

การตรวจหาสารวานิลลินในห่วงโซ่การผลิตข้าวหอมมะลิไทย ด้วยเทคนิค LC-MS/MS

Determination of Vanillin in Thai Hom Mali Rice Production Chain by LC-MS/MS Technique

กฤษฎณา สุตทะสาร¹⁾ รัตนะวรรณ จันทรศิริ²⁾ ผกามาศ วงศ์โคตย²⁾ สุพรรณนิการ์ ปักเคธาติ¹⁾ นฤมล เสือแดง²⁾
Grissana Sudtasarn¹⁾ Rattanawan Jansasithon²⁾ Pakamas Wongtay²⁾ Supannikar Pakkethati¹⁾ Narumol Sueadang²⁾

Abstract

China is a major importer of Thai Hawm Mali rice from Thailand and earns high income for our country. However, the detection of vanillin in exported Hawm Mali rice from Thailand has been reported since April, 2021 which caused random sampling and recalled rice products. This study aims to survey and analyze vanillin concentration in Thai Hawm Mali rice samples in rice production chain from foundation seed fields, farmer fields, mills until exporters. Rice Department has developed a method for vanillin analysis referred from China (BJS 201705) using liquid chromatography tandem-mass spectrometry (LC-MS/MS) technique. The limit of quantitation (LOQ) of this measurement is $40.00 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. The vanillin concentration from 223 rice samples (13 Rice research centers, 120 farmer fields, 40 mills (both paddy and white rice samples), 5 community enterprises, and 5 packaged rice samples from supermarkets) ranged from < 40.00 - $378.90 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ and the highest content was found in a packaged Hawm Mali rice from the supermarket. However, Thai Hawm Mali foundation seeds which are physically and genetically pure seeds showed $107.46 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ of vanillin while rice samples from farmer fields that only a drying process is applied showed the highest vanillin concentration at $364.57 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. This can be implied that vanillin can be naturally found in Thai Hawm Mali rice, in addition, there were no peaks of ethyl vanillin and methyl vanillin which are used as synthetic vanillin markers found in any samples.

Keywords: Thai Hawm Mali rice, paddy rice, white rice, vanillin, ethyl vanillin, methyl vanillin, liquid chromatography tandem-mass spectrometry (LC-MS/MS) technique, production chain

บทคัดย่อ

ประเทศจีนเป็นผู้นำเข้าข้าวหอมมะลิไทยรายใหญ่ สร้างรายได้ค่อนข้างสูงให้กับประเทศไทย แต่เมื่อเดือนเมษายน พ.ศ. 2564 มีรายงานการสุ่มตรวจพบสารวานิลลินในตัวอย่างข้าวหอมมะลิไทยที่ส่งออกไปขายยังประเทศจีน ส่งผลให้มีการระงับการจำหน่ายข้าวหอมมะลิไทยที่ตรวจพบสารวานิลลิน งานวิจัยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาปริมาณสารวานิลลินในข้าวหอมมะลิไทยตลอดห่วงโซ่การผลิต ตั้งแต่แปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ แปลงนาเกษตรกร โรงสี จนถึงผู้ส่งออก โดยการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารวานิลลินด้วยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี แทนเดม-แมสสเปกโตรเมทรี (LC-MS/MS) อ้างอิงตามวิธีของประเทศจีน (BJS 201705) ซึ่งความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (LOQ) เท่ากับ $40 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ไม่โครกรัมต่อกิโลกรัม พบว่า จากการวิเคราะห์ตัวอย่างข้าวหอมมะลิไทยจำนวน 223 ตัวอย่าง ประกอบด้วยเมล็ดพันธุ์ข้าวเปลือกชั้นพันธุ์หลักจากศูนย์วิจัยข้าวจำนวน 13 ศูนย์ ข้าวเปลือกจากแปลงนาเกษตรกรจำนวน 120 ตัวอย่าง ข้าวเปลือกและข้าวสารจากโรงสีจำนวน 40 โรง ข้าวสารบรรจุถุงจากวิสาหกิจชุมชนและร้านสะดวกซื้อ อย่างละ 5 ตัวอย่าง

Received: 30 August 2022 / Revised: 4 October 2022 / Accepted: 14 October 2022

¹⁾ กองวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว จตุจักร กรุงเทพฯ 10900 โทร. 0-2579-7892

Division of Rice Research and Development, Rice Department, Chatuchak, Bangkok 10900 Tel. 0-2579-7892

²⁾ สถาบันวิทยาศาสตร์ข้าวแห่งชาติ อ.เมือง จ.สุพรรณบุรี 72000 โทร. 0-3555-5340

Thailand Rice Science Institute, Mueang, Suphan Buri 72000 Tel. 0-3555-5340

พบสารวานิลลินตั้งแต่ร้อยละ 40.00 ถึง 378.90 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดยพบสูงสุดในข้าวสารบรรจุถุงที่จำหน่ายในร้านสะดวกซื้อ เมล็ดพันธุ์ข้าวเปลือกชั้นพันธุ์หลักซึ่งมีความบริสุทธิ์สูง พบสารวานิลลินปริมาณสูงสุด 107.46 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตัวอย่างจากแปลงนาเกษตรกรที่ผ่านเฉพาะกระบวนการลดความชื้น พบสารวานิลลินสูงสุด 364.57 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม กล่าวได้ว่า สารวานิลลินอาจพบได้ตามธรรมชาติในข้าวหอมมะลิไทย แต่ยังไม่พบสารเอทิลวานิลลินและเมทิลวานิลลินซึ่งเป็นสารอ้างอิงของสารวานิลลินสังเคราะห์ในตัวอย่งข้าวที่นำมาวิเคราะห์

คำสำคัญ: ข้าวหอมมะลิไทย ข้าวเปลือก ข้าวสาร สารวานิลลิน สารเอทิลวานิลลิน สารเมทิลวานิลลิน เทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี แทนเดม-แมสสเปกโทรเมทรี ห่วงโซ่การผลิต

คำนำ

วานิลลิน (vanillin) เป็นสารแต่งกลิ่นรส (flavoring agent) ที่ใช้มากในผลิตภัณฑ์อาหารและเครื่องดื่ม โดยสารวานิลลินเป็นองค์ประกอบหลักที่พบในฝักวานิลลา และให้กลิ่นหอมหวานของวานิลลาที่เราคุ้นเคยกัน อย่างไรก็ตาม สารวานิลลินที่พบในธรรมชาติมีปริมาณค่อนข้างน้อยและมีราคาสูง จึงมีการสังเคราะห์สารวานิลลินขึ้นมาใช้ทดแทน ซึ่งมีราคาถูกกว่า โดยสารปรุงแต่งกลิ่นรสจัดเป็นวัตถุเจือปนอาหาร (food additive) ตามพระราชบัญญัติอาหาร มีการกำหนดคุณภาพและมาตรฐานการใช้วัตถุเจือปนอาหารให้ตรงตามวัตถุประสงค์ชนิดอาหาร และปริมาณไม่เกินที่กำหนด แต่มีอาหารบางประเภทที่ไม่อนุญาตให้มีการเติมวัตถุเจือปนอาหาร เช่น นมดัดแปลงสำหรับทารกและเด็กเล็ก ข้าว เป็นต้น นอกจากนี้ ยังไม่มีการระบุค่ามาตรฐานทางกฎหมายของสารวานิลลินหรือปริมาณของสารวานิลลินที่สามารถตรวจพบได้ตามธรรมชาติในข้าวหอมมะลิไทยที่วางจำหน่ายหรือส่งออก

อย่างไรก็ตาม ในเดือนเมษายน พ.ศ. 2564 ได้มีการส่งตัวอย่างข้าวหอมมะลิไทยที่ส่งออกไปยังประเทศจีนมาตรวจเพื่อหาสารเจือปน และมีรายงานการตรวจพบสารวานิลลินในตัวอย่งดังกล่าว จึงมีคำสั่งระงับการจำหน่ายข้าวในชุดที่ตรวจพบปริมาณ 200 ตัน ส่งผลให้เกิดการสุ่มตรวจและระงับการจำหน่ายข้าวในชุดต่อๆ มาที่ด่านศุลกากรหลายแห่งในประเทศจีนทำให้เกิดความเสียหายต่อการส่งออกข้าวไทย

รายงานวิจัยที่ผ่านมา พบสารวานิลลินในตัวอย่งข้าวหอมมะลิ (สุปรีดา และคณะ, 2555) และข้าวพันธุ์อินเดีย (Mathure *et al.*, 2011; 2014) ทั้งในข้าวหุงสุก (Maraval *et al.*, 2008) และข้าวเหนียว (Zeng *et al.*, 2009) และรายงานการตรวจพบสารวานิลลินซึ่งเป็น

องค์ประกอบของกลิ่นในข้าว แต่ยังไม่มีการรายงานปริมาณของสารวานิลลินที่ตรวจพบตามธรรมชาติในตัวอย่งข้าว

นอกจากนี้ มีงานวิจัยที่สามารถสกัดและสังเคราะห์สารวานิลลินจากผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร เช่น รำข้าว (Zheng *et al.*, 2007) ฟางข้าว (Nurika *et al.*, 2020) เปลือกเฮเซลนัท (Askew, 2021) เป็นต้น โดยเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณของสารวานิลลินสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ เทคนิคสเปกโทรเมทรี (spectrometry) (Rind *et al.*, 2009) เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (NIR) (พีรณัฐ และคณะ, 2556) เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) (สิริพร และคณะ, 2554) และเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี แทนเดม-แมสสเปกโทรเมทรี (LC-MS/MS) (Böttcher and Monks, 2022) ซึ่งเป็นเทคนิคที่นิยมใช้มากที่สุด เนื่องจากมีความถูกต้องแม่นยำสูง

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารวานิลลินในข้าวหอมมะลิไทย โดยครอบคลุมตลอดห่วงโซ่การผลิตข้าว ตั้งแต่แปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ แปลงนาเกษตรกร ตลอดจนโรงสี และผู้ส่งออก เพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงว่า สารวานิลลินเป็นสารที่อาจพบได้ตามธรรมชาติในผลิตภัณฑ์ข้าว และรวบรวมเป็นข้อมูลปริมาณสารวานิลลินที่สามารถตรวจพบในกระบวนการผลิตข้าวหอมมะลิ สำหรับใช้เป็นค่ามาตรฐานหรือใช้อ้างอิงในการส่งออกข้าวหอมมะลิไทยไปยังประเทศจีนในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารวานิลลินด้วยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี (อ้างอิงตามวิธีวิเคราะห์ของจีน; BJS 201705)

- ซึ่งตัวอย่างแบ่งข้าว 1.0000±0.0005 กรัม เติมน้ำ

Table 1 Condition of LC-MS/MS for vanillin analysis

Time (min)	A (%)	B (%)
0	75	25
2	50	50
6	50	50
7	75	25
9	75	25

3 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 30 วินาที ให้เข้ากัน เติม acetonitrile 7 มิลลิลิตร เขย่า 30 วินาที จากนั้นนำไป sonicate เป็นเวลา 25 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ก่อนนำส่วนใสไปกรองผ่านฟิลเตอร์เมมเบรนขนาด 0.22 ไมโครเมตร นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องลิควิดโครมาโทกราฟี แทนเดม-แมสสเปกโตรมิเตอร์ (liquid chromatography with tandem mass spectrometer; LC-MS/MS) (Sciex รุ่น QTRAP4500) โดยใช้คอลัมน์ Atlantis DC18 ขนาด 2.1x100 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 ไมโครเมตร ปริมาณในการฉีด 5 ไมโครลิตร มีเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) A: 0.1% formic acid ในน้ำ B: Acetonitrile ที่อัตราส่วนตามที่กำหนด (Table 1) และมีอัตราการไหล 0.3 มิลลิลิตรต่อนาที โดยควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์ที่ 30 องศาเซลเซียส

- การสแกนในรูปแบบ multiple reaction monitoring (MRM) ที่ Q1 = 153.3, Q3 = 93.1 (dwell time: 100 CE:25 EP:10 CXP:13) สำหรับการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (quantitative analysis) และ 125.2 (dwell time: 100 CE:16 EP:10 CXP:13) สำหรับการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (qualitative analysis) โดยปริมาณของสารวานิลลินที่พบในตัวอย่างข้าว สามารถคำนวณได้จากการกราฟมาตรฐานโดยใช้สาร 4-Hydroxy-3-methylbenzaldehyde หรือ Vanillin (Sigma-Aldrich: CAS:121-33-5) เป็นสารมาตรฐาน

- การตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบของสารวานิลลินสังเคราะห์ โดยการเติมสารวานิลลินสังเคราะห์ที่หาซื้อได้ทั่วไปลงในตัวอย่างข้าว จากนั้นนำมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบของสารด้วยเครื่อง LC-MS/MS เปรียบเทียบกับองค์ประกอบของสารที่พบในตัวอย่างข้าวที่ไม่ได้เติมสาร

วานิลลินสังเคราะห์ ซึ่งจากงานวิจัยที่ผ่านมามีการรายงานพบสารเอทิลวานิลลิน (ethyl vanillin) ใช้การสแกนในรูปแบบ MRM ที่ Q1 = 167.2 และ Q3 = 111.0 และ เมทิลวานิลลิน (methyl vanillin) ใช้การสแกนในรูปแบบ MRM ที่ Q1 = 167.0 และ Q3 = 139.0 โดยสารทั้ง 2 ชนิดนี้ใช้เป็น marker ของสารวานิลลินสังเคราะห์ (Böttcher and Monks, 2022)

2. การสำรวจวิเคราะห์หาสารวานิลลินในตัวอย่างข้าวหอมมะลิในระบบห้องปฏิบัติการผลิตข้าว

การเก็บตัวอย่างข้าวหอมมะลิจากแหล่งต่างๆ ดังนี้

2.1 ตัวอย่างข้าวเปลือกเมล็ดพันธุ์หลัก การผลิตนาปี 2563/2564 จากศูนย์วิจัยข้าว จำนวน 13 ศูนย์ ได้แก่ ศูนย์วิจัยข้าวขอนแก่น ชุมแพ สกลนคร สุรินทร์ นครราชสีมา ร้อยเอ็ด อุดรธานี อุบลราชธานี เชียงราย เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน ฉะเชิงเทรา และลพบุรี จำนวน 13 ตัวอย่าง

2.2 ตัวอย่างข้าวเปลือกจากแปลงนาเกษตรกร การผลิต นาปี 2563/2564 จากโครงการส่งเสริมเกษตรกรแบบแปลงใหญ่และนาอินทรีย์ จังหวัดสกลนคร สุรินทร์ นครราชสีมา ยโสธร อุดรธานี อุบลราชธานี ชัยภูมิ แม่ฮ่องสอน เชียงราย เชียงใหม่ ฉะเชิงเทรา สุพรรณบุรี และกาญจนบุรี จำนวน 120 ตัวอย่าง

2.3 ตัวอย่างข้าวเปลือกและข้าวสารจากโรงสี ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ การผลิต นาปี 2563/2564 จำนวน 40 โรง ในจังหวัดขอนแก่น บุรีรัมย์ มหาสารคาม ศรีสะเกษ นครราชสีมา อุบลราชธานี ร้อยเอ็ด สุรินทร์ มุกดาหาร และชัยภูมิ จำนวน 80 ตัวอย่าง

2.4 ตัวอย่างข้าวสารจากร้านสะดวกซื้อ การผลิต นาปี 2563/2564 จำนวน 5 ตัวอย่าง

2.5 ตัวอย่างข้าวสารจากกลุ่มวิสาหกิจชุมชน การผลิต นาปี 2563/2564 จำนวน 5 ตัวอย่าง

ตัวอย่างข้าวทั้งหมดจำนวน 223 ตัวอย่าง นำไปวิเคราะห์หาสารวานิลลินที่สถาบันวิทยาศาสตร์ข้าวแห่งชาติ โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกระทั่งทำการวิเคราะห์ โดยตัวอย่างที่เป็นข้าวเปลือกถูกกะเทาะและขัดให้อยู่ในรูปแบบข้าวสาร และบดเป็นแป้งข้าว จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารวานิลลินด้วยเครื่อง LC-MS/MS ตามวิธีที่พัฒนาได้จากการทดลองที่ 1 โดยทำการวิเคราะห์ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

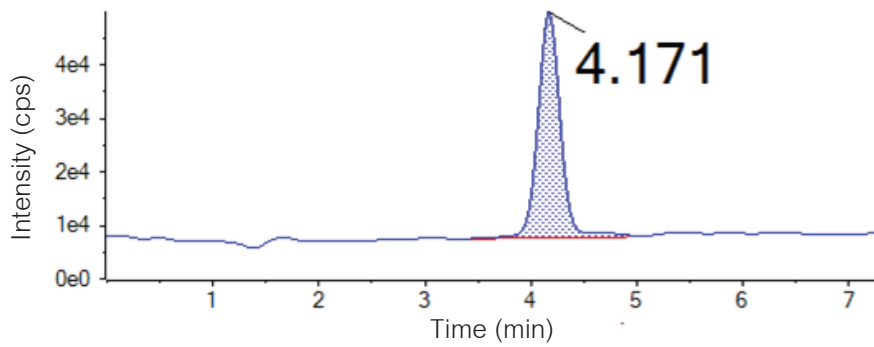
ระยะเวลาในการดำเนินการ 1 ปี (มิถุนายน พ.ศ. 2564 - พฤษภาคม พ.ศ. 2565)

ผลการทดลองและวิจารณ์

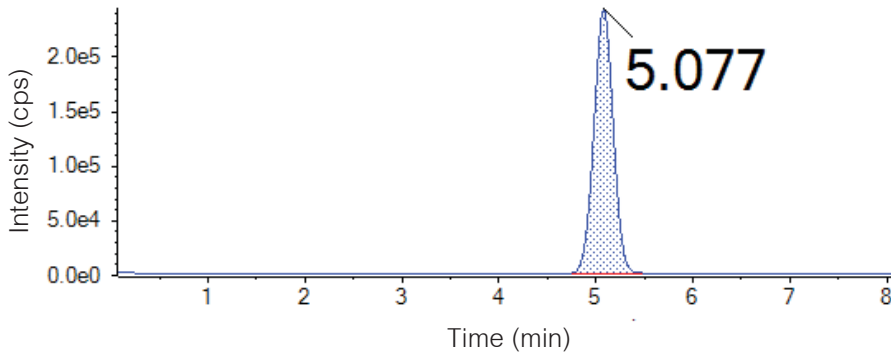
1. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารวานิลลิน

ผลการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์หาสารวานิลลินด้วยเทคนิค LC-MS/MS สามารถวิเคราะห์สารวานิลลิน และสารข้างอิงวานิลลินสังเคราะห์ในตัวอย่างข้าวได้โดยอาศัย

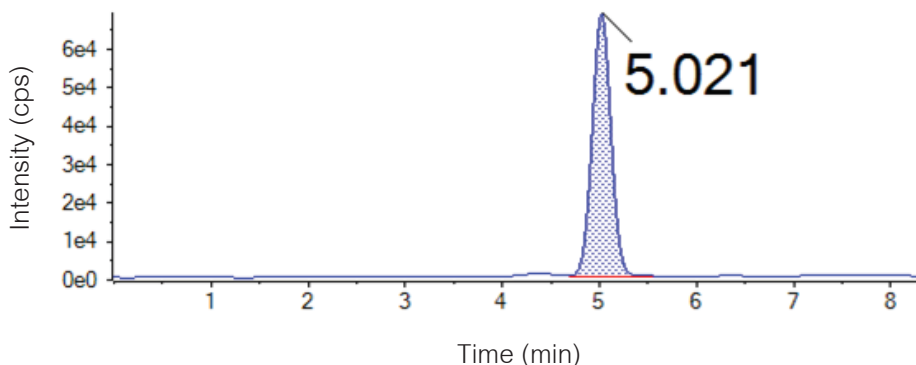
ความแตกต่างของมวลต่อประจุของสารที่ต่างกััน ตรวจพบสารวานิลลินที่เวลา (retention time) 4.17 นาที เลือกใช้คู่มวลต่อประจุในการตรวจวัดคือ 153.3 และ 93.1 (Fig. 1a) ในขณะที่พบสารข้างอิงของวานิลลินสังเคราะห์ ได้แก่ เอทิลวานิลลิน และเมทิลวานิลลิน ที่เวลา 5.07 และ 5.02 นาที ตามลำดับ (คู่มวลต่อประจุ 167.2 และ 111 สำหรับเอทิลวานิลลิน และมวลต่อประจุ 167 และ 139 สำหรับเมทิลวานิลลิน) (Fig. 1b-c)



(a) Vanillin



(b) Ethyl vanillin



(c) Methyl vanillin

Fig. 1 Chromatogram of vanillin, ethyl vanillin and methyl vanillin analyzed by LC-MS/MS

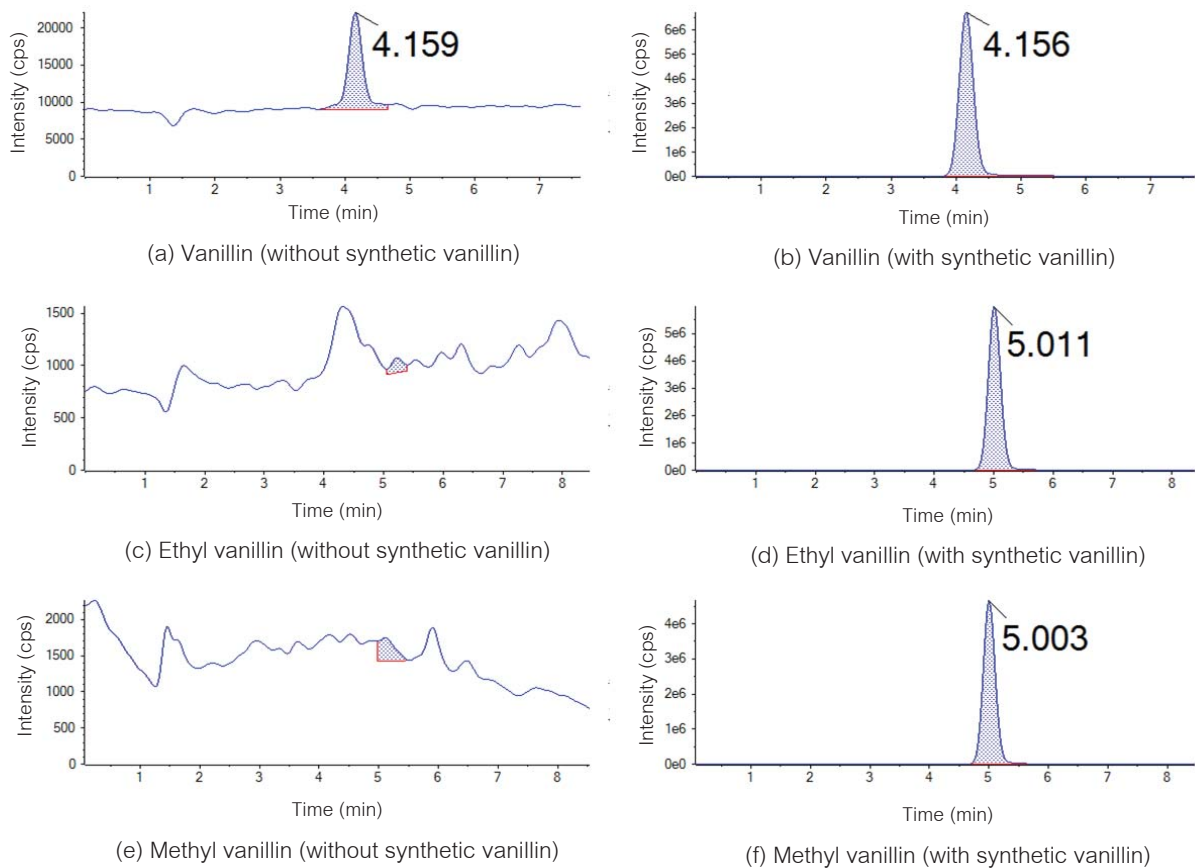


Fig. 2 Chromatogram of matrix blank sample (without adding synthetic vanillin) (a) and matrix blank sample with adding synthetic vanillin (b)

การวิเคราะห์หาปริมาณสารวานิลลินในตัวอย่งข้าว จำเป็นต้องมีการศึกษาถึงผลกระทบของเมทริกซ์ (matrix effect) ได้แก่ ตัวอย่งแบ่งข้าว ซึ่งอาจส่งผลให้สัญญาณที่ตรวจวัดได้ในสารละลายแตกต่างกับสัญญาณที่ตรวจวัดได้ในเมทริกซ์ ดังนั้น ในการวิเคราะห์หาปริมาณของสารที่สนใจ จำเป็นต้องสร้างกราฟมาตรฐานจากเมทริกซ์ (matrix-matched calibration) หรือตัวอย่งแบ่งข้าว ซึ่งในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารวานิลลินในตัวอย่งข้าว คณะวิจัยไม่สามารถหาตัวอย่งข้าวที่ไม่พบสารวานิลลินเพื่อนำมาใช้เป็น matrix blank หรือตัวอย่งที่ถูกนำมาเติมสารมาตรฐานวานิลลินที่ทราบความเข้มข้นเพื่อใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ได้ จึงจำเป็นต้องหาปริมาณสารวานิลลินที่สามารถตรวจพบได้ในตัวอย่งข้าวที่นำมาใช้เป็น matrix blank เพื่อกำหนดเป็นปริมาณหรือความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (LOQ) ในตัวอย่งข้าว โดยงานวิจัยนี้มีค่า LOQ เท่ากับ 40.00 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งตัวอย่งข้าวที่ตรวจพบ

สารวานิลลินที่มีความเข้มข้นต่ำกว่านี้จะไม่สามารถระบุความเข้มข้นที่ถูกต้องได้

นอกจากนี้ เมื่อทำการเปรียบเทียบตัวอย่งข้าวที่เติมสารวานิลลินสังเคราะห์ที่ซื้อได้ทั่วไป พบว่ามีปริมาณสารวานิลลินเพิ่มมากขึ้น และพบสารเอทิลวานิลลิน และเมทิลวานิลลิน ในขณะที่ตัวอย่งข้าวที่ไม่ได้เติมสารวานิลลินสังเคราะห์จะตรวจพบเฉพาะสารวานิลลินเท่านั้น แต่ไม่พบสารเอทิลวานิลลิน และเมทิลวานิลลิน (Fig. 2) และพบว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ของสารเอทิลวานิลลิน และเมทิลวานิลลิน (LOQ) เท่ากับ 5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

2. ผลการวิเคราะห์หาสารวานิลลินในตัวอย่งข้าวหอมมะลิในระบบห่วงโซ่การผลิตข้าว

2.1 เมล็ดพันธุ์ข้าวเปลือกชั้นพันธุ์หลัก ผลการวิเคราะห์ข้าวหอมมะลิ จำนวน 223 ตัวอย่ง ประกอบด้วยเมล็ดพันธุ์ข้าวเปลือกชั้นพันธุ์หลักจากศูนย์วิจัยข้าวจำนวน 13 ศูนย์ พบสารวานิลลินน้อยกว่า 40.00-107.46

ไม่โครกรัมต่อกิโลกรัม (Table 2) โดยพบมากที่สุด ในเมล็ดข้าวเปลือกชั้นพันธุ์หลักจากศูนย์วิจัยข้าวฉะเชิงเทรา

2.2 ข้าวเปลือกจากแปลงนาเกษตรกร จำนวน 120 ตัวอย่าง พบสารวานิลลินน้อยกว่า 40.00-364.57 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดยพบสารวานิลลินสูงสุดในตัวอย่างจากแปลงนาเกษตรกรจังหวัดสุรินทร์ (Table 2)

จากผลการทดลองดังกล่าว พบว่า สารวานิลลินตรวจพบในเมล็ดพันธุ์ข้าวเปลือกชั้นพันธุ์หลักซึ่งมีความบริสุทธิ์สูง และข้าวเปลือกจากแปลงนาเกษตรกรซึ่งเก็บเกี่ยวโดยตรงจากแปลงนาไม่ผ่านกระบวนการใดๆ นอกจากการลดความชื้น จึงกล่าวได้ว่าสารวานิลลินเป็นสารที่อาจพบได้ตามธรรมชาติในข้าว

2.3 ตัวอย่างข้าวเปลือกและข้าวสารหอมมะลิ จากโรงสี จำนวน 40 โรง พบว่า ตัวอย่างข้าวส่วนใหญ่มีสารวานิลลินน้อยกว่า 40 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดยข้าวสารจากโรงสีจำนวน 6 โรง พบสารวานิลลิน 103.25-200.47 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ข้าวเปลือกจากโรงสีจำนวน 1 โรง

พบสารวานิลลิน 123.44 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และข้าวเปลือกและข้าวสาร จำนวน 2 โรง พบ 64.54-116.62 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

2.4 ข้าวสารบรรจุถุงที่จำหน่ายในร้านสะดวกซื้อ จำนวน 5 ตัวอย่าง พบสารวานิลลิน 70.31-378.90 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Table 2)

2.5 ข้าวสารบรรจุถุงจากกลุ่มวิสาหกิจชุมชน จำนวน 5 ตัวอย่าง พบสารวานิลลินน้อยกว่า 40.00-270.70 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Table 2) การพบสารวานิลลินในข้าวสารบรรจุถุงปริมาณค่อนข้างสูง โดยความแปรปรวนที่ตรวจพบในตัวอย่างข้าวถุง อาจเกี่ยวข้องกับกระบวนการในการจัดการและแปรรูปข้าว ซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษาและ/หรือเพิ่มจำนวนตัวอย่างในการวิเคราะห์ต่อไป

อย่างไรก็ตาม ในการศึกษานี้ไม่พบสารเอทิลวานิลลิน และเมทิลวานิลลินในข้าวหอมมะลิจากแหล่งต่างๆ ที่นำมาวิเคราะห์

ข้าวหอมมะลิที่เก็บจากแหล่งต่างๆ ตรวจพบสาร

Table 2 Vanillin concentration found in Hom Mali rice samples from different sources in rice production chains

Source	Province	No.	Type	Vanillin concentration* (µg/kg)
1. Foundation Seeds		13	Paddy	< 40.00-107.46
2. Farmer's fields	Sakon Nakhon	10	Paddy	46.21-105.90
	Surin	18	Paddy	< 40.00-364.57
	Nakhon Ratchasima	10	Paddy	< 40.00-120.88
	Yasothon	11	Paddy	52.03-145.87
	Udon Thani	10	Paddy	< 40.00-270.00
	Ubon Ratchathani	10	Paddy	< 40.00
	Chaiyaphum	11	Paddy	< 40.00-64.36
	Mae Hong Son	10	Paddy	< 40.00
	Chiang Rai	10	Paddy	< 40.00-66.22
	Chiang Mai	3	Paddy	< 40.00-65.64
3. Mill	Chachoengsao	11	Paddy	99.56-156.40
	Suphan Buri/Kanchanaburi	6	Paddy	< 40.00
4. Supermarket		40	Paddy	< 40.00-123.44
		40	White	< 40.00-200.47
5. Community enterprise		5	White	70.31-378.90
		5	White	< 40.00-270.70

*Vanillin concentration < 40.00 µg/kg can not be accurately analysed

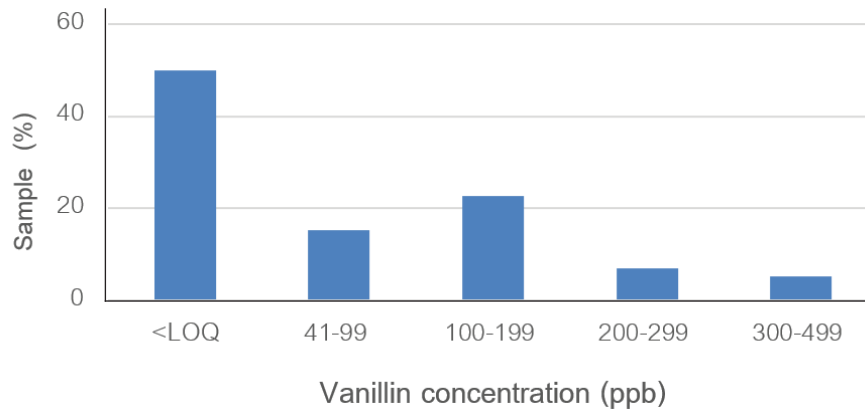


Fig. 3 Vanillin contained in KDML105 rice samples (total 223 samples)

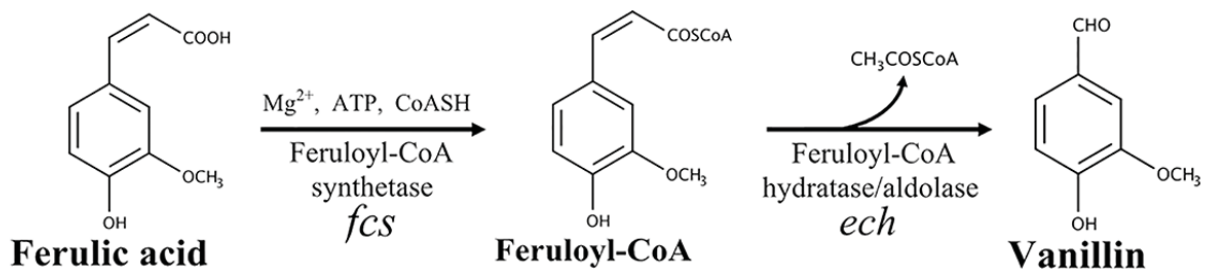


Fig. 4 Biosynthetic pathways of vanillin (Source: Luziatelli *et al.*, 2019)

วานิลลินในปริมาณที่แตกต่างกัน ทั้งนี้อาจจะมาจากหลายปัจจัยไม่ว่าจะเป็นแหล่งที่ปลูก กระบวนการในการผลิต และแปรรูปเป็นข้าวสารที่แตกต่างกัน ซึ่งยังไม่มีรายงานถึงการตรวจพบสารวานิลลินในข้าวจากกระบวนการผลิตต่างๆ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการตรวจพบสารวานิลลินในข้าวหอมมะลิ ตั้งแต่ตัวอย่างข้าวเปลือกจากเมล็ดพันธุ์หลัก แปลงนาเกษตรกร และโรงสี จนถึงตัวอย่างข้าวสารบรรจุถุงที่จำหน่ายร้านสะดวกซื้อและกลุ่มวิสาหกิจชุมชน โดยพบว่าตัวอย่างส่วนใหญ่ (ร้อยละ 50) มีสารวานิลลินน้อยกว่า 40 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในขณะที่พบสารวานิลลิน 41-99 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม 100-199 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และ 200-299 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในตัวอย่างข้าวหอมมะลิ ร้อยละ 15 23 และ 7 ตามลำดับ และพบมีตัวอย่างข้าวหอมมะลิ เพียงร้อยละ 5 ที่พบสารวานิลลิน มากกว่า 300 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Fig. 3)

รายงานวิจัยที่ผ่านมาพบสารวานิลลินในตัวอย่างพันธุ์ข้าวของอินเดีย เช่น Basmati, Ambemohar,

Indrayani ปริมาณ 44-324 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Mathure *et al.*, 2011) ในข้าวอินเดียกลุ่มข้าว Basmati ที่ไม่หอม และข้าวพันธุ์ไม่หอม พบสารวานิลลินในตัวอย่างข้าวมากกว่า 77 พันธุ์ แต่ไม่พบความสัมพันธ์กับสารที่ให้กลิ่นชนิดอื่น (Mathure *et al.*, 2014) นอกจากนี้ยังมีการรายงานพบสารวานิลลินในข้าวหอมสูง (Jezussek *et al.*, 2002; Maraval *et al.*, 2008) ข้าวเหนียวของญี่ปุ่นพันธุ์ Tatsukomochi, Kinunohada และ Miyakoganemochi ในกรรมวิธีการหุงที่ปล่อยให้ข้าวอุ่นในหม้อหุงข้าวต่ออีก 30 นาทีหลังข้าวสุก (Zeng *et al.*, 2009)

เมื่อศึกษาถึงวิถี (pathway) ในการสร้างสารวานิลลินพบว่า สารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารวานิลลิน ได้แก่ กรดเฟอรูลิก (ferulic acid) (Fig. 4) ซึ่งสารดังกล่าวเป็นสารที่พบมากในส่วนของรำข้าวและข้าวกล้อง เมื่อมีการนำส่วนเหลือใช้ของน้ำมันรำข้าวมาใช้ในการสังเคราะห์สารวานิลลินในอุตสาหกรรม (Mazhar *et al.*, 2017) ผกามาตและคณะ (2563) รายงานว่าพบกรดเฟอรูลิก ซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอลิกที่พบเป็นส่วนใหญ่ในข้าวทุกพันธุ์ โดยเฉพาะในข้าวกล้อง รวมทั้งยังพบกรดวานิลลิก

(vanillic acid) ซึ่งอยู่ในกลุ่มกรดฟีนอลิกที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และใช้เป็นสารแต่งกลิ่น โดยพบสารวานิลลินในตัวอย่างข้าวกล้องสูงกว่าข้าวสาร รวมทั้งข้าวสีในรูปข้าวกล้องซึ่งพบว่าข้าวพันธุ์มะลินิลสุรินทร์มีสารวานิลลิน 293.40 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในขณะที่ข้าวพันธุ์มะลินิลดาหนองคายพบ 188.05 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

จากข้อมูลดังกล่าว จึงมีสมมติฐานว่ากระบวนการในการสีข้าวหรือแปรรูปจากข้าวกล้องเป็นข้าวสาร น่าจะมีความเกี่ยวข้องกับปริมาณของสารวานิลลินที่แตกต่างกัน

สรุปผลการทดลอง

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาสารวานิลลินในตัวอย่างข้าวหอมมะลิไทยด้วยเทคนิค LC-MS/MS สามารถตรวจหาปริมาณของสารวานิลลินที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 40.00 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างข้าวหอมมะลิจากแหล่งต่างๆ ในห่วงโซ่การผลิตข้าว จำนวน 223 ตัวอย่าง พบสารวานิลลินตั้งแต่ไม่น้อยกว่า 40.00-364.57 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดยพบสารวานิลลินในตัวอย่างเมล็ดข้าวเปลือกชั้นพันธุ์หลักจากศูนย์วิจัยข้าว ตั้งแต่ไม่น้อยกว่า 40.00-107.46 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในตัวอย่างข้าวเปลือกจากแปลงนาเกษตรกร ตั้งแต่ไม่น้อยกว่า 40.00-364.57 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม แต่ยังไม่พบสารเอทิลวานิลลิน และเมทิลวานิลลิน ซึ่งเป็นสารอ้างอิงของสารวานิลลินสังเคราะห์ในตัวอย่างข้าวหอมมะลิที่นำมาศึกษา

จากการศึกษาครั้งนี้กล่าวได้ว่า สารวานิลลินอาจเป็นสารที่พบได้ตามธรรมชาติในข้าว โดยตัวอย่างข้าวเปลือกและข้าวสารจากโรงสีจำนวน 40 โรง ในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบสารวานิลลินน้อยกว่า 40.00 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตัวอย่างข้าวจากโรงสีจำนวน 9 โรง พบสารวานิลลิน 64.54-200.47 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตัวอย่างข้าวสารบรรจุถุงที่จำหน่ายในร้านสะดวกซื้อและตัวอย่างข้าวสารบรรจุถุงจากกลุ่มวิสาหกิจชุมชน พบสารวานิลลินน้อยกว่า 40.00-378.90 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดยตัวอย่างข้าวหอมมะลิส่วนใหญ่ (ร้อยละ 50) พบสารวานิลลินน้อยกว่า 40.00 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

จากการศึกษาครั้งนี้กล่าวได้ว่า ปัจจัยต่างๆ เช่น กระบวนการในการสีข้าวหรือแปรรูปเป็นข้าวสารอาจมีความเกี่ยวข้องกับปริมาณของสารวานิลลินที่แตกต่างกันในตัวอย่างข้าวหอมมะลิไทย ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานถึงการ

ตรวจพบสารวานิลลินในข้าวจากกระบวนการต่างๆ มาก่อน จึงควรเป็นโจทย์วิจัยของกรมการข้าวที่ต้องศึกษาถึงปัจจัยที่เกี่ยวข้องในห่วงโซ่การผลิตข้าว เช่น แหล่งปลูก กระบวนการผลิต กระบวนการแปรรูปเป็นข้าวสารที่แตกต่างกัน เป็นต้น เพื่อหาสาเหตุต่อไป

คำขอบคุณ

คณะผู้ดำเนินงาน ขอขอบคุณผู้อำนวยการและเจ้าหน้าที่ของศูนย์วิจัยข้าวทั้ง 13 ศูนย์ ที่ได้อนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์หลัก รวมทั้งกลุ่มเกษตรกร วิสาหกิจชุมชน และสมาคมโรงสีในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ที่ได้อนุเคราะห์ส่งตัวอย่างข้าวมาใช้ในการศึกษาค้นคว้า และขอบคุณทีมงานวิจัย และผู้ช่วยนักวิจัย กองวิจัยและพัฒนาข้าว และสถาบันวิทยาศาสตร์ข้าวแห่งชาติทุกท่าน ที่ช่วยในการดำเนินงานวิจัยจนสำเร็จผลตามวัตถุประสงค์

เอกสารอ้างอิง

- ผกามาศ วงศ์เตย์, ดารารัตน์ มณีจันทร์, รัตนวรรณ จันทร์ศิริ, อสมภรณ์ จิตตพรพงษ์, นฤมล เสือแดง, ภัทรศยา สายเอียด, ศตวรรณ คงสมจิตต์, วชิร สุขวิวัฒน์, ปราณี่ มณีนิล และเกศสุดา ปางรัมย์. 2563. ปริมาณสารฟีนอลิกในพันธุ์ข้าวไทย และผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อคุณภาพข้าว. วารสารวิชาการข้าว 11(2): 103-113.
- พีรณัฐ ทวีชลพิสิฐ, วรรณพร พงษ์อภัย, ธนฤทธิ ฤทธิธณ, เฉลิมชัย วงษ์อารี, ธิตติมา วงษ์ชีรี และกานดา เลิศลดาภิษณ์. 2556. การตรวจสอบปริมาณสารวานิลลินในฝักวานิลลาบ่มอย่างไม่ทำลายด้วยเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 44(2) (พิเศษ): 281-284.
- สิริพร สีแดง, ธิตติมา วงษ์ชีรี, เฉลิมชัย วงษ์อารี, ผ่องเพ็ญ จิตอารีย์รัตน์ และวาริช ศรีละออง. 2554. ผลของการนวดฝักต่อปริมาณสารให้กลิ่นในฝักวานิลลาหลังการบ่ม. หน้า 23-27. ใน: การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปี 2554 “การพัฒนาอนาคตชนบทไทย: ฐานรากที่มั่นคงเพื่อการพัฒนาประเทศอย่างยั่งยืน”. 27-29 มกราคม 2554. โรงแรมโฆษะ, ข.ขอนแก่น.
- สุปรีดา หอมกลิ่น, จิระนุช นิตยารักษ์กุล และสุกัญญา วงศ์พรชัย. 2555. การวิเคราะห์องค์ประกอบสารที่ระเหยได้ในเมล็ดพันธุ์ข้าวหอมมะลิ (KDML105) ด้วยเทคนิค GCxGC-TOFMS. หน้า 543-546. ใน: การประชุม

- วิชาการข้าวแห่งชาติ ครั้งที่ 2 มิติใหม่วิจัยข้าวไทย พร้อม
รับการเปลี่ยนแปลงของสภาพภูมิอากาศและการเปิด
ตลาดเสรีอาเซียน. 21-23 ธันวาคม 2555. โรงแรมสวิส
โซเทล เลอ คองคอร์ด, กรุงเทพมหานคร.
- Askew, K. 2021. Closing the loop in chocolate: Barry
callebaut collaborate on 'ground-breaking'
process to turn hazelnut shells into vanillin.
Available source: [https://www.foodnavigator.com/
Article/2021/02/19/Barry-Callebaut-and-Bloom-
Biorenewables-turn-hazelnut-shells-into-
vanillin?utm_source=copyright&utm_medium=
OnSite&utm_campaign=copyright](https://www.foodnavigator.com/Article/2021/02/19/Barry-Callebaut-and-Bloom-Biorenewables-turn-hazelnut-shells-into-vanillin?utm_source=copyright&utm_medium=OnSite&utm_campaign=copyright). (February 19,
2021)
- Böttcher, J. and K. Monks. 2022. Natural or artificial? –
Determination of vanillin in vanilla products and
associated marker substances. Science Together.
Available source: [https://www.knauer.net/
Application/application_notes/VFD0165_
Determination%20of%20vanillin%20in%20
vanilla%20products%20and%20associated%20
marker%20substances_FINAL%20-web-.pdf](https://www.knauer.net/Application/application_notes/VFD0165_Determination%20of%20vanillin%20in%20vanilla%20products%20and%20associated%20marker%20substances_FINAL%20-web-.pdf).
(January 15, 2022)
- Jezussek, M., B.O. Juliano and P. Schieberle. 2002.
Comparison of key aroma compounds in cooked
brown rice varieties based on aroma extract
dilution analyses. Journal of Agricultural and Food
Chemistry 50(5): 1101-1105.
- Luziatelli, F., L. Brunetti, A.G. Ficca and M. Ruzzi. 2019.
Maximizing the efficiency of vanillin production by
biocatalyst enhancement and process optimization.
Frontiers in Bioengineering and Biotechnology 7:
279.
- Maraval, I., C. Mestres, K. Pernin, F. Ribeyre, R.
Boulanger, E. Guichard and Z. Gunata. 2008.
Odor-active compounds in cooked rice cultivars
from camargue (France) analyzed by GC-O and
GC-MS. Journal of Agricultural and Food Chemistry
56(13): 5291-5298.
- Mathure, S.V., K.V. Wakte, N. Jawali and A.B. Nadaf.
2011. Quantification of 2-Acetyl-1-pyrroline and
Other Rice Aroma Volatiles Among Indian Scented
Rice Cultivars by HS-SPME/GC-FID. Food
Analytical Methods 4: 326-333.
- Mathure, S.V., N. Jawali, R.J. Thengane and A.B. Nadaf.
2014. Comparative quantitative analysis of
headspace volatiles and their association with
BADH2 marker in non-basmati scented, basmati
and non-scented rice (*Oryza sativa* L.) cultivars
of India. Food Chemistry 142: 383-391.
- Mazhar, B., N. Jahan, N.M. Ali, S. Andleeb and S. Ali.
2017. Production of vanillin by a novel bacterium
from waste residues of rice bran oil. Punjab
University Journal of Zoology 32(1): 137-142.
- Nurika, I., S. Suhartini, N. Azizah and G.C. Barker. 2020.
Extraction of vanillin following bioconversion of rice
straw and its optimization by response surface
methodology. Molecules 25(24): 6031.
- Rind, F.A.M., U.R. Mughal, A.H. Memon, F. Almani,
M.G.H. Laghari, M.L. Maheshwari, M.Y. Khuhawar,
N. Memon and A. Dayo. 2009. Spectrophotometric
analysis of vanillin from natural and synthetic
sources. Asian Journal of Chemistry 21(4): 2849-
2856.
- Zeng, Z., H. Zhang, T. Zhang, S. Tamogami and J.Y.
Chen. 2009. Analysis of flavor volatiles of glutinous
rice during cooking by combined gas
chromatography-mass spectrometry with modified
headspace solid-phase microextraction method.
Journal of Food Composition and Analysis 22(4):
347-353.
- Zheng, L., P. Zheng, Z. Sun, Y. Bai, J. Wang and X. Guo.
2007. Production of vanillin from waste residue of
rice bran oil by *Aspergillus niger* and *Pycnoporus
cinnabarinus*. Bioresource Technology 98(5):
1115-1119.