

# รายงานฉบับสมบูรณ์ ปี 2551

การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์และการหาปริมาณ  
แคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซินในผลิตภัณฑ์พริกและอาหารรสเผ็ด

**Development of Analytical Methods and Determination of Capsaicin  
and Dihydrocapsaicin in Chili Products and Hot Spicy Food**

คณะผู้วิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร. ชรรมนุญ หนูจักร<sup>1</sup>

รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม<sup>1,2</sup>

อาจารย์วาสนา โตเลี้ยง<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<sup>2</sup>สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุกรรม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยงบประมาณแผ่นดิน ปี 2551

### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างซอสพริก สำหรับปริมาณวิเคราะห์แคปไซซินอยด์ (CAPs) ด้วยเทคนิคไมเซลลารีอิเล็กโทรโครเมติกโครมาโทกราฟี (MEKC) ที่ได้พัฒนาแล้วจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ โดยศึกษาและเปรียบเทียบผลของชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้สกัด (เอทิลอะซิเตตหรืออะซิโตนไทรล์) แบบที่เติมเกลือและไม่เติมเกลือ พบว่าการสกัดตัวอย่างด้วยเอทิลอะซิเตตแบบเติมเกลือให้ประสิทธิภาพของการสกัด CAPs ที่ดีกว่า เมื่อศึกษาการสกัดด้วยวิธีนี้โดยใช้ซอสพริกเตรียมที่ประกอบด้วย CAPs ที่ 20, 50 และ 100 ppm ( $\mu\text{g/g}$ ) พบว่าได้ recovery ในช่วง 96-105% แสดงว่ามีความเที่ยงสูงทั้งภายในวัน ( $\text{RSD} < 3.7\%$ ,  $n=5$  batch) และต่างวันกัน ( $\text{RSD} < 2.5\%$  เป็นเวลา 5 วัน) เมื่อวิเคราะห์ตัวอย่างซอสพริกจริง 8 ตัวอย่าง ด้วย MEKC โดยเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น พบว่ามีปริมาณ CAPs ในช่วง 21-128 ppm โดยที่ 3 ตัวอย่างมีปริมาณ CAPs มากกว่า 50 ppm ซึ่งเกินปริมาณจำกัดของสหภาพยุโรป (European Commission) นอกจากนี้ปริมาณ CAPs ที่วิเคราะห์ได้จากต่างยี่ห้อกันไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณพริกในซอสพริกและระดับความเผ็ดที่ระบุไว้ ดังนั้น MEKC และวิธีการเตรียมตัวอย่าง ที่พัฒนาขึ้นนี้ จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของการวิเคราะห์ปริมาณ CAPs ในซอสพริก เพื่อควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์และเป็นข้อมูลความปลอดภัยของผู้บริโภคได้

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เลขานุการ

เลขทะเบียน 014424

วัน, เดือน, ปี 22 ก.พ. 53

### Abstract

The sample preparation for micellar electrokinetic chromatographic (MEKC) determination of capsaicinoids in chili sauces was developed using solvent extraction (ethyl acetate or acetonitrile) with and without addition of salts. Results showed that ethyl acetate extraction with adding salts provided better extraction efficiency. Using the prepared sauces spiked with 20, 50 and 100 ppm ( $\mu\text{g/g}$ ) CAPs, high recoveries of 96-105% were obtained with high precision for intraday ( $\text{RSD} < 3.7\%$ ,  $n=5$  batches) and interday ( $\text{RSD} < 2.5\%$ , 5 days,  $n=25$ ). This validated method was used for MEKC determination of CAPs in eight samples of chili sauces, and 21-128 ppm CAPs were found. It should be noted that three of them contain CAPs of higher than 50 ppm, which is above limited levels recommended by European Commission. In addition, the determined CAPs in chili sauces are neither correlated with their chili content nor hot degree labeled on each product. Therefore, this developed method may be used as an alternative method for determination of CAPs in chili sauces for quality control and health safety.



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี โดยได้รับการสนับสนุน คำแนะนำและความช่วยเหลือจาก บุคคลและหน่วยงาน ดังต่อไปนี้

ขอขอบพระคุณอย่างยิ่งสำหรับแหล่งเงินทุนสนับสนุนจาก “งบประมาณแผ่นดิน ปี 2551” และสถานที่ทำวิจัย และเครื่องมือจากภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบคุณนางสาวกนกวรรณ วรคง ผู้ช่วยวิจัยของโครงการวิจัย รวมทั้งนิสิตและคณาจารย์ในหน่วยวิจัยเทคนิคการแยกสารและการวิเคราะห์เชิงโครมาโทกราฟี ที่ให้ข้อเสนอแนะต่างๆ

ขอขอบคุณลูกศิษย์นิสิตปริญญาโทและเอก ในกลุ่มวิจัยที่มีส่วนช่วยเหลือในผลงานวิจัย และรายงานวิจัยฉบับนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดาและพี่น้องทุกคนเป็นอย่างสูง ที่เป็นกำลังใจตลอดเวลาในการทำงานวิจัยนี้



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
Abstract	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญรูป	ง
สารบัญตาราง	จ
สัญลักษณ์และคำย่อ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทฤษฎี	10
บทที่ 3 การทดลอง	21
บทที่ 4 ผลการทดลองและการวิจารณ์	28
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	43
เอกสารอ้างอิง	45
ภาคผนวก	51

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1.1	1
2.1	10
2.2	13
2.3	14
2.4	15
2.5	16
3.1	24
4.1	31
4.2	32
4.3	35
4.4	38
4.5	41
4.6	42

## สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า	
1.1	ข้อกำหนดปริมาณแคปไซซินอยค์ในอาหารประเภทต่างๆ	2
1.2	มูลค่าการส่งออกของซอสพริกและเครื่องแกง	2
1.3	ชนิดของตัวอย่างและเทคนิคการเตรียมตัวอย่างที่ผ่านมา	5
3.1	ตัวอย่างซอสพริกที่ใช้ในการศึกษา	23
4.1	เปรียบเทียบปริมาณเกลือที่เหมาะสมในการสกัดซอสพริก	33
4.2	ขีดจำกัดของการวิเคราะห์	36
4.3	ช่วงความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่ใช้และสมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐาน	37
4.4	ความเที่ยงของการวิเคราะห์แคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซิน	39
4.5	ปริมาณของแคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซินในตัวอย่างซอสพริก	40

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### สัญลักษณ์และคำย่อ

$\Delta\mu$	ความแตกต่างของค่า $\mu$ ของสาร
$\alpha$	Selectivity
$\epsilon$	Permittivity
$\Phi$	อัตราส่วนปริมาตรของ pseudo-stationary phase ต่อปริมาตรของ aqueous phase
$\eta$	ความหนืดของสารละลาย
$\mu$	ความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้า (electrophoretic mobility)
$\mu^\circ$	ความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าที่ความแรงของไอออนิกใกล้ศูนย์ (absolute electrophoretic mobility)
$\mu_{eo}$	ความสามารถในการเคลื่อนที่ของอิเล็กโทรออสโมซิส (electroosmotic mobility)
$\mu_{net}$	ความสามารถในการเคลื่อนที่รวม (net mobility)
$\mu_{ps}$	electrophoretic mobility ของ pseudo-stationary phase
$\zeta$	zeta potential
$A_{corr}$	corrected peak area
$d$	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของกะปิลลารี
$e$	ประจุของอิเล็กตรอน ( $1.6 \times 10^{-19}$ คูโลมบ์)
$E$	ความเข้มของสนามไฟฟ้า (electric field strength)
$f$	จำนวนเท่าที่เจือจางสารละลายพริกตัวอย่างจากเริ่มต้น (dilution factor)
$I$	ความแรงไอออนิก (ionic strength)
$k$	รีเทนชันแฟกเตอร์ (retention factor)
$K$	ค่าคงที่ของการกระจาย (distribution constant)
$l$	ความยาวจากปลายกะปิลลารีด้านที่บรรจุสารจนถึงเครื่องตรวจวัด
$L$	ความยาวทั้งหมดของกะปิลลารี
$Q$	ปริมาณแคปไซซินและโคไฮโดรแคปไซซินที่มีอยู่ในตัวอย่างในหน่วย g/kg
$r_h$	รัศมีไฮโดรไดนามิกของไอออน (hydrodynamic radius of ion) ซึ่งเป็นรัศมีของไอออนที่มีโมเลกุลของน้ำล้อมรอบขณะที่ไอออนเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้า
$R_s$	ค่าการแยกของสาร (resolution)
S/N	อัตราส่วนของสัญญาณตรวจต่อสัญญาณรบกวน (signal-to-noise ratio)



$t_{eo}$	ไมเกรชันไทม์ของ EOF marker
$t_m$	ไมเกรชันไทม์ (migration time)
$t_{ps}$	ไมเกรชันไทม์ของ pseudo-stationary phase
$t_R$	รีเทนชันไทม์ (retention time) ของสาร
$v_{ep}$	ความเร็วในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสาร (electrophoretic velocity)
$V$	ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้แยกสาร (applied voltage)
$V_F$	ความเร็วโดยปริมาตรของสารตัวอย่างที่เคลื่อนที่ผ่านเครื่องตรวจวัด
$z$	ประจุบนไอออน (electronic charge)
BGE	background electrolyte
CAP	แคปไซซิน
CAPs	แคปไซซินอยด์
CE	capillary electrophoresis
CMC	critical micellar concentration
DCAP	ไดไฮโดรแคปไซซิน
EOF	electroosmotic flow
HPLC	ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิกวิดโครมาโทกราฟี (high performance liquid chromatography)
ISTD	internal standard
LOD	ขีดจำกัดของการตรวจวัด (limit of detection)
LOQ	ขีดจำกัดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (limit of quantitation)
MEKC	micellar electrokinetic chromatography
ppm	1 ส่วนในล้านส่วน (part per million)
RSD	ค่าส่วนเบี่ยงเบนสัมพัทธ์ (relative standard deviation)
SDS	โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต
SQL	ขีดจำกัดของปริมาณวิเคราะห์ของตัวอย่าง (sample quantitation limit)
$K_d$	สัมประสิทธิ์ของการกระจาย (distribution coefficient)
$P$	สัมประสิทธิ์ของการแบ่งส่วน (partition coefficient)
$C_{org}$	ความเข้มข้นของสารในเฟสตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent)
$C_s$	ความเข้มข้นของสารในเฟสตัวอย่าง (sample)
$E$	ประสิทธิภาพของการสกัด (extraction efficiency)
$R$	Recovery

$W_{\text{org}}$	ปริมาณสารในเฟสตัวทำละลายอินทรีย์
$W_0$	ปริมาณสารเริ่มต้น
$V_{\text{org}}$	ปริมาตรของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในการสกัด
$V_s$	ปริมาตรของตัวอย่างที่นำมาสกัด
SFE	supercritical fluid extraction
SPME	solid-phase microextraction
EtOAc	เอทิลอะซิเตต (Ethyl acetate)
ACN	อะซิโตไนไทรล์ (Acetonitrile)



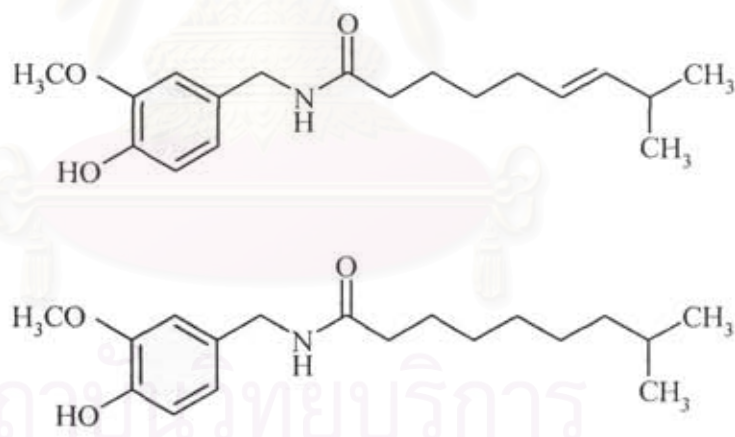
สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

