การวิเคราะห์สารอินทรีย์ระเหยง่ายในตัวอย่างจากสัตว์ โดยเทคนิค GC-IMS

ผู้จัดทำ : ดร.ณัฐนี ตั้งกิจอนันต์สิน และ ผศ.ดร.ชฎิล กุลสิงห์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

รูป A : ภาพการดมกลิ่นของสุนัข

(ที่มา : https://www.dogilike.com/content/vettalk/2812)

เจ้าตูบแสนรัก หรือ สุนัข เรียกได้ว่าเป็นเจ้าแห่งการดมกลิ่น โดยสุนัขเป็นสัตว์ที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ โดยการปฏิสนธิของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (อสุจิ) กับเซลล์สืบพันธุ์ของสุนัขเพศเมีย (ไข่) เป็นการปฏิสนธิที่เกิดขึ้นภายในร่างกายของสุนัข เช่นเดียวกับมนุษย์และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทั่วไป แต่ขั้นตอนของการผสมพันธุ์ของสุนัขนั้นจะอาศัยการดมกลิ่นด้วย ซึ่งพฤติกรรมการผสมพันธุ์ของสุนัข เช่น สุนัขจะมีการหันหลังชนกันเวลาผสมพันธุ์ การดมกลิ่นและการปล่อยกลิ่นเพื่อแสดงออกถึงความต้องการทางเพศ เป็นต้น

เมื่อสุนัขเข้าถึงวัยเจริญพันธุ์ จะได้รับอิทธิพลจากฮอร์โมนที่ผลิตจากต่อมไร้ท่อ ซึ่งมีผลต่อกระบวนการเปลี่ยนแปลงของอวัยวะต่างๆที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ของร่างกาย โดยเฉพาะสุนัขเพศเมียที่จะต้องเป็นประจำเดือน (เป็นสัด) หรือเรียกอีกอย่างว่า อาการฮีท สุนัขเพศเมียจะมีของเหลวสีแดงไหลออกมาจากอวัยวะเพศ คล้ายกับการมีประจำเดือนของมนุษย์ เราเรียกระยะต่างๆของการสืบพันธุ์หรือช่วงที่สุนัขเป็นประจำเดือน โดยการแสดงออกของสุนัขจะแบ่งออกเป็น 4 ระยะ ได้แก่ ระยะก่อนเป็นสัด ระยะเป็นสัด ระยะหลังเป็นสัด และ ระยะไม่เป็นสัด

1. ระยะก่อนเป็นสัด หรือ Proestrus จะพบอวัยวะเพศบวมขยายตัว และมีสารคัดหลั่งลักษณะเป็นเลือดสีแดงออกจากช่องคลอด (Sanguinous Vaginal Discharge) ระยะนี้สุนัขตัวเมียจะมีกลิ่นดึงดูดสุนัขเพศผู้

2. ระยะเป็นสัด (ระยะมีประจำเดือน) หรือ Estrus เป็นระยะของการผสมพันธุ์ในสุนัข โดยสุนัขเพศเมียเริ่มเบี่ยงก้นให้กับสุนัขเพศผู้ โดยมีอาการยืนนิ่งเพื่อรับการผสม (Standing Heat) โดยอวัยวะเพศยังคงบวมอยู่ แต่จะพบสารคัดหลั่งเป็นเมือกใสๆ หรือสีแดงอ่อน ซึ่งระยะ Estrus เป็นช่วงที่มีการตกไข่ของสุนัขเพศเมีย

รูป B : ภาพการดมกลิ่นของสุนัขช่วงเป็นสัด

(ที่มา : https://www.dogilike.com)

3. ระยะหลังเป็นสัด หรือ Diestrus โดยระยะนี้อวัยวะเพศจะไม่มีการบวม รวมถึงไม่พบสารคัดหลั่ง ซึ่งเป็นช่วงที่มีฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่เป็นฮอร์โมนรองรับการตั้งท้องสูง และจะลดลงช่วงท้ายของระยะการตั้งท้อง (ปกติการตั้งท้องของสุนัขจะใช้เวลาเฉลี่ย 2 เดือน)

4. ระยะไม่เป็นสัด หรือ Anestrus ระยะนี้พบว่าอวัยวะเพศของสุนัขเพศเมียจะเล็กลงเหมือนปกติ และไม่ดึงดูดสุนัขเพศผู้แล้ว ซึ่งไม่มีฮอร์โมนทางระบบสืบพันธุ์ในระยะนี้ โดยเฉลี่ยระยะนี้อยู่ในช่วงประมาณ 4 - 5 เดือน

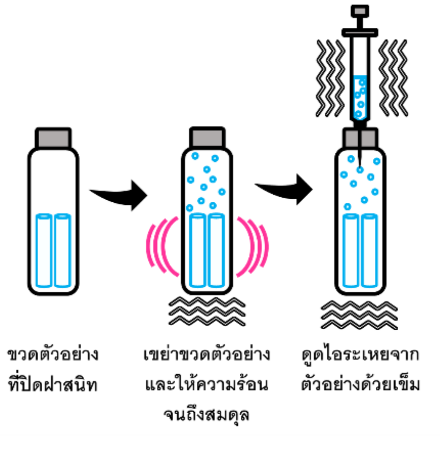
รูป C : ภาพลูกสุนัข

(ที่มา : https://www.sanook.com/women/4489/)

ช่วงเป็นสัด สุนัขเพศผู้จะได้กลิ่นสุนัขเพศเมียที่เป็นสัด ทำให้ต้องการจะผสมพันธุ์ ซึ่งการผสมพันธุ์ในช่วงดังกล่าวจะมีโอกาสสูงมากที่จะทำให้สุนัขตั้งท้องได้ เนื่องจากช่วงเวลานี้เป็นช่วงที่ฮอร์โมนของสุนัขมีการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจน ทำให้สารให้กลิ่นในตัวสุนัขเกิดการเปลี่ยนแปลงไปด้วย ในงานวิจัยนี้เราจึงได้ทำการศึกษากลิ่นจากสารคัดหลั่งของสุนัขเพศเมียในช่วงเป็นสัด และไม่เป็นสัด ซึ่งการศึกษากลิ่นทางวิทยาศาสตร์จะมีเครื่องมือที่หลากหลายสำหรับการวิเคราะห์สารระเหย (Volatile Organic Compounds: VOCs) เช่น แก๊สโครมาโตกราฟี (GC) ที่นิยมสำหรับการศึกษาค้นคว้าและแยกแยะสาร VOCs แต่เมื่อต้องการแยกแยะสารจำนวนมากในตัวอย่างต่างๆ จำเป็นที่จะต้องใช้เวลานาน ซึ่งถือเป็นข้อจำกัดสำหรับเครื่อง ต่อมาจึงมีการพัฒนาเทคนิค GC ที่ใช้ร่วมกับเครื่องตรวจวัดชนิด Ion Mobility Spectrometry (IMS) ซึ่งทำให้สามารถจัดจำแนกสารผสมได้ 2 รอบ ได้แก่ GC และ IMS เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ

ในการวิเคราะห์ โดยใน GC จะแยกสารตาม Boiling Point และ IMS จะทำการแยกไอออนต่อจากนั้นโดยอาศัยการแตกตัวรวมถึงความสามารถในการเคลื่อนที่ของไอออนแต่ละตัว จึงทำให้สามารถวิเคราะห์ VOCs ได้ดีขึ้น และลดเวลาในการวิเคราะห์เมื่อเทียบกับการวิเคราะห์แบบเดิม

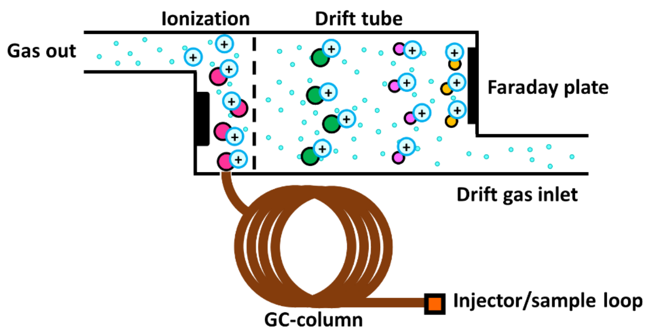
GC-IMS เป็นเทคนิคที่เหมาะสำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ให้สารสถานะแก๊ส หรือ VOCs ตัวอย่างต่างๆที่จะวิเคราะห์จะต้องถูกทำให้เป็นไอระเหย หรืออยู่ในสถานะของสารระเหย เทคนิคที่นิยมใช้ในการเตรียมตัวอย่างคือเทคนิคเฮดสเปซ (Headspace: HS) โดยขั้นตอนการสกัดจะเริ่มจากการให้ความร้อนกับตัวอย่างที่บรรจุไว้ในขวดที่ปิดสนิท เพื่อให้สารที่อยู่ในตัวอย่างระเหยออกมาในรูป VOCs จากนั้นจะดูดส่วนไอระเหยไปวิเคราะห์ในเครื่อง GC-IMS ต่อไป ซึ่งขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างแบบ HS จะช่วยลดระยะเวลาการเตรียมตัวอย่างและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เนื่องจากไม่ได้ใช้สารละลายหรือสารเคมีในการสกัดตัวอย่าง สำหรับขั้นตอนการสกัดแบบ HS จะแสดงในรูปที่ 1 โดยปัจจุบันมีการพัฒนาเครื่อง Autosampler (รูปที่ 2) สำหรับการสกัดตัวอย่างแบบ HS



รูปที่ 1 แสดงขั้นตอนการสกัดด้วยเทคนิคเฮดสเปซ

รูปที่ 2 แสดงเครื่อง GC-IMS พร้อม Autosampler

เมื่อได้สาร VOCs แล้วจะถูกเครื่อง Autosampler ฉีดสารตัวอย่างที่อยู่ในรูปสารระเหยเข้าสู่ระบบ GC-IMS หลังจากนั้นสารจะถูกแก๊สไนโตรเจน (N_2) ซึ่งทำหน้าที่เป็นแก๊สพา (Carrier gas) พาไอระเหยของตัวอย่างไปยังคอลัมน์ (Column) เพื่อแยกสาร โดยสารแต่ละชนิดจะใช้เวลาในการเดินทางในคอลัมน์แตกต่างกัน ขึ้นกับชนิดของสาร รวมถึงชนิดของคอลัมน์ที่ใช้ในการแยก จากนั้นสารที่ถูกแยกจากคอลัมน์จะถูกส่งผ่านเข้าไปยังเครื่องตรวจวัด ชนิด IMS เพื่อแยกไอออนของสารผสม ซึ่งสารบางชนิดจะไม่ได้ถูกแยกจากคอลัมน์ แต่จะสามารถมาแยกต่อได้ใน IMS จึงทำให้เทคนิคนี้เกิดการแยก 2 ครั้ง (2 มิติ) จาก GC และ IMS ดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 แสดงการทำงานของเครื่อง GC-IMS

เครื่องมือและวิธีการวิเคราะห์

ตารางที่ 1 สภาวะการทดลองของเครื่องเตรียมตัวอย่างอัตโนมัติชนิดเฮดสเปซ

Incubation Temp (°C)	40
Incubation Time (min)	20
Syringe Temp (°C)	70
Injection volume (µL)	100

ตารางที่ 2 สภาวะการทดลองของเครื่อง GC

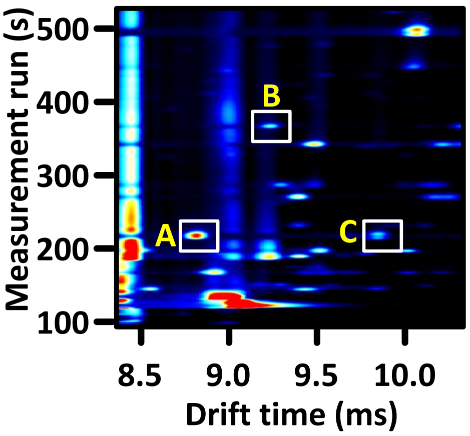
Column	FS-SE-54-CB-1, ID 0.53mm,15m
Injector Temp (°C)	80
Column Flow (mL min^{-1})	2
Oven Temp (°C)	40
Run time (min)	25

ตารางที่ 3 สภาวะการทดลองของเครื่อง IMS

IMS Temp (°C)	45
Drift Gas Flow (mL min^{-1})	150

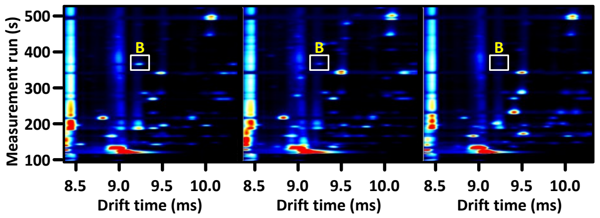
ผลการวิเคราะห์

GC-IMS จะแสดงผลที่เรียกว่า Contour Plot ซึ่งความเข้มของสีจะแสดงถึงความเข้มข้น หรือ ปริมาณสาร VOCs แต่ละชนิด โดยแต่ละตำแหน่งของสีจะบ่งชี้ถึงตำแหน่งของสารแต่ละชนิดที่แยกได้ในระบบ2มิติ ดังตัวอย่างของผลการทดสอบการวิเคราะห์สารระเหย ในตัวอย่างจากสุนัข ที่เก็บมาด้วยวิธีการเช็ดสารคัดหลั่งของสุนัขด้วยก้านสำลี แสดงในรูปที่ 4 ตำแหน่ง A, B และ C คือสารแต่ละชนิดที่แยกในระบบ GC-IMS

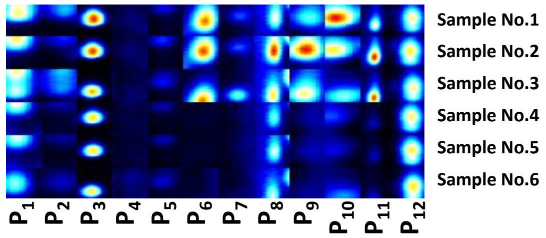


รูปที่ 4 โครมาโตแกรมแสดงสาร VOCs ที่ตรวจพบในตัวอย่างจากสุนัข

GC-IMS สามารถหาปริมาณสารจากความเข้มของจุดที่ปรากฏในโครมาโตแกรม ดังรูปที่ 5 เมื่อแสดงผลเปรียบเทียบระหว่าง 3 โครมาโตแกรมของตัวอย่างจากสุนัข 3 ตัวอย่าง พบว่าที่ตำแหน่งของสาร B ของแต่ละตัวอย่างมีปริมาตรของพีกที่แตกต่างกัน เนื่องจากผลของกลิ่นที่เปลี่ยนไปในแต่ละตัวอย่างที่ได้เก็บมานั้นเอง อีกทั้งยังสามารถแสดงผลของจุดแต่ละตำแหน่งบนโครมาโตแกรม เพื่อเปรียบเทียบความเหมือนและแตกต่างกันได้ด้วย ดังรูปที่ 6

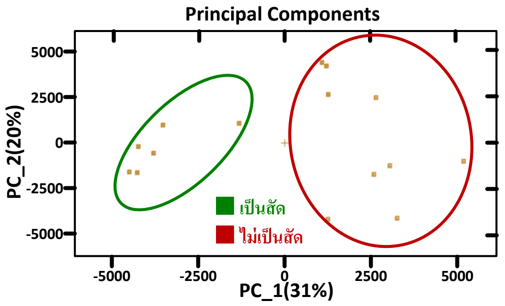


รูปที่ 5 โครมาโตแกรมแสดงสาร VOCs ที่ตรวจพบในตัวอย่างจากสุนัข ที่แสดงความเข้มของตำแหน่ง B แตกต่างกัน



รูปที่ 6 แสดงผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบตัวอย่างจากสุนัข โดยแสดงผลของแต่ละตำแหน่งของโครมาโตแกรม

นอกจากการนี้ GC-IMS ยังสามารถจัดกลุ่มของตัวอย่างโดยใช้การวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก หรือ Principal Component Analysis(PCA) ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้วิเคราะห์ข้อมูลจากจุดแต่ละตำแหน่งบนโครมาโตแกรม เพื่อหาความสัมพันธ์ของกลุ่มตัวอย่างได้ และนำไปสู่การแยกกลุ่มตัวอย่าง ซึ่งจากผลการทดลองตัวอย่างจากสุนัขในช่วงที่เป็นสัดและไม่เป็นสัด พบว่าเราสามารถแบ่งตัวอย่างออกได้เป็น 2 กลุ่ม ดังแสดงผลใน PCA รูปที่ 7 นั้นเอง



รูปที่ 7 แสดงผลการวิเคราะห์ตัวอย่างแบบจัดกลุ่มโดยใช้ PCA

สรุปผลการทดลอง

การวิเคราะห์กลิ่นในตัวอย่างจากสัตว์ สามารถแยกช่วงเป็นสัดและไม่เป็นสัดของสุนัขได้ อีกทั้งยังปลอดภัยต่อผู้ทำการวิจัย เพราะไม่มีการเตรียมตัวอย่างแบบใช้สารเคมี เมื่อใช้เทคนิค HS สำหรับการสกัดสาร VOCs ออกจากตัวอย่าง และพบว่าสามารถวิเคราะห์ผลได้ในเวลาที่เร็วกว่าเทคนิคอื่น เช่น GC-MS ที่มีการสกัดแบบ HS-SPME ที่ใช้เวลานานกว่า อีกทั้งการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีเฮดสเปซสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้ง่าย ไม่ซับซ้อน ไม่มีการใช้ตัวดูดซับสาร (SPME fiber) ที่มีราคาแพง และยังเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ในการสกัดจากตัวอย่าง รวมถึงลดของเสียที่เป็นอันตรายจากห้องปฏิบัติการ

ตัวอย่างการประยุกต์ใช้งานเครื่อง GC-IMS

- การจำแนกชนิดของกาแฟ
- การจำแนกชนิดน้ำผึ้งตามแหล่งที่มาเพื่อจำหน่าย
- การวิเคราะห์เพื่อควบคุมภาพของวัตถุดิบ
- การควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ก่อนจัดจำหน่าย
- การตรวจติดตามคุณภาพของผลิตภัณฑ์หลังบรรจุ
- การเปรียบเทียบผลิตภัณฑ์จากผู้ผลิตต่างๆ
- การหาเอกลักษณ์ของผลิตภัณฑ์
- การวิเคราะห์ปริมาณของสารที่สนใจในผลิตภัณฑ์
- การวิเคราะห์ตัวอย่าง COVID-19

เครื่องมือที่เกี่ยวข้อง

FlavourSpec®GC-IMS พร้อมเครื่องเตรียมตัวอย่างชนิดเฮดสเปซ

- เครื่องมือสามารถทำงานได้โดยไม่ต้องใช้ระบบคอมพิวเตอร์ควบคุม (Stand-alone)
- มีหน้าจอสำหรับควบคุมการทำงานและแสดงสถานะบริเวณหน้าเครื่อง
- ใช้แก๊สไนโตรเจนเป็นแก๊สพา (Carrier gas) ช่วยประหยัดค่าใช้จ่าย
- มีโหมดสำหรับทำความสะอาดระบบก่อนการทำงาน
- สามารถเลือกวิเคราะห์ในโหมด Positive หรือ Negative ได้
- สามารถเลือกจัดการผลการวิเคราะห์แบบอัตโนมัติหรือแบบปรับตั้งค่าเองได้
- สามารถเก็บข้อมูลการวิเคราะห์ไว้ในเครื่องมือได้ และสามารถนำข้อมูลออกมาจากเครื่องมือเพื่อทำการประมวลผลผ่านระบบคอมพิวเตอร์ได้
- รองรับการวิเคราะห์ตัวอย่างได้ต่อเนื่องสูงสุด 60 ตัวอย่าง
- มีระบบอุ่นขวดตัวอย่างที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้สูงสุด 200 องศาเซลเซียส
- เข็มฉีดตัวอย่างสามารถควบคุมอุณหภูมิได้สูงสุด 150 องศาเซลเซียส
- มีระบบทำความสะอาดเข็มฉีดตัวอย่างด้วยแก๊สเฉื่อยอัตโนมัติ

ติดตามแอพพลิเคชั่นอื่น ๆ ได้ที่ https://www.scispec.co.th

บริษัท ซายน์ สเปค จำกัด
10 ซอยกาญจนาภิเษก ซอย 0010 แยกสอง
เขตบางแค กทม. 10160
โทร 02 454 8533
scispec @scispec

ISSUED: 23070702