รายงานการวิจัย

โครงการวิจัยเรื่องการคัดสายพันธุ์พริกและงาเพื่อการประยุกต์ด้านอุตสาหกรรมอาหารและอาหารเสริม

Chilli and Sesamin Variety Selection for the Applications in Food Industry and Food Supplements

วรินทร ชวศิริ

สันติ ทิพยางค์

ธรรมนูญ หนูจักร

ปรีชา ภูวไพรศิริศาล

พัฒทรา สวัสดี

ลักษณา ดูบาส

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ **แบบ ต-1ช/ด**

แบบรายงานความก้าวหน้า

1. รายละเอียดเกี่ยวกับแผนงานวิจัย / โครงการวิจัย

ชื่อเรื่อง (ภาษาไทย) การคัดสายพันธุ์พริกและงาเพื่อการประยุกต์ด้านอุตสาหกรรมอาหารและอาหารเสริม

(ภาษาอังกฤษ) Chilli and Sesamin Variety Selection for the Applications in Food Industry and Food Supplements

รายนามคณะผู้วิจัย พร้อมทั้งหน่วยงานที่สังกัดและหมายเลขโทรศัพท์

(1) หัวหน้าโครงการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรินทร ชวศิริ

(2) นักวิจัย รองศาสตราจารย์ ดร.สันติ ทิพยางค์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธรรมนูญ หนูจักร

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรีชา ภูวไพรศิริศาล

อาจารย์ ดร.พัฒทรา สวัสดี

อาจารย์ ดร.ลักษณา ดูบาส

หน่วยงานที่สังกัด หน่วยวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ 02-2187625 โทรสาร 02-2541309, 02-2187598

e-mail : warintho@yahoo.com

ได้รับอนุมัติงบประมาณ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2551

งบประมาณที่ได้รับ 1,340,000 บาท ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี (โครงการต่อเนื่อง 4 ปี)

เริ่มทำการวิจัยเมื่อ (เดือน ปี) 1 ตุลาคม 2550 **ถึง** 30 กันยายน 2551

2. รายละเอียดเกี่ยวกับผลงานความก้าวหน้าของการวิจัย

2.1 วัตถุประสงค์ของแผนงานวิจัย / โครงการวิจัย ในปีที่ 3 (โดยสรุป)

1) วิเคราะห์ปริมาณแคปไซซินอยด์จากตัวอย่างพริกพันธุ์ต่างๆ ที่สกัดเทคนิค solvent extraction ด้วยเทคนิค HPLC

2) พัฒนาวิธีการสกัดแคปไซซินอยด์จากพริก ด้วยเทคนิค mirowave-assisted extraction (MAE)

3) พัฒนารูปแบบสารสกัดพริกเพื่อการใช้ประโยชน์ด้านอาหาร

4) การใช้โพลิเมอริกเรซินในการสกัดแยกสารมาตรฐาน sesaminol glycoside และเตรียมตัวอย่างเมล็ดงาสำหรับการวิเคราะห์ด้วย HPLC

2.2 แสดงตารางเปรียบเทียบผลการดำเนินงานตามแผนการดำเนินงานวิจัยที่ได้เสนอไว้กับงานวิจัยที่ได้ดำเนินการจริง ในรูปของแผนการดำเนินงานตลอดแผนงานวิจัย / โครงการวิจัย ว่ามีกิจกรรม / ขั้นตอนปฏิบัติตามลำดับอย่างไร

กิจกรรม	ปีที่ 3											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. วิเคราะห์ปริมาณแคปไซซินอยด์ของพริกสายพันธุ์ต่างๆ ด้วยเทคนิค solvent extraction	◄·····►			◄·····►								
	◄——►			◄——►								
2. พัฒนาการสกัดแคปไซซินอยด์ ด้วยเทคนิค MAE	◄·····►										◄·····►	
	◄——►										◄——►	
3. การพัฒนารูปแบบสารสกัดพริกเพื่อการใช้ประโยชน์ด้านอาหาร							◄·····►					◄·····►
							◄——►					◄——►
4.การใช้โพลิเมอริกเรซินสำหรับการแยกและวิเคราะห์ sesaminol glycoside	◄·····►									◄·····►		
	◄——►									◄——►		
5.สรุปผลและเขียนรายงาน											◄·····►	

◄·····► แผนงานวิจัยตามที่เสนอไว้ในโครงการ

◄——► แผนงานวิจัยที่ได้ดำเนินการแล้ว

2.3 แสดงรายละเอียดของผลการดำเนินงาน พร้อมสรุปและวิเคราะห์ผลที่ได้ดำเนินการไปแล้ว

ส่วนที่ 1 :พริก

- **งานวิจัยในปีงบประมาณ** 2550-2551

ผู้วิจัยได้ศึกษาการแยกแคปไซซิน (capsaicin) บริสุทธิ์ จากสารสกัดด้วยวิธีต่างๆ แต่อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถหาวิธีที่เหมาะสมได้ แต่พบการสกัดที่น่าสนใจ คือ การใช้น้ำมันพืชในการสกัดแคปไซซินจากพริกซึ่งสามารถสกัดแคปไซซินออกมาได้ อีกทั้งพริกหลังการสกัดยังมีสภาพที่ดีสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารที่ต้องการความเผ็ดไม่มากได้อีกด้วย

นอกจากนี้ ผู้วิจัยได้ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์แคปไซซินอยด์ (capsaicinoids) ด้วยเทคนิค HPLC โดยให้ค่า resolution มากกว่า 1 และ ได้ค่า %recovery ที่ยอมรับได้ รวมทั้ง precision ที่ดี

- **งานวิจัยในปีงบประมาณ** 2552

1) ศึกษาการสกัดแคปไซซินอยด์จากพริกด้วยเทคนิค solvent extraction **และวิเคราะห์ปริมาณด้วยเทคนิค** HPLC

<u>วัตถุประสงค์</u>

1. ศึกษาการสกัดแคปไซซินอยด์จากพริกด้วยเทคนิค solvent extraction และวิธีวิเคราะห์ปริมาณด้วย HPLC

วิธีการทดลองและผลการทดลอง

1.1 การศึกษาความแม่นยำ (precision) ของการสกัดแคปไซซินอยด์จากพริกด้วยเทคนิค solvent extraction และวิเคราะห์ปริมาณด้วย HPLC

งานวิจัยที่ผ่านมาได้ทำการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง (linearity) และความเที่ยงของการสกัดแคปไซซินอยด์ (แคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซิน) จากพริกและวิเคราะห์ปริมาณด้วยเทคนิค HPLC สำหรับงานวิจัยส่วนนี้จะทำการศึกษาความแม่นยำของวิธีดังกล่าว

ทำการรีฟลักซ์ (reflux) พริกแห้งที่บดละเอียด 1.25 g (ที่เติมสารมาตรฐานลงไปในปริมาณที่แน่นอน ได้แก่ 19.5/10.5, 119.6/64.4 และ 221/119 ppm แคปไซซิน/ไดไฮโดรแคปไซซิน) ในเอทานอล 20 มล. อุณหภูมิ 80 ^{o}C เป็นเวลา 5 ชั่วโมง นำสิ่งสกัดที่ได้มากรองกากพริกออกด้วยกระดาษกรอง แล้วเตรียมเป็นสารละลาย 25 มล. กรองสารละลายผ่าน PTFE syringe filter แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC โดยใช้ภาวะการทดลองต่อไปนี้

Analytical column: Hyperclone ODS C18, 150 x 4.60 mm, 5 µm

Mobile phase: acetonitrile: 1% acetic acid (42:58)

Flow rate: 1.0 mL/min

Injection volume: 20 µL

Detector: photo diode array UV-VIS ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

Temperature: room temperature

ความแม่นยำของการสกัดและวิเคราะห์นี้แสดงได้จากค่า %recovery ซึ่งคำนวณได้จากสมการที่แสดงข้างล่างและได้ผลดังแสดงในตารางที่ 1

$$\%\text{recovery} = \frac{a - b}{c} \times 100$$

a คือ ปริมาณแคปไซซิน (หรือไดไฮโดรแคปไซซิน) ที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างพริกที่เติมสารมาตรฐาน (ppm)

b คือ ปริมาณแคปไซซิน (หรือไดไฮโดรแคปไซซิน)ที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างพริกที่ไม่เติมสารมาตรฐาน (ppm)

และ c คือ ปริมาณสารมาตรฐานแคปไซซิน (หรือไดไฮโดรแคปไซซิน)ที่แน่นอนที่เติมลงไปในตัวอย่างพริก

119.6	64.4	94.70 ± 3.25	83.04 ± 2.43
221	119	87.18 ± 2.43	95.26 ± 2.11

จากตารางที่ 1 จะเห็นว่าค่า %recovery ที่หาได้นั้นมีค่าอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ตามมาตรฐาน AOAC นั่นคือการสกัดสารด้วยวิธีการข้างต้นจนถึงการวิเคราะห์ปริมาณมีความแม่นยำ ซึ่งผู้วิจัยจะยึดแนวทางการปฏิบัติดังกล่าวในการสกัดและวิเคราะห์ปริมาณแคปไซซินอยด์ในตัวอย่างพริกต่อไป

1.2 การสกัดและวิเคราะห์ปริมาณแคปไซซินอยด์ในตัวอย่างพริก

งานวิจัยส่วนนี้เป็นการวิเคราะห์ปริมาณแคปไซซินอยด์ในตัวอย่างพริกจากแหล่งต่างๆ โดยจะทำการสกัดสารด้วยเทคนิค solvent extraction และวิเคราะห์ปริมาณด้วย HPLC ด้วยกระบวนการในข้อ 1.1 ซึ่งได้ผลการวิเคราะห์ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณแคปไซซินอยด์ในตัวอย่างพริกจากแหล่งต่างๆ

ตัวอย่างที่	ชื่อตัวอย่าง	ปริมาณสาร (ppm)	
		capsaicin	dihydrocapsaicin
1	พันธุ์ super hot อ.ด่านซ้าย จ.เลย	221.88 ± 3.70	91.87 ± 3.30
2	พริกขี้ฟ้า พันธุ์แม่ปิง 90 จ.สุโขทัย	44.60 ± 1.14	24.48 ± 4.48
3	SP001 จ.สุพรรณบุรี	78.68 ± 1.69	34.97 ± 3.22
4	ห้วยสีทน	167.42 ± 4.29	71.04 ± 2.44
5	พจ 007 (พันธุ์ยอดสน)	133.52 ± 3.45	64.68 ± 1.99
6	97-7127	93.12 ± 2.46	40.20 ± 1.09
7	พันธุ์ super hot (ไม่คัดพันธุ์)	177.33 ± 1.29	64.88 ± 2.02
8	พจ 27-1-2-1 (พันธุ์ยอดสน)	18.22 ± 1.25	6.54 ± 3.90

หมายเหตุ ชื่อตัวอย่างของพริก เป็นชื่อที่ระบุโดยกรมวิชาการเกษตร ซึ่งทางกรมวิชาการเกษตรให้ข้อมูลว่า บางชื่อตัวอย่างเป็นการผสมพันธุ์พริกใหม่ (breeding) ยังไม่ได้ให้ชื่อไทย คงใช้เป็นสัญลักษณ์ เช่น 97_7127 เป็นต้น

สรุปผลการทดลอง

ปริมาณสารสำคัญในกลุ่มแคปไซซินอยด์ในพริกสายพันธุ์ต่างๆ ซึ่งได้แก่ แคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซินสามารถทำการวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง HPLC ใช้คอลัมน์ Hyperclone ODS C18 ขนาด 5 µm บรรจุใส่ในคอลัมน์ขนาด 150 x 4.60 mm และใช้ acetonitrile: 1% acetic acid ในอัตราส่วน 42:58 เป็นเฟสเคลื่อนที่ ทำการตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จากการวิเคราะห์พริกทั้งสิ้น 13 ชนิด ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากกรมวิชาการเกษตร พบว่าพริกขี้ฟ้ามีความเผ็ดน้อยกว่าพริกขี้หนู และพริกขี้หนูพันธุ์ super hot มีความเผ็ดมากที่สุด นอกจากนี้พื้นที่ในการเพาะปลูกยังมีผลต่อความเผ็ดของพริกซึ่งจะเห็นได้จากพริกขี้หนูพันธุ์ super hot ที่ปลูกในพื้นที่ที่ต่างกัน มีความเผ็ดต่างกัน

2) **พัฒนาการสกัดแคปไซซินอยด์ ด้วยเทคนิค microwave-assisted extraction (MAE)**

<u>วัตถุประสงค์</u>

พัฒนาวิธีการสกัดแคปไซซินอยด์จากพริกด้วยเทคนิค microwave-assisted extraction (MAE) และศึกษาผลของตัวแปรต่อประสิทธิภาพของการสกัด โดยใช้ factorial design เพื่อการพัฒนาวิธีการสกัดรวดเร็วขึ้น

<u>วิธีการทดลอง ผลการทดลอง และวิจารณ์ผลการทดลอง</u>

งานวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยมุ่งศึกษาการสกัดแคปไซซินอยด์ด้วยเทคนิค microwave-assisted extraction (MAE) เนื่องจากเป็นเทคนิคที่สะดวก รวดเร็ว และใช้ปริมาณสารตัวอย่างน้อยกว่าการสกัดด้วยเทคนิค solvent extraction ซึ่งเป็นวิธีดั้งเดิม

2.1 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการสกัดแคปไซซินอยด์จากพริกด้วยเทคนิค MAE

ปัจจัยที่จะทำการศึกษา ได้แก่ กำลังของเครื่องไมโครเวฟ เวลาในการสกัด และปริมาตรเอทานอล ซึ่งผู้วิจัยจะใช้ระเบียบวิธีของ factorial design โดยอาศัยการออกแบบการทดลองแบบบล็อกสุ่ม (RBD) และใช้โปรแกรม MINITAB14 ในการวิเคราะห์ข้อมูล เพื่อหาสมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแคปไซซินอยด์ กับปัจจัยทั้งสาม และปัจจัยหลักและปัจจัยร่วมอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

อิทธิพลหลัก (main effect) และอิทธิพลร่วม (interaction) ในการวิเคราะห์นี้มีดังนี้

1. อิทธิพลหลัก จากปัจจัยกำลังของเครื่องไมโครเวฟ (P), เวลา (t) และปริมาตรเอทานอล (V)

2. อิทธิพลร่วมสองทาง (2-way interaction) จากปัจจัยร่วมระหว่างกำลังของเครื่องไมโครเวฟกับเวลา (P.t), กำลังของเครื่องไมโครเวฟกับปริมาตรเอทานอล (P.V) และ เวลากับปริมาตรเอทานอล (t.V)

3. อิทธิพลร่วมสามทาง (3-way interaction) จากปัจจัยร่วมระหว่างกำลังของเครื่องไมโครเวฟ, เวลากับปริมาตรเอทานอล (P.t.V)

ในการทดลองผู้วิจัยได้กำหนดค่าต่างๆ เพื่อศึกษาผลของปัจจัยดังกล่าว ดังแสดงในตารางที่ 3 โดยขั้นต้นชั่งตัวอย่างพริกน้ำหนักแน่นอนใกล้เคียง 0.5000 กรัม ใส่หลอดไมโครเวฟ เติมเอทานอล ปริมาตรตามค่าในตารางที่ 3 จากนั้นทำการรันไมโครเวฟโดยใช้ค่ากำลังของเครื่องและเวลาตามค่าในตารางที่ 4 นำสิ่งสกัดที่ได้มากรองกากพริกออกด้วยกระดาษกรอง แล้วเตรียมเป็นสารละลาย 25 มล. กรองสารละลายผ่าน PTFE syringe filter ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4 และนำข้อมูลดังกล่าวไปวิเคราะห์ สรุปได้ว่าปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดปริมาณแคปไซซินอยด์อย่างมีนัยสำคัญได้แก่ กำลังของเครื่องไมโครเวฟ, เวลา, ปริมาตรเอทานอลและจาก interaction plot (ไม่แสดงในที่นี้) พบว่าปัจจัยร่วมระหว่างกำลังของเครื่องไมโครเวฟกับเวลามีผล ซึ่ง ณ กำลัง 400 W เวลามีอิทธิพลต่อปริมาณของแคปไซซินที่สกัดได้มากกว่าที่กำลัง 800 W ในทำนองเดียวกัน ที่กำลัง 800 W ปริมาตรเอทานอจะมีอิทธิพลต่อปริมาณของแคปไซซินที่สกัดได้มากกว่าที่กำลัง 400 W แต่เมื่อพิจารณากราฟ interaction ระหว่างเวลากับปริมาตรเอทานอล จะเห็นว่าความชันของเส้นกราฟเมื่อใช้เวลาการสกัด 3 และ 10 นาทีไม่แตกต่างกัน หมายความว่าไม่ว่าจะใช้เวลาการสกัดเป็น 3 หรือ 10 นาที ปริมาตรเอทานอลที่ใช้จะมีอิทธิพลต่อปริมาณของแคปไซซิน

ที่สกัดได้ไม่ต่างกัน จากที่กล่าวมาสรุปได้ว่าปัจจัยร่วมระหว่างกำลังของเครื่องไมโครเวฟกับเวลา และกำลังของเครื่องไมโครเวฟกับปริมาตรเอทานอล มีผลกระทบอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ปัจจัยร่วมระหว่างเวลากับปริมาตรเอทานอล ไม่มีผลกระทบต่อปริมาณแคปไซซินที่สกัดได้อย่างมีนัยสำคัญ

การวิเคราะห์อิทธิพลจากปัจจัยร่วมต่อปริมาณไดไฮโดรแคปไซซินที่สกัดได้ทำได้ในทำนองเดียวกันกับในกรณีของแคปไซซิน ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าปัจจัยร่วมระหว่างกำลังของเครื่องไมโครเวฟกับเวลา, กำลังของเครื่องไมโครเวฟกับปริมาตรเอทานอล และเวลากับปริมาตรเอทานอล ไม่มีผลกระทบต่อปริมาณไดไฮโดรแคปไซซินที่สกัดได้อย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 3 แสดงปัจจัย และระดับของปัจจัยที่ศึกษา

ปัจจัย	ตัวย่อ	หน่วย	ระดับ	
			ต่ำ	สูง
power	P	W	400 (P_1)	800 (P_2)
extraction time	t	min	3 (t_1)	10 (t_2)
extraction volume	V	mL	10 (V_1)	30 (V_2)

สมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแคปไซซินอยด์กับกำลังของเครื่องไมโครเวฟ, เวลา และปริมาตรเอทานอลที่ใช้ในการสกัดที่ได้จากการคำนวณด้วยโปรแกรมคือ

ปริมาณแคปไซซิน: $y = 2084.88 + 0.322535P + 41.8335t - 1.23179V - 0.0319287Pt + 0.00889252PV + 0.000019437PtV$ --- (1)

ปริมาณไดไฮโดรแคปไซซิน: $y = 1384.35 + 0.183354P + 16.7738t + 1.78356V$ --- (2)

สมการที่ 1 และ 2 สามารถนำไปใช้ทำนายภาวะการสกัดที่ทำให้ได้ปริมาณแคปไซซินอยด์มากที่สุดได้หากทราบปริมาณแคปไซซินอยด์ทั้งหมดที่มีอยู่จริงโดยการแทนค่าปริมาณแคปไซซินอยด์และค่าของปัจจัย 2 ปัจจัยที่ต้องการใช้แล้วแก้สมการหาค่าของอีกปัจจัยที่เหลือ

ตารางที่ 4 ปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้, ค่าเฉลี่ย และค่าเปอร์เซ็นต์ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (percent relative standard deviation, %RSD) ของการวิเคราะห์ปริมาณแคปไซซินอยด์ที่สกัดได้จากพริกพันธุ์ยอดสนด้วยเทคนิค microwave-assisted extraction โดยใช้ภาวะการสกัดต่างๆ

ชุด	ภาวะที่ใช้			ตัวอย่างที่	ปริมาณสาร (ppm)		ค่าเฉลี่ย (ppm)		%RSD	
	P (W)	t (min)	V (mL)		capsaicin	DHC	capsaicin	DHC	Capsaicin	DHC
a-1	400	3	10	1	2378.33	1537.77	2349.19	1545.22	1.08	1.07
				2	2331.60	1533.66				
				3	2337.64	1564.21				
a-2	400	3	30	1	2339.89	1514.41	2346.90	1545.73	0.39	1.86
				2	2343.48	1570.86				
				3	2357.34	1551.92				
a-3	400	10	10	1	2524.22	1625.86	2503.91	1622.45	1.01	0.26
				2	2475.60	1617.82				
				3	2511.92	1623.67				
a-4	400	10	30	1	2598.08	1667.62	2601.23	1696.16	0.95	1.64
				2	2627.33	1723.18				
				3	2578.28	1697.67				
a-5	800	3	10	1	2464.43	1614.10	2438.75	1587.88	1.32	1.45
				2	2449.08	1571.22				
				3	2402.74	1578.33				
a-6	800	3	30	1	2643.55	1639.75	2581.96	1642.58	2.16	1.72
				2	2534.70	1672.09				
				3	2567.62	1615.89				
a-7	800	10	10	1	2617.41	1699.77	2578.50	1729.35	1.58	4.36
				2	2581.77	1673.15				
				3	2536.32	1815.12				
a-8	800	10	30	1	2662.26	1740.56	2674.63	1743.11	0.55	0.31
				2	2690.80	1739.53				
				3	2670.82	1749.25				

2.2 ศึกษาความแม่นยำของสมการ

การศึกษาความแม่นยำของสมการ 1 และ 2 ทำได้โดยการเปรียบเทียบปริมาณแคปไซซินอยด์ (จากตัวอย่างพริกเดียวกัน) ที่ได้จากการคำนวณโดยใช้สมการดังกล่าวกับค่าที่ได้จากการทดลอง ค่าที่ใช้ศึกษาคือเปอร์เซ็นต์ความแตกต่าง ซึ่งคำนวณได้จากสมการ

$$\%\text{ความแตกต่าง} = \frac{\text{ค่าจากสมการ} - \text{ค่าจากการทดลอง}}{\text{ค่าจากการทดลอง}} \times 100\,\% \qquad \text{--- (3)}$$

สกัดตัวอย่างพริกด้วยเทคนิค MAE ด้วยภาวะใดๆ ตามที่ต้องการ เตรียมสารละลายแล้ววิเคราะห์ด้วย HPLC นำปริมาณแคปไซซินอยด์ที่วิเคราะห์ได้มาเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากสมการ ผลการเปรียบเทียบแสดงดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลการเปรียบเทียบปริมาณแคปไซซินอยด์ที่คำนวณได้จากการแทนค่าของปัจจัยในสมการกับค่าที่ได้จากการทดลอง

ภาวะที่ใช้			ปริมาณสาร (ppm)				%ความแตกต่าง	
			จากการทดลอง		จากสมการโปรแกรม			
P (W)	t (min)	V (mL)	capsaicin	dihydro-capsaicin	capsaicin	dihydro-capsaicin	Capsaicin	dihydro-capsaicin
400	3	30	2500.49	1627.63	2371.54	1561.52	-5.16	-4.06
400	10	10	2559.71	1666.79	2528.54	1643.27	-1.22	-1.41
800	3	10	2506.32	1636.46	2451.07	1599.19	-2.20	-2.28
500	5	25	2533.64	1647.60	2457.07	1604.49	-3.02	-2.62

จากตารางที่ 5 จะเห็นว่า %ความแตกต่างมีค่าค่อนข้างต่ำ นั่นแสดงว่าสมการที่หาได้นั้นมประสิทธิภาพค่อนข้างดีในการใช้ทำนายปริมาณแคปไซซินอยด์ที่ภาวะการสกัดใดๆ ซึ่งส่งผลให้การพัฒนาวิธีการสกัดได้ง่ายขึ้น โดยอาศัยสมการที่พัฒนาขึ้น อย่างไรก็ตามสมการที่พัฒนาขึ้นนี้อาจไม่สามารถใช้วิเคราะห์กับพริกพันธุ์ชนิดอื่นๆ ได้เนื่องจากผลของ matrix ที่ต่างกัน

2.3 การตั้งและพิสูจน์สมมติฐานเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแคปไซซินอยด์ที่สกัดได้กับปัจจัยในการสกัดสำหรับพริกพันธุ์ใดๆ ด้วยเทคนิค microwave-assisted extraction

เนื่องจากสมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแคปไซซินอยด์กับกำลังของเครื่องไมโครเวฟ, เวลา และปริมาตรเอทานอลที่หาได้ในการทดลองตอนที่ 2.2 นั้นสามารถใช้ได้กับพริกพันธุ์ยอดสนเพียงพันธุ์เดียว หากต้องการทำนายปริมาณแคปไซซินอยด์หรือทำนายภาวะที่เหมาะสมสำหรับพริกพันธุ์อื่นก็ต้องหาสมการใหม่ขึ้นมาโดยทำการทดลองเช่นเดียวกันซึ่งเป็นการเสียเวลา ดังนั้นผู้ทดลองจะทำการหาสมการสำหรับพริกพันธุ์อื่นด้วยวิธีที่รวดเร็วกว่าภายใต้เงื่อนไขว่า *พริกทุกพันธุ์มี matrix ที่เหมือนกันแต่ต่างกันที่*

ปริมาณแคปไซซินอยด์เท่านั้น และด้วยเงื่อนไขนี้เองทำให้เกิดสมมติฐานว่า "**ปัจจัยหลักและปัจจัยร่วมที่มีอิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญต่อการสกัดแคปไซซินอยด์จากพริกพันธุ์ใดๆ จะเหมือนกัน และระดับความรุนแรงของอิทธิพลของปัจจัยเหล่านั้นไม่แตกต่างกัน**" สมมติฐานดังกล่าวอธิบายได้ดังต่อไปนี้

จากสมการ 1 และ 2

ปริมาณแคปไซซิน: $y = 2084.88 + 0.322535P + 41.8335t - 1.23179V - 0.0319287Pt + 0.00889252PV + 0.000019437PtV$

ปริมาณไดไฮโดรแคปไซซิน: $y = 1384.35 + 0.183354P + 16.7738t + 1.78356V$

จากสมมติฐานข้างต้นจะได้ว่า สมการสำหรับพริกพันธุ์ใดๆ คือ

ปริมาณแคปไซซิน: $y = X + 0.322535P + 41.8335t - 1.23179V - 0.0319287Pt + 0.00889252PV + 0.000019437PtV$ --- (4)

ปริมาณไดไฮโดรแคปไซซิน: $y = Y + 0.183354P + 16.7738t + 1.78356V$ --- (5)

เมื่อ X และ Y คือผลรวมของค่าเฉลี่ยและความคลาดเคลื่อนของปริมาณแคปไซซิน และไดไฮโดรแคปไซซินของพริกพันธุ์ใดๆ ตามลำดับ และเมื่อกำหนดค่า V = 30 มล. ดังนั้นสมการ 4 และ 5 จะลดรูปเป็น

ปริมาณแคปไซซิน: $y = X + 0.58931P + 41.8335t - 0.03134Pt$ --- (6)

ปริมาณไดไฮโดรแคปไซซิน: $y = Y + 0.183354P + 16.7738t$ --- (7)

สมการ 6-7 เป็นสมการที่ได้จากการทำนาย

ทำการทดลองโดยสกัดตัวอย่างพริกพันธุ์ซุปเปอร์ฮอตด้วยเทคนิค microwave-assisted extraction ด้วยภาวะต่างๆ เตรียมสารละลายแล้ววิเคราะห์ด้วย HPLC จากนั้นนำค่าปัจจัยต่างๆ และปริมาณ capsaicinoid ที่หาได้ไปแทนค่าในสมการ 6 และ 7 เพื่อคำนวณหาค่า X และ Y ตามลำดับ ซึ่งผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 6

จากตารางที่ 6 ได้ค่าเฉลี่ยของ X และ Y เท่ากับ 2477.84 และ 1206.28 ppm ตามลำดับ นำไปแทนค่าในสมการ 6 และ 7 จะได้สมการสำหรับพริกพันธุ์ซุปเปอร์ฮอตจากการทำนายคือ

ปริมาณแคปไซซิน: $y = 2477.84 + 0.58931P + 41.8335t - 0.03134Pt$ --- (8)

ปริมาณไดไฮโดรแคปไซซิน: $y = 1206.28 + 0.183354P + 16.7738t$ --- (9)

ตารางที่ 6 ปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้, ค่า X และ Y ของการวิเคราะห์ปริมาณแคปไซซินอยด์ที่สกัดได้จากพริกพันธุ์ซุปเปอร์ฮอตด้วยเทคนิค microwave-assisted extraction โดยใช้ภาวะการสกัดต่างๆ

ชุด	ภาวะที่ใช้		ตัวอย่างที่	ปริมาณสาร (ppm)		X (ppm)	Y (ppm)
	P (W)	t (min)		Capsaicin	DHC		
c-1	400	3	1	2822.07	1409.96	2535.41	1232.79
			2	2785.65	1425.23	2498.99	1248.06
			3	2831.29	1404.77	2544.63	1227.60
c-2	400	10	1	2922.67	1451.85	2430.95	1157.26
			2	2922.89	1462.64	2431.16	1168.06
			3	2964.62	1495.94	2472.89	1201.35
c-3	800	3	1	2964.59	1451.03	2479.82	1200.51
			2	2982.96	1507.10	2498.19	1256.59
			3	2968.90	1506.58	2484.13	1256.07
c-4	800	10	1	3051.97	1553.06	2449.90	1185.13
			2	2964.18	1502.17	2362.11	1134.25
			3	2924.37	1498.35	2322.31	1130.42
c-5	500	6	1	2934.04	1443.98	2519.37	1198.15
			2	2970.51	1515.65	2555.84	1269.82
			3	2991.89	1506.73	2577.22	1260.90
c-6	600	8	1	2966.10	1487.08	2465.26	1189.37
			2	2964.74	1525.46	2463.90	1227.75
			3	2945.74	1474.57	2444.90	1176.86
c-7	700	4	1	3025.12	1469.60	2569.99	1220.65
			2	2905.01	1433.03	2449.88	1184.08
					เฉลี่ย	2477.84	1206.28
					%RSD	2.55	3.35

จากนั้นจะศึกษาวิเคราะห์ปัจจัยหลักและปัจจัยร่วมที่มีผลกระทบอย่างมีนัยสำคัญต่อปริมาณของแคปไซซินอยด์ที่สกัดได้จากพริกพันธุ์ซุปเปอร์ฮอต โดยการทดลองตอนนี้จะทำการศึกษาเพียง 2 ปัจจัยเท่านั้นคือ กำลังของเครื่องไมโครเวฟ และเวลาที่ใช้ในการสกัด ซึ่งผู้ทดลองจะนำผลการทดลองชุดที่ c-1 ถึง c-4 ของตารางที่ 6 ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MINITAB14 เช่นเดียวกัน ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณแคปไซซินที่สกัดได้อย่างมีนัยสำคัญได้แก่ กำลังของเครื่องไมโครเวฟ, เวลา และปัจจัยร่วมระหว่างกำลังของเครื่องไมโครเวฟกับเวลา

สมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแคปไซซินอยด์กับกำลังของเครื่องไมโครเวฟ และเวลาที่ใช้ในการสกัดที่ได้จากการคำนวณด้วยโปรแกรมคือ

ปริมาณแคปไซซิน: $y = 2551.25 + 0.521832P + 34.2032t - 0.0413211Pt$--- (10)

ปริมาณไดไฮโดรแคปไซซิน: $y = 1340.28 + 0.153287P + 6.17482t$ --- (11)

เมื่อเปรียบเทียบสมการ 8 และ 9 กับสมการ 10 และ 11 พบว่ามีความคล้ายกัน จากนั้นจะทำการเปรียบเทียบสัมประสิทธิ์หน้าเทอมที่คล้ายกันทุกเทอมเพื่อพิสูจน์สมมติฐาน โดยจะพิจารณาค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างซึ่งคำนวณได้จากสมการ

$$\%\text{ความแตกต่าง} = \frac{a - b}{b} \times 100$$

เมื่อ a คือสัมประสิทธิ์ของเทอมต่างๆ ของสมการที่ได้จากการทำนาย

และ b คือสัมประสิทธิ์ของเทอมต่างๆ ของสมการที่ได้จากโปรแกรม

ผลการเปรียบเทียบดังกล่าวแสดงดังตาราง 6

ตารางที่ 7 ผลการเปรียบเทียบค่าคงที่และสัมประสิทธิ์ของเทอมต่างๆ ระหว่างสมการที่ได้จากการทำนายกับสมการที่ได้จากการคำนวณด้วยโปรแกรม MINITAB14

เทอม	ค่าสัมประสิทธิ์				%ความแตกต่าง	
	จากสมการทำนาย		จากสมการโปรแกรม			
	capsaicin	DHC	capsaicin	DHC	capsaicin	DHC
ค่าคงที่	2477.84	1206.28	2551.25	1340.28	-2.88	-10.00
P	0.58931	0.183354	0.521832	0.153287	12.93	19.61
T	41.8335	16.7738	34.2032	6.17482	22.31	171.65
Pt	-0.03134	-	-0.04132	-	-24.16	-

จากตารางที่ 7 จะเห็นว่าค่า %ความแตกต่างของสัมประสิทธิ์ของเทอมต่างๆ ของสมการที่ได้จากการทำนายมีค่าต่างจากของสมการที่ได้จากการคำนวณด้วยโปรแกรมค่อนข้างมาก (> 10%) และเนื่องจากค่าสัมประสิทธิ์แต่ละตัวจะบ่งบอกถึงระดับความรุนแรงของอิทธิพลของปัจจัยนั้นๆ ต่อปริมาณแคปไซซินอยด์ที่สกัดได้ จึงกล่าวได้ว่าระดับความรุนแรงของอิทธิพลของปัจจัยเหล่านั้นที่ได้จากการทำนายแตกต่างจากการคำนวณด้วยโปรแกรมค่อนข้างมาก อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาเทอมค่าคงที่จะเห็นได้ว่ามีความแตกต่างกันค่อนข้างน้อย คณะผู้วิจัยจึงทำการคำนวณเปรียบเทียบระหว่างสมการ 8 และ 9 ซึ่งเป็นสมการที่ได้จากการทำนาย และสมการ 10 และ 11 ซึ่งเป็นสมการที่ได้จากโปรแกรมเมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณแคปไซซินในพริกพันธุ์ซูปเปอร์ฮอต (คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างตามสมการที่ 3) ผลการเปรียบเทียบแสดงดังตารางที่ 8 และ 9

ตารางที่ 8 ผลการเปรียบเทียบปริมาณแคปไซซินอยด์ที่คำนวณได้จากการแทนค่าของปัจจัยในสมการที่ได้จากการทำนาย (สมการ 8-9) กับค่าที่ได้จากการทดลอง (ชุดที่ c-5 ถึง c-7)

ชุด	ภาวะที่ใช้		ปริมาณสาร (ppm) ที่หาได้				%ความแตกต่าง	
			จากการทดลอง		จากสมการทำนาย			
	P (w)	t (min)	capsaicin	DHC	capsaicin	DHC	capsaicin	DHC
c-5	500	6	2965.48	1488.78	2929.48	1398.60	-1.21	-6.06
c-6	600	8	2958.86	1495.70	3015.66	1450.48	1.92	-3.02
c-7	700	4	2965.06	1451.31	2969.94	1401.72	0.16	-3.42

ตารางที่ 9 ผลการเปรียบเทียบปริมาณแคปไซซินอยด์ที่คำนวณได้จากการแทนค่าของปัจจัยในสมการที่ได้จากการคำนวณโปรแกรม (สมการ 10 และ 11) กับค่าที่ได้จากการทดลอง (ชุดที่ c-5 ถึง c-7)

ชุด	ภาวะที่ใช้		ปริมาณสาร (ppm) ที่หาได้				%ความแตกต่าง	
			จากการทดลอง		จากสมการโปรแกรม			
	P (w)	t (min)	capsaicin	DHC	capsaicin	DHC	capsaicin	DHC
c-5	500	6	2965.48	1488.78	2893.42	1453.97	-2.43	-2.34
c-6	600	8	2958.86	1495.70	2939.63	1481.65	-0.65	-0.94
c-7	700	4	2965.06	1451.31	2937.65	1472.28	-0.92	1.44

จากตารางที่ 8 และ 9 จะเห็นว่าผลการทดลองที่ได้ค่อนข้างน่าประหลาดใจ กล่าวคือการคำนวณปริมาณแคปไซซินอยด์ด้วยสมการที่ได้จากการทำนาย (8 และ 9)นั้นให้ค่า %ความแตกต่างที่ค่อนข้างต่ำและใกล้เคียงกับการคำนวณด้วยสมการที่ได้จากการคำนวณโปรแกรม แม้ว่าสมการที่ได้จากการทำนายจะมีค่าสัมประสิทธิ์หน้าเทอมต่างๆ แตกต่างจากสมการที่ได้จากการคำนวณด้วยโปรแกรมค่อนข้างมาก แต่การทำนายปริมาณแคปไซซินอยด์ด้วยสมการทั้งสองให้ผลใกล้เคียงกัน นั่นเป็นเพราะว่าสัมประสิทธิ์ (อิทธิพล) ของแต่ละเทอมมีค่าน้อยมากเมื่อเทียบกับเทอมที่เป็นค่าคงที่ ดังนั้นผู้ทดลองจึงมีความเห็นว่าสมการที่ได้จากการทำนายสามารถใช้แทนสมการที่ได้จากการคำนวณโปรแกรมได้ และวิธีการทำนายหาสมการที่ได้แสดงดังการทดลองในตอนนี้น่าจะนำไปใช้ได้กับตัวอย่างพริกพันธุ์อื่นๆ ได้ นั่นคือยึดสมการของพริกพันธุ์ใดพันธุ์หนึ่งเป็นหลัก แล้วทำการทดลองเพื่อหาเทอมค่าคงที่ที่เป็นค่าเฉพาะของพริกแต่ละพันธุ์

<u>สรุปผลการทดลอง</u>

ทางคณะผู้วิจัยได้ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อวิธีการสกัดแคปไซซินอยด์จากพริกสายพันธุ์ไทยด้วยเทคนิค microwave-assisted extraction (MAE) ได้ศึกษาปัจจัย กำลังของเครื่องไมโครเวฟ (400-800 W), เวลาในการสกัด (3-10 นาที) และปริมาตรเอทนอล (10-30 มล.) พบว่ากำลังของเครื่องไมโครเวฟมีผลต่อประสิทธิภาพการสกัดมากที่สุด เวลาในการสกัดและปริมาตรมีผลเช่นกัน แต่มีอิทธิพลน้อยกว่า และสมการที่

6 และ 7 สามารถใช้ในการทำนายภาวะที่เหมาะสมของการทดลองในพริกพันธุ์ต่างๆ ได้ โดยต้องทำการทดลองเพื่อหาค่าคงที่ของพริกพันธุ์นั้นๆ ออกมาก่อน

แนวทางการศึกษาต่อไป

เนื่องจากในการใช้เครื่องมือ microwave-assisted extraction มีข้อจำกัดในเรื่องปริมาณสารที่สามารถใช้งานได้ประกอบกับเครื่องมือที่ใช้มีราคาแพง ทางคณะผู้วิจัยจึงเห็นว่าควรพัฒนาวิธีการสกัดสารด้วยเทคนิค solvent extraction แต่ทำที่อุณหภูมิสูง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดสาร โดยทำการสกัดในอ่างควบคุมอุณหภูมิ และ/หรือ สกัดใน ultrasonic bath เพื่อเป็นการประหยัดค่าใช้จ่าย

3. การพัฒนารูปแบบสารสกัดพริกเพื่อการใช้ประโยชน์ด้านอาหาร

<u>วัตถุประสงค์</u>

พัฒนาสารสกัดพริกในรูปของฟิล์มละลายเร็วเพื่อใช้ทดแทนพริกป่น

วิธีการเตรียมฟิล์มละลายเร็ว

ใช้การเตรียมฟิล์มตามวิธีของรายงานโครงการปริญญานิพนธ์ เรื่อง "การพัฒนาสูตรตำรับมัลติวิตามินรูปแบบแผ่นฟิล์มละลายเร็วในช่องปาก" หลักสูตรเภสัชศาสตร์บัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2551 จากรายงานพบว่า สูตรตำรับการเตรียมที่ได้แผ่นฟิล์มที่มีลักษณะที่ดี คือ ใช้ Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC E5) 3.0%, กลีเซอรีน 2.5% และ เติมมัลติวิตามิน 15% วิธีการเตรียมมีดังนี้

1. ละลายสารก่อฟิล์มในน้ำร้อน (80 ^{o}C) จากนั้นเติมน้ำเย็นจนได้สารละลายใส
2. เติมกลีเซอรีน, สารสกัดพริก และน้ำเย็นที่เหลือลงในสารละลายในข้อที่ 1 กวนส่วนผสมต่างๆ ให้เข้ากัน
3. เทลงในแม่พิมพ์ แล้วเข้าอบที่อุณหภูมิประมาณ 45 ^{o}C ประมาณ 6 ชั่วโมงหรือจนฟิล์มแห้ง

วิธีทดลองและผลการทดลอง

การทดลองที่ 1:

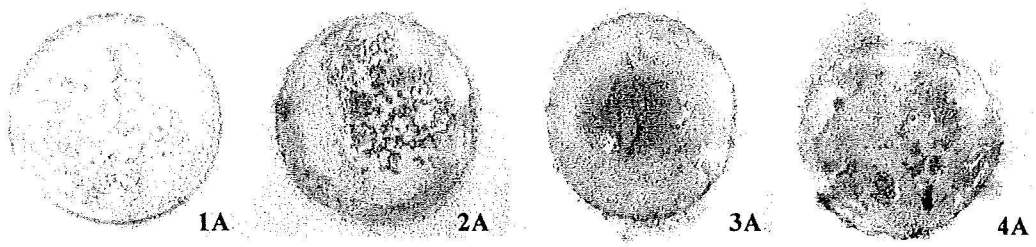
เตรียมแผ่นฟิล์มที่มีส่วนผสมของสารสกัดตามตำรับที่แสดงในตารางที่ 1 โดยใช้ HPMC E5 เป็นสารก่อฟิล์ม และศึกษาอัตราส่วนของสารสกัดพริกต่างๆ

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของฟิล์มละลายเร็วที่มีสารสกัดพริกอัตราส่วนต่างๆ

ส่วนประกอบ (g)	Plate			
	1A	1B	1C	1D
HPMC E5	3.0	3.0	3.0	3.0
กลีเซอรีน	2.5	2.5	2.5	2.5
สารสกัดพริก	1.3	2.0	2.6	3.3
น้ำกลั่น	93.2	92.5	91.9	91.2
Total	100.0	100.0	100.0	100.0

Note: น้ำหนักที่เตรียมคือ 15 กรัมต่อเพลท และเพลทมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 ซม.

ฟิล์มที่เตรียมได้มีลักษณะดังภาพที่ 1 โดยพบว่า สารสกัดพริกไม่รวมตัวกับเนื้อฟิล์ม ทำให้ผิวหน้าของฟิล์มมีสารสกัดพริกอยู่เป็นจำนวนมาก



รูปที่ 1 ฟิล์มละลายเร็วที่เตรียมได้จากการทดลองที่ 1

การทดลองที่ 2:

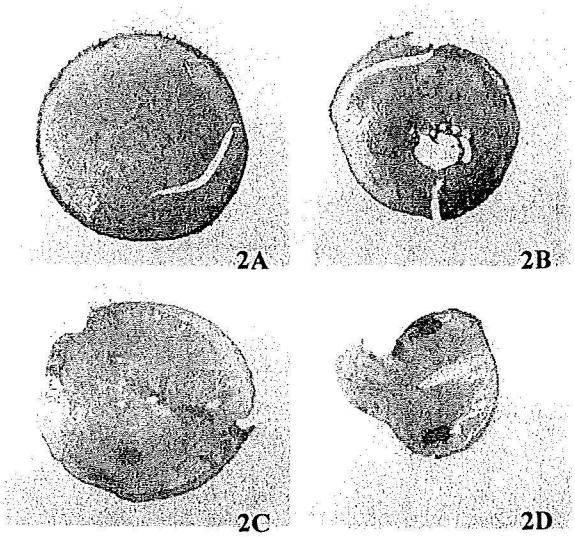
จากผลการทดลองที่ 1 ซึ่งสารสกัดพริกไม่รวมตัวกับเนื้อฟิล์ม ในการทดลองนี้ จึงได้ลองใส่ tween 40 (emulsifier) เพื่อช่วยให้สารสกัดพริกสามารถรวมตัวกับเนื้อฟิล์มได้ดีขึ้น และปรับเปลี่ยนปริมาณของสารสกัดพริกด้วยดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบของฟิล์มละลายเร็วที่มีสารสกัดพริกอัตราส่วนต่างๆ และtween 40

ส่วนประกอบ (g)	Plate			
	2A	2B	2C	2D
HPMC E5	3.0	3.0	3.0	5.0
กลีเซอรีน	2.5	2.5	2.5	2.5
สารสกัดพริก	2.6	2.6	1.3	1.3
Tween 40	1.0	3.0	3.0	3.0
น้ำกลั่น	90.9	88.9	90.2	88.2
Total	100.0	100.0	100.0	100.0

Note: น้ำหนักที่เตรียมคือ 15 กรัมต่อเพลท และเพลทมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 ซม.

ฟิล์มที่เตรียมได้มีลักษณะดังแสดงในรูปที่ 2 จากผลการทดลอง จะเห็นว่า การเพิ่ม tween 40 จะทำให้ฟิล์มมีลักษณะเหนียวขึ้น ไม่เป็นแผ่นฟิล์มที่ดี และถึงแม้ว่าปริมาณสารสกัดพริกจะน้อยลง หรือใช้สารก่อฟิล์มเพิ่มขึ้น สารสกัดพริกก็ยังไม่สามารถรวมตัวกับเนื้อฟิล์มได้ดี



รูปที่ 2 ฟิล์มละลายเร็วที่เตรียมได้จากการทดลองที่ 2 (ใส่ tween 40)

การทดลองที่ 3:

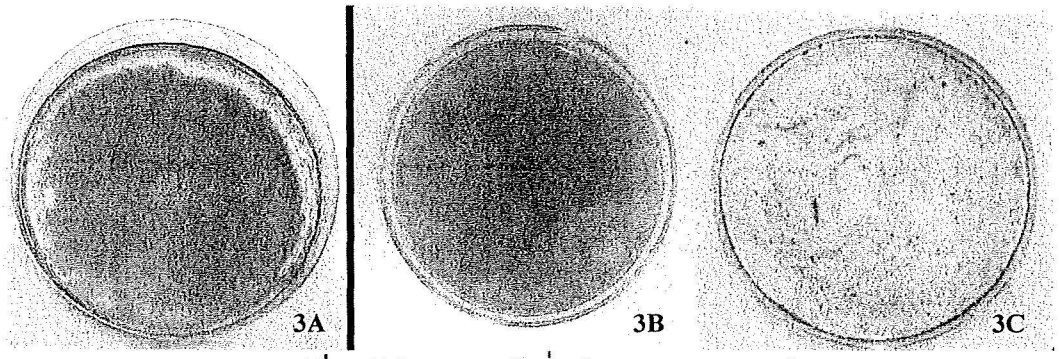
จากผลการทดลองที่ 1 และ 2 พบว่า HPMC E5 ไม่สามารถรวมตัวกับสารสกัดพริกได้ดี ดังนั้น จึงลองใช้สารก่อฟิล์มชนิดอื่นๆ คือ PVP (polyvinylpyrrolidone) K90 และ PVP K30 ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ส่วนประกอบของฟิล์มละลายเร็วที่มีสารสกัดพริก โดยใช้สารก่อฟิล์มชนิดต่างๆ

ส่วนประกอบ (g)	Plate		
	3A	3B	3C
สารก่อฟิล์ม	5.0 (HPMC E5)	5.0 (PVP K90)	5.0 (PVP K30)
กลีเซอรรีน	2.5	2.5	2.5
สารสกัดพริก	1.3	1.3	1.3
Tween 40	3.0	3.0	3.0
น้ำกลั่น	88.2	88.2	88.2
Total	100.0	100.0	100.0

Note: น้ำหนักที่เตรียมคือ 15 กรัมต่อเพลท และเพลทมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 ซม.

จากผลการทดลอง (รูปที่ 3) พบว่า ไม่มีสารก่อฟิล์มใดที่เข้ากับสารสกัดพริกได้ดี โดยพบว่า การใช้ PVP K90 ให้ลักษณะฟิล์มดีที่สุด

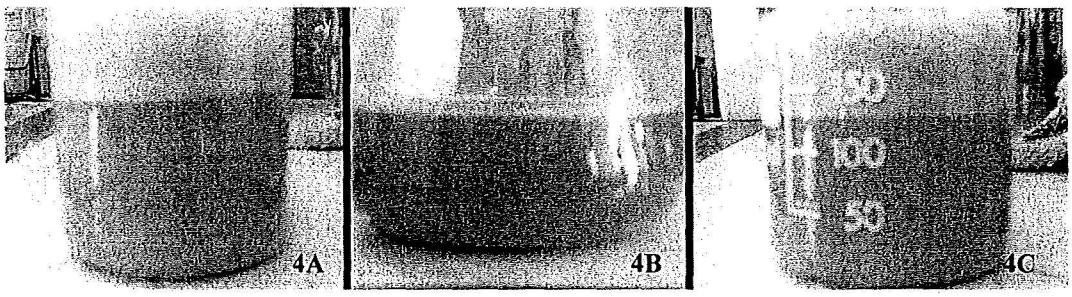


รูปที่ 3 ฟิล์มละลายเร็วที่เตรียมจากสารก่อฟิล์มชนิดต่างๆ

การทดลองที่ 4:

เนื่องจากสารสกัดพริก ประกอบด้วยส่วนที่เป็นน้ำมันและสารอื่นๆ ทำให้ไม่สามารถรวมตัวได้ดีกับสาก่อฟิล์มซึ่งละลายได้ดีในน้ำ ดังนั้น ผู้วิจัยจึงคิดว่า น่าจะทำการเคลือบสารสกัดพริกด้วยโพลิเมอร์ที่ละลายน ได้ดีก่อนจึงนำไปขึ้นรูปฟิล์ม ในการทดลองนี้ จึงได้ทำการปั่นสารสกัดพริกกับโพลิเมอร์ 3 ชนิด ที่มีรายการ การใช้ encapsulation ได้แก่ polymers X, Y และ Z พบว่า สารละลายผสมระหว่างสารสกัดพริกและโพลิ เมอร์ทั้งสามชนิดให้ลักษณะเป็นสารละลายที่มีการกระจายตัวของที่ดีในน้ำ ดังแสดงในรูปที่ 4 ดังนั้น จึง เลือกใช้ polymer X สำหรับการผสมกับสารสกัดพริกก่อนทำการขึ้นรูปฟิล์มต่อไป เนื่องจากโพลิเมอร์นี้มีราคา ถูก

<u>หมายเหตุ</u> ไม่สามารถระบุชื่อโพลิเมอร์ที่ใช้ได้ เนื่องจากคาดว่าจะมีการจดสิทธิบัตรต่อไป



รูปที่ 4 แสดงสารละลายผสมระหว่างสารสกัดพริกกับ 4A) Polymer X, 4B) Polymer Y, and 4C) Polymer Z.

การทดลองที่ 5:

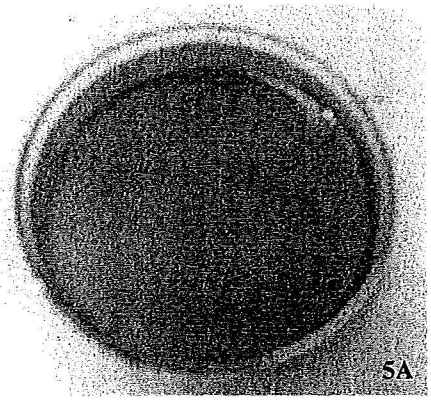
นำสารผสมระหว่างสารสกัดพริกและโพลิเมอร์ X มาใช้ร่วมกับสารก่อฟิล์ม PVP K90 โดยไม่ใส่ tween 40 ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ส่วนประกอบของฟิล์มละลายเร็วที่มีสารสกัดพริกผสมโพลิเมอร์

ส่วนประกอบ (% w/w)	Plate 5A
PVP K90	5.0
กลีเซอรีน	1.0
Chili blending (chili oleoresin 1.5%)	7.5
น้ำกลั่น	79.0
Total	100.0

Note: น้ำหนักที่เตรียมคือ 15 กรัมต่อเพลท และเพลทมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 ซม.

เมื่อเปรียบเทียบฟิล์ม 3A จากรูปที่ 3 และ ฟิล์ม 5A ในการทดลองนี้ พบว่า ฟิล์มที่ได้มีการกระจายตัวของสารสกัดอย่างดี ดังแสดงในรูปที่ 5 แต่พบปัญหาที่สำคัญ คือ ไม่สามารถดึงฟิล์มออกจากเพลทแก้วได้



รูปที่ 5 ฟิล์มที่ได้จากการใช้สารสกัดพริกผสมกับโพลิเมอร์ก่อนขึ้นรูปฟิล์ม

<u>งานที่จะดำเนินการต่อไป</u>

1. แก้ไขปัญหาการที่ไม่สามารถลอกฟิล์มออกจากเพลทได้ อาจใช้เพลทที่ทำจากวัสดุอื่น เช่น อลูมิเนียม หรือพลาสติก
2. ปรับส่วนประกอบของฟิล์มโดยใช้สารก่อฟิล์มผสม เพื่อให้ได้ลักษณะฟิล์มที่ดีขึ้นอีก พร้อมทั้งทดสอบคุณสมบัติต่างๆ รวมทั้งเสถียรภาพของฟิล์มและสารสำคัญในฟิล์ม

ส่วนที่ 2 งา

- **งานวิจัยในปีงบประมาณ 2550-2551**

ผู้วิจัยสามารถแยกสารสำคัญ sesamin และ sesamolin จากน้ำมันงาได้ เพื่อใช้เป็นสามาตรฐานในการวิเคราะห์คุณภาพของน้ำมันงา จากนั้นทดลองหาตัวทำละลายและวิธีการที่เหมาะสมในการสกัดเมล็ดงเพื่อหาปริมาณสารสำคัญ และนำผลการทดลองที่ได้ ศึกษาปริมาณสารสำคัญในเมล็ดงา 4 สายพันธุ์ พบว่างาดำอุบลราชธานี 3 ให้ปริมาณสารสำคัญมากที่สุด

นอกจากนี้ยังได้ศึกษาการใช้ประโยชน์จากกากงา ซึ่งได้แก่ การสกัด sesaminal glycoside เพื่อใช้เป็นสารมาตรฐานในการวิเคราะห์ต่อไป

- **งานวิจัยในปีงบประมาณ 2552**

1. การใช้โพลิเมอริกเรซินสำหรับการแยกและวิเคราะห์ sesaminol glycoside

<u>วัตถุประสงค์</u>

1. สกัดและแยกสาร sesaminol glucoside จากกากงา เพื่อใช้เป็นสารมาตรฐานสำหรับการตรวจวิเคราะห์
2. ศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการสกัดโดยการใช้โพลิเมอริกเรซินและชนิดตัวทำละลายที่เหมาะสม

<u>วิธีวิจัย</u>

1. พืชตัวอย่างและกากงา

เมล็ดงาที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญเก็บมาจากแปลงปลูกสาธิตในศูนย์วิจัยพืชไร่อุบลราชธานี ได้แก่ งาขาวพันธุ์อุบลราชธานี 2 งาดำพันธุ์อุบลราชธานี 3 งาดำพันธุ์นครสวรรค์และงาแดงพันธุ์อุบลราชธานี 1 เมื่อเดือนพฤศจิกายน 2549

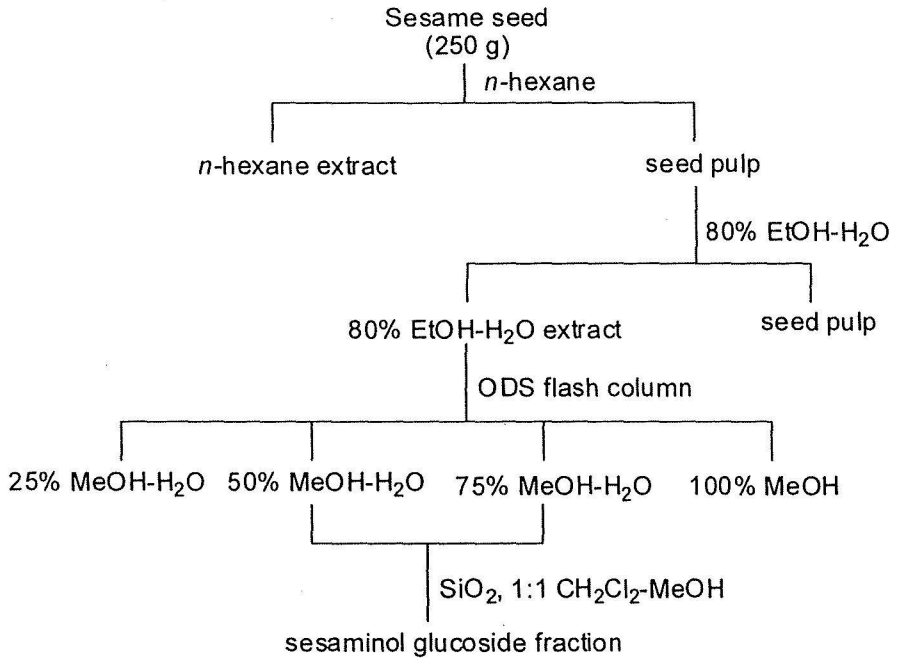
2. การสกัด sesaminol glucoside เพื่อใช้เป็นสารมาตรฐาน

การสกัดแยกสารมาตรฐาน sesaminol glucoside ใช้วิธีของ Moazzami และคณะ [1] ดังนี้

นำงาขาวพันธุ์อุบลราชธานี 2 น้ำหนัก 250 กรัม มาบดให้เมล็ดแตก สกัดเอาไขมันออกด้วย *n*-hexane เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

กรองเอากากงาที่ได้สกัดด้วย 80% EtOH-H_2O 1 ลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรองแยกสารละลาย 80% EtOH-H_2O แล้วระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน นำส่วนสกัด 80% EtOH-H_2O มาแยก โดยใช้เทคนิค flash chromatography ตัวทำละลายที่ใช้ชะคอลัมน์ เรียงตามลำดับคือ 25%, 50%, 75% และ 100% MeOH-H_2O ตามลำดับ แล้วทำการเก็บ fraction ในขวดรูปกรวย โดยในแต่ละตัวทำละลายที่ใช้ชะเก็บ fraction ละ 300 mL จากนั้นนำแต่ละ fraction ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน แล้วทำการรวม fraction ที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน โดยใช้เทคนิค TLC ซึ่งรวม fraction ได้ทั้งหมด 3 fraction แล้วจึงตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของสารอีกครั้งด้วยเทคนิค TLC พบว่าองค์ประกอบหลักอยู่ใน fraction 50% และ 75% MeOH-H_2O จึงเลือก fraction ดังกล่าวมาแยกให้บริสุทธิ์ต่อด้วยเทคนิค column chromatography โดยระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ

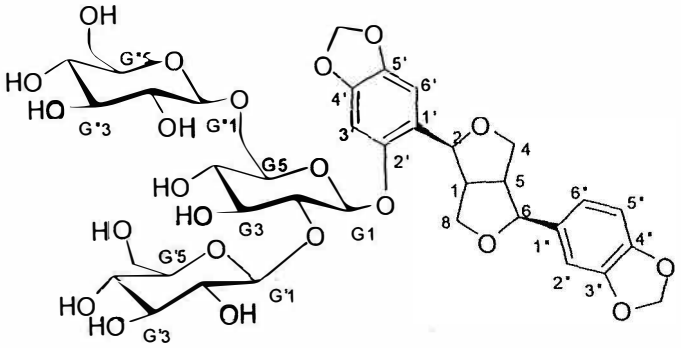
แบบหมุน จะได้ของเหลวข้นหนืดสีน้ำตาล น้ำหนัก 0.24 กรัม มาแยกด้วย silica gel โดยใช้ CH_2Cl_2:MeOH ในอัตราส่วน 1:1 เป็นตัวชะสารออกจาก column แล้วทำการเก็บ fraction ด้วยหลอดทดลองขนาดเล็ก โดยเก็บ fraction ละ 10 mL รวม fraction ที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน โดยใช้เทคนิค TLC หลังจากนั้นตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของสารอีกครั้งด้วยเทคนิค TLC นำไปวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี รายละเอียดการสกัดแยกสารมาตรฐาน Sesaminol glycoside สรุปไว้ในแผนภาพที่ 1



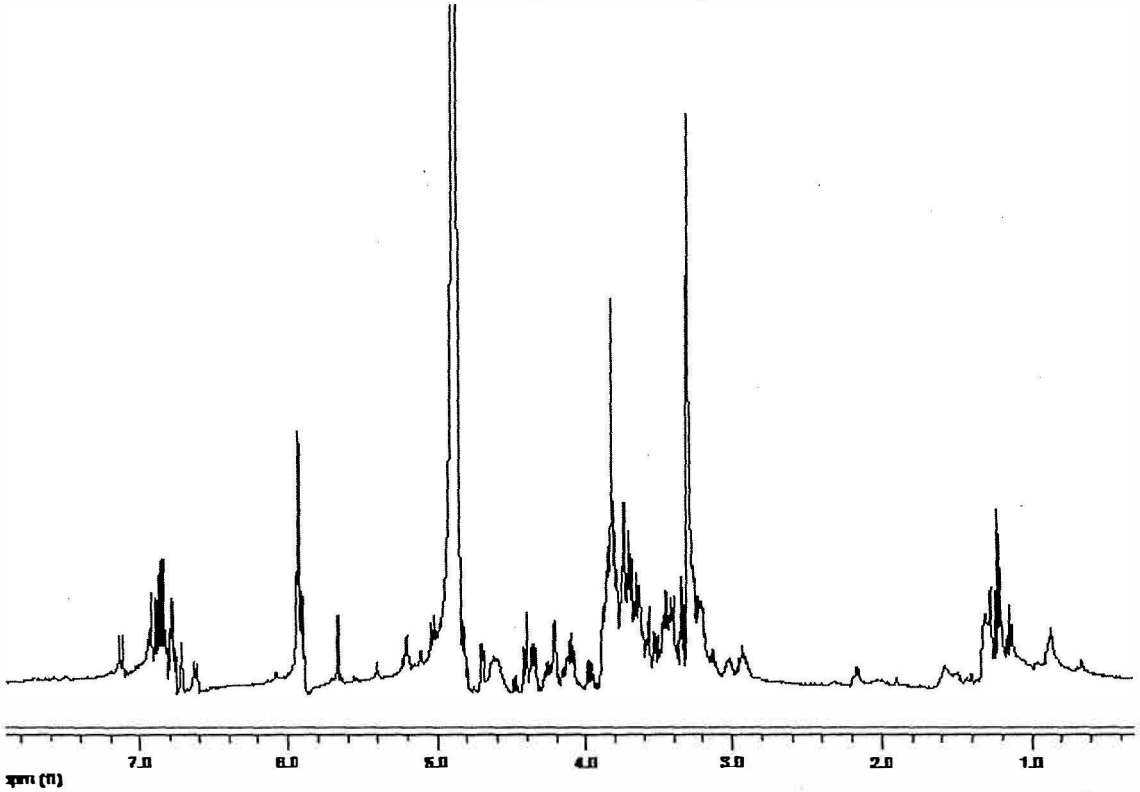
แผนภาพที่ 1 ขั้นตอนการสกัดแยกสารมาตรฐาน sesaminol glycoside ของกากงา

3. **การพิสูจน์โครงสร้าง** sesaminol glucoside

การพิสูจน์โคงสร้างทางเคมีใช้เทคนิค ^{1}H NMR เป็นหลัก จากการบันทึกสัญญาณของ fraction ที่มี sesaminol glucoside ใน CD_3OD จากการวิเคราะห์พบว่าสารที่ได้ยังมีสิ่งเจือปนอยู่บ้าง นอกจากนี้ยังพบสัญญาณที่สำคัญที่ทำให้ยืนยันได้ว่ามี sesaminol glucoside อยู่จริง ได้แก่ สัญญาณของ aromatic ซึ่ได้แก่ สัญญาณของ 1,3,4-trisubstituted aromatic และ 1,2,4,5-tetrasubstituted aromatic ในช่วง δ_H 6.6-6.9 ppm สัญญาณของ oxygenated methylene (-O-CH_2-O-) ที่ δ_H 5.9 ppm และสัญญาณของ aromatic G1, G′1 และ G′′1 ที่ δ_H 4.3, 4.8 และ 5.0 ppm เมื่อเปรียบเทียบกับค่า chemical shift ที่มีรายงานไว้ [1] พบว่าใกล้เคียงกัน และเมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่าองค์ประกอบหลักคือ sesaminol triglucoside



Sesaminol triglucoside



รูปที่ 1 ^{1}H NMR spectrum (400 MHz, CD_3OD) ของ fraction ที่มี sesaminol glucoside ซึ่งจากการวิเคราะห์ยืนยันด้วย HPLC พบว่ามี sesaminol triglucoside เป็นองค์ประกอบหลัก

4. **การวิเคราะห์** sesaminol glucoside **ในกากงา**

การวิเคราะห์ sesaminol glucoside ในกากงาใช้วิธีของ Moazzami และคณะ [1] ดังนี้

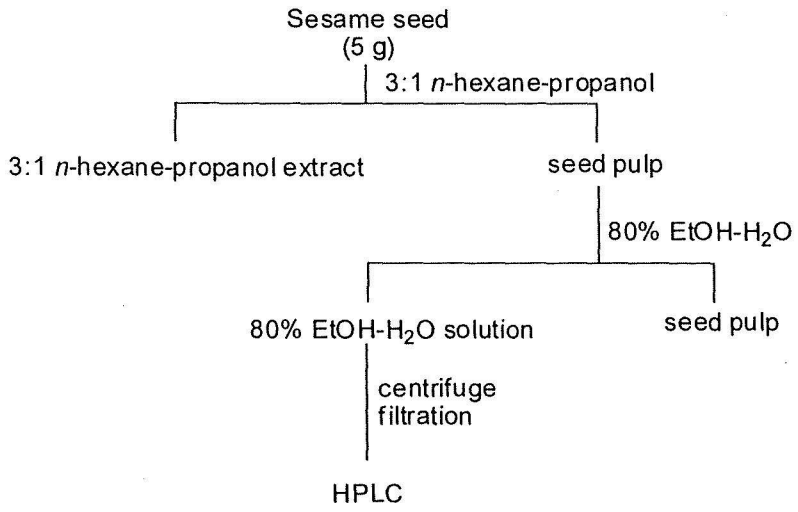
<u>การเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์</u>

เมล็ดงาที่ใช้ในการวิเคราะห์ sesaminol glycoside มี 4 สายพันธุ์ คือ

งาขาวอุบลราชธานี 2 งาแดงอุบลราชธานี 1

งาดำนครสวรรค์ งาดำอุบลราชธานี 3

นำงา 5 กรัม มาบดให้เมล็ดแตก สกัดเอาไขมันออกด้วย 3:1 hexane:2-propanol (30 mL) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการกรอง นำกากงาที่ได้สกัดด้วย 85% EtOH-H_2O (8.25 mL) เป็นเวลา 5 ชั่วโมง เติมน้ำ 1.75 mL ทิ้งข้ามคืน จากนั้นเซ็นตริฟิวก์ นำสารละลายที่ได้มากรองผ่าน 0.45 μm PTEF จะได้สารละลายตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ด้วย HPLC รายละเอียดการเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ สรุปไว้ในแผนภาพที่ 2



แผนภาพที่ 2 การเตรียมสารตัวอย่างจากกากงา สำหรับการวิเคราะห์ sesaminol glucoside

<u>สภาวะการวิเคราะห์</u>

การวิเคราะห์ sesaminol glucoside ใช้สภาวะตามที่ระบุไว้ในรายงานของ Moazzami และคณะ [5] โดยมีรายละเอียดดังนี้

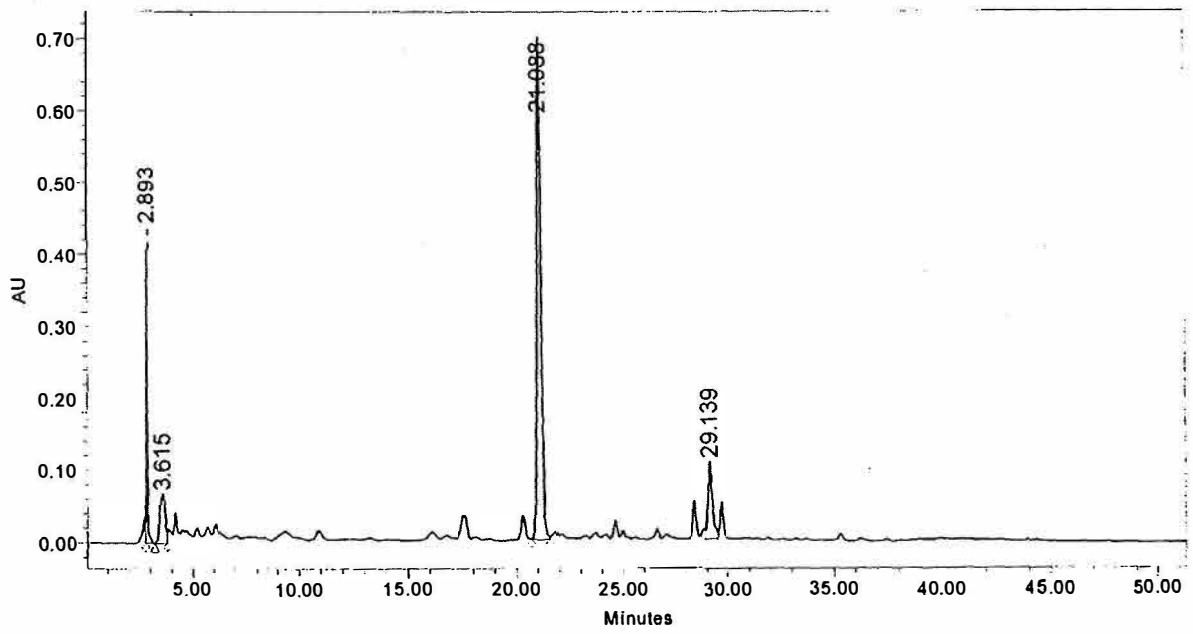
Flow rate: 1.00 mL/min

Column: C18 (4.5 × 250 mm)

Mobile phase: 15:85 MeOH-H_2O (5 min) → 30:70 MeOH-H_2O (25 min) → 70:30 MeOH-H_2O (20 min)

Detector: UV 290 nm

จากการวิเคราะห์ปริมาณ sesaminol glucoside ด้วย HPLC จะพบพีคของ sesaminol riglucoside และ sesaminol diglucoside ที่ retention time (t_R) เท่ากับ 21.088 และ 29.139 นาที ตามลำดับ โดยมีอัตราส่วนของ sesaminol triglucoside:sesaminol diglucoside เท่ากับ 15:1



รูปที่ 2 โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ปริมาณ sesaminol glucoside ซึ่งประกอบด้วย sesaminol triglucoside และ sesaminol diglucoside ในอัตราส่วน 15:1

5. การศึกษาการสกัดแยก sesaminol glucoside ด้วยโพลิเมอริกเรซิน

เนื่องจากการเตรียมตัวอย่างกากงาสำหรับการวิเคราะห์ sesaminol glucoside พบว่าใช้เวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง ซึ่งไม่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์หรือนำไปสกัดแยกสารมาตรฐาน คณะผู้วิจัยเป็นว่าแนวทางหนึ่งในการลดเวลาในการเตรียมตัวอย่างกากงา หรือ การสกัดแยก sesaminol glucoside ซึ่งได้กล่าวถึงข้อดีไว้ในบทนำแล้ว ดังนั้นจึงได้ออกแบบการทดลองเป็น 2 ส่วนคือ การสกัดแยกตามวิธีของ Moazzami และคณะ [5] และการสกัดแยกโดยใช้โพลิเมอริกเรซิน ซึ่งการสกัดด้วยวิธีนี้จะแตกต่างจากวิธีแรกที่การให้ความร้อนช่วยในช่วงการสกัดด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างแอลกอฮอล์กับน้ำ พร้อมทั้งลดระยะเวลาของการสกัดเหลือเพียง 1 ชั่วโมงและเพิ่มขั้นตอนของการดูดซับสารที่สกัดด้วยโพลิเมอริกเรซินโดยใช้ Diaion HP20 ก่อนนำไปวิเคราะห์ นอกจากนี้จะได้ศึกษาผลของตัวทำละลายแอลกอฮอล์ชนิดต่าง ๆ ในการสกัด sesaminol glucoside

<u>การสกัดแยกด้วย Diaion HP20</u>

นำงาขาวพันธุ์อุบลราชธานี 2 น้ำหนัก 5 กรัม มาบดให้เมล็ดแตก สกัดเอาไขมันออกด้วย 3:1 hexane:propanol (30 mL) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรองเอากากงามาสกัดด้วย 85:15 MeOH:H_2O (82.5 mL) ที่อุณหภูมิ 80^{o}C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้ไป centrifuge จากนั้นนำส่วนใส (supernatant) ไประเหย MeOH จนเหลือเฉพาะน้ำ เทสารละลายลงในคอลัมน์ที่บรรจุด้วย Diaion HP20 ซึ่งอิ่มตัวด้วยน้ำ จากนั้นชะด้วยน้ำปริมาณ 4 เท่าของปริมาณ Diaion HP20 ที่บรรจุในคอลัมน์ (4 bed volumes) จากนั้นชะด้วย 85:15 MeOH:H_2O ปริมาณ 200 mL นำไประเหยให้แห้งและวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ^{1}H NMR และ HPLC สำหรับการสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดอื่นดำเนินการเช่นเดียวกัน เพียงแต่เปลี่ยนตัวทำละลายจาก 85:15

MeOH:H_2O เป็น 85:15 EtOH:H_2O และ 85:15 propanol:H_2O ในทุกขั้นตอนที่มีการใช้ระบบตัวทำละลายดังกล่าว

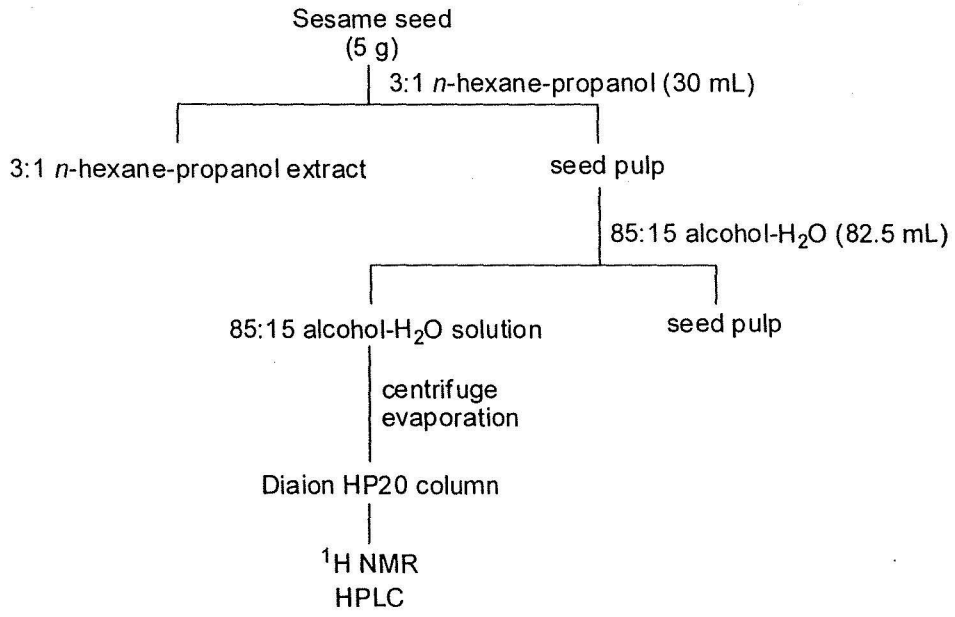
<u>สภาวะที่ใช้ในการสกัดแยกด้วยโพลิเมอริกเรซิน</u>

ระบบตัวทำละลาย : 85:15 alcohol:H_2O

เส้นผ่านศูนย์กลางคอลัมน์ : 2 cm

ความสูงของ Diaion HP20 : 12 cm

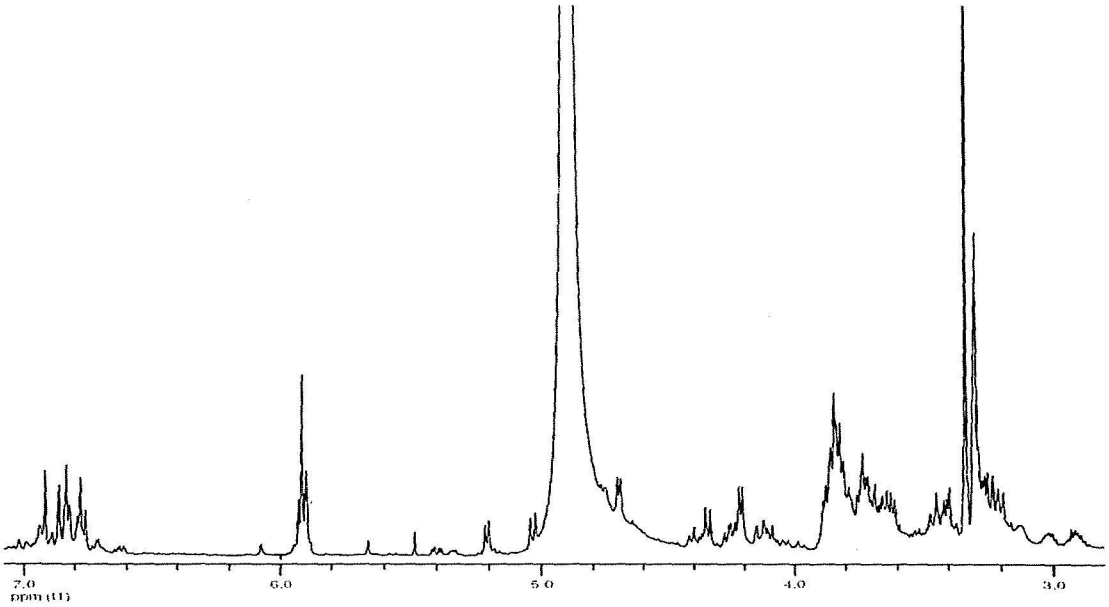
ปริมาณที่เก็บจากการแยก : 200 mL



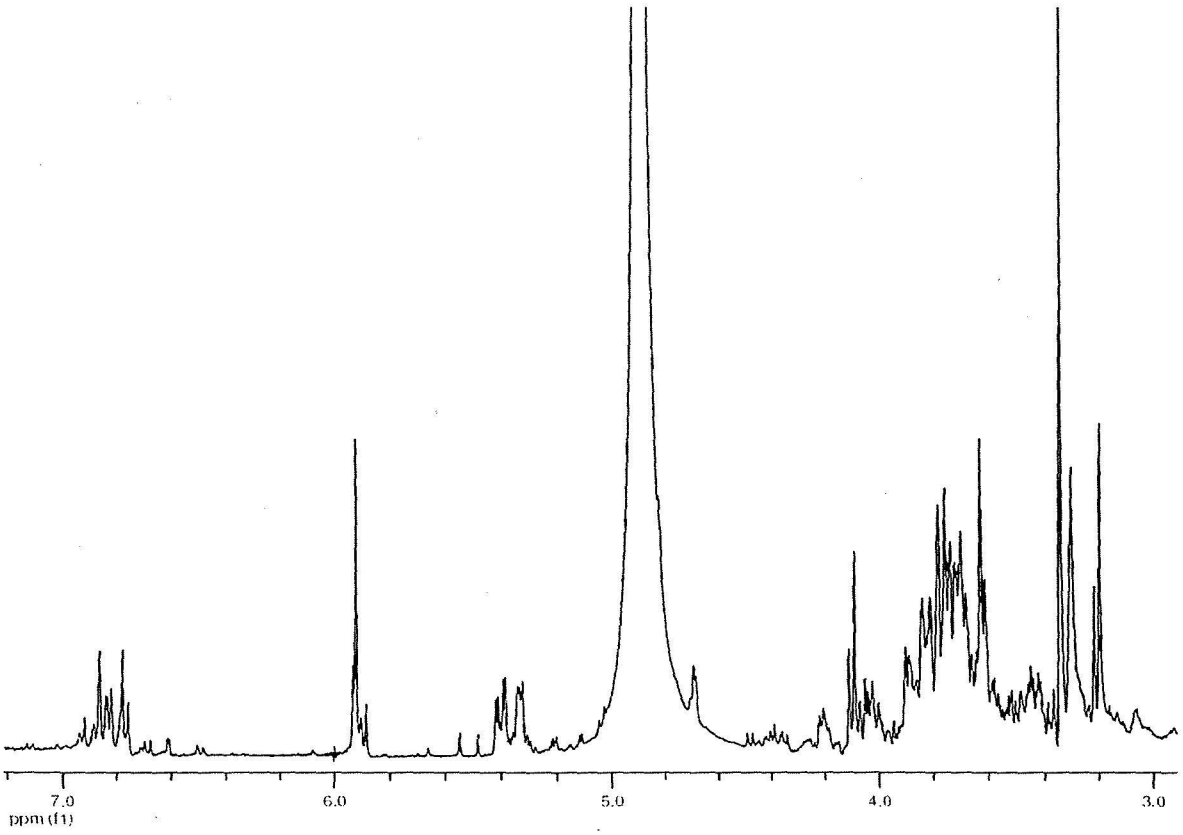
แผนภาพที่ 3 การสกัดแยก sesaminol glucoside โดยใช้โพลิเมอริกเรซิน

<u>การวิเคราะห์ประสิทธิภาพการใช้ใน Diaion HP20 ในการสกัดแยก sesaminol glucoside ด้วย ^{1}H NMR และ HPLC</u>

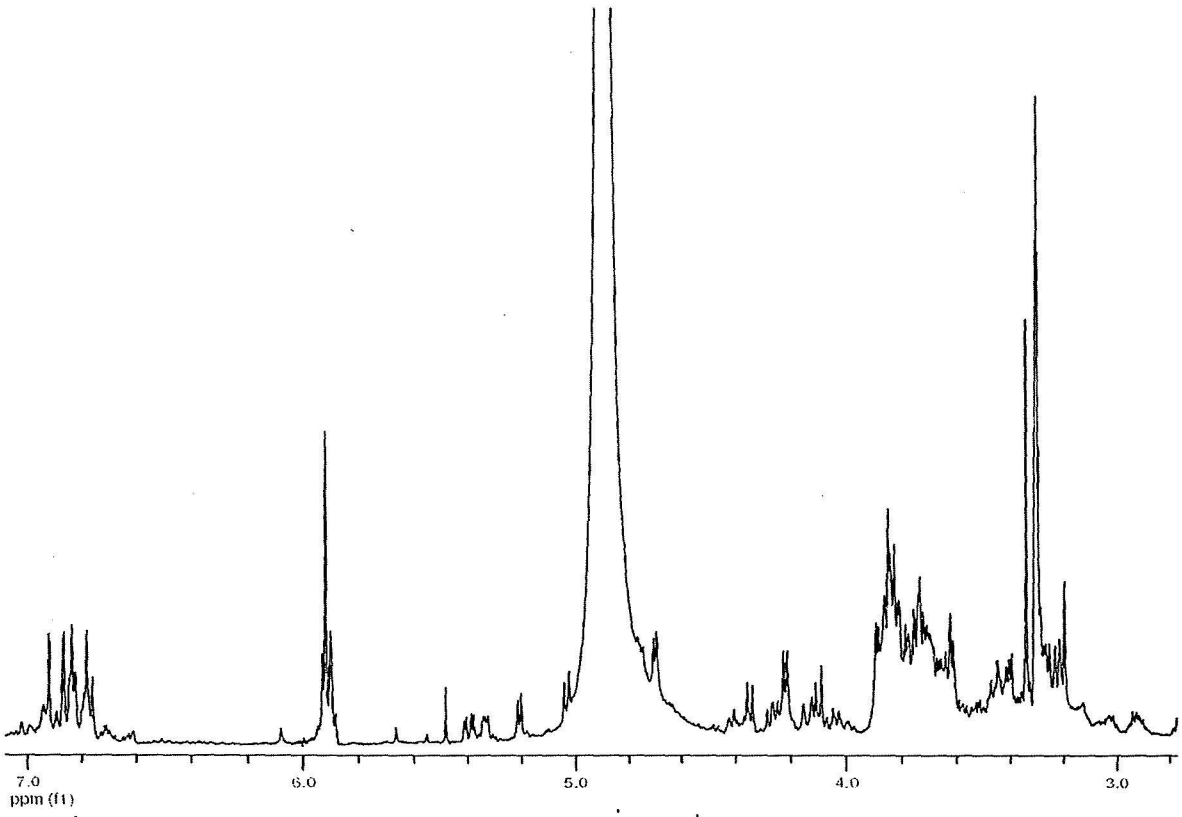
จากการวิเคราะห์ด้วย ^{1}H-NMR ทำให้ทราบว่าสารที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีของ Moazzimi และการสกัดด้วยโพลิเมอริกเรซินทั้ง 3 แบบ พบสัญญาณที่ทำให้ทราบว่า สารสกัดที่ได้จากวิธีการทั้ง 4 วิธีเป็น sesaminol glucoside ซึ่งได้แก่สัญญาณของ 1,3,4-trisubstituted aromatic และ 1,2,4,5-trisubstituted aromatic สัญญาณของ oxygenated methylene –O-CH_2-O-' และ –O-CH_2-O-" (δ_H 5.9) สัญญาณของ anomeric G1, G′1, G′′1 (δ_H 4.3, 4.8, 5.0) เมื่อเทียบกับ chemical shift ที่มีรายงานพบว่าใกล้เคียง จึงสรุปว่าสารที่แยกได้เป็น sesaminol triglucoside นอกจากนี้ยังพบว่าการสกัดด้วย 85:15 MeOH:H_2O ได้ sesaminol triglucoside ที่บริสุทธิ์กว่าวิธีอื่น เนื่องจากมีสัญญาณของสิ่งเจือปนน้อยกว่า (พิจารณาในช่วง δ_H 5.8-6.4) อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถระบุปริมาณของ sesaminol triglucoside จากข้อมูลของ ^{1}H-NMR ได้ จึงนำสารที่สกัดได้ไปวิเคราะห์ด้วย HPLC



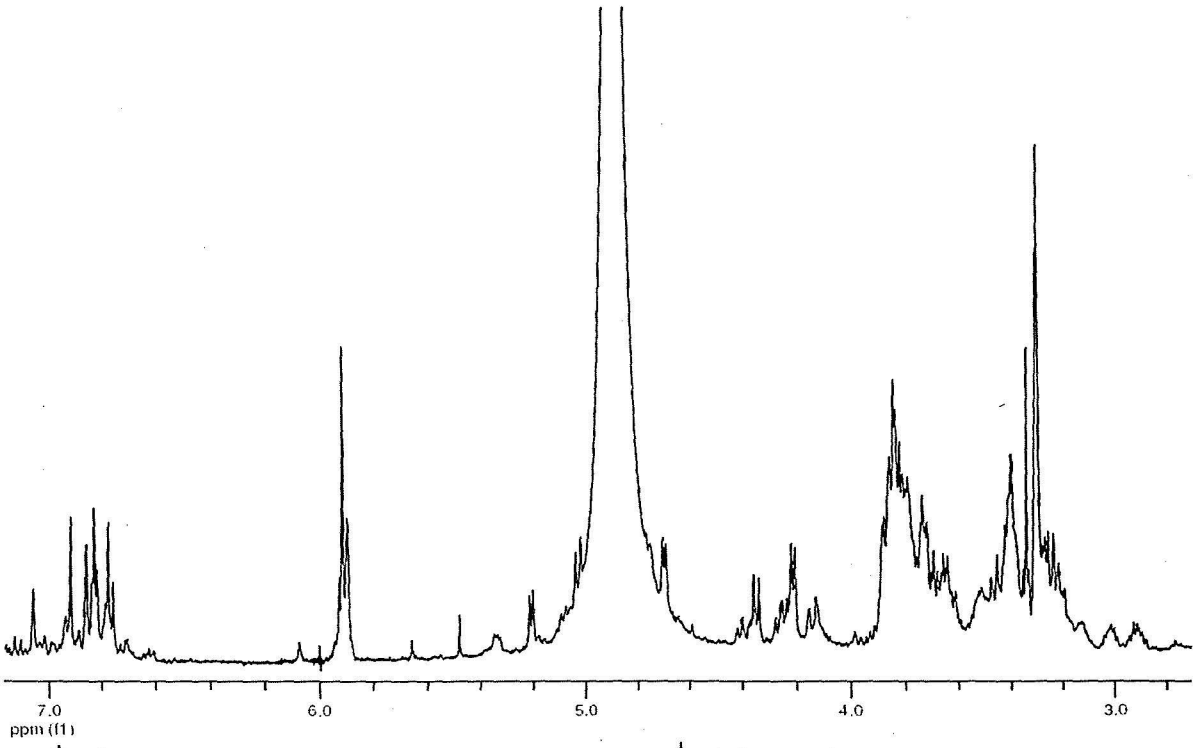
รูปที่ 3 ^{1}H NMR spectrum (400 MHz, CD_3OD) ของสารที่สกัดโดยวิธีของ Moazzami และคณะ



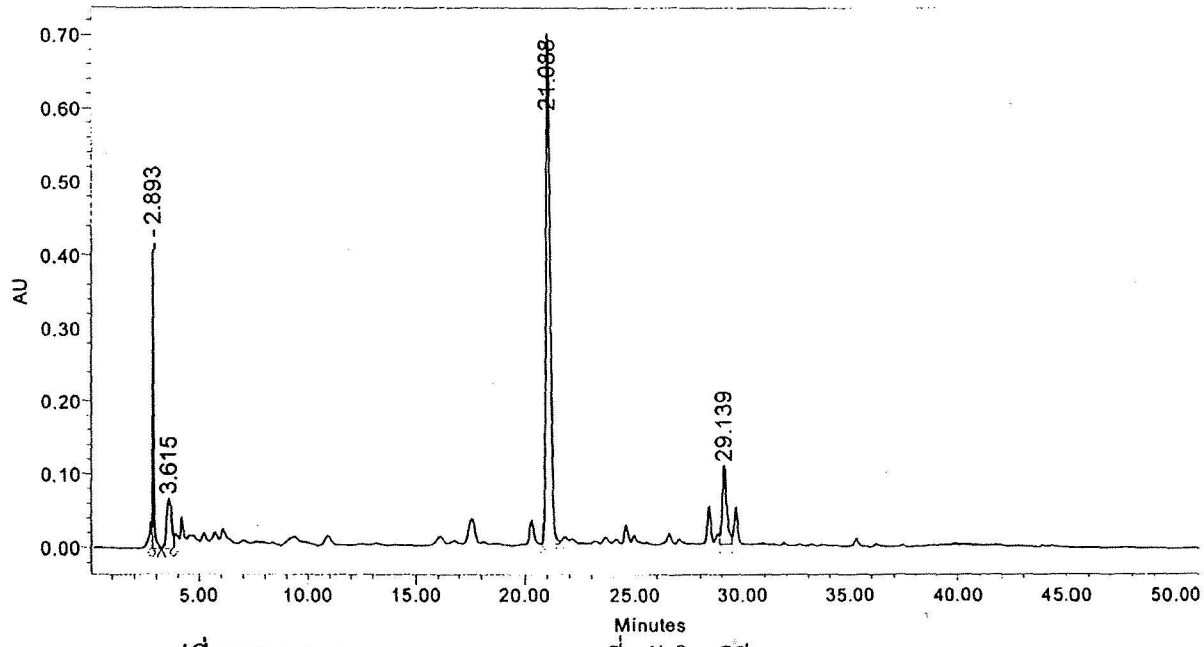
รูปที่ 4 ^{1}H NMR spectrum (400 MHz, CD_3OD) ของสารที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 85:15 MeOH-H_2O



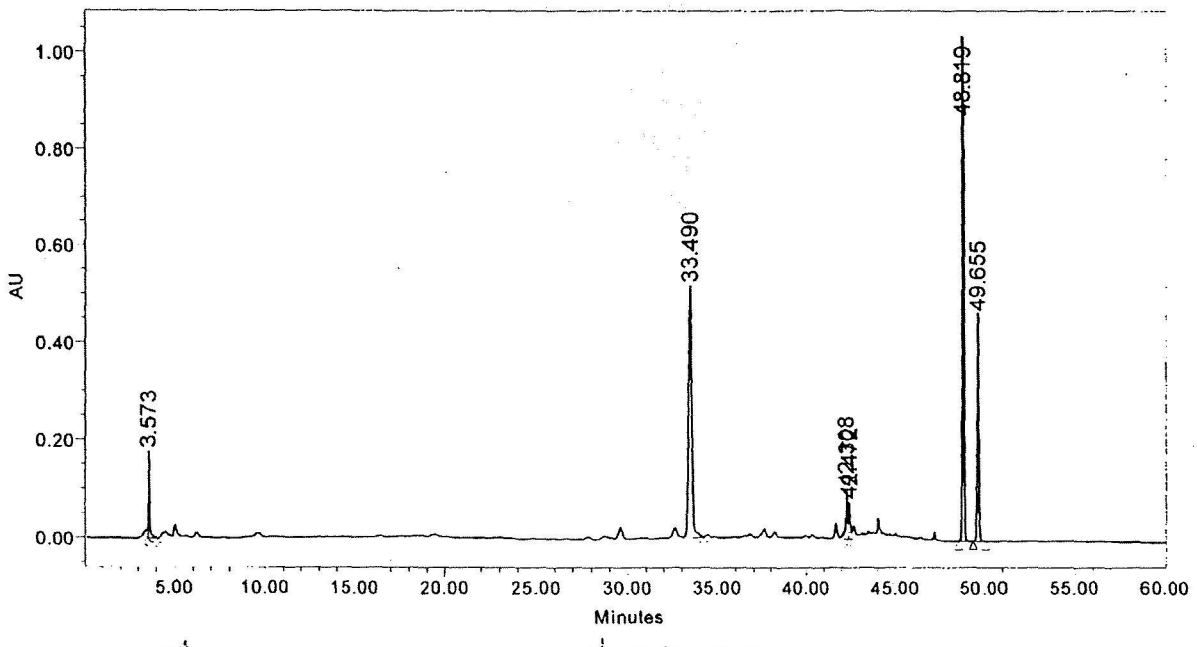
รูปที่ 5 ^{1}H NMR spectrum (400 MHz, CD_3OD) ของสารที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 85:15 EtOH-H_2O



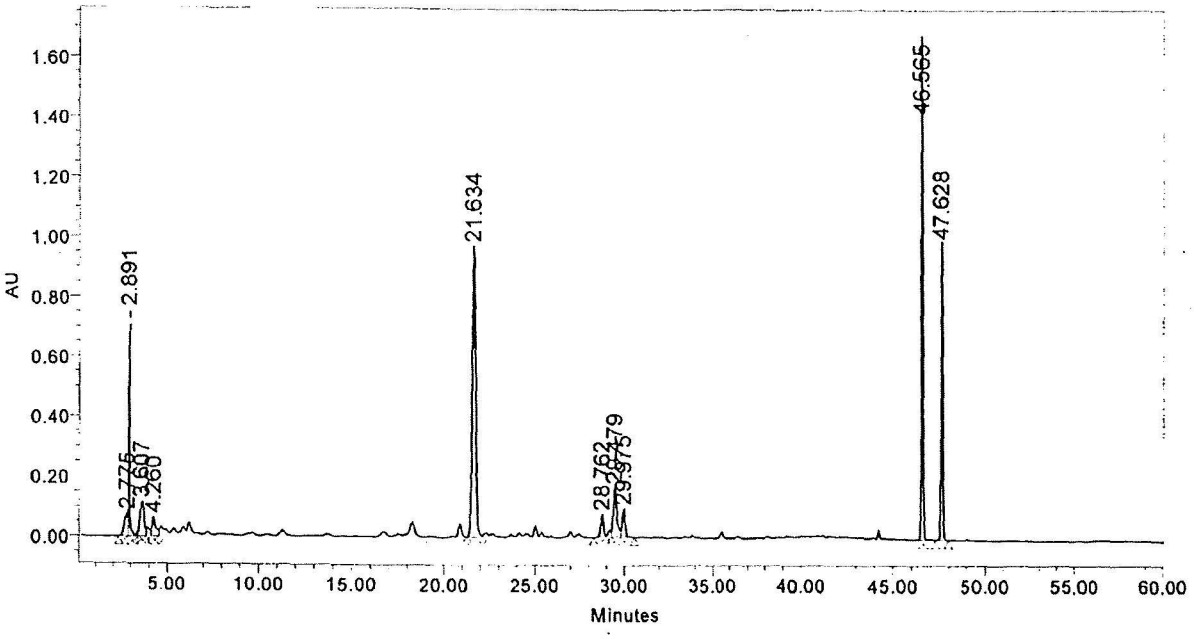
รูปที่ 6 ^{1}H NMR spectrum (400 MHz, CD_3OD) ของสารที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 85:15 propanol-H_2O



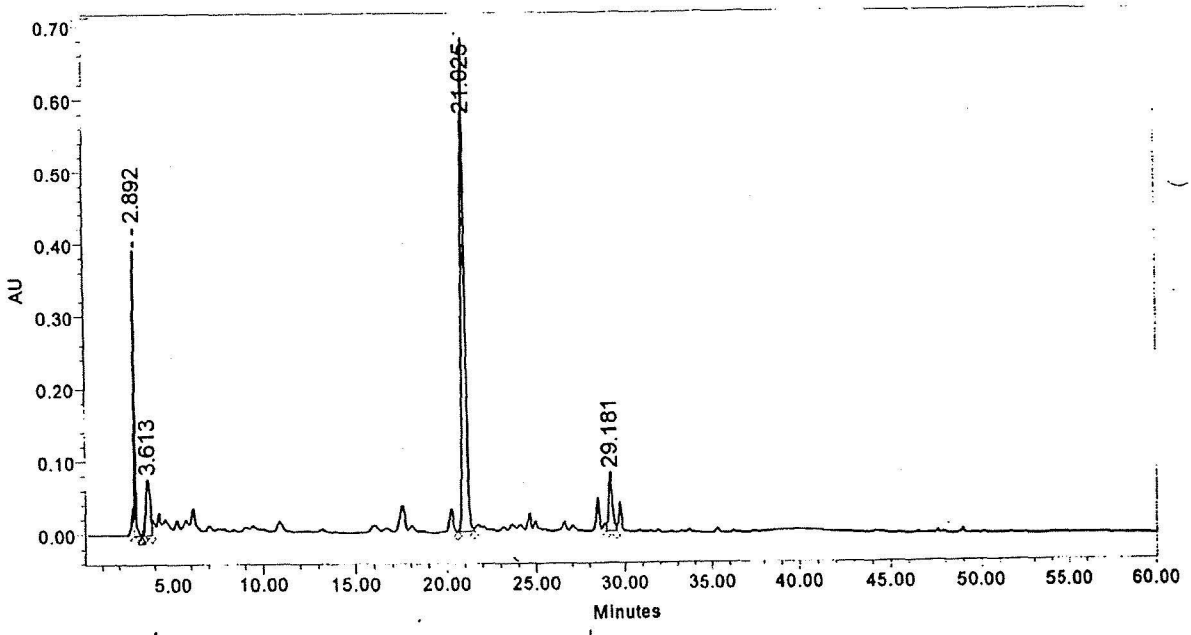
รูปที่ 7 HPLC chromatogram ของสารที่สกัดโดยวิธีของ Moazzami และคณะ



รูปที่ 8 HPLC chromatogram ของสารที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 85:15 MeOH-H_2O



รูปที่ 9 HPLC chromatogram ของสารที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 85:15 EtOH-H_2O



รูปที่ 10 HPLC chromatogram ของสารที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 85:15 propanol-H_2O

จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่าสารสกัดทั้ง 4 วิธีให้สัดส่วนของ sesaminol triglucoside:sesaminol diglucoside ในช่วง 15-22:1 ซึ่งถือว่าใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตามการสกัดด้วยโพลิเมอริกเรซินและตัวทำละลาย 85:15 MeOH-H_2O และ 85:15 EtOH-H_2O มีสิ่งเจือปนไม่ทราบชนิดในปริมาณสูงที่ช่วง t_R 45.00-50.00 นาที

ตารางที่ 1 อัตราส่วน sesaminol triglucoside : sesaminol diglucoside จากการสกัดทั้ง 4 วิธี

วิธีการสกัด	อัตราส่วน sesaminol triglucoside : sesaminol diglucoside
วิธี Moazzami	17:1
วิธีโพลิเมอริกเรซิน	
85:15 MeOH-H_2O	22:1
85:15 EtOH-H_2O	15:1
85:15 propanol-H_2O	17:1

หากกล่าวโดยสรุป การสกัด sesaminol glucoside ซึ่งประกอบด้วย สารหลัก 2 ชนิดคือ sesaminol diglucoside และ sesaminol triglucoside จากกากงา โดยใช้โพลิเมอริกนั้น สามารถย่นระยะเวลาในการสกัดทั้งเพื่อการวิเคราะห์และแยกบริสุทธิ์ลงได้อย่างมาก นอกจากนี้สารสกัดที่ได้ยังมีสิ่งเจือปนน้อยสามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ง่าย โดยอาจจะใช้วิธีการตกผลึกหรือวิธีการทางโครมาโทกราฟีไม่กี่ขั้น ก็ได้สารบริสุทธิ์

เอกสารอ้างอิง

1. Moazzami, A.; Andersson, R.; Eldin, A. HPLC analysis of sesaminol glucosides in sesame seeds. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 633-638.

2.4 ระบุรายละเอียดที่ได้แก้ไขปรับปรุงตามข้อเสนอแนะของผู้ประเมิน (ถ้ามี)

2.5 งบประมาณที่ได้ใช้จ่ายไปแล้วนับตั้งแต่เริ่มทำการวิจัยเป็นเงินทั้งสิ้น ..... บาท

2.6 งานตามแผนงานวิจัย / โครงการวิจัยที่จะทำต่อไป

2.7 คำชี้แจงเกี่ยวกับปัญหาและหรืออุปสรรค (ถ้ามี).....

(ลงชื่อ) .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรินทร ชวศิริ)

หัวหน้าโครงการวิจัย

..... ธันวาคม 2552

ผลการประเมินรายงานความก้าวหน้าของแผนงานวิจัย / โครงการวิจัย

<u>สรุปความเห็นของการประเมิน</u>

☐ เห็นควรสนับสนุนให้ดำเนินการต่อไป

☐ ข้อเสนอแนะเพิ่มเติม

.....

.....

.....

.....

.....

(ลายเซ็น)

(.....)

หัวหน้าส่วนราชการ

วันที่ ..... เดือน ..... พ.ศ. 2553

หมายเหตุ : แบบฟอร์มนี้ใช้สำหรับข้อเสนอการวิจัยทั้งแผนงานวิจัยและโครงการวิจัย