พริกมีกลุ่มสารที่สำคัญที่ทำให้มีรสเผ็ดร้อนและมีกลิ่นฉุน คือ แคปไซซินอยด์ (capsaicinoids) โดยองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นแคปไซซิน (capsaicin) และไดไฮโดรแคปไซซิน (dihydrocapsaicin) สูตรโครงสร้างดังรูปที่ 1 ในอัตราส่วน 1:1 ถึง 1:2 ส่วนสารแคปไซซินอยด์อื่นๆ มีในปริมาณน้อย สารเหล่านี้พบมากที่ผนังชั้นในและรกของพริก [บัญญัติ: 2527] แคปไซซินเป็นสารที่มีฤทธิ์ระคายเคืองผิวหนัง ช่วยบรรเทาอาการเจ็บปวดและป้องกันการอักเสบ ชะลอการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย [มูลนิธิโกลบอลทอง: 2527] กระตุ้นการทำงานของกระเพาะอาหาร ให้หลังกรดเกลือเพิ่มมากขึ้น ทำให้อัตราการหายใจ การเต้นของชีพจรและความดันโลหิตเพิ่มขึ้น ทำให้ระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดลดลงได้ แต่พบว่าพริกทำให้เกิดเนื้องอกในตับได้ด้วย [นิจศิริ: 2534]



รูปที่ 1.1 สูตร โครงสร้างของแคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซิน

ได้มีรายงานว่าคนอินเดีย ไทยและเม็กซิกัน นิยมบริโภคอาหารรสเผ็ด คิดเป็นแคปไซซิน 25 ถึง 200 mg/คน/วัน ในขณะที่คนอเมริกาและในยุโรปบริโภคอาหารรสเผ็ด คิดเป็นแคปไซซิน ประมาณ 1.5 mg/คน/วัน เมื่อเร็วๆ นี้ สหภาพยุโรป (European Commission) ได้รายงานความคิดเห็นของคณะกรรมการวิทยาศาสตร์ทางอาหารเกี่ยวกับแคปไซซิน [Opinion of the Scientific

Committee on Food on Capsaicin] โดยมีสาระที่สำคัญว่าคนอินเดียและเม็กซิกันที่บริโภคอาหารรสเผ็ดจัดมากมีความสัมพันธ์และความเสี่ยงของการเป็นโรคมะเร็งกระเพาะสูง ในขณะที่คนยุโรปที่บริโภคอาหารรสเผ็ดในระดับปกติ (1.5 mg/คน/วัน) ไม่พบว่ามีความเสี่ยงของโรคมะเร็งกระเพาะ แม้ว่าที่ประชุมยังไม่ได้มีมติออกกฎควบคุมอาหารรสเผ็ดอย่างชัดเจน แต่เพื่อความปลอดภัยคณะกรรมการให้ความเห็นของข้อจำกัดของแคปไซซินอยด์ ซึ่งคิดเป็นแคปไซซินในอาหารรสเผ็ด ดังตารางที่ 1.1

อาหารไทยส่วนใหญ่มีพริกเป็นส่วนประกอบ รวมทั้งเป็นองค์ประกอบในเครื่องปรุงรส เช่น ซอสพริกและเครื่องแกงสำเร็จรูปต่างๆ จากข้อมูลของสถาบันอาหารรายงานว่าในปี 2547 จนถึง 2551 มีมูลค่าการส่งออกรวมของซอสพริกและเครื่องแกงเป็นมูลค่าหลายพันล้านบาท แสดงดังตารางที่ 1.2 [www.ops.moc.go.th]

ตารางที่ 1.1 ข้อกำหนดปริมาณแคปไซซินอยด์ในอาหารประเภทต่างๆ

ประเภทอาหาร	ปริมาณแคปไซซินอยด์ไม่เกิน (ppm)
อาหารและเครื่องดื่มทั่วไป	5
อาหารรสเผ็ด	10
Ketchup	20
Tabasaco, Harrissa, Hot pimento oil	50
หรืออาหารอื่นในรูปแบบคล้ายๆ กัน	

ตารางที่ 1.2 มูลค่าการส่งออกของซอสพริกและเครื่องแกง

ปี	2547	2548	2549	2550	2551
					(ม.ก.-ก.ย.)
มูลค่า (ล้านบาท)	1573.4	1826.3	1939.7	1747.9	1605.1

จากนโยบายรัฐบาลในปี 2547 ที่สนับสนุนโครงการครัวไทยสู่ครัวโลก ทำให้มูลค่าการส่งออกของผลิตภัณฑ์เครื่องปรุงรสและสมุนไพร เพิ่มขึ้นร้อยละ 20.1 โดยตลาดที่สำคัญของไทย ได้แก่ ยุโรป อเมริกา ญี่ปุ่น ออสเตรเลียและประเทศอื่นๆ เครื่องแกงสำเร็จรูปเป็นลักษณะเฉพาะของอาหารไทย จึงจัดได้ว่าประเทศไทยต้องแข่งขันกับตัวเองในด้านคุณภาพและความปลอดภัยของเครื่องแกงสำเร็จรูป ในโลกของเศรษฐกิจยุคใหม่จำเป็นต้องตระหนักถึงข้อกำหนดขององค์ประกอบของสารต่างๆ ในอาหาร แม้ว่าในปัจจุบันยังไม่มีข้อกำหนดของการติดฉลากระบุปริมาณแคปไซซิน



นอยด์ในอาหาร แต่มีแนวโน้มว่าองค์การอาหารและยาของอเมริกาและยุโรปจะมีข้อกำหนดดังกล่าว เพื่อความปลอดภัยและสุขอนามัยของประชาชน ดังนั้นการพัฒนาวิธีการแยกและตรวจวิเคราะห์หาปริมาณแคปไซซินอยด์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งแคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซินในผลิตภัณฑ์พริก และอาหารรสเผ็ดเป็นสิ่งจำเป็น แม้ว่าจะมีวิธีมาตรฐานของการวิเคราะห์สารดังกล่าวในพริกและ ส่วนสกัดของพริก แต่วิธีการแยกและวิเคราะห์รวมทั้งวิธีการเตรียมตัวอย่างที่รวดเร็วและมี ประสิทธิภาพเป็นสิ่งจำเป็น โดยเฉพาะอาหารประเภทแกงต่างๆ ของไทยหรืออาหารไทยอื่นๆ ซึ่ง จัดว่าเป็นตัวอย่างที่มีความซับซ้อนมากกว่าส่วนสกัดของพริก และประเทศไทยน่าจะเป็นผู้ริเริ่ม พัฒนาวิธีการวิเคราะห์สารเหล่านี้ในอาหาร หากมีการกำหนดการติดฉลากระบุปริมาณแคปไซซิน ในอาหารดังกล่าว และประเทศไทยยังไม่มีวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์ จะทำให้สูญเสีย รายได้ส่งออกหลายร้อยล้านบาทได้ มีผลกระทบกับการส่งออก ผู้ผลิตอาหารรสเผ็ดและเกษตรกรที่ ปลูกพริกได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะพัฒนาวิธีเตรียมตัวอย่าง วิธีการแยกและวิเคราะห์ ปริมาณแคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซินในพริก ส่วนสกัดพริก ผลิตภัณฑ์พริก (เช่น เครื่องแกง และเครื่องปรุงต่างๆ) อาหารเสริมที่มีพริกเป็นองค์ประกอบ และอาหารรสเผ็ดต่างๆ (เช่น แกง ผัด พริกและคัมข่า)

ปัจจุบันเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิกวิดโครมาโทกราฟี (high-performance liquid chromatography, HPLC) ใช้สำหรับวิเคราะห์แคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซินในพริกและส่วน สกัดของพริก แต่จะมีวิธีการเตรียมตัวอย่างที่ยุ่งยาก ที่ต้องการขั้นตอน solid phase extraction (SPE) เพื่อกำจัดเมทริกซ์ที่อาจติดค้างในคอลัมน์ หรือรบกวนการวิเคราะห์สารตัวอย่าง จึงมีแนวความคิดที่ จะพัฒนาเทคนิคอะพอลาร์รีโอเล็กโทรโฟริซิส (capillary electrophoresis, CE) สำหรับวิเคราะห์แคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซินแบบที่ไม่ต้องผ่านการเตรียมตัวอย่างที่ยุ่งยาก เปรียบเทียบกับแบบที่ ต้องผ่านการเตรียมตัวอย่างด้วย SPE และเปรียบเทียบกับเทคนิค HPLC ซึ่ง CE จัดเป็นเทคนิคการ แยกสารแบบใหม่ ที่มีประสิทธิภาพของการแยกสารที่ดี วิเคราะห์ได้รวดเร็ว ใช้สารเคมีในปริมาณ น้อยเมื่อเปรียบเทียบกับ HPLC และ CE ไม่เสี่ยงต่อการที่สารติดค้างในคอลัมน์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## 1.2 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

จากงานวิจัยที่ผ่านมา เทคนิคที่ใช้ในการแยกและวิเคราะห์หาปริมาณแคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซิน ดังตารางที่ 1.3 ได้แก่ ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (thin-layer chromatography, TLC), แก๊สโครมาโทกราฟี (gas chromatography, GC), ซุปเปอร์คริติคัลฟลูอิดโครมาโทกราฟี (supercritical fluid chromatography, SFC), HPLC, โวลแทมเมทรี (Voltammetry) และ CE

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC ทำได้โดยการ bromination สารที่จะวิเคราะห์ก่อน [Todd *et al.*: 1975, Suzuki *et al.*: 1980, Perucka and Oleszek: 2000] เพื่อให้เกิดการแยกของสารต่างๆ แต่อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพการแยกไม่ค่อยดีนักและใช้ระยะเวลาานาน ส่วนเทคนิค GC นั้นเนื่องจากแคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซินเป็นสารที่กลายเป็นไอได้ยาก จึงต้องมีการเตรียมให้อยู่ในรูปอนุพันธ์ของสารที่กลายเป็นไอได้ง่าย เช่น อนุพันธ์เมทิลเอสเทอร์ [Jurenitsch and Kampelmuhler: 1980, Hawer *et al.*: 1994, Spicer and Admirall: 2005, Pino *et al.*: 2007, Thomas *et al.*: 1998]

เทคนิคที่ใช้ทั่วไปในการแยกและวิเคราะห์หาปริมาณแคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซิน คือ เทคนิค HPLC ซึ่งส่วนใหญ่จะใช้คอลัมน์เป็น reversed phase-HPLC โดยมีเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายผสม ได้แก่ เมทานอล:น้ำ [Sticher *et al.*: 1978, LopezHernandez *et al.*: 1996] น้ำ:อะซิโตนในไตรล:กรดฟอสฟอริก [James and Bradley: 2000], น้ำ:อะซิโตนในไตรล [Yao *et al.*: 1994], potassium dihydrogenphosphate:อะซิโตนในไตรล [Teruo *et al.*: 1985], เมทานอล:น้ำ:อะซิโตนในไตรล:กรดอะซิติก [Kaale *et al.*: 2002] และมีการเปลี่ยนสารให้อยู่ในรูปสารเชิงซ้อนกับซิลเวอร์ [Jurenitsch and Leinmuller: 1980, Constant *et al.*: 1995] ส่วนเครื่องตรวจวัดที่ใช้ได้แก่ เครื่องตรวจวัดแบบ UV [Sticher *et al.*: 1978, LopezHernandez *et al.*: 1996, James and Bradley: 2000, Yao *et al.*: 1994, Jurenitsch and Leinmuller:1980, Constant *et al.*:1995, Kaale *et al.*: 2002 ], electrochemical [Teruo *et al.*: 1985] และ fluorescence [Tucker.: 2001] เป็นต้น

สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณแคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซินด้วยเทคนิค CE ที่ผ่านมานั้นได้มีรายงานโดยการใช้เทคนิค CE แบบ micellar electrokinetic chromatography (MEKC) [Laskaridou-Monnerville: 1999] ซึ่งมีการเติมสารลดแรงตึงผิวเป็น sodium dodecyl sulfate (SDS) ทำหน้าที่เป็น pseudo-stationary phase และสารละลายอิเล็กโทรไลต์ (background electrolyte, BGE) เป็นสารละลายผสมระหว่าง sodium tetraborate และ sodium dihydrogenphosphate ที่ pH 9.0 ที่ประกอบด้วยตัวทำละลายอินทรีย์เป็นเมทานอล โดยใช้เครื่องตรวจวัดแบบ UV โดยประยุกต์สำหรับวิเคราะห์ตัวอย่างพริก

งานวิจัยที่ผ่านมานั้นเกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์หาปริมาณแคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซินในตัวอย่างพริก (ทั้งพริกสดและพริกแห้ง) ส่วนสกัดพริก (capsicum oleoresin) รวมทั้ง

ผลิตภัณฑ์ที่มีพริกเป็นส่วนประกอบ เช่น สเปรย์พริก ยานวด ขอสพริก อาหารที่มีพริกเป็นส่วนประกอบ เป็นต้น

ในการวิเคราะห์ตัวอย่างแต่ละชนิดที่ผ่านมานั้นจะต้องผ่านขั้นตอนหรือวิธีการเตรียมตัวอย่าง ได้แก่ ultrasound-assisted extraction, microwave-assisted extraction, supercritical fluid extraction (SFE), pressurized liquid extraction, magnetic stirring, SPE, solid-phase microextraction (SPME), soxhlet extraction และสกัดด้วยตัวทำละลาย (solvent extraction หรือ liquid phase extraction)

ตารางที่ 1.3 ชนิดของตัวอย่างและเทคนิคการเตรียมตัวอย่างที่ผ่านมา

ตัวอย่าง	วิธีวิเคราะห์	เทคนิคการเตรียมตัวอย่าง	เอกสารอ้างอิง
พริกสด	HPLC, LC-MS	สกัดด้วยตัวทำละลายอะซิโตน	Schweiggert <i>et. al.</i> : 2006, Sato <i>et. al.</i> : 1999
	CE	SPE ด้วยเมทานอล	Laskaridou-Monnerville: 1999
	TLC	สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต	Suzuki <i>et. al.</i> : 1980
	HPLC	SFE ด้วย carbon dioxide	Yao <i>et. al.</i> : 1994
	HPLC	SFE ด้วย carbon dioxide	Uquiche <i>et. al.</i> : 2004
	HPLC	สกัดด้วยตัวทำละลายด้วย diethyl ether	Topuz and Ozdemir: 2007
	HPLC, TLC	สกัดด้วยตัวทำละลายอะซิโตน:petroleum ether	Perucka and oleszek: 2000
	GC, GC/MS	สกัดด้วยตัวทำละลายอะซิโตนไนโตรล์	Pino <i>et. al.</i> : 2007
	GC	สกัดด้วยตัวทำละลายอะซิโตน	Cisneros-Pineda <i>et. al.</i> : 2007
	HPLC	pressurized liquid extraction ด้วยเมทานอล	Barbero <i>et. al.</i> : 2006, Barbero <i>et. al.</i> : 2008
	HPLC	microwave-assisted extraction เอทานอล	Barbero <i>et. al.</i> : 2006
	HPLC	SPE ด้วยเมทานอล	Thompson <i>et. al.</i> : 2006
	HPLC	SFE ด้วย n-hexane	Duarte <i>et. al.</i> : 2004
พริกแห้ง	HPLC	สกัดด้วยตัวทำละลายอะซิโตน	Weaver <i>et. al.</i> : 1984
	HPLC	สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล	Weaver and Awde: 1986, Batchelor and Jones: 2000
พริก	HPLC	ultrasound-assisted extraction ด้วยเมทานอล	Barbero <i>et. al.</i> : 2008

	GC	magnetic stirring ด้วยอะซิโตน	Thomas <i>et. al.</i> : 1998
	HPLC	magnetic stirring ด้วยเอทานอล	Davis <i>et. al.</i> : 2007
พริกและส่วน สกัดพริก	HPLC	SPE ด้วยอะซิโตน ไทรล์ และ เฮกเซน	Attuquayefio and Buckle: 1987
ส่วนสกัดพริก	HPLC	สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล และ SPE ด้วยเฮกเซน	Cooper <i>et. al.</i> : 1991
	HPLC	สกัดด้วยตัวทำละลาย diethyl ether	Wei and Zhao: 2008
สเปรย์พริก	LC-MS, LC-MS-MS	SPME ด้วยเมทานอล	Reilly <i>et. al.</i> : 2001
	GC/MS	SPME ด้วยเอทิลอะซิเตด	Spicer and Almirall: 2005
พริก ขอสพริก และอาหารเค็ม	HPLC, LC-MS	สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล	Kozukue <i>et. al.</i> : 2005
ขอสพริก	HPLC	สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล	Batchelor and Jones: 2000
	voltammetry	สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล	Kachoosangi <i>et. al.</i> : 2008
ขานวด	LC	สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน	Kaale <i>et. al.</i> : 2002

จะเห็นว่าการวิเคราะห์หาปริมาณแคปไซซินและโคไฮโครแคปไซซินในตัวอย่างส่วนใหญ่  
ที่มักจะวิเคราะห์กับตัวอย่างพริกไม่ว่าจะเป็นพริกสด หรือพริกแห้ง อีกทั้งวิธีการเตรียมตัวอย่างส่วน  
ใหญ่ก็มักจะใช้วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย ซึ่งตัวทำละลายที่ใช้กันได้แก่ เอทานอล [Kachoosangi  
*et. al.*: 2008, Batchelor and Jones: 2000], เมทานอล [Cooper *et. al.*: 1991, Laskaridou-  
Monnerville: 1999, Kozukue *et. al.*: 2005], เมทานอล:น้ำ [Kaale *et. al.*: 2002] อะซิโตน [Weaver  
*et. al.*: 1984, Weaver and Awde: 1986, Sato *et. al.*: 1999, Cisneros-Pineda *et. al.*: 2007], อะซิโตน:  
ปีโตเลียมอีเทอร์ [Perucka and Oleszek: 2000], เฮกเซน [Kaale *et. al.*: 2002] เอทิลอะซิเตด [Suzuki  
*et. al.*: 1980, Schweiggert *et. al.*: 2006], ไดเอทิลอีเทอร์ [Wei and Zhao: 2008], อะซิโตน ไทรล์  
[Attuquayefio and Buckle: 1987, Topuz and Ozdemir: 2007, Pino *et. al.*: 2007] แต่อย่างไรก็ตาม  
วิธีนี้ยังอาจต้องการขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างแบบ SPE แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC  
[Attuquayefio and Buckle: 1987, Cooper *et. al.*: 1991] หรือนำไปผ่านขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง  
แบบ SPE ก่อนการวิเคราะห์ด้วย CE [Laskaridou-Monnerville: 1999] ซึ่งยังไม่เข้าใจเหตุผลที่  
ชัดเจน อาจเป็นไปได้ว่าภาวะของ CE ที่เลือกใช้ไม่เหมาะสมต่อการแยกสารที่สนใจออกจากเมท  
ริกซ์ตัวอย่าง หรือการตกตะกอนของเมทริกซ์เนื่องจากความไม่เหมาะสมของตัวทำละลายอินทรีย์ที่  
ใช้



จากการสืบค้นข้อมูลพบว่า การวิเคราะห์หาปริมาณแคปไซซินและโคไฮโครแคปไซซินในตัวอย่างซอสพริกมีการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC [Batchelor and Jones: 2000, Kozukue *et. al.*: 2005] และเทคนิคโวลูเมตริก [Kachosangi *et. al.*: 2008] ในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างนั้นจะทำการสกัดด้วยตัวทำละลายก่อน ยกตัวอย่างเช่น สกัดตัวอย่างซอสด้วยเอทานอล จากนั้นนำไปต้มและกวนเป็นเวลา 30 นาที แล้วปล่อยให้เย็น [Batchelor and Jones: 2000] อีกผลงานวิจัยหนึ่งได้ทำการสกัดซอสพริกด้วยเอทานอลเช่นกัน จากนั้นนำไป sonicate เป็นเวลา 10 นาที แล้วกวนอีก 2 ชั่วโมง แล้วนำไป centrifuge เป็นเวลา 20 นาที [Kachosangi *et. al.*: 2008] ซึ่งวิธีการสกัดแบบแรกเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดด้วยการให้ความร้อนโดยตรง [Batchelor and Jones: 2000] ส่วนอีกวิธีหนึ่งที่สกัดที่อุณหภูมิห้องแต่ก็ใช้เวลานาน [Kachosangi *et. al.*: 2008] ส่วนผลงานวิจัยของ Kozukue *et. al.* (2005) ได้ใช้เมทานอลในการสกัดซอสพริก จากนั้นนำไป sonicate เป็นเวลา 20 นาที แล้ว centrifuge ที่อุณหภูมิ 1 °C เป็นเวลา 10 นาที แม้ว่าวิธีการวิเคราะห์ปริมาณด้วยเครื่องมือทางโวลูเมตริกจะทำให้ผลการวิเคราะห์ที่รวดเร็ว แต่ต้องผ่านขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างที่ใช้เวลานานถึง 2.5 ชั่วโมง [Kachosangi *et. al.*: 2008] ซึ่งนานกว่าการแยกและการวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือ HPLC และ CE ถึงอย่างไรก็ตามการใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายในการสกัดก็ยังมีข้อด้อยอยู่คือ ต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในปริมาณมาก อีกทั้งเอทานอลยังมีราคาแพงเมื่อเทียบกับตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดอื่นที่ใช้ในการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ทั่วไป นอกจากนี้เมทานอลและเอทานอลเป็นตัวทำละลายที่สามารถละลายน้ำได้ และซอสพริกมีน้ำเป็นส่วนประกอบประมาณ 50% น้ำอาจมีผลทำให้ประสิทธิภาพในการสกัดลดลง ดังนั้นงานวิจัยก่อนหน้านี้จึงใช้เวลาในการสกัดนานหรือเพิ่มความร้อนเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัด นอกจากนี้ปริมาณของส่วนสกัดจะเป็นปริมาณรวมของตัวทำละลายที่ละลายน้ำได้รวมกับปริมาณของน้ำ ดังนั้นปริมาณของส่วนสกัดจะเพิ่มขึ้นตามปริมาณของน้ำ หากนำส่วนสกัดไปวิเคราะห์โดยตรง ความเข้มข้นของสารในส่วนสกัดจะน้อยกว่าความเป็นจริง เมื่อคำนวณเป็นปริมาณสารในตัวอย่างซอสพริก ค่าที่ได้จะน้อยกว่าความเป็นจริงเช่นกัน ดังนั้นการเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณแคปไซซินและโคไฮโครแคปไซซินหรือแคปไซซินอยด์ควรจะทำให้ถูกต้องและเป็นที่ยอมรับ

### 1.3 ทฤษฎี สมมุติฐาน หรือกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย

โครงการวิจัยนี้ในปีที่ 1 ได้ทำการพัฒนาเทคนิค CE สำหรับแยกและวิเคราะห์แคปไซซินและโคไฮโครแคปไซซิน และเปรียบเทียบ CE และ HPLC สำหรับปริมาณวิเคราะห์ของแคปไซซินและโคไฮโครแคปไซซินในตัวอย่างส่วนสกัดพริก และในปีที่ 2 นี้ได้ทำการพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างสำหรับปริมาณวิเคราะห์แคปไซซินและโคไฮโครแคปไซซินในตัวอย่างซอสพริก

จากรายงานการวิจัยที่ผ่านมาเกี่ยวกับการวิเคราะห์หาปริมาณแคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซินในตัวอย่างซอสพริก ใช้เวลาในการเตรียมตัวอย่างที่นาน ใช้ปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์ในปริมาณมาก ราคาแพง ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้มีการพัฒนาการเตรียมตัวอย่างซอสพริกให้ง่าย สะดวก รวดเร็ว ประหยัด และให้ความถูกต้องของปริมาณวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MEKC ที่ได้พัฒนาขึ้นมาในปีที่ 1

ดังนั้นเทคนิค CE แบบ MEKC น่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของการวิเคราะห์หาปริมาณแคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซินในตัวอย่างซอสพริก และอาหารรสเผ็ด ซึ่งคาดว่าตัวอย่างต่างๆ กัน จะมีปริมาณของสารดังกล่าวแตกต่างกันและหากมีการระบุหรือคิดผลากปริมาณของสารในตัวอย่างดังกล่าวจะเป็นประโยชน์กับผู้ผลิตอาหารและผู้บริโภค

#### 1.4 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 1) พัฒนาเทคนิคอะทิลลารีอิลิกโทรฟอริซิสสำหรับแยกและวิเคราะห์แคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซิน
- 2) เปรียบเทียบอะทิลลารีอิลิกโทรฟอริซิสและไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิกวิดโครมาโทกราฟีสำหรับปริมาณวิเคราะห์ของแคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซิน
- 3) พัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างสำหรับปริมาณวิเคราะห์แคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซินในผลิตภัณฑ์พริกและอาหารรสเผ็ด
- 4) ประยุกต์เทคนิคที่พัฒนาขึ้นสำหรับวิเคราะห์และเปรียบเทียบปริมาณแคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซินในตัวอย่างผลิตภัณฑ์พริกและอาหารรสเผ็ดต่างๆ

สำหรับงานวิจัยปีที่ 2 ในรายงานนี้ ตามวัตถุประสงค์ที่ 3) ส่วนวัตถุประสงค์ที่ 1) และ 2) ได้ทำสำเร็จแล้วในปีที่ 1

#### 1.5 ขอบเขตของโครงการวิจัย

งานวิจัยนี้แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน ขั้นตอนแรก (ปีที่ 1 ที่ผ่านมา) เป็นการพัฒนาเทคนิค CE สำหรับการแยกและวิเคราะห์แคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซิน โดยใช้ CE แบบ MEKC และ microemulsion electrokinetic chromatography (MEEKC) โดยเป็นการหาภาวะของ MEKC และ MEEKC ในการแยกและวิเคราะห์สารมาตรฐานและส่วนสกัดพริก การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการ (validation of method) การเปรียบเทียบปริมาณวิเคราะห์ของ MEKC, MEEKC และ HPLC

ขั้นตอนที่ 2 (ปีที่ 2 ในรายงานนี้) เป็นการศึกษาและหาวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมตัวอย่างสำหรับปริมาณวิเคราะห์แคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซิน โดยประกอบด้วยการสกัด



ด้วยตัวทำละลาย (organic extraction) และ SPE โดยเป็นการหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด และการชะใน SPE ตัวอย่างที่ใช้ได้แก่ พริก ผลึกกัมม์พริก (เครื่องแกงและเครื่องปรุงต่างๆ) อาหารเสริม อาหารรสเผ็ด (แกงผัดพริกและต้มยำ เป็นต้น) เปรียบเทียบการวิเคราะห์ตัวอย่างแบบที่ผ่านและไม่ผ่าน SPE

ขั้นตอนที่ 3 (ปีที่ 3 ปีงบประมาณปีถัดไป) ดำรง วิเคราะห์และเปรียบเทียบปริมาณแคปไซซินและโคไฮโครแคปไซซินในตัวอย่างของผลิตภัณฑ์พริกและอาหารรสเผ็ด และจัดกลุ่มของอาหารโดยใช้หลักเกณฑ์ของ European Commission

#### 1.6 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

ได้วิธีการของกะพิลลารีอิเล็กโทรโฟริซิสสำหรับปริมาณวิเคราะห์ของแคปไซซินและโคไฮโครแคปไซซินในซอสพริก เพื่อที่จะนำข้อมูลที่ได้นำไปใช้ในการอ้างอิงปริมาณของสารทั้งสองในซอสพริกชนิดต่างๆ และการนำไปใช้เป็นวิธีการตรวจสอบคุณภาพของผลิตภัณฑ์ได้

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

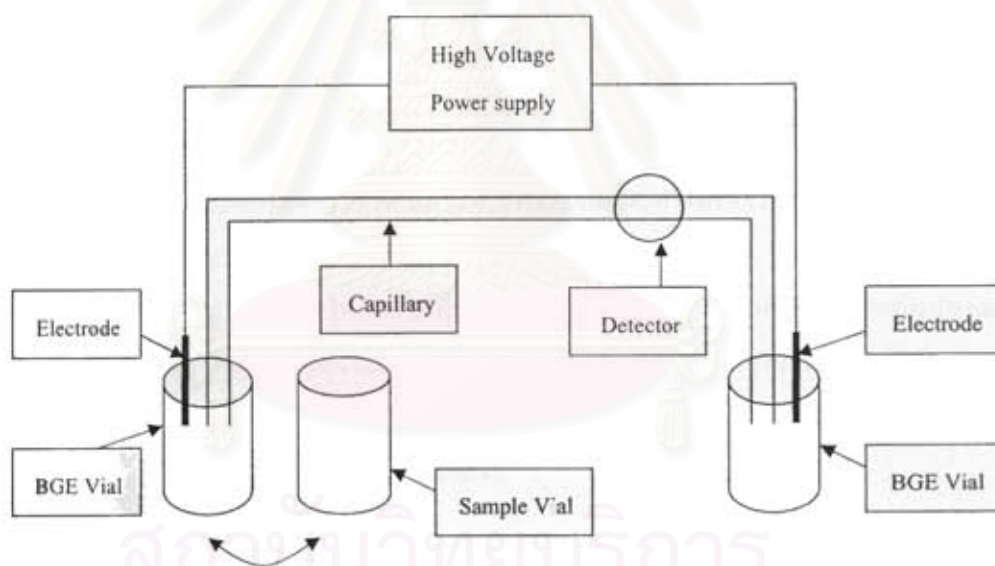
## บทที่ 2

### ทฤษฎี

#### 2.1 กระพืดลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Capillary Electrophoresis, CE)

กระพืดลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส (capillary electrophoresis, CE) เป็นเทคนิคที่มีการแยกสารภายใต้อิทธิพลของสนามไฟฟ้าในหลอดกระพืดลารีที่บรรจุสารละลายอิเล็กโทรไลต์ หลักการแยกสารอาศัยความแตกต่างของความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้า (electrophoretic mobility,  $\mu$ ) ซึ่งขึ้นอยู่กับความแตกต่างของอัตราส่วนของค่าประจุต่อขนาดของไอออน

#### 2.2 ส่วนประกอบของเครื่อง CE



รูปที่ 2.1 ส่วนประกอบอย่างง่ายของเครื่อง CE: ดัดแปลงจาก [Weinberger: 2000]

##### 1) กระพืดลารี (capillary)

กระพืดลารีที่ใช้ทั่วไปในปัจจุบันเป็น fused silica capillary ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 10 ถึง 200  $\mu\text{m}$  (ที่นิยมใช้ทั่วไป 50 และ 75  $\mu\text{m}$ ) และยาวประมาณ 20 ถึง 100 cm (นิยมใช้ 30 ถึง 60 cm) ภายนอกของกระพืดลารีเคลือบด้วยพอลิเอไมด์เพื่อป้องกันการแตกหักของกระพืดลารี และลอก

พอลิเอไมด์ออกเฉพาะตรงบริเวณตรวจวัดในกรณีที่ใช้เครื่องตรวจวัดประเภทแสง เช่น ยูวี-วิสิเบิล (UV-Visible) หรือ ฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence)

### 2) เครื่องกำเนิดศักย์ไฟฟ้า (voltage supply)

เครื่องกำเนิดศักย์ไฟฟ้ากระแสตรงที่ให้ความต่างศักย์ -30 ถึง +30 kV ในการแยกสารส่วนใหญ่นิยมใช้ความต่างศักย์คงที่ อาจให้ศักย์ไฟฟ้าเป็นบวก โดยด้านเครื่องตรวจวัดหรือด้านปลาย (outlet) เป็นขั้วลบ (แคโทด) และด้านที่ฉีดสาร (inlet) เป็นขั้วบวก (แอโนด) ลักษณะนี้เรียกว่า การใช้ศักย์ไฟฟ้าแบบปกติ (normal polarity of applied voltage) หรือการใช้ศักย์ไฟฟ้าแบบกลับขั้ว (reverse polarity of applied voltage) โดยให้ด้านปลายเป็นขั้วบวก (ศักย์ไฟฟ้าเป็นลบ)

### 3) ขั้วไฟฟ้า (electrode)

ขั้วไฟฟ้าที่ใช้ส่วนใหญ่เป็นโลหะแพลทินัม

### 4) สารละลายอิเล็กโทรไลต์ (background electrolyte, BGE)

ส่วนใหญ่เป็นบัฟเฟอร์ เช่น ฟอสเฟต อะซิเตด หรือ บอเรด เป็นต้น ซึ่ง BGE อาจประกอบด้วยสารเติมแต่ง เช่น ตัวทำละลายอินทรีย์ เป็นต้น โดย BGE จะบรรจุอยู่ใน vial ที่มีปลายทั้งสองข้างของคะพิลลารีจุ่มอยู่

### 5) เครื่องตรวจวัด (detector)

ในงานวิจัยนี้ใช้เครื่องตรวจวัดเป็น UV-Visible และทำการตรวจวัดสารบนคอลัมน์

### 6) ระบบการบรรจุสารตัวอย่าง (sample injection)

ระบบการบรรจุสารอาจให้ศักย์ไฟฟ้า (electrokinetic injection) หรือให้ความดัน (pressure injection) ซึ่งในงานวิจัยนี้จะใช้ความดันในการบรรจุสาร ทำได้โดยอัดความดัน (ใช้แก๊สไนโตรเจน หรือเครื่องอัดความดันอัตโนมัติ) เข้าไปในภาชนะที่บรรจุสารตัวอย่างเป็นระยะเวลาหนึ่ง (injection time,  $t_{inj}$ ) เพื่อบรรจุสารละลายเข้าไปในคะพิลลารี

## 2.3 ความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้า (electrophoretic mobility, $\mu$ )

ความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้า (electrophoretic mobility หรือ mobility,  $\mu$ ) มีหน่วยสากลเป็น  $m^2V^{-1}s^{-1}$  นิยามเป็นความเร็วในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสาร (electrophoretic velocity,  $v_{ep}$ ) ภายใต้อิทธิพลของความเข้มของสนามไฟฟ้า (electric field strength,  $E$ )  $1 V m^{-1}$  และมีความสัมพันธ์กับตัวแปรต่างๆ ดังสมการที่ 2.1 [Kuh: 1993]

$$\mu = \frac{v_{ep}}{E} = \frac{ze}{6\pi\eta r_h} \quad (2.1)$$

$z$  คือ ค่าประจุของสาร

$e$  คือ ค่าประจุของอิเล็กตรอน ( $1.6 \times 10^{-19}$  คูโลมบ์)

$\eta$  คือ ความหนืดของสารละลาย

$r_h$  คือ รัศมีไฮโดรไดนามิกของไอออน (hydrodynamic radius of ion) ซึ่งเป็นรัศมีของไอออนที่มีโมเลกุลของน้ำล้อมรอบขณะที่ไอออนเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้า

ที่อุณหภูมิ 25 °C และสารละลายอิเล็กโทรไลต์เจือจางมากๆ หรือที่ความแรงไอออนิก (ionic strength,  $I$ , หน่วย  $\text{mol kg}^{-1}$  หรือ  $\text{mol l}^{-1}$ ) ของสารละลายอิเล็กโทรไลต์มีค่าใกล้ศูนย์ เรียกความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้านี้ว่า ความสามารถในการเคลื่อนที่สัมบูรณ์ (absolute electrophoretic mobility,  $\mu^\circ$ ) ซึ่งเป็นค่าเฉพาะของสารหนึ่งๆ

ปัจจัยที่มีผลต่อค่า  $\mu$  ได้แก่ [Kenndler: 1998]

1) ผลของความแรงไอออนิก (ionic strength) โดยเมื่อเพิ่มความแรงไอออนิกของ BGE ทำให้แคตไอออนมาล้อมรอบไอออนของสารตัวอย่างมากขึ้น ทำให้ effective charge ( $z$ ) ลดลง และมี  $r_h$  เพิ่มขึ้น (โดย  $r_h$  จะเป็นผลรวมของไอออนของสารตัวอย่างและแคตไอออน (counter ion) ดังนั้นค่า  $\mu$  จึงลดลง

2) ผลของความหนืดและอุณหภูมิ จากสมการที่ 2.1 ค่า  $\mu$  จะแปรผกผันกับความหนืด ดังนั้นเมื่อเพิ่มความหนืดของ BGE จะทำให้ค่า  $\mu$  ของสารลดลง ส่วนการเพิ่มอุณหภูมิจะทำให้ความหนืดของ BGE ลดลง ดังนั้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นค่า  $\mu$  จะเพิ่มขึ้น

3) ผลของ pH ของ BGE สำหรับสารตัวอย่างที่เป็นกรดอ่อนหรือเบสอ่อน ค่า pH ของ BGE จะมีผลต่อดีกรีการแตกตัวของสาร (the degree of dissociation,  $\alpha$ ) โดยค่า  $\mu$  จะแปรผันตามค่า  $\alpha$

4) ผลของตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) โดยทั่วไปเมื่อเติมตัวทำละลายอินทรีย์เพิ่มขึ้นจะทำให้ค่า  $\mu$  ลดลง แล้วเมื่อเติมตัวทำละลายอินทรีย์เพิ่มจนถึงปริมาณหนึ่งค่า  $\mu$  จะเพิ่มขึ้นได้

5) ผลของความต่างศักย์และขนาดกะพิลลารี จากสมการที่ 2.1 จะเห็นว่าค่า  $\mu$  ของสารไม่ขึ้นกับขนาดของกะพิลลารี ( $d$ ) และความต่างศักย์ไฟฟ้า ( $E$ ) แต่ในทางปฏิบัติ การเพิ่ม  $d$  และ  $E$  อาจทำให้ค่า  $\mu$  เพิ่มขึ้นได้ เนื่องจากผลของการเพิ่ม Joule heating



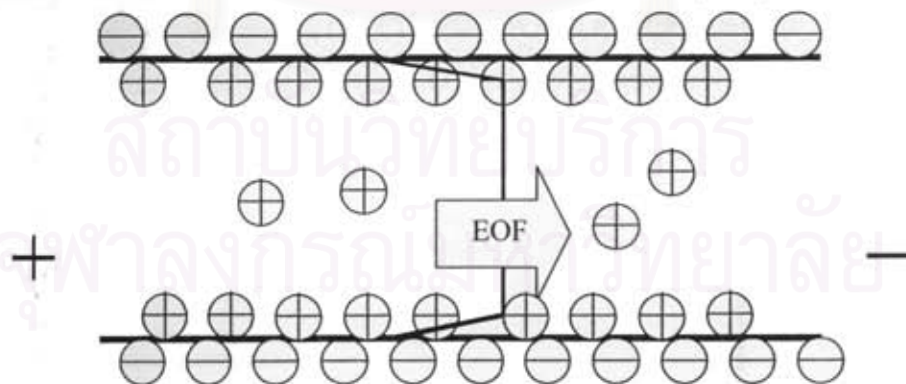
## 2.4 อิเล็กโทรออสโมซิส (electroosmosis)

### 2.4.1 การเกิดอิเล็กโทรออสโมซิส

ที่ผิวด้านในของคะพิลลารีประกอบด้วยหมู่ซิลานอล (-Si-OH) เมื่อสัมผัสกับสารละลายอิเล็กโทรไลต์หรือบัฟเฟอร์ที่มี  $\text{pH} > 2$  จะเกิดการไอออไนซ์ขึ้น ทำให้ผิวด้านในของคะพิลลารีมีประจุลบ (-Si-O<sup>-</sup>) ดังสมการ



การไอออไนซ์ดังกล่าวทำให้เกิด H<sup>+</sup> กระจายอยู่ในสารละลายหรือรวมกับ OH<sup>-</sup> เกิดเป็นโมเลกุลของน้ำ แคตไอออนจากสารละลายอิเล็กโทรไลต์ในคะพิลลารีจะเกิดเป็น double electric layer ขึ้นดังรูปที่ 2.2 โดยมีปริมาณแคตไอออนในสารละลายมากกว่าแอนไอออนจำนวนมาก แคตไอออนบางส่วนจะติดอยู่ที่ผิวของคะพิลลารี เกิดเป็น stern layer ซึ่งจะไม่เคลื่อนที่เนื่องจากอิทธิพลของไฟฟ้าสถิต (electrostatic force) และ/หรือ แรงแวนเดอร์วาลส์ (Van der Waals force) แคตไอออนบางส่วนจะกระจายอยู่ในสารละลาย เรียกว่า diffusion layer และไอออนบวกที่เหลือจะอยู่ใน bulk solution เมื่อให้ศักย์ไฟฟ้าที่ปลายทั้งสองข้างของคะพิลลารี (โดยปลายด้านเครื่องตรวจวัดเป็นขั้วแคโทดหรือขั้วลบ) ไอออนบวกในสารละลาย ซึ่งมีจำนวนมากกว่าไอออนลบจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วลบ และพาเอาโมเลกุลของน้ำหรือตัวทำละลายที่ล้อมรอบไอออนบวกเคลื่อนที่ไปด้วย เรียกปรากฏการณ์ของการเคลื่อนที่ของน้ำหรือสารละลายนี้ว่า อิเล็กโทรออสโมซิส (electroosmosis) และเรียกการเคลื่อนที่ของน้ำหรือตัวทำละลายว่า electroosmotic flow (EOF)



รูปที่ 2.2 Electroosmotic flow (EOF) : ดัดแปลงจาก [Landers: 1997]



ความเร็วของอิเล็กโทรออสโมซิสในความเข้มสนามไฟฟ้า  $1 \text{ V m}^{-1}$  เรียกว่า ความสามารถในการเคลื่อนที่ของอิเล็กโทรออสโมซิสหรือสัมประสิทธิ์ของอิเล็กโทรออสโมซิส (electroosmotic mobility หรือ electroosmotic coefficient,  $\mu_{eo}$ ) แสดงดังสมการที่ 2.2

$$\mu_{eo} = \frac{v_{eo}}{E} = \frac{-\epsilon \zeta}{4\pi\eta} \quad (2.2)$$

#### 2.4.2 ลักษณะการเคลื่อนที่ (flow profile) ใน CE

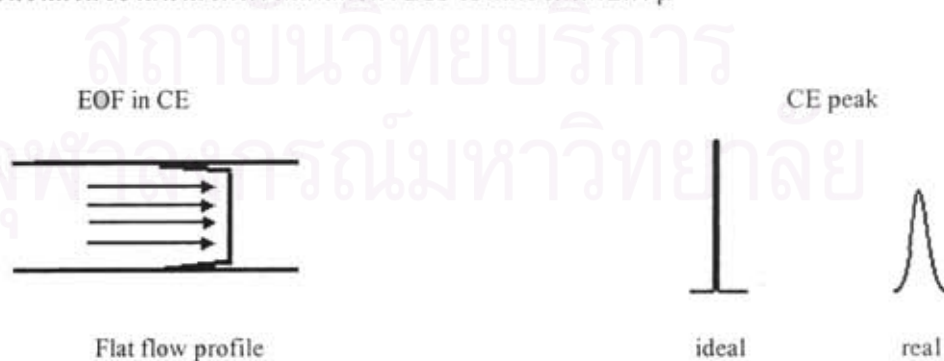
EOF เริ่มเกิดที่ผิวของคะพิลลารีและเพิ่มขึ้นมีค่าสูงสุดที่ระยะห่างจากผิวคะพิลลารีประมาณ 15 nm [Landers: 1997] โดยคะพิลลารีที่ใช้ทั่วไปใน CE มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 ถึง 100  $\mu\text{m}$  (50,000 ถึง 100,000 nm) ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่า EOF เท่ากันตลอดพื้นที่หน้าตัดของคะพิลลารี การไหลของสารใน CE จึงเป็นแบบแบน (flat flow profile) ดังรูปที่ 2.3 ด้วยเหตุนี้พีกของสารใน CE จึงแคบกว่าใน HPLC

ปัจจัยที่มีผลต่อค่า EOF ได้แก่

1) ชนิดของคะพิลลารี และค่า pH ของ BGE ที่ค่า pH เท่ากัน คะพิลลารีแต่ละชนิดให้ค่า  $\mu_{eo}$  ต่างกันเนื่องจากความหนาแน่นของประจุลบที่ผิวคะพิลลารีต่างกัน และ  $\mu_{eo}$  เพิ่มขึ้นตามค่า pH เนื่องจากผิวคะพิลลารีมีประจุลบมากขึ้น ดังนั้นที่ค่า pH ของ BGE ต่ำๆ จะทำให้การไอออนิซ์ของหมู่ซิลานอลบริเวณผิวคะพิลลารีลดลง มีผลทำให้ค่า EOF ลดลง

2) ความแรงไอออนิกของ BGE ถ้าเพิ่มความแรงไอออนิกจะทำให้ค่า EOF ลดลง แต่อย่างไรก็ตามถ้าเพิ่มความแรงไอออนิกของ BGE มากไป อาจทำให้ค่า EOF เพิ่มขึ้นได้ เนื่องจากผลของ Joule heating

นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นๆ เช่น ความหนืด อุณหภูมิ ตัวทำละลายอินทรีย์ ขนาดของคะพิลลารีและความเข้มของสนามไฟฟ้า ก็มีผลต่อค่า EOF เช่นเดียวกับค่า  $\mu$



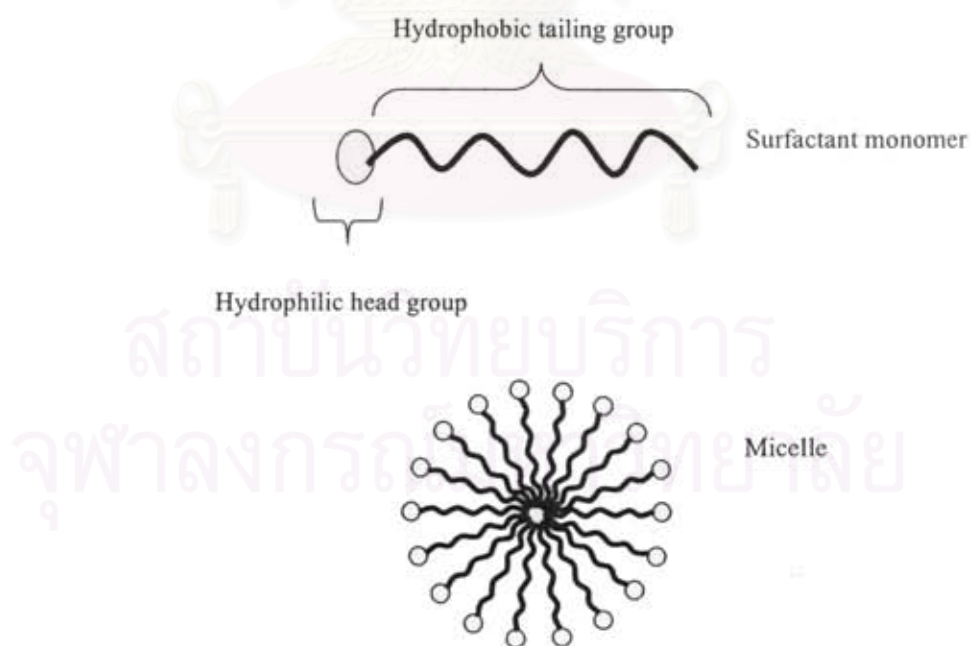
รูปที่ 2.3 ลักษณะการไหลของสารและรูปร่างของพีกใน CE : ดัดแปลงจาก [Li: 1992]

## 2.5 ประเภทของเทคนิค CE

เทคนิค CE แบ่งออกได้เป็น 6 ประเภท ตามกลไกของการแยกสาร

- 1) Capillary Zone Electrophoresis (CZE)
- 2) Micellar Electrokinetic Chromatography (MEKC) และ Microemulsion Electrokinetic Chromatography (MEEKC)
- 3) Capillary Electrochromatography (CEC)
- 4) Capillary Gel Electrophoresis (CGE)
- 5) Capillary Isoelectric Focusing (CIEF)
- 6) Capillary Isotachopheresis (CITP)

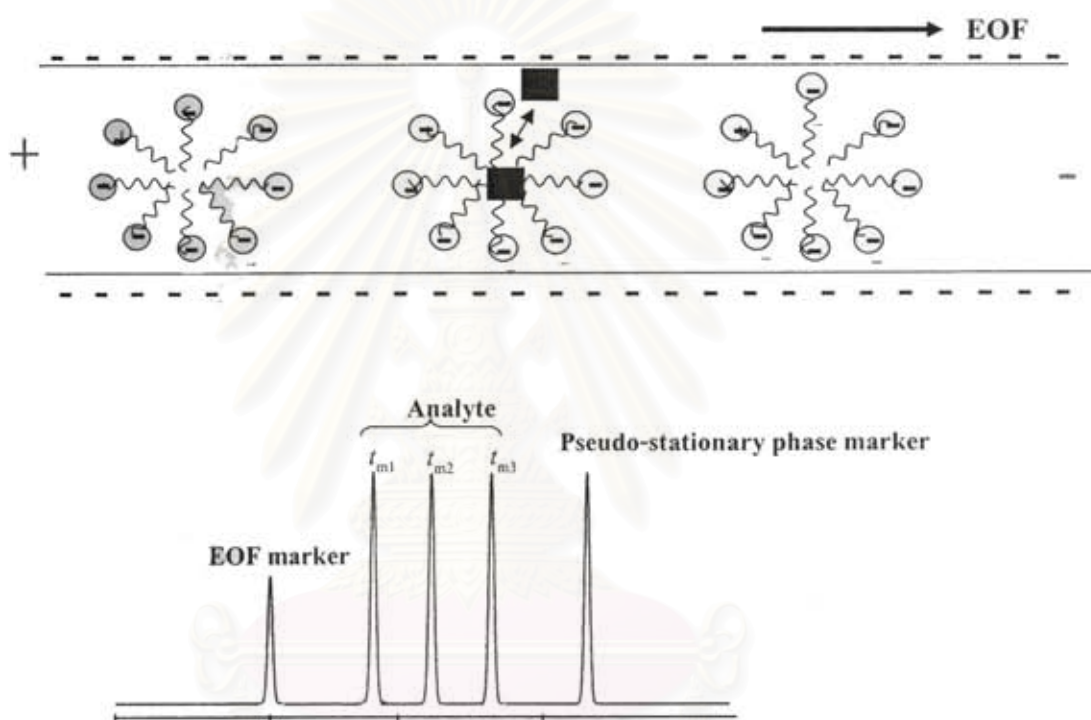
งานวิจัยนี้จะเกี่ยวข้องกับเทคนิค CE แบบ คือ MEKC โดยเทคนิค MEKC จะมีการเติมสารลดแรงตึงผิว (surfactant) ลงไปใน BGE ให้มีความเข้มข้นสูงกว่า critical micellar concentration (CMC) ของสารลดแรงตึงผิวชนิดนั้นๆ โมเลกุลเดี่ยวๆ ของสารลดแรงตึงผิวจะรวมตัวกันเป็นไมเซลล์ (micelle) ดังรูปที่ 2.4 และทำหน้าที่เป็น pseudo-stationary phase ซึ่งคล้ายกับ stationary phase ใน HPLC แต่ไมเซลล์เคลื่อนที่ได้



รูปที่ 2.4 สารลดแรงตึงผิวและไมเซลล์: คัดแปลงจาก [Patrick: 1993]

## 2.6 การเคลื่อนที่ของสารในเทคนิค MEKC ในภาวะที่มี EOF มาก

สำหรับกรณีแยกสารที่ไม่มีประจุและใช้สารลดแรงตึงผิวประเภทแอนไอออนภายใต้ภาวะที่มี EOF มาก จึงมีทิศทางไปทางขั้วแคโทด (ขั้วลบ) ใน MEKC ดังรูปที่ 2.5 ตามลำดับ pseudo-stationary phase จึงมีค่า  $\mu$  เป็นลบ แต่อย่างไรก็ตาม pseudo-stationary phase สามารถเคลื่อนที่ไปยังขั้วแคโทดได้เนื่องจาก  $\mu_{eo}$  มากกว่า  $\mu_{ps}$  ลำดับการเคลื่อนที่จากก่อนไปหลัง คือ EOF marker, สารตัวอย่าง และ pseudo-stationary phase marker



รูปที่ 2.5 ลักษณะการเคลื่อนที่ของสารในเทคนิค MEKC โดยใช้บัฟเฟอร์ภาวะที่เป็นเบส : ดัดแปลงจาก [Khaledi: 1998, p. 78]

## 2.7 คุณภาพและปริมาณวิเคราะห์ด้วยเทคนิค CE (Qualitative and Quantitative Analysis in CE)

คุณภาพวิเคราะห์ใน CE สามารถทำได้โดยเปรียบเทียบจากค่าไมเกรชันไทม์ ( $t_m$ ) และค่าความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสาร (electrophoretic mobility,  $\mu$ ) ซึ่งสารชนิดเดียวกันจะให้ค่าเท่ากัน นอกจากนี้ยังสามารถทำได้โดยใช้ spiking techniques ซึ่งใช้เมื่อสงสัยว่าพีกไหนเป็นพีกของสารที่ต้องการวิเคราะห์ โดยทำการเติมสารที่ต้องการวิเคราะห์ลงไป ถ้าพีกใดมีพื้นที่ได้พีกเพิ่มขึ้นแสดงว่าพีกนั้นเป็นพีกของสารที่ต้องการวิเคราะห์ และสำหรับในกรณีที่ใช้ photodiode array detector สามารถเปรียบเทียบยูวีสเปกตรัมได้

ปริมาณของสารที่เคลื่อนที่ผ่านเครื่องตรวจวัด ( $Q$ ) มีความสัมพันธ์กับตัวแปรต่างๆ ดังสมการที่ 2.19

$$Q(\text{mole}) = \frac{\text{Peak area} \times V_F (\text{m}^3 \text{s}^{-1})}{\text{Response factor} (\text{AU mol}^{-1} \text{m}^{-3})} \quad (2.19)$$

$V_F$  คือ volume flow ของสารตัวอย่างที่เคลื่อนที่ผ่านเครื่องตรวจวัด

สำหรับใน HPLC ปริมาณสารที่เคลื่อนที่ผ่านเครื่องตรวจวัด ( $Q$ ) จะขึ้นกับ peak area เนื่องจากความเร็วของสารตัวอย่างที่ผ่านเครื่องตรวจวัดมีค่าคงที่

สำหรับใน CE ปริมาณสารที่เคลื่อนที่ผ่านเครื่องตรวจวัด ( $Q$ ) จะไม่ขึ้นกับ peak area เนื่องจากความเร็วของสารตัวอย่างที่ผ่านเครื่องตรวจวัด ( $V_F$ ) ขึ้นกับหลายปัจจัยไม่ว่าจะเป็นผลรวมของ electrophoretic velocity ( $v_{ep}$ ) กับ electroosmotic velocity ( $v_{eo}$ ) ซึ่งเป็นไปดังสมการที่ 2.20 ดังนั้นค่า  $Q$  จึงขึ้นกับพื้นที่ใต้พีคส่วนไมเกรชันโทม์ นิยามเป็น corrected peak area ดังสมการที่ 2.21 ดังนั้นใน CE ใช้พื้นที่ใต้พีคส่วนไมเกรชันโทม์ (หรือ corrected peak area) ในการทำปริมาณวิเคราะห์

$$V_F = \frac{\pi r^2 l}{t_m} \quad (2.20)$$

ตัวแปรต่างๆ นิยามดังที่กล่าวมาแล้ว

$$\text{ดังนั้น} \quad Q \propto \frac{\text{Peak area (AUs)}}{t_m (\text{s})} \quad (2.21)$$

แม้จะมีงานวิจัยกล่าวว่าปริมาณของสารที่บรรจุด้วยการอัดความดันในเทคนิค CE มีความเที่ยงสูง [Mayer: 2001] แต่อย่างไรก็ตามความไม่เที่ยงของปริมาณที่บรรจุขึ้นกับความเที่ยงของความดัน เวลา และความหนืดของบัฟเฟอร์ในกะพิลลารีที่เกิดขึ้นจากการเปลี่ยนอุณหภูมิของกะพิลลารีในส่วนที่ไม่ได้ควบคุมอุณหภูมิ สำหรับงานวิจัยโดยทั่วไปของการทำปริมาณวิเคราะห์ (quantitative analysis) ที่ใช้คำนวณหรือหาปริมาณสาร คือ การทำกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ซึ่งใช้วิธีต่างๆ กัน ดังนี้



### 1) External Standard

เป็นการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง corrected peak area (แกน y) กับความเข้มข้นต่างๆ (แกน x) จะได้กราฟเส้นตรง ( $y = mx + c$ ) สำหรับการหาปริมาณสารตัวอย่าง ทำโดย corrected peak area ของพีคหรือพื้นที่ใต้พีคที่วิเคราะห์ได้ มาคำนวณหาความเข้มข้นจากสมการเส้นตรง

### 2) Internal Standard

สารที่เป็น internal standard จะเป็นสารมาตรฐานอีกชนิดหนึ่งที่ไม่ใช่สารตัวที่ต้องการวิเคราะห์และเติมลงไปในสารตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐานในปริมาณที่เท่ากัน การทำกราฟมาตรฐานทำได้โดยสร้างกราฟความสัมพันธ์โดยที่แกน y เป็นสัดส่วนของ corrected peak area ของสารตัวอย่างคือ corrected peak area ของ internal standard และแกน x เป็นความเข้มข้นของสารตัวอย่าง ดังนั้นในการหิตสารแต่ละครั้ง ถ้าสารมีความเข้มข้นเท่ากัน อัตราส่วนของปริมาณสารต่อ internal standard จะคงที่

## 2.8 การสกัดด้วยตัวทำละลาย (solvent extraction หรือ liquid-phase extraction)

การสกัดด้วยตัวทำละลาย หมายถึง การแยกกลุ่มของสารที่สนใจออกเมทริกซ์ของตัวอย่าง โดยทำให้กลุ่มของสารที่สนใจดังกล่าวถ่ายเทจากเฟสสารตัวอย่าง (sample phase) ซึ่งอาจเป็นของแข็งหรือของเหลว เป็นต้น ไปสู่เฟสใหม่ที่เป็นของเหลว (โดยทั่วไปหมายถึง ตัวทำละลายอินทรีย์) หรืออาจเรียกว่า การสกัดด้วยเฟสของเหลว (liquid-phase extraction) เทคนิคการสกัดด้วยตัวทำละลายจึงเป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้ในขั้นตอนการเตรียมสารตัวอย่างก่อนที่วิเคราะห์สารด้วยเครื่องมือต่างๆ เพื่อกำจัดเมทริกซ์ที่อาจรบกวนการวิเคราะห์หรือเพิ่มความเข้มข้นของสารที่สนใจ กรณีที่เฟสตัวอย่างเป็นของแข็ง เรียกว่า liquid-solid extraction หรือถ้าเฟสตัวอย่างเป็นของเหลวที่ไม่ละลายรวมเป็นเนื้อเดียวกับเฟสใหม่ที่เป็นของเหลว เรียกว่า liquid-liquid extraction เนื่องจากข้อสพรกมีลักษณะเป็นของเหลวชั้น หลักการของการสกัดด้วยตัวทำละลายอาจสามารถอธิบายได้เช่นเดียวกับ liquid-liquid extraction โดยทั่วไปเฟสตัวอย่างจะเป็นน้ำและอีกเฟสหนึ่งเป็นเฟสตัวทำละลายอินทรีย์

สมดุลของการกระจายตัวของสารในเฟสตัวอย่าง เช่น ของเหลว กับเฟสตัวทำละลายอินทรีย์ ดังสมการ



A คือ สารที่ต้องการสกัด (analyte)

s คือ เฟสของสารตัวอย่าง (sample phase)

org คือ เฟสของตัวทำละลายอินทรีย์ (organic phase)

การสกัดด้วยตัวทำละลายเป็นเทคนิคหนึ่งที่ใช้ในการแยกสารประกอบที่สนใจออกจากของผสม โดยอาศัยหลักการของการกระจายของตัวถูกละลาย (solute) หรือสารที่สนใจระหว่างเฟสตัวทำละลาย 2 ชนิดที่ไม่ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปริมาณของตัวถูกละลายที่ละลายได้ในแต่ละเฟสขึ้นอยู่กับชนิดของตัวถูกละลายและตัวทำละลาย อัตราส่วนความเข้มข้นของตัวถูกละลาย อัตราส่วนความเข้มข้นของตัวถูกละลายในตัวทำละลายที่ 1 ต่อความเข้มข้นของตัวถูกละลายในตัวทำละลายที่ 2 ที่สมดุล คือค่าคงที่ของสมดุลของการกระจาย (distribution constant) หรือ สัมประสิทธิ์ของการกระจาย (distribution coefficient,  $K_d$ ) หรือสัมประสิทธิ์ของการแบ่งส่วน (partition coefficient,  $P$ ) ซึ่งเป็นค่าคงที่เฉพาะตัวถูกละลายชนิดหนึ่งๆ สำหรับตัวทำละลายคู่หนึ่งๆ ที่อุณหภูมิหนึ่งๆ ดังสมการ [Morrison and Freiser: 1962]

$$K_d = \frac{C_{org}}{C_s} \quad (2.22)$$

$C_{org}$  คือ ความเข้มข้นของสารในเฟสตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent)

$C_s$  คือ ความเข้มข้นของสารในเฟสตัวอย่าง (sample)

จากสมการ ถ้า  $K_d$  มีค่ามาก แสดงว่าสารมีความสามารถในการละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ได้มาก ในทางกลับกัน ถ้า  $K_d$  มีค่าน้อย แสดงว่าสารมีความสามารถในการละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ได้น้อย ดังนั้น  $K_d$  ขึ้นอยู่กับชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ที่จะนำมาเป็นตัวสกัด ตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมจะต้องให้ค่า  $K_d$  มากๆ โดยประสิทธิภาพของการสกัด (extraction efficiency,  $E$ ) หรือ Recovery ( $R$ ) หาได้จากสมการ

$$E = \frac{W_{org}}{W_0} \quad (2.23)$$

$W_{org}$  คือ ปริมาณสารในเฟสตัวทำละลายอินทรีย์

$W_0$  คือ ปริมาณสารเริ่มต้น

ประสิทธิภาพของการสกัดสามารถคำนวณจากปริมาณของสารในตัวทำละลายอินทรีย์ต่อปริมาณสารเริ่มต้น ถ้าตัวทำละลายอินทรีย์สามารถสกัดสารออกมาได้มาก ประสิทธิภาพของการสกัดก็จะมีค่ามาก ดังนั้นค่าประสิทธิภาพการสกัดนี้ จะบ่งบอกถึงความสามารถของตัวทำละลายอินทรีย์ในการสกัดสาร

$$E = \frac{C_{\text{org}} V_{\text{org}}}{(C_{\text{org}} V_{\text{org}} + C_s V_s)} \quad (2.24)$$

$V_{\text{org}}$  คือ ปริมาตรของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในการสกัด

$V_s$  คือ ปริมาตรของตัวอย่างที่นำมาสกัด

$$E = \frac{K_d \beta}{(1 + K_d \beta)} \quad (2.25)$$

$\beta$  คือ Phase ratio ซึ่งเป็นอัตราส่วนของปริมาตรของเฟสตัวทำละลายอินทรีย์ต่อเฟสตัวอย่าง ( $V_{\text{org}}/V_s$ )

### 2.9 Salting-Out Effect

Salting-out effect เป็นผลที่เกิดขึ้นจากการเติมเกลือลงไปในเฟสตัวอย่างเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่เฟสตัวอย่างเป็นน้ำหรือมีน้ำเป็นองค์ประกอบ และเฟสที่ใช้สกัดเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ โดยที่เกลือจะไปเพิ่มความแรงไอออน (ionic strength) ในเฟสตัวอย่าง ทำให้ความสามารถในการละลายของสารในเฟสตัวอย่างลดลง แต่เพิ่มความสามารถในการละลายของสารในเฟสตัวทำละลายอินทรีย์ หรือ ค่า  $K_d$  เพิ่มขึ้น นั่นเอง ดังนั้นจึงทำให้เพิ่มประสิทธิภาพในการสกัด ดังสมการที่ 2.22 ถึง 2.25

เกลือที่นิยมใช้กัน เช่น โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) แมกนีเซียมซัลเฟต (anhydrous  $\text{MgSO}_4$ ) [Morrison and Freiser: 1962, Anastassiades *et. al.*: 2003, Majors: 2008] ในกรณีใช้เกลือที่ผ่านการกำจัดความชื้น (อาจใช้ในรูปแบบ anhydrous หรืออบแห้ง) ในปริมาณที่พอควรจะทำให้เกิดการอิมิดจ์ของเกลือในเฟสตัวอย่างที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ จะช่วยทำให้การแยกชั้นระหว่างน้ำกับตัวทำละลายอินทรีย์ได้ดีและเร็วขึ้น ทำให้ประสิทธิภาพในการสกัดดีขึ้น

### บทที่ 3

#### การทดลอง

##### 3.1 เครื่องมือ

- 1) เครื่องกะฟิลลาริโอเล็กโทรฟอริซีส ของบริษัท Beckman รุ่น P/ACE™ MDQ
- 2) เครื่องวัดพีเอช (pH meter) ของ Metrohm รุ่น 744
- 3) เครื่อง sonication ของ ultrasonic steri-cleaner
- 4) เครื่องผลิตน้ำ Milli Q
- 5) เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)
- 6) เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ของ Mettler AT 200
- 7) เครื่อง vortex mixer

##### 3.2 สารเคมีและอุปกรณ์

- 1) capsaicinoid (capsaicin 65% และ dihydrocapsaicin 35%) ของบริษัท Aldrich
- 2) Ethyl acetate (EtOAc) HPLC grade ของบริษัท Fisher Scientific
- 3) Acetonitrile (ACN) HPLC grade ของบริษัท Merck
- 4) Sodium dodecyl sulfate (SDS) ของบริษัท Sigma
- 5) sodium tetraborate ของบริษัท Merck
- 6) sodium hydroxide (NaOH) ของบริษัท Fluka
- 7) Magnesium sulphate ( $MgSO_4$ ) anhydrous ของบริษัท Panreac
- 8) methanol ของบริษัท Merck
- 9) Sodium Chloride (NaCl) ของบริษัท Carlo Erba
- 10) hydrochloric acid ของบริษัท Merck
- 11) Bisphenol A ของบริษัท Merck
- 12) 0.45  $\mu m$  membrane filter
- 13) น้ำ Milli Q
- 14) ตัวอย่างซอสพริก ที่มีในท้องตลาด 8 ตัวอย่าง



### 3.3 การเตรียมสารละลายมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์

3.3.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานแคปไซซิน (CAP) และไดไฮโดรแคปไซซิน (DCAP) ความเข้มข้นรวม 2500 ppm โดยชั่งแคปไซซินยอด้น้ำหนักที่แน่นอนและละลายด้วยอะซิโตนไทรล์ จะได้สารละลายมาตรฐานที่ประกอบด้วย 1625 ppm CAP และ 875 ppm DCAP

3.3.2 เตรียมสารละลายมาตรฐานของ Bisphenol A (เป็น internal standard) ความเข้มข้น 1000 ppm โดยชั่ง Bisphenol A น้ำหนักแน่นอน และละลายด้วยอะซิโตนไทรล์

3.3.3 เตรียมสารละลายมาตรฐานของ Bisphenol A (ISTD) ความเข้มข้น 100 ppm โดยปีเปิดจากสารละลายมาตรฐาน Bisphenol A ความเข้มข้น 1000 ppm แล้วปรับปริมาตรด้วย 30 % อะซิโตนไทรล์

### 3.4 การเตรียมสารละลายสำหรับบัฟเฟอร์

3.4.1 เตรียมสารละลาย 500 mM sodium dodecyl sulfate (SDS) โดยชั่ง SDS น้ำหนักที่แน่นอนละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำ Milli Q

3.4.2 เตรียมสารละลาย 100 mM  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  (บอเรตบัฟเฟอร์) ที่ pH ประมาณ 9.2 โดยชั่ง  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$  น้ำหนักที่แน่นอน ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำ Milli Q จะได้บอเรตบัฟเฟอร์ที่ pH ประมาณ 9.2 โดยไม่ต้องปรับ pH ใดๆ

### 3.5 การเตรียมสารละลายสำหรับเจือจางตัวอย่าง

3.5.1 เตรียมสารละลาย 120 mM SDS โดยชั่ง SDS น้ำหนักที่แน่นอนละลายปรับปริมาตรด้วยน้ำ Milli Q

### 3.6 ภาวะของ CE สำหรับการทดลอง

ภาวะของ CE เริ่มต้นที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณแคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซิน คือ

เครื่อง CE: Beckman รุ่น MDQ

คะพิลลารี: uncoated fused silica capillary 50  $\mu\text{m}$  i.d.  $\times$  40.2 cm (30 cm ถึงเครื่องตรวจวัด)

การบรรจุสาร: อัดความดัน 0.5 psi เป็นเวลา 5 วินาที

การตรวจวัด: photodiode array ช่วง 200-400 nm และตรวจวัดที่ 214 nm

Capillary rinse: ก่อนการทดลองแต่ละวัน rinse ด้วย 0.1 M NaOH 20 นาที และ BGE 20 นาที และ

ทำการ rinse ด้วยน้ำ Milli Q 2 นาที 0.1 M NaOH 3 นาที และ BGE 3 นาที ก่อน

การวิเคราะห์แต่ละครั้ง และหลังการทดลองในแต่ละวัน rinse ด้วยเมทานอล 10 นาที น้ำ Milli Q 10 นาที 0.1 M NaOH 20 นาที และ น้ำ 20 นาที

อุณหภูมิของกะพืดลารี: 25 °C

ศักย์ไฟฟ้า: 25 kV

BGE: 10 mM  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  ที่ pH 9.2 ที่ประกอบด้วย 60 mM SDS และ 15%v/v อะซิโตนไนท์

3.7 การหาชนิดและปริมาณของตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด CAP และ DCAP และการกำจัดเมทริกซ์ในตัวอย่างที่เป็นผลิตภัณฑ์พริก

3.7.1 ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษามี 3 ชนิด คือ

1) ซอสเบสซิงค์ (sauce blank) หมายถึง ซอสที่ไม่มีส่วนผสมของแคปไซซินอยด์ (CAPs) เตรียมจากการผสมของ น้ำตาล, กระเทียม, น้ำส้มสายชู, เกลือและน้ำ ในอัตราส่วนผสมโดย น้ำหนัก 35 : 10 : 15 : 5 : 35

2) ซอสพริกเตรียม (prepared chili sauce) คือ ซอสเบสซิงค์ที่มีการเติมสารมาตรฐาน CAPs ลงไปในปริมาณที่แน่นอน

3) ซอสพริกจริง (real chili sauce) ซื้อมาจากท้องตลาดและไม่สามารถเปิดเผยชื่อได้

ตารางที่ 3.1 ตัวอย่างซอสพริกจริงที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่างซอสพริก	ระดับความเผ็ดที่ระบุไว้	ปริมาณพริกที่ระบุไว้
S1-h45	เผ็ดมาก	45
S1-M40	เผ็ดปานกลาง	40
S3-h50	เผ็ดมาก	50
S3-m25	เผ็ดน้อย	25
S5-M22	เผ็ดปานกลาง	22
S6-x30	ไม่ได้ระบุ	30
S7-x28	ไม่ได้ระบุ	28
S8-h70	เผ็ดมาก	70

### 3.7.2 ขั้นตอนการสกัดของตัวอย่างทำละลาย (รูปที่ 3.1)

- 1) ชั่งตัวอย่าง 2.50 กรัม (ซอสพริกจริง ซอสพริกเตรียมเองหรือซอสเบลงค์) ใส่ลงในหลอดพลาสติกขนาด 50 ml
- 2) บีบตัวอย่างอินทรีย์ 10 ml ลงไป (ได้แก่ อะซิโตน ไทลีนหรือเอทิลอะซิเตต โดยที่แต่ละตัวอย่างของแต่ละตัวอย่างทำซ้ำ 3-5 ชุด)
- 3) นำไป vortex เป็นเวลา 3 นาที และ sonicate เป็นเวลา 10 นาที
- 4) เติม anhydrous  $MgSO_4$  1.0 กรัม และ NaCl 0.25 กรัม ลงในหลอดพลาสติกขนาด 50 ml (ในกรณีที่สกัดแบบไม่เติมเกลือ ไม่ต้องทำขั้นตอนนี้)
- 5) นำไป vortex ให้เข้ากันเป็นเวลา 2 นาที และตั้งทิ้งไว้สักครู่ (1-2 นาที) เพื่อให้เกิดการแยกชั้นของน้ำและชั้นของตัวทำละลายอย่างชัดเจน
- 6) นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
- 7) บีบชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ 9.0 ml ใส่ในหลอดทดลอง แล้วนำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบหมุน (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ  $50^{\circ}C$
- 8) นำส่วนที่ระเหยแห้งแล้ว มาละลายด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม 500  $\mu$ l คือ บีบ 250  $\mu$ l ของสารละลายมาตรฐาน 100 ppm ISTD 30%v/v อะซิโตน ไทลีน จนละลายหมด แล้วจึงบีบอีก 250  $\mu$ l ของสารละลาย 120 mM SDS จะได้สารละลายตัวอย่างสุดท้ายที่มี 15%v/v อะซิโตน ไทลีน, 50 ppm ISTD และ 60 mM SDS
- 9) กรองสารละลายตัวอย่างด้วย 0.45  $\mu$ m PTFE syring filter ก่อนการวิเคราะห์ด้วย MEKC

หมายเหตุ: ในกรณีที่สกัดซ้ำ 2 ครั้ง นำส่วนที่เหลือจากข้อที่ 7 ดูดชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์ออกให้หมด แล้วบีบตัวทำละลายอินทรีย์ลงไปสกัดอีก 10 ml ตามข้อ 3 ถึง 9 (ยกเว้นไม่ต้องเติมเกลืออีก) โดยในข้อที่ 8 ปริมาตรสุดท้ายเป็น 100  $\mu$ l ที่มีการเติม CAPs ให้เข้มข้นเป็น 25 ppm ( $\mu$ g/ml) เพื่อให้สามารถตรวจวัด CAPs ได้



รูปที่ 3.1 แผนผังการเตรียมตัวอย่าง

### 3.8 กราฟมาตรฐาน

ทำการทดลองโดยใช้ภาวะของ CE ที่เหมาะสม และใช้สารละลายมาตรฐานในข้อ 3.3.1 ซึ่งประกอบด้วย CAP และ DCAP ที่ความเข้มข้นต่างๆ และประกอบด้วย 50 ppm Bisphenol A เป็น internal standard จากนั้นสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับปริมาณวิเคราะห์ ดังผลการทดลองหัวข้อ 4.2.2

### 3.9 ขีดจำกัดของปริมาณวิเคราะห์ในตัวอย่าง

เตรียมซอสพริกเตรียมจากซอสเบสิคส์ที่มีการเติมสารมาตรฐาน CAPs ลงไปตามความเหมาะสม (C) นำไปวิเคราะห์ด้วย CE แล้ววัดอัตราส่วนของสัญญาณต่อสัญญาณรบกวน (S/N)



จนกระทั่งได้ค่า S/N ใกล้เคียงกับ 10 จากนั้นคำนวณขีดจำกัดของปริมาณวิเคราะห์ในตัวอย่าง (sample quantitation limit, SQL) ดังผลการทดลองในหัวข้อ 4.2.1

$$SQL = \frac{10}{S/N} \times C$$

### 3.10 ความแม่นยำและความเที่ยงของการสกัดด้วยตัวทำละลาย

3.10.1 เตรียมซอสพริกที่มีความเข้มข้นของแคปไซซินอยด์เป็น 20, 50 และ 100 ppm ( $\mu\text{g/g}$ ) โดยแต่ละความเข้มข้นของซอสพริกเตรียม ประกอบด้วย 50 ppm ISTD และ 60 mM SDS ที่มี 15% v/v อะซิโตนไนโทล

3.10.2 นำสารตัวอย่างในข้อ 3.10.1 มาวิเคราะห์ด้วย MEKC โดยใช้บัฟเฟอร์และภาวะดังหัวข้อ 3.6 ทำการทดลองซ้ำวันละ 5 batch เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นคำนวณหาปริมาณสารโดยใช้กราฟมาตรฐานข้อ 3.8 แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความแม่นยำและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ดังผลการทดลองหัวข้อ 4.2.3

### 3.11 การหาปริมาณแคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซินในตัวอย่างซอสพริก

ชั่งซอสพริกจริงน้ำหนักที่แน่นอนใกล้เคียง 2.50 กรัม ใส่ลงในหลอดพลาสติกขนาด 50 ml แล้วเปิดเอทิลอะซิเตตลงไป 10 ml จากนั้นนำไป vortex เป็นเวลา 3 นาที และ sonicate เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปเติมหรือไม่เติมเกลือลงไป (anhydrous  $\text{MgSO}_4$  1.0 กรัม และ NaCl 0.25 กรัม) vortex เป็นเวลา 2 นาที นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วแยกชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์ 9.0 ml ไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบหมุน (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ  $50^\circ\text{C}$  จากนั้นเติมตัวทำละลายที่เหมาะสม 500  $\mu\text{l}$  ที่ประกอบด้วยปิเปต 250  $\mu\text{l}$  (0.250 ml) ของสารละลายมาตรฐาน 100 ppm ISTD 30%v/v อะซิโตนไนโทล จนละลายหมด แล้วจึงปิเปตอีก 250  $\mu\text{l}$  (0.250 ml) ของสารละลาย 120 mM SDS จะได้สารละลายตัวอย่างสุดท้ายที่มี 15%v/v อะซิโตนไนโทล, 50 ppm ISTD และ 60 mM SDS จากนั้นกรองสารละลายตัวอย่างด้วย syringe filter ขนาด 0.45  $\mu\text{m}$  แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MEKC ที่ภาวะเหมาะสมที่หาได้จากทำการทดลองเมื่อปีที่ 1 แล้วคำนวณหาปริมาณแคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซินโดยใช้กราฟมาตรฐานในหัวข้อ 3.8 จากนั้นคำนวณเป็นปริมาณสารในซอสพริก ดังสมการที่ 3.1

$$C_A = \frac{C_1 \times V_3}{W} \times \frac{V_1}{V_2} \quad (3.1)$$

$C_A$  คือ ความเข้มข้นของสาร (CAP หรือ DCAP) ในซอสพริก (ppm,  $\mu\text{g/g}$ )

$C_i$  คือ ความเข้มข้นของสารในส่วนสกัดสุดท้ายที่วิเคราะห์ได้เทียบจากกราฟมาตรฐาน (ppm,  $\mu\text{g/ml}$ )

$V_1$  คือ ปริมาตรของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้สกัด (ml) ในที่นี้คือ 10.00 ml

$V_2$  คือ ปริมาตรของส่วนสกัดที่นำไปประเทษ (ml) ในที่นี้คือ 9.00 ml

$V_3$  คือ ปริมาตรสุดท้ายก่อนการวิเคราะห์ด้วย MEKC (ml) ในที่นี้คือ 0.500 ml

$W$  คือ น้ำหนักของซอสพริก (g)



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 4

### ผลการทดลองและการวิจารณ์

#### 4.1 การหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัด

ในงานวิจัยนี้ทำการหาภาวะที่เหมาะสมของการเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณแคปไซซิน (CAP) และไดไฮโดรแคปไซซิน (DCAP) ในตัวอย่างซอสพริกด้วยเทคนิคไมเซลล์อิเล็กโทรโครมาโทกราฟี (micellar electrokinetic chromatography, MEKC) โดยศึกษาผลของชนิดของตัวทำละลายที่ใช้สกัดและผลของการเติมเกลือ

##### 4.1.1 การหาชนิดของตัวทำละลายที่ใช้สกัดและผลของการเติมเกลือ

จากงานวิจัยที่ผ่านมาดังที่ได้กล่าวไว้ในตารางที่ 1.3 ได้มีรายงานการเตรียมตัวอย่างพริกโดยการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่ละลายน้ำ เช่น ปิโตรเลียมอีเทอร์ เฮกเซน ไดเอทิลอีเทอร์ และเอทิลอะซิเตต เป็นต้น หรือตัวทำละลายอินทรีย์ที่ละลายน้ำได้ เช่น เอทานอล เมทานอล อะซิโตน และอะซิโตนไนโตรส เป็นต้น ในกรณีที่ตัวอย่างเป็นพริกสด มักจะมีการอบตัวอย่างก่อนการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ เพื่อกำจัดน้ำที่อาจลดประสิทธิภาพในการสกัดสารได้

สำหรับซอสพริกประกอบด้วย กระจับเต็ม น้ำตาล เกลือ น้ำส้มสายชู (กรดแอซิติกและน้ำ) น้ำ และพริก ซึ่งส่วนใหญ่เป็นน้ำประมาณ 20-50 เปอร์เซ็นต์ (เกิดจากน้ำและน้ำส้มสายชู) การระเหยน้ำจากตัวอย่างซอสพริกก่อนการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์มีความยุ่งยาก ดังนั้นแนวทางการเตรียมตัวอย่างน่าจะเป็นได้ 2 แบบคือ แบบที่ 1 การสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่ละลายน้ำ หรือแบบที่ 2 การสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่ละลายน้ำ แล้วมีการเติมเกลือลงไปเพื่อทำให้เกิดการแยกของชั้นน้ำออกจากชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ เพราะน้ำอาจทำให้ประสิทธิภาพในการสกัดสารลดลง อีกทั้งทำให้ปริมาตรในส่วนสกัดเพิ่มขึ้น (ปริมาตรของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ละลายน้ำ + ปริมาตรของน้ำ) หากนำส่วนสกัดนี้ไปวิเคราะห์โดยตรงทำให้ความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ค่าน้อยกว่าความเป็นจริง ดังนั้นเมื่อคำนวณเป็นปริมาณของสารในตัวอย่างจะได้น้อยกว่าความเป็นจริงเช่นเดียวกัน แม้ว่าผลงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีรายงานการเตรียมตัวอย่างซอสพริกโดยการสกัดโดยตรงด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่ละลายน้ำได้ เช่น เอทานอล [Batchelor and Jones: 2000 และ Kachooangi *et. al.*: 2008] และ เมทานอล [Kozukue *et. al.*: 2005] แต่วิธีการดังกล่าวนี้ไม่น่าถูกต้อง

ในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการสกัดสำหรับหาปริมาณ CAP และ DCAP ในซอสเตรียมและซอสพริกจริง ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์แบบเติมเกลือและไม่เติมเกลือ

โดยที่ซอสครีมที่ได้มาจากซอสเบสส์ (หัวข้อ 3.7.1) มาเติมสารละลายมาตรฐาน CAP และ DCAP ให้มีความเข้มข้นของ CAPs 50 และ 100 ppm ( $\mu\text{g/g}$ ) ในซอสครีม จากนั้นนำซอสครีมหรือซอสพริกจริงไปสกัดตามวิธีการในหัวข้อ 3.7.2 ทำซ้ำตัวอย่างละ 3 Batch แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MEKC ในภาวะที่เหมาะสมที่ได้ทำการพัฒนาขึ้นแล้วในงานวิจัยก่อนหน้าที่ตั้งที่ไว้ในหัวข้อ 3.6 เพื่อหาปริมาณ CAPs ