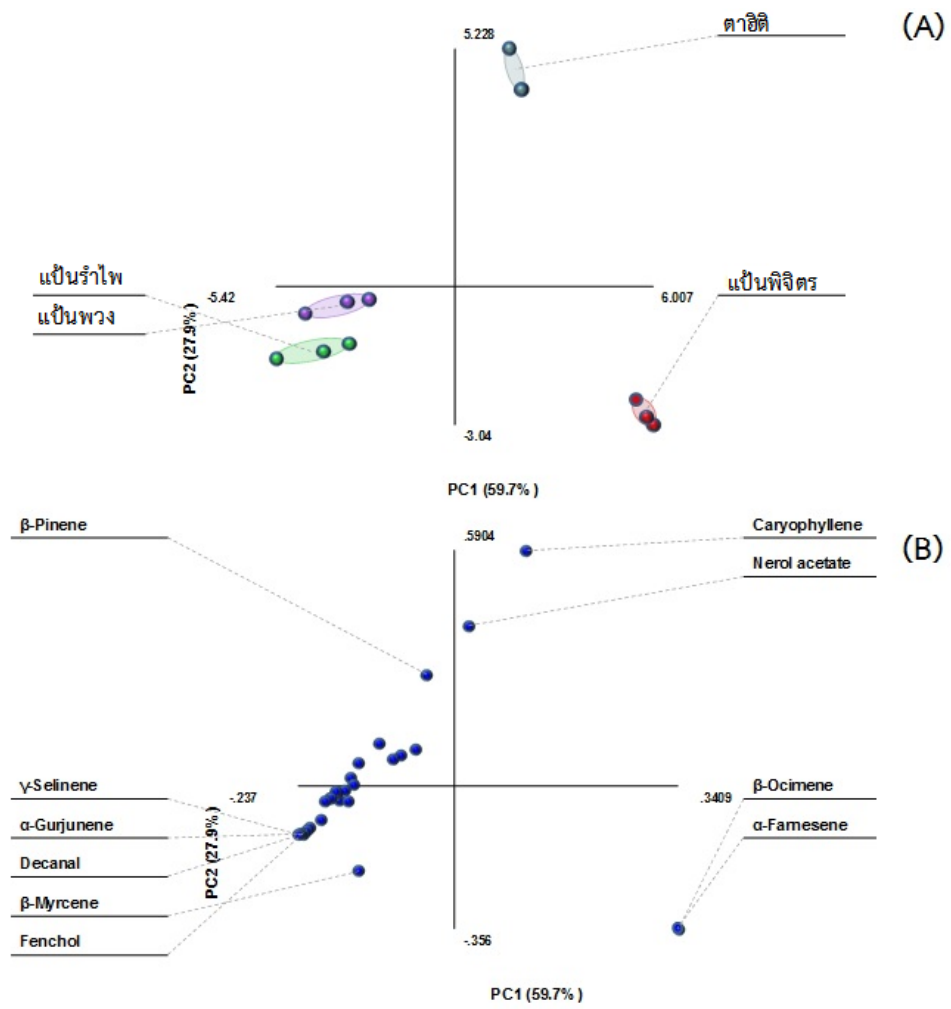
Hierarchical cluster analysis (HCA) เป็นวิธีการวิเคราะห์จัดกลุ่มตามความเหมือนของข้อมูล จากเดนโดแกรม โดยแสดงตัวอย่างที่ต้องการจัดกลุ่มมะนาวแต่ละพันธุ์ และระยะห่างตามความเหมือนของข้อมูลพบว่า สสารระเหยง่ายในน้ำมะนาวคั้นสดสามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่มตามพันธุ์ ได้แก่ (I) แปนรำไพ (II) แปนพวง (III) ตาฮิติ และ (IV) แปนพิจิตร ดังแสดงในเดนโดแกรม (รูปที่ 4.6) โดยกลุ่มที่มีระยะตามแนวแกน y ใกล้กันมากที่สุดคือ พันธุ์แปนรำไพและแปนพวง ซึ่งแสดงถึงความคล้ายกันของมะนาวทั้งสองพันธุ์มากกว่าพันธุ์อื่นๆ โดยกลุ่มของแปนรำไพและแปนพวงมีความคล้ายกับพันธุ์ตาฮิติเป็นลำดับถัดมา



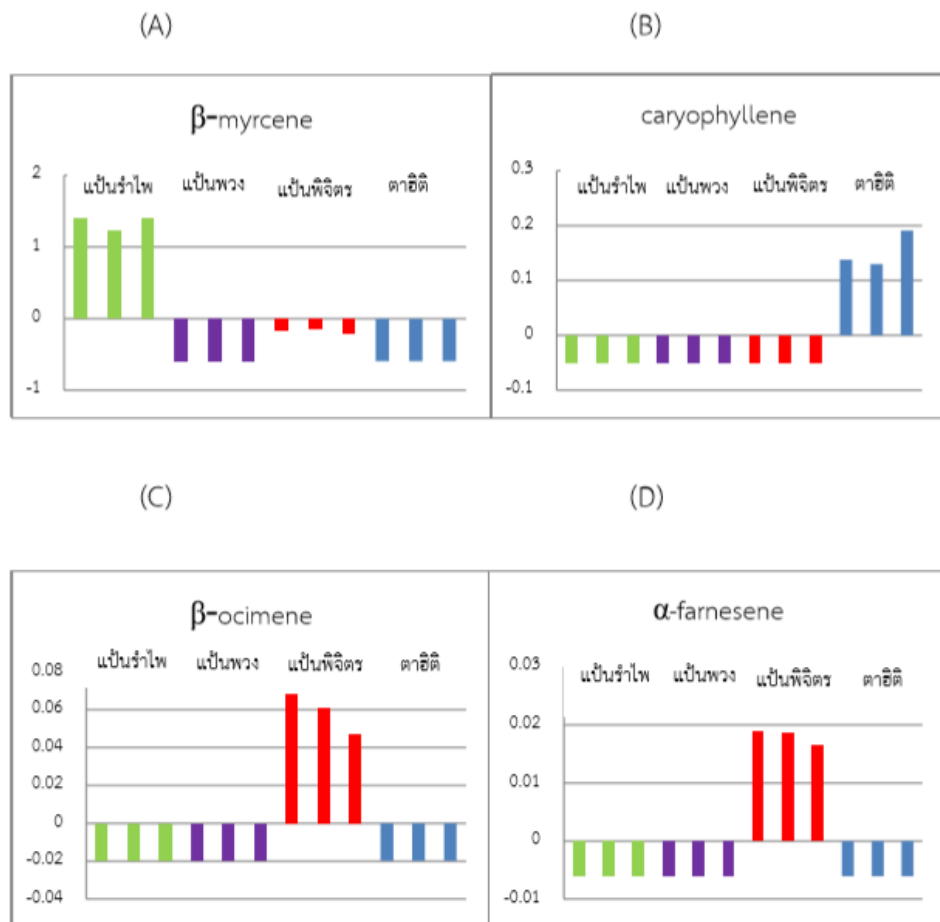
รูปที่ 4.6 เดนโดแกรมของ HCA ของน้ำมะนาวคั้นสด 4 พันธุ์

จากการวิเคราะห์ด้วย PCA โดยใช้ข้อมูลปริมาณสารระเหยให้กลิ่นซึ่งคำนวณจากพื้นที่ใต้กราฟของสารระเหยแต่ละชนิด โดยวิเคราะห์ข้อมูลจาก 12 โครมาโทแกรมของน้ำมะนาวคั้นสด 4 พันธุ์ พบว่า PC1 และ PC2 มีค่าความแปรปรวนของข้อมูลทั้งหมด 87.6% (59.7% และ 27.9% ตามลำดับ) จาก score plot (รูปที่ 4.7A) สามารถแบ่งตัวอย่างน้ำมะนาวออกได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มแปนรำไพและแปนพวง, กลุ่มตาฮิติ และกลุ่มแปนพิจิตร ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลจาก HCA น้ำมะนาวพันธุ์แปนรำไพมีความคล้ายคลึง

กับน้ำมันหอมระเหยพันธุ์แป้นพวงมากที่สุด และมีความแตกต่างจากน้ำมันหอมระเหยพันธุ์แป้นพิจิตรและ ตาฮิติอย่างชัดเจน จาก loading plot (รูปที่ 4.7B) พบว่า β -myrcene มีแนวโน้มที่พบมาก ในน้ำมันหอมระเหยพันธุ์แป้นรำไพ ซึ่งสารระเหยง่ายนี้ให้ลักษณะกลิ่นเฉพาะคือกลิ่น sweet และ กลิ่น balsamic ดังนั้น β -myrcene จึงเป็นสารที่มีแนวโน้มเป็นสารระเหยง่ายให้กลิ่นสำคัญของ น้ำมันหอมระเหยพันธุ์แป้นรำไพ แม้ว่า β -myrcene จะพบในน้ำมันหอมระเหยพันธุ์แป้นพิจิตรและ แป้นรำไพ แต่ปริมาณ β -myrcene ที่พบในพันธุ์แป้นพิจิตรมีค่าน้อยกว่าพันธุ์แป้นรำไพถึง 5 เท่า นอกจากนี้ สาร caryophyllene มีความสัมพันธ์กับน้ำมันหอมระเหยตาฮิติ โดยสารนี้ให้กลิ่น spicy และ กลิ่น woody และสาร β -ocimene ซึ่งเป็นสารที่ให้กลิ่น green และกลิ่น terpenic และ α -farnesene ซึ่งเป็นสารที่ให้กลิ่น citrus และ กลิ่น herbaceous มีความสัมพันธ์กับมะนาวแป้นพิจิตร (Cheong, Liu, Zhou, Curran, & Yu, 2012; Mookdasanit et al., 2003) ซึ่งจากแผนภาพ mean centering แสดงให้เห็นว่าปริมาณ β -myrcene ในน้ำมันหอมระเหยพันธุ์แป้นรำไพมีค่าสูงกว่าพันธุ์อื่น (รูปที่ 4.8A) caryophyllene มี ปริมาณสูงที่สุดในน้ำมันหอมระเหยตาฮิติ (รูปที่ 4.8B) และ β -ocimene และ α -farnesene มี ปริมาณสูงที่สุดในน้ำมันหอมระเหยพันธุ์แป้นพิจิตร (รูปที่ 4.8 C และ D)



รูปที่ 4.7 Principal component analysis (PCA) ของน้ำมันหอมระเหยพันธุ์ต่างๆ (A) และสารระเหยง่าย (B)



รูปที่ 4.8 Mean centering ของ β -myrcene (A) caryophyllene (B)
 β -ocimene (C), α -farnesene (D)

4.3.3 การวิเคราะห์สารระเหยง่ายให้กลิ่นสำคัญในน้ำมะนาวคั้นสด 4 พันธุ์

จากการศึกษาวิจัยสารระเหยง่ายให้กลิ่นสำคัญในน้ำมะนาวนั้นพิจารณาจากค่า OAV (Odor activity value) ซึ่งได้จากการคำนวณจากสัดส่วนความเข้มข้นของสารระเหยง่ายและค่า odor detection threshold ของสารนั้นๆ โดยหากสารระเหยง่ายชนิดใดมีค่า OAV มากกว่า 1 สารนั้นมีแนวโน้มเป็นสารระเหยง่ายให้กลิ่นสำคัญที่เป็นองค์ประกอบหลักในน้ำมะนาว

จากตารางที่ 4.3 และ รูปที่ 4.9 พบว่า น้ำมะนาวพันธุ์แป้นรำไพและแป้นพวงมีองค์ประกอบของสารระเหยง่ายให้กลิ่นสำคัญ และปริมาณใกล้เคียงกันมากที่สุดโดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สัน (Pearson Correlation Coefficient: r) ของทั้ง 2 พันธุ์เข้าใกล้ 1 สารระเหยง่ายให้กลิ่นสำคัญที่มีค่า OAV สูงสุดในน้ำมะนาวพันธุ์แป้นรำไพและแป้นพวง ได้แก่ linalool (OAV=128.57 และ 118.57), terpinolene (OAV=62.93 และ 59.51) และ decanal (OAV=32.67 และ 30.00) ตามลำดับ โดยเป็นสารระเหยง่ายให้กลิ่นสำคัญที่พบมากเฉพาะในกลุ่มน้ำมะนาวพันธุ์แป้นรำไพและแป้นพวงเท่านั้น ได้แก่ decanal (ให้กลิ่น peel-like และ กลิ่น penetrating) และ terpinen-4-ol (OAV= 1.45 และ 1.43) (ให้กลิ่น floral และ กลิ่น fresh) (ค่านิยามของลักษณะกลิ่นแสดงในภาคผนวก ตารางที่ จ.1)

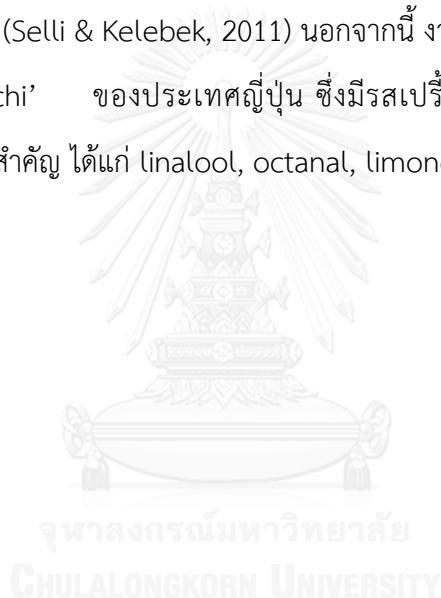
แม้สารระเหยในน้ำมะนาวพันธุ์แป้นรำไพและแป้นพวงนั้นมีองค์ประกอบสารระเหยง่ายให้กลิ่นสำคัญใกล้เคียงกัน แต่ β -myrcene (OAV=19.60) (ให้กลิ่น sweet และ กลิ่น balsamic) พบในน้ำมะนาวพันธุ์แป้นรำไพ และ β -famesene (OAV=6.21) (ให้กลิ่น fresh และกลิ่น floral) พบในน้ำมะนาวพันธุ์แป้นรำไพและพันธุ์ตาสีติ สารทั้ง 2 ชนิดนี้ไม่พบในแป้นพวง ดังนั้นน้ำมะนาวพันธุ์แป้นรำไพจึงมีลักษณะกลิ่นที่แตกต่างจากน้ำมะนาวพันธุ์แป้นพวง ได้แก่ กลิ่น sweet, กลิ่น balsamic, กลิ่น fresh และ กลิ่น floral

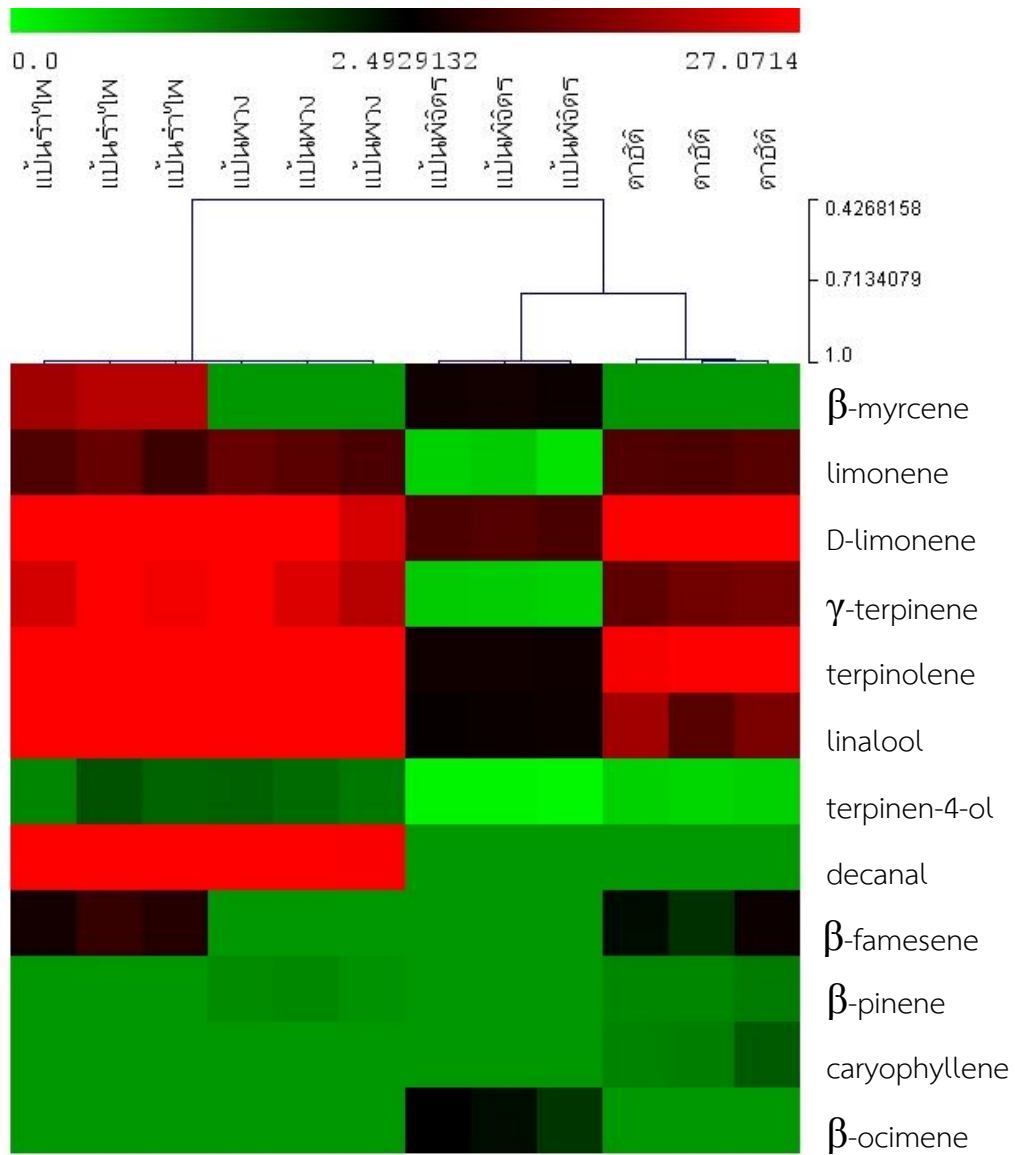
สารระเหยง่ายให้กลิ่นสำคัญในน้ำมะนาวพันธุ์แป้นพิจิตร ได้แก่ D-limonene (OAV=10.13), linalool (OAV=4.29), β -myrcene (OAV=4.20) โดยสารระเหยง่ายให้กลิ่นสำคัญที่พบมากเฉพาะในกลุ่มน้ำมะนาวพันธุ์แป้นพิจิตรเท่านั้น คือ β -ocimene (OAV=2.35) ให้ลักษณะกลิ่น green และ กลิ่น terpenic โดยค่า OAV ของสารระเหยง่ายในมะนาวพันธุ์แป้นพิจิตรมีค่าต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์อื่นๆ

สารระเหยง่ายให้กลิ่นสำคัญในน้ำมะนาวพันธุ์ตาสีติ ได้แก่ D-limonene (OAV=34.48), terpinolene (OAV=28.29) และ linalool (OAV=14.29) นอกจากนี้ สารระเหยง่ายให้กลิ่นสำคัญ

ที่พบเฉพาะมะนาวพันธุ์ตาคิคือ caryophyllene (OAV=1.33) ให้ลักษณะกลิ่น spicy และ กลิ่น woody

สารระเหยง่ายให้กลิ่นสำคัญ (OAV \geq 1) ในน้ำมะนาวทุกพันธุ์ ได้แก่ D-limonene (กลิ่น citrus และ กลิ่น terpenic), terpinolene (กลิ่น lime และ กลิ่น terpenic) และ linalool (กลิ่น floral และ กลิ่น woody) ซึ่งลักษณะดังกล่าวเป็นกลิ่นที่พบได้ทั่วไปในมะนาวทุกพันธุ์ โดย D-limonene และ linalool เป็นสารระเหยง่ายให้กลิ่นสำคัญที่พบในผลไม้ตระกูลส้มหลายชนิด เช่น งานวิจัยที่มีการศึกษาสารระเหยให้กลิ่นในน้ำส้มสีเลือด (blood orange juice) 2 พันธุ์ พบว่า limonene เป็นสารระเหยที่มีค่า OAV สูงสุด ตามด้วย nootkatone (ให้กลิ่น citrusy, grapefruit) และ linalool ตามลำดับ (Selli & Kelebek, 2011) นอกจากนี้ งานวิจัยศึกษาสารระเหยง่ายให้กลิ่นสำคัญในส้ม 'Sudachi' ของประเทศญี่ปุ่น ซึ่งมีรสเปรี้ยวและนิยมใช้ในการปรุงอาหาร พบสารระเหยง่ายให้กลิ่นสำคัญ ได้แก่ linalool, octanal, limonene และ terpinolene





รูปที่ 4.9 Heat map ของสารระเหยง่ายที่มี OAV \geq 1

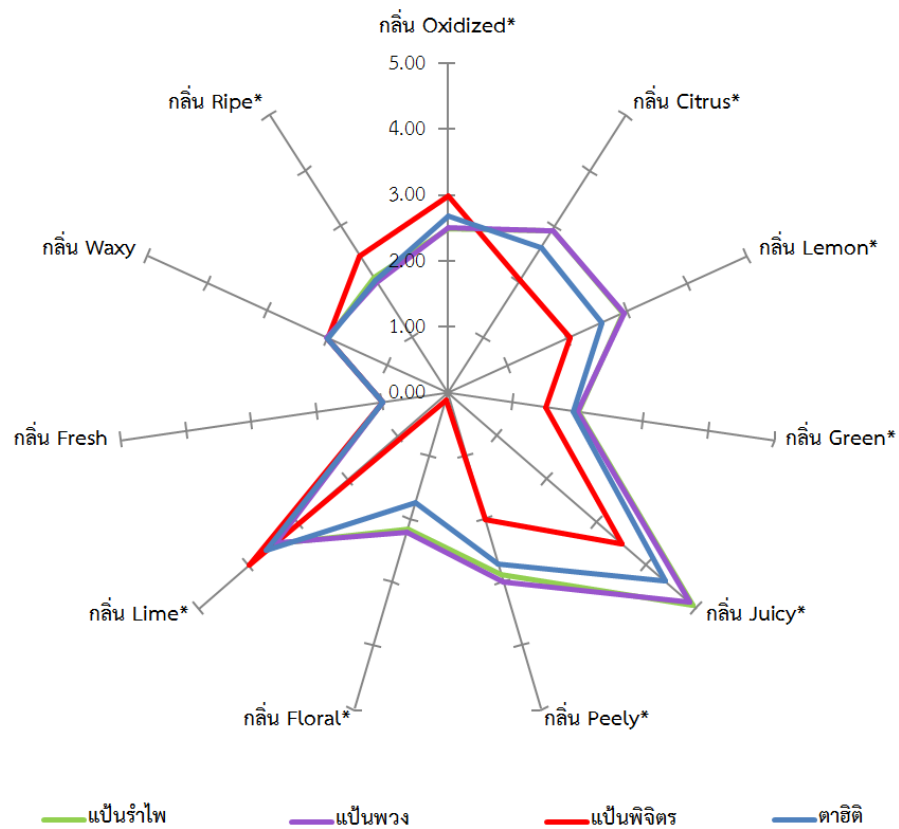
4.3.4 การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสเชิงพรรณนา

การทดสอบเพื่อวิเคราะห์หาลักษณะทางประสาทสัมผัสเชิงพรรณนา (descriptive analysis) โดยผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝน 8 คน พบลักษณะเฉพาะด้านกลิ่น 11 กลิ่นจากการทดสอบ น้ำมะนาวคั้นสดทั้ง 4 พันธุ์ ประกอบด้วยกลิ่น oxidized, กลิ่น citrus, กลิ่น lemon, กลิ่น green, กลิ่น juicy, กลิ่น peely, กลิ่น lime, กลิ่น floral, กลิ่น fresh, กลิ่น waxy, และกลิ่น ripe โดยพบว่า 9 กลิ่นมีความแตกต่างในน้ำมะนาวคั้นสด 4 พันธุ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) (ได้แก่ กลิ่น oxidized, กลิ่น citrus, กลิ่น lemon, กลิ่น green, กลิ่น juicy, กลิ่น peely, กลิ่น lime, กลิ่น floral, กลิ่น fresh, กลิ่น waxy, และกลิ่น ripe) ในขณะที่กลิ่น fresh และกลิ่น waxy ไม่พบความแตกต่างในน้ำมะนาวคั้นสด 4 พันธุ์ (ค่านิยามและความเข้มข้นของตัวอย่างอ้างอิง และค่าทางสถิติของแต่ละคุณลักษณะ แสดงในภาคผนวก ตารางที่ ข.1) น้ำมะนาวพันธุ์แป้นรำไพและแป้นพวง มีลักษณะกลิ่นที่ไม่มีความแตกต่าง โดยมีความเข้มข้นของกลิ่น citrus, กลิ่น lemon, กลิ่น green, กลิ่น juicy, กลิ่น peely และ กลิ่น floral สูงที่สุด ตามด้วยน้ำมะนาวตาฮิติ สำหรับน้ำมะนาวพันธุ์แป้นพิจิตรนั้น มีลักษณะกลิ่น oxidized, กลิ่น lime และ กลิ่น ripe สูงที่สุด และมีคุณลักษณะของกลิ่นอื่นๆ ได้แก่ กลิ่น floral, กลิ่น citrus, กลิ่น lemon, กลิ่น green, กลิ่น juicy, และกลิ่น peely ต่ำที่สุด (รูปที่ 4.10) จากการวิเคราะห์ด้วย PCA โดยใช้ข้อมูลความเข้มข้นของคุณลักษณะของกลิ่นในน้ำมะนาว (รูปที่ 4.11) PC1 และ PC2 มีค่าความแปรปรวนของข้อมูลทั้งหมด 92.8% (89.7% และ 3.1% ตามลำดับ) ซึ่งเมื่อพิจารณาร่วมกับตารางที่ 4.3 พบว่า สารระเหยง่ายที่พบเฉพาะน้ำมะนาวพันธุ์แป้นรำไพและแป้นพวงและมีค่า OAV ≥ 1 คือ terpinen-4-ol (OAV = 30 และ 32.67) ซึ่งให้ลักษณะกลิ่น floral และ กลิ่น fresh และ decanal (OAV = 1.43 และ 1.45) ซึ่งให้ลักษณะกลิ่น peel-like และ กลิ่น penetrating

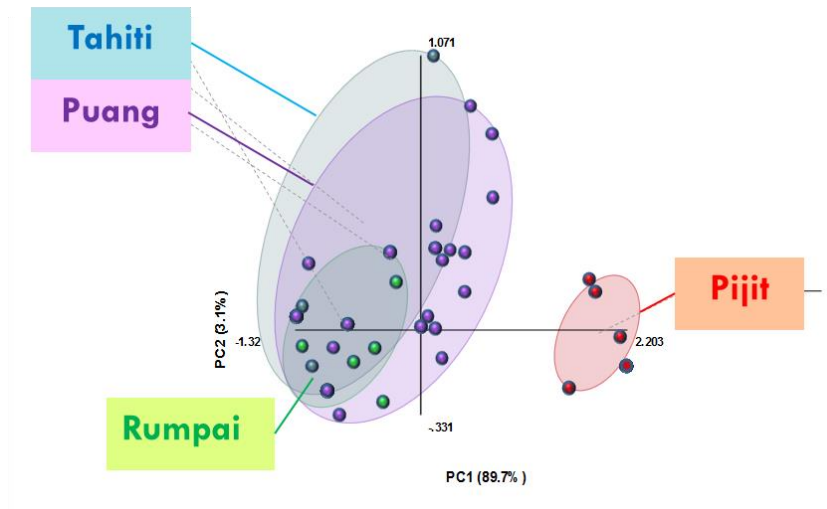
4.3.5 การทดสอบการยอมรับของผู้บริโภค

การทดสอบการยอมรับของผู้บริโภคโดยผู้ทดสอบที่มีความชำนาญด้านการทำอาหาร 117 คน ให้คะแนนความชอบ 9-point hedonic scale ในด้านกลิ่น, สี, รส และความชอบโดยรวม ซึ่งแสดงในรูปที่ 4.12 โดยน้ำมะนาวพันธุ์แป้นพวงได้รับคะแนนความชอบสูงสุดในทุกด้านอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ตามด้วยน้ำมะนาวพันธุ์แป้นรำไพ, ตาฮิติ และแป้นพิจิตร

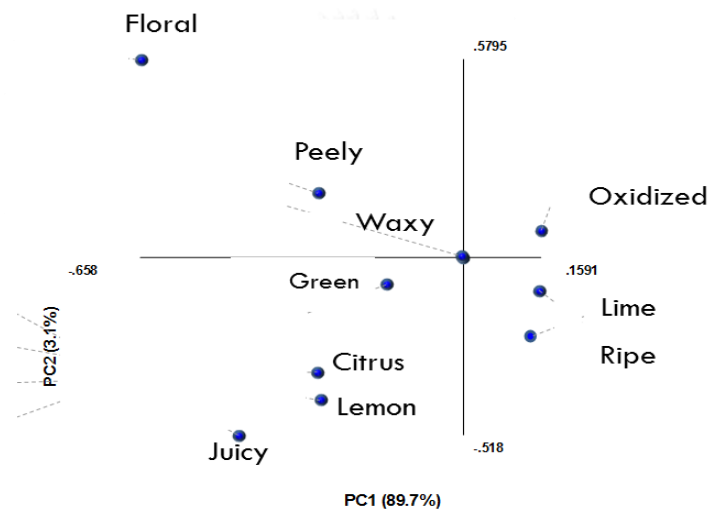
ตามลำดับ จะได้ว่า คุณลักษณะกลิ่นที่มีแนวโน้มเป็นที่พึงพอใจของผู้บริโภค ได้แก่ กลิ่น citrus, กลิ่น lemon, กลิ่น green, กลิ่น juicy, กลิ่น peely, และ กลิ่น floral



รูปที่ 4.10 กราฟใยแมงมุมคุณลักษณะด้านกลิ่น (aroma) ของมะนาว 4 พันธุ์
* ตัวอย่างน้ำมะนาวคั้นสดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

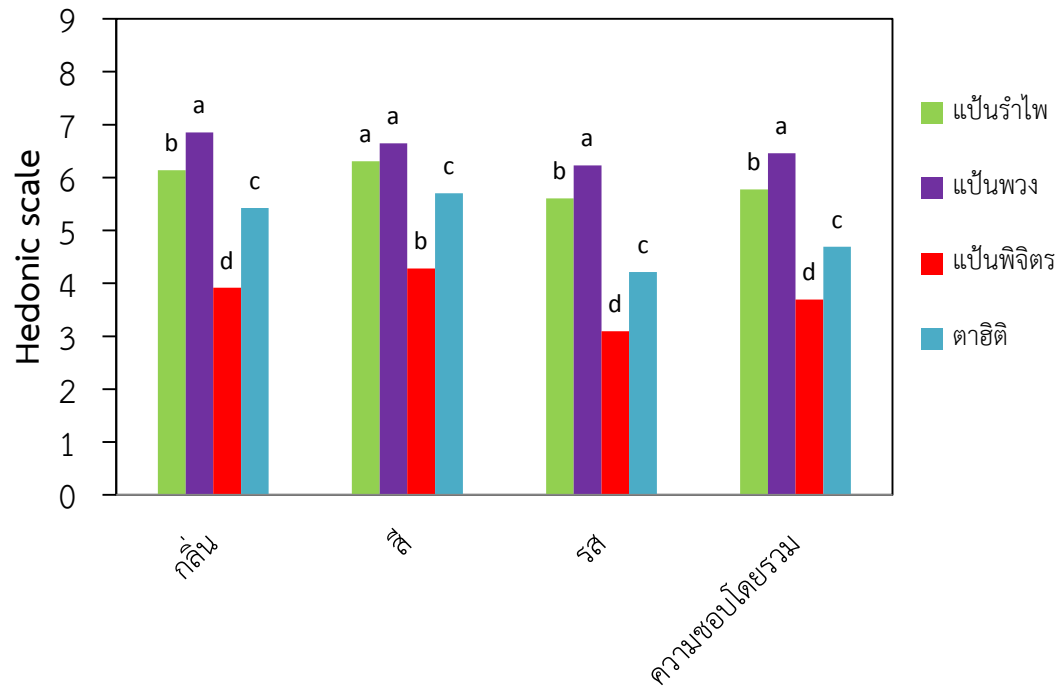


(A)



(B)

รูปที่ 4.11 Principal component analysis (PCA) ของน้ำมะนาวพันธุ์ต่างๆ (A) และลักษณะด้านกลิ่นของมะนาว 4 พันธุ์ (B)



รูปที่ 4.12 คะแนนความชอบเฉลี่ยของผู้บริโภค (n=117) น้ำมะนาวคั้นสด 4 พันธุ์

*คะแนนความชอบในแต่ละด้านอักษรที่เหมือนกันมีความแตกต่างกัน

อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

การศึกษาผลของอุณหภูมิและระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำมะนาว พบว่า การเก็บรักษาที่ 35°C นาน 6 ชั่วโมง น้ำมะนาวมีสารระเหยง่ายกลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบเพิ่มมากขึ้น เช่น α -terpineol ซึ่งก่อให้เกิดกลิ่น green และกลิ่น violet ในน้ำมะนาว ส่วนการเก็บรักษาน้ำมะนาวที่ อุณหภูมิ 4°C ตลอดการเก็บรักษานาน 12 ชั่วโมง น้ำมะนาวจะมีโดยชนิดและปริมาณสารระเหยง่าย ไม่แตกต่างจากน้ำมะนาวคั้นสด และสามารถชะลอการเปลี่ยนแปลงของสารระเหยง่ายได้ดี

การวิเคราะห์สารระเหยง่ายในน้ำมะนาว 4 พันธุ์ ได้แก่ แปนรำไพ แปนพวง แปนพิจิตร และ ตายีตีด้วยเทคนิค dynamic headspace/ GC-MS พบสารระเหยทั้งหมด 29 ชนิด โดยกลุ่มที่พบมากที่สุดคือกลุ่ม monoterpene hydrocarbons และสารที่มีปริมาณมากที่สุดในทุกพันธุ์คือ limonene น้ำมะนาวพันธุ์แปนรำไพมีปริมาณสารระเหยง่ายสูงที่สุด 91.68 ppm ตามด้วย น้ำมะนาวพันธุ์แปนพวง 87.47 ppm, น้ำมะนาวพันธุ์ตายีตี 66.90 ppm และน้ำมะนาว พันธุ์แปนพิจิตร 12.16 ppm จากการวิเคราะห์ HCA และ PCA พบว่า น้ำมะนาวพันธุ์แปนรำไพ มีชนิดและปริมาณสารระเหยง่ายใกล้เคียงกับมะนาวพันธุ์แปนพวงมากที่สุดโดยมีชนิดสารระเหยง่าย คล้ายกันถึง 24 ชนิดจาก 29 ชนิด และมีชนิดและปริมาณของสารระเหยง่ายต่างจากน้ำมะนาวพันธุ์ พิจิตรและตายีตีอย่างชัดเจน จากการวิเคราะห์ PCA และ mean centering ของสารระเหยง่าย ในน้ำมะนาวพบว่า β -myrcene ในน้ำมะนาวพันธุ์แปนรำไพ (ให้กลิ่น sweet และกลิ่น balsamic) caryophyllene ในน้ำมะนาวพันธุ์ตายีตี (ให้กลิ่น spicy และ woody) และ β -ocimene และ α -farnesene ในน้ำมะนาวพันธุ์แปนพิจิตร (ให้กลิ่น green และกลิ่น citrus) เป็นสารระเหยง่ายที่มี แนวโน้มเป็นสารระเหยง่ายให้กลิ่น (potential biomarkers) ของน้ำมะนาวพันธุ์แปนรำไพ, ตายีตี, และแปนพิจิตรได้

จากการวิเคราะห์ค่า OAV พบว่า β -ocimene ในน้ำมะนาวพันธุ์แปนพิจิตร decanal และ terpenen-4-ol ในน้ำมะนาวพันธุ์แปนรำไพและแปนพวง และ caryophyllene ในน้ำมะนาว พันธุ์ตายีตี เป็นสารระเหยง่ายให้กลิ่นสำคัญและเป็นลักษณะเฉพาะในน้ำมะนาวทั้ง 4 พันธุ์

จากการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของน้ำมะนาวพบว่า น้ำมะนาวพันธุ์แป้นรำไพ, แป้นพวง, และตาฮิติมีลักษณะกลิ่น citrus, กลิ่น lemon, กลิ่น green, กลิ่น juicy, กลิ่น peely, และกลิ่น floral โดยลักษณะกลิ่นในน้ำมะนาวพันธุ์แป้นรำไพและแป้นพวงไม่แตกต่างกันและมีความเข้มของลักษณะกลิ่นดังกล่าวสูงกว่าตาฮิติและแป้นพิจิตร ตามด้วยน้ำมะนาวตาฮิติ ซึ่งมีความเข้มของกลิ่นรองลงมา ส่วนน้ำมะนาวพันธุ์แป้นพิจิตรมีลักษณะกลิ่น oxidized, กลิ่น lime และ กลิ่น ripe สูง จากการทดสอบการยอมรับของผู้บริโภค พบว่า น้ำมะนาวพันธุ์แป้นพวงได้รับการยอมรับจากผู้บริโภคสูงที่สุดในด้านกลิ่น, สี, รสชาติ, และความชอบโดยรวม ตามด้วยน้ำมะนาวพันธุ์แป้นรำไพ, ตาฮิติ และแป้นพิจิตร ตามลำดับ

5.2 ข้อเสนอแนะ

- ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับปัจจัยด้านพื้นที่เพาะปลูก, ฤดูกาลเพาะปลูก, และเปรียบเทียบวิธีการสกัดสารระเหยง่ายต่อชนิดและปริมาณของสารระเหยง่ายในน้ำมะนาวพันธุ์ต่างๆ
- การศึกษาสารระเหยง่ายที่มีแนวโน้มเป็นสารระเหยง่ายให้กลิ่นของน้ำมะนาวนั้นจะให้ผลที่ชัดเจนขึ้นหากศึกษาอัตราส่วนของปริมาณสารระเหยง่ายในน้ำมะนาวแต่ละพันธุ์ร่วมด้วย

รายการอ้างอิง

- Akakabe, Y., Sakamoto, M., Ikeda, Y., & Tanaka, M. (2008). Identification and characterization of volatile components of the Japanese sour citrus fruit *Citrus nagato-yuzukichi* Tanaka. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 72(7), 1965-1968.
- Alavoine, F., Crochon, M., & Bouillon, C. (1990). Practical methods to estimate taste quality of fruit: how to tell it to the consumer. *Acta Horticulturae*, 259, 61-68.
- Allegrone, G., Belliardo, F., & Cabella, P. (2006). Comparison of volatile concentrations in hand-squeezed juices of four different lemon varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 1844-1848.
- Amador, J. R. (2011). Juice analysis. In J. R. Amador (Ed.), *Procedures for analysis of citrus products* (6 ed., pp. 24). USA: John Bean Technologies Corporation, Inc.
- Averbeck, M., & Schieberle, P. H. (2009). Characterisation of the key aroma compounds in a freshly reconstituted orange juice from concentrate. *European Food Research and Technology*, 229(4), 611-622.
- Barboni, T., Luro, F., Chiaramonti, N., Desjobert, J.-M., Muselli, A., & Costa, J. (2009). Volatile composition of hybrids Citrus juices by headspace solid-phase micro extraction/gas chromatography/mass spectrometry. *Food Chemistry*, 116(1), 382-390. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.031>
- Cajka, T., & Hajslova, J. (2011). Volatile compounds in food authenticity and traceability testing *Food Flavors* (pp. 355-412): CRC Press.
- Cheong, M. W., Liu, S. Q., Zhou, W., Curran, P., & Yu, B. (2012). Chemical composition and sensory profile of pomelo (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) juice. *Food Chemistry*, 135(4), 2505-2513. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.012>
- Christensen, L. P., Edelenbos, M., & Kreuzmann, S. (2007). Fruits and vegetables of moderate climate. In R. G. Berger (Ed.), *Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability* (pp. 135-187). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

- Clark Jr, B. C., & Chamblee, T. S. (1992). Acid-catalyzed reactions of citrus oils and other terpene-containing flavors. In G. Charalambous (Ed.), *Developments in food science: off-flavors in foods and beverages* (Vol. 28, pp. 229-285): Elsevier.
- Comelli, N., Avila, M. C., Volzone, C., & Ponzi, M. (2013). Hydration of α -pinene catalyzed by acid clays. *Central European Journal of Chemistry*, 11(5), 689-697.
- Danuta, K., & Anna, W. (2011). Essential oils and spices. In H. Jelen (Ed.), *Food Flavors* (pp. 193-222): CRC Press.
- Delort, E., Jaquier, A., Decorzant, E., Chapuis, C., Casilli, A., & Frérot, E. (2015). Comparative analysis of three Australian finger lime (*Citrus australasica*) cultivars: Identification of unique citrus chemotypes and new volatile molecules. *Phytochemistry*, 109, 111-124.
- Hajšlová, J., & Čajka, T. (2007). Gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS). In Y. Pico (Ed.), *Food Toxicants Analysis* (pp. 419-473): Elsevier.
- Hübschmann, H. J. (2009). *Handbook of GC/MS fundamentals and applications* (Vol. 45). Germany: Wiley-VCH, Weinheim.
- Jolliffe, I. T. (2002). *Principal component analysis* (2 ed.). United States of America: Springer.
- Karlberg, A. T., Magnusson, K., & Nilsson, U. (1992). Air oxidation of *d*-limonene (the citrus solvent) creates potent allergens. *Contact Dermatitis*, 26(5), 332-340.
- Kuljarachanan, T., Devahastin, S., & Chiewchan, N. (2009). Evolution of antioxidant compounds in lime residues during drying. *Food Chemistry*, 113(4), 944-949.
- Lawless, H. T., & Heymann, H. (2010a). Descriptive analysis. In H. T. Lawless & H. Heymann (Eds.), *Sensory evaluation of food: principles and practices* (2 ed., pp. 227-253). New York, NY: Chapman and Hall.
- Lawless, H. T., & Heymann, H. (2010b). Acceptance testing. In H. T. Lawless & H. Heymann (Eds.), *Sensory evaluation of food: principles and practices* (2 ed., pp. 325-344). New York, NY: Chapman and Hall.

- Lota, M. L., de Rocca Serra, D., Tomi, F., Jacquemond, C., & Casanova, J. (2002). Volatile Components of Peel and Leaf Oils of Lemon and Lime Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(4), 796-805.
- Lotong, V., Chambers, E., & Chambers, D. H. (2003). Categorization of commercial orange juices based on flavor characteristics. *J Food Sci*, 68(2), 722-725. doi:10.1111/j.1365-2621.2003.tb05739.x
- Magwaza, L. S., & Opara, U. L. (2015). Analytical methods for determination of sugars and sweetness of horticultural products—A review. *Scientia Horticulturae*, 184, 179-192.
- Mahmud, S., Saleem, M., Siddique, S., Ahmed, R., Khanum, R., & Perveen, Z. (2009). Volatile components, antioxidant and antimicrobial activity of *Citrus acida* var. sour lime peel oil. *Journal of Saudi Chemical Society*, 13(2), 195-198.
- Marsili, R. T. (2007). Comparing sensory and analytical chemistry flavor analysis. In R. Marsili (Ed.), *Sensory-Directed Flavour Analysis*. U.S.A: CRC Press.
- Meteorological department, T. (2015). *The assessment of rainfall impact in Thailand by using GMI*. (551.586 – 04 – 2015).
- Mookdasanit, J., Tamura, H., Yoshizawa, T., Tokunaga, T., & Nakanishi, K. (2003). Trace volatile components in essential oil of *Citrus sudachi* by means of modified solvent extraction method. *Food Science and Technology Research*, 9(1), 54-61.
- Nasser Al-Jabri, N., & Hossain, M. A. (2014). Comparative chemical composition and antimicrobial activity study of essential oils from two imported lemon fruits samples against pathogenic bacteria. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 3(4), 247-253.
- Norusis, M. J. (2010). Cluster analysis. *PASW statistics 18 statistical procedures companion* (pp. 361-391). Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall.
- Petersen, M. A., Tønder, D., & Poll, L. (1998). Comparison of normal and accelerated storage of commercial orange juice—changes in flavour and content of volatile compounds. *Food Quality and Preference*, 9(1), 43-51.
- Plotto, A., Margaría, C. A., Goodner, K. L., Goodrich, R., & Baldwin, E. A. (2004). Odour and flavour thresholds for key aroma components in an orange juice matrix:

- terpenes and aldehydes. *Flavour and Fragrance Journal*, 19(6), 491-498.
doi:10.1002/ffj.1470
- Pripdeevech, P. (2011). Analysis of odor constituents of *Melodorum fruticosum* flowers by solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Chemistry of Natural Compounds*, 47(2), 292-294.
- Roberto, R. M., García, N. P., Hevia, A. G., & Valles, B. S. (2005). Application of purge and trap extraction and gas chromatography for determination of minor esters in cider. *Journal of Chromatography A*, 1069(2), 245-251.
- Rouseff, R., & Perez-Cacho, P. R. (2007). Citrus Flavour. In R. G. Berger (Ed.), *Flavours and fragrances: chemistry, bioprocessing and sustainability* (pp. 117-134): Springer Berlin Heidelberg.
- Selli, S., & Kelebek, H. (2011). Aromatic profile and odour-activity value of blood orange juices obtained from Moro and Sanguinello (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Industrial Crops and Products*, 33(3), 727-733.
- Shirey, R. E. (2012). SPME commercial devices and fibre coatings *Handbook of solid phase microextraction* (pp. 99-133). Oxford: Elsevier.
- Soria, A. C., García-Sarrió, M. J., & Sanz, M. L. (2015). Volatile sampling by headspace techniques. *Trends in Analytical Chemistry*, 71, 85-99.
- Stone, H., & Sidel, J. L. (2004). Descriptive analysis. *Sensory evaluation practices* (3 ed., pp. 201-245). San Diego, CA: Academic Press.
- Weitkamp, A. W. (1959). The action of sulfur on terpenes. the limonene sulfides. *Journal of the American Chemical Society*, 81(13), 3430-3434.
- Williamson, P. (2013). Sensory descriptive analysis on commercial wines of varied styles. Retrieved <http://research.wineaustralia.com/wp-content/uploads/2014/11/Appendix-I-Sensory.pdf>, from The Australian wine research institute
- Yadav, A. R., Chauhan, A. S., Rekha, M. N., Rao, L. J. M., & Ramteke, R. S. (2004). Flavour quality of dehydrated lime [*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle]. *Food Chemistry*, 85(1), 59-62.

Yuasa, Y., & Yuasa, Y. (2006). A practical synthesis of *d*- α -terpineol via Markovnikov addition of *d*-limonene using trifluoroacetic acid. *Organic Process Research & Development*, 10(6), 1231-1232.

กองบรรณาธิการเทคโนโลยีชาวบ้าน. (2557). มะนาว ปลูกกินเองได้ ปลูกขายทำเงิน (3 ed.). กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์มติชน.

นนทรีย์, ภ. (2532). เทคนิคการปลูกมะนาวออกนอกฤดู (1 ed.). กรุงเทพมหานคร: โครงการหนังสือเกษตรชุมชน.





ภาคผนวก ก
วิธีการวิเคราะห์



ก.1 การหาปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ทั้งหมด (Total Acidity)(Amador, 2011)

สารเคมี

1. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 N : ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 กรัม ลงในน้ำกลั่น 1 ลิตร
2. สารละลายฟีนอล์ฟทาลีน : ละลายฟีนอล์ฟทาลีน 1 กรัม ลงใน isopropanol ที่มีความเข้มข้น 50% ปริมาณ 100 มิลลิลิตร

วิธีการ

1. ชั่งน้ำมะนาวคั้นสด 5 กรัม ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร
2. เติมน้ำกลั่น 245 มิลลิลิตร ใส่ขวดรูปชมพู่ที่มีน้ำมะนาว
3. หยดสารละลายฟีนอล์ฟทาลีนลงไป 5 หยด
4. ไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 N จนกระทั่งสารละลายในขวดรูปชมพู่ กลายเป็นสีชมพูอ่อน
5. คำนวณปริมาณกรดทั้งหมดในรูปชิตริกโดย

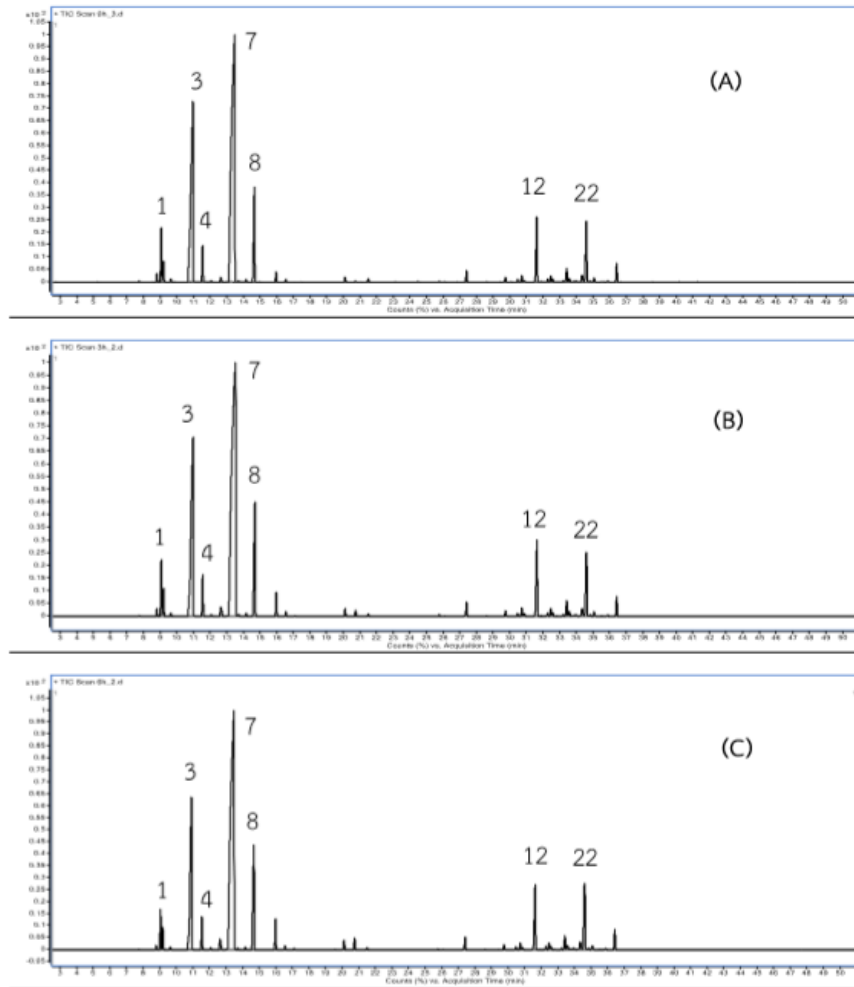
$$\% \text{Acid (w/w)} = \frac{\left(\frac{\text{ml Titrant}}{1000 \text{ ml/l}}\right)(N \text{ Titrant})\left(\frac{64.04 \text{ gCA}}{1 \text{ mole OH}^-}\right)}{\text{Sample Weight(g)}} \times 100$$

เมื่อแทนค่า ความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ (N Titrant) = 0.1 N และ น้ำหนักตัวอย่างน้ำมะนาวคั้นสด (Sample Weight) = 5 g จึงได้ว่า

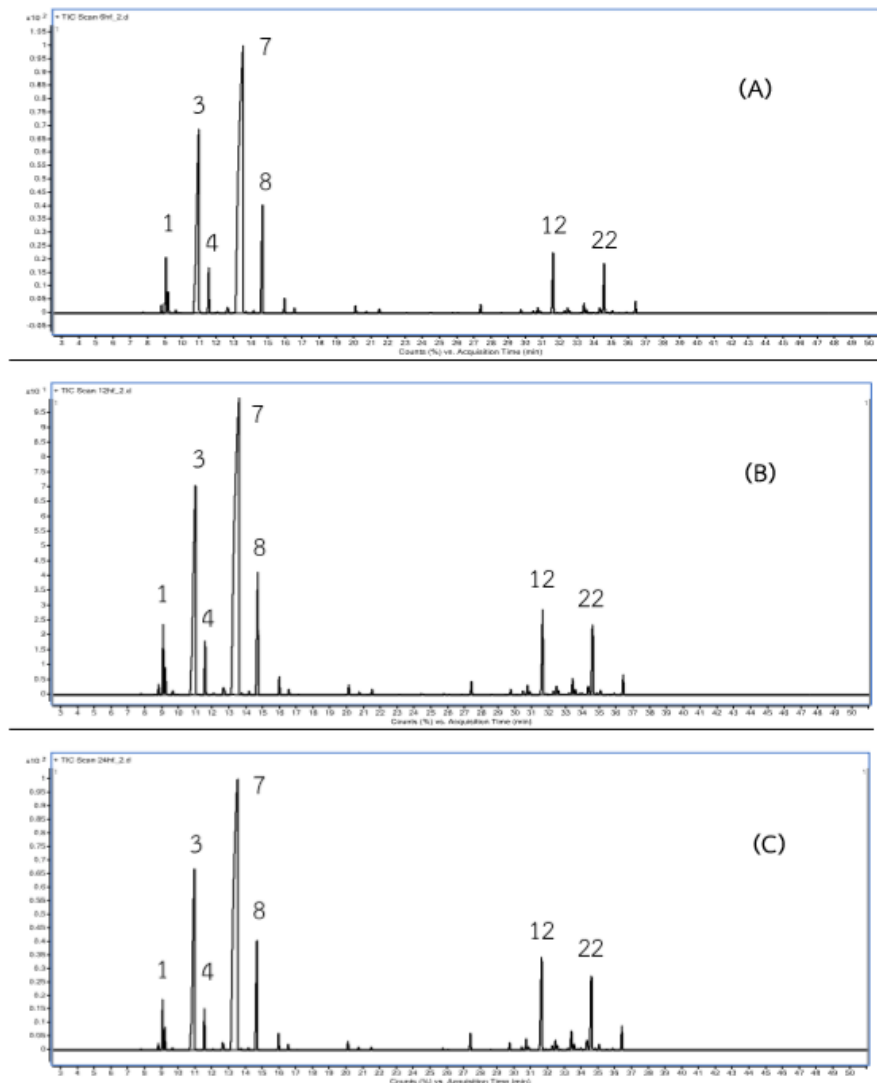
$$\% \text{Acid (w/w)} = (\text{ml NaOH}) \times 0.128$$

ภาคผนวก ข
ผลการทดลองเพิ่มเติม





รูปที่ ข.1 โครมาโทแกรมของน้ำมะนาวคั้นสด (A) และน้ำมะนาวที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 35°C เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง (B) และ 6 ชั่วโมง (C)



รูปที่ ข.2 โครมาโทแกรมของน้ำมะนาวที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง (A), 12 ชั่วโมง (B), และ 24 ชั่วโมง (C)

ตารางที่ ข.1 ลักษณะเฉพาะ, นิยาม, และตัวอย่างอ้างอิงของกลิ่นในน้ำมะนาวคั้นสด

	คุณลักษณะ	นิยาม	ตัวอย่างอ้างอิง (ในน้ำ 300 mL)	คะแนน
1	oxidized	กลิ่น หวาน เย็นซ่า มีลักษณะคล้ายกลิ่นเมื่อเปิดกระป๋อง	Oxidized flavor * 45 µl	4
2	citrus	กลิ่นหวานเขียว ซ่า เปรี้ยว มีกลิ่นน้ำมันเล็กน้อย ให้ความรู้สึกสดชื่น	Citrus flavor * 45 µl	4
3	lemon	กลิ่นเขียว ขม เปรี้ยว ฉุน ซ่า คล้ายเปลือกมะกรูด	Lemon flavor* 45 µl	4
4	green	กลิ่นเขียว สด คล้ายหญ้าตัดใหม่ และมีความหวานคล้ายผิวฝรั่ง	Green flavor* 45 µl	3
5	juicy	กลิ่นหอม หวาน เปรี้ยว ฉ่ำ ซ่า คล้ายสัมผัส และมีกลิ่นน้ำมันเหมือนผิวเปลือกส้ม	Juicy flavor* 45 µl	7
6	peely	กลิ่นเขียว ซ่ามาก ขม เปรี้ยว หวาน ฉุน น้ำมันเปลือก	Peely flavor* 45 µl	4
7	lime	กลิ่นเปรี้ยว เขียว ซ่าเล็กน้อย คล้ายมะนาวดอง	Lime flavor* 45 µl	6
8	floral	กลิ่นหอม ฟุ้งหวานเหมือนดอกไม้ มีความฉ่ำเล็กน้อย	Floral flavor* 45 µl	5
9	fresh	กลิ่นเขียว ขม คล้ายเปลือกยางมะละกอ	Fresh flavor* 11 µl	3
10	waxy	กลิ่นเขียว ซ่า เปรี้ยว คล้ายผักแพวมีกลิ่นหนักเหมือนไขมัน	Waxy flavor* 90 µl	5
11	ripe	กลิ่นหอม หวาน เย็น คล้ายน้ำหวานกลิ่นสละ	Ripe flavor* 45 µl	4

*ตัวอย่างอ้างอิงได้รับการอนุเคราะห์จากบริษัท เฟิร์มเมนนิช (ประเทศไทย) จำกัด

ตารางที่ ข.2 ค่าเฉลี่ยของลักษณะกลิ่นจากการทดสอบทาง
ประสาทสัมผัสเชิงพรรณนาของมะนาว 4 พันธุ์

คุณลักษณะ	แป้นรำไพ	แป้นพวง	แป้นพิจิตร	ตาฮิติ	P-Value
1 Oxidized	2.50 c	2.52 c	3.00 a	2.69 b	0.000
2 Citrus	2.94 a	2.94 a	2.04 c	2.63 b	0.000
3 Lemon	2.92 a	2.94 a	2.04 c	2.56 b	0.000
4 Green	2.00 a	1.98 ab	1.50 c	1.91 b	0.000
5 Juicy	4.92 a	4.85 a	3.50 c	4.36 b	0.000
6 Peely	2.88 a	2.98 a	2.00 c	2.71 b	0.000
7 Floral	2.15 a	2.21 a	0.10 c	1.74 b	0.000
8 Lime	3.50 c	3.46 c	3.98 a	3.64 b	0.000
9 Fresh ^{ns}	1.00	1.00	1.00	1.00	1.000
10 Waxy ^{ns}	2.00	2.02	2.00	2.00	0.377
11 Ripe	2.08 b	2.00 c	2.48 a	2.04 bc	0.000

a,b... อักษรที่ต่างกันในแต่ละแถว หมายถึง ค่าเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

^{ns} ไม่พบความแตกต่าง (non-significant)

ตารางที่ ข.3 ค่าเฉลี่ยคะแนนความชอบจากการทดสอบการยอมรับของผู้บริโภค

	พันธุ์มะนาว			
	แป้นรำไพ	แป้นพวง	แป้นพิจิตร	ตาฮิติ
กลิ่น	6.15 ± 1.67 b	6.81 ± 1.40 a	3.95 ± 2.05 d	5.39 ± 1.85 c
สี	6.32 ± 1.35 a	6.70 ± 1.31 a	4.28 ± 1.81 c	5.69 ± 1.62 d
รส	5.52 ± 2.16 b	6.19 ± 2.06 a	3.12 ± 1.98 d	4.19 ± 2.30 c
ความชอบโดยรวม	5.78 ± 1.97 b	6.46 ± 1.65 a	3.71 ± 1.89 d	4.68 ± 2.08 c

a,b... อักษรที่ต่างกันในแต่ละแถว หมายถึง ค่าเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ภาคผนวก ค
ตัวอย่างการคำนวณ



ค.1. การคำนวณปริมาณสารระเหยง่าย (ppm)

ตัวอย่างการหาปริมาณการสกัดสารระเหยง่ายในน้ำมะนาวแป้นไร้ไฟคั้นสดด้วยวิธี HS-SPME/GC-MS โดยใช้ตัวอย่างน้ำมะนาว 3 มิลลิลิตร

Compound	Peak Area
α -pinene	0.197105194
2-methyl-3-heptanone (Internal Standard)	0.083699998

จากสมการ

$$\text{Concentration (ppm)} = \frac{(0.00837 \text{ g IS})(0.1 \text{ ml IS})(\text{Compound Peak Area})}{(10 \text{ ml MeOH})(\text{IS Peak Area})(\text{ml Sample})} \times 1000$$

โดย Concentration = ความเข้มข้นของสารที่สนใจ (มิลลิกรัม/ลิตร)
 Compound Peak Area = Peak Area ของสารที่สนใจ
 IS Peak Area = Peak Area ของ Internal Standard
 mg Sample = ปริมาณตัวอย่างน้ำมะนาวที่ใส่ใน vial (มิลลิกรัม)

แทนค่า Peak area ลงในสมการ

$$\alpha - \text{pinene (ppm)} = \frac{(0.00837 \text{ g IS})(0.1 \text{ ml IS})(0.197105194)}{(10 \text{ ml MeOH})(0.83699998)(3 \text{ ml Sample})} \times 1000$$

$$\alpha - \text{pinene (ppm)} = 32.8509$$

หาปริมาณสารระเหยง่ายทั้ง 3 ซ้ำ แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย

ค.2. การคำนวณค่า Linear Retention Index (LRI)

ตัวอย่างการหาค่า LRI ของ terpinolene ในน้ำมันมะนาวพันธุ์แป้นรำไพจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Dynamic Headspace/GC-MS

Retention time (RT)	Compound	Formula
10.736	Decane	C ₁₀ H ₂₂
13.514	Terpinolene	C ₁₀ H ₁₆
13.689	Undecane	C ₁₁ H ₂₄

จากสมการ
$$LRI = 100 \left(\frac{t - t_n}{t_{n+1} - t_n} + n \right)$$

โดย

LRI = Linear Retention Index ของสารประกอบที่สนใจ

t = retention time ของสารประกอบที่สนใจ (นาที)

t_n = retention time ของสารมาตรฐานแอลเคนที่ถูกชะออกมาก่อน สารประกอบที่สนใจ(นาที) และมีจำนวนอะตอมคาร์บอนเท่ากับ n

t_{n+1} = retention time ของสารมาตรฐานแอลเคนที่ถูกชะออกมาหลัง สารประกอบที่สนใจ(นาที)และมีจำนวนอะตอมคาร์บอนเท่ากับn+1

n = จำนวนอะตอมคาร์บอนของสารมาตรฐานแอลเคนที่ถูกชะออกมาก่อน สารประกอบที่สนใจ

แทนค่าจะได้
$$LRI = 100 \left(\frac{13.514 - 10.736}{13.689 - 10.736} + 10 \right)$$

$$LRI = 1094$$

ภาคผนวก ง
แบบสอบถามการยอมรับของผู้บริโภค



Consumer test/ Acceptance test

รหัสตัวอย่าง..... วันที่ 9 กุมภาพันธ์ 2559

ชื่อตัวอย่าง น้ำมะนาวคั้นสด รหัสผู้ทดสอบ.....

เพศ : ชาย หญิง อายุ.....โปรดทดสอบระดับการยอมรับของตัวอย่างโดยใช้เครื่องหมาย แสดงความชอบของผู้บริโภค

ระดับความพึงพอใจ	รหัสตัวอย่าง _____			
	กลิ่น	สี	รส	ความชอบโดยรวม
1 = ไม่ชอบเลย				
2 = ไม่ชอบมาก				
3 = ไม่ชอบปานกลาง				
4 = ไม่ชอบเล็กน้อย				
5 = เฉยๆ				
6 = ชอบเล็กน้อย				
7 = ชอบปานกลาง				
8 = ชอบมาก				
9 = ชอบมากเป็นพิเศษ				

ภาคผนวก จ
คำอธิบายลักษณะกลิ่นเพิ่มเติม



ตารางที่ จ.1 ลักษณะเฉพาะด้านกลิ่นและนิยามที่ปรากฏเพิ่มเติมในวิทยานิพนธ์

คุณลักษณะ	นิยาม
balsamic	กลิ่นคล้ายน้ำส้มสายชูชนิดบัลซามิก
citrus ^{1,2}	กลิ่นคล้ายผลไม้ตระกูลส้ม ได้แก่ ส้ม มะนาว เกรปฟรุ้ต และเลมอน
floral ^{1,2}	กลิ่นคล้ายดอกไม้ ได้แก่ กุหลาบ มะลิ บอสซัม ลาเวนเดอร์ เป็นต้น
fresh ¹	กลิ่นคล้ายผลไม้ดิบที่มีเนื้อสัมผัสกรอบ
green ¹	กลิ่นคล้ายหญ้าตัดใหม่ หรือผักสีเขียวสด
hay ²	กลิ่นคล้ายหญ้าแห้ง
herbaceous	กลิ่นคล้ายสมุนไพร
lime ²	กลิ่นคล้ายน้ำและเปลือกมะนาว มีกลิ่นดินเล็กน้อย
lemon ²	กลิ่นคล้ายน้ำและเปลือกเลมอน มีกลิ่นเขียวและกลิ่นคล้ายดอกไม้เล็กน้อย
peel-like ¹	กลิ่นเปรี้ยว ฉุนเล็กน้อย และมีกลิ่นคล้ายผิวมะนาว
penetrating ²	กลิ่นฉุนเล็กน้อยคล้ายแอลกอฮอล์
piney	กลิ่นคล้ายต้นสนและยางไม้ และมีกลิ่นคล้ายยาเล็กน้อย
rosy	กลิ่นคล้ายดอกกุหลาบ
sweet ¹	กลิ่นหอมหวาน กลิ่นคล้ายผลไม้สุกหรือดอกไม้
spicy	กลิ่นฉุนเล็กน้อยคล้ายเครื่องเทศ
terpenic	กลิ่นคล้ายน้ำมันสนหรือน้ำมันเครื่องยนต์
violet	กลิ่นคล้ายดอกไวโอเล็ต
woody ²	กลิ่นคล้ายเปลือกไม้หรือต้นโอ๊ค

¹ (Lotong, Chambers, & Chambers, 2003)

² (Williamson, 2013)

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวนันทมน สุวรรณพรหม เกิดวันที่ 8 มีนาคม พ.ศ. 2535 ที่จังหวัดอุดรธานี สำเร็จ การศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร จากภาควิชา เทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2556 และศึกษา ต่อในระดับปริญญาโท วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2557 จากนั้นได้เข้าร่วมงานประชุมวิชาการนานาชาติ International Symposia on Tropical & Temperate Horticulture ในระหว่างวันที่ 20 - 25 พฤศจิกายน 2559 ที่ Cairns Convention Centre เมืองแครนส์ ประเทศออสเตรเลีย จัดโดย the International Society for Horticultural Science (ISHS), the Australian Institute of Horticulture (AIH) and the Australian Society for Horticulture Science (AuSHS) และ งานวิจัยได้รับการตอบรับเข้าร่วมตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ Acta Horticulturae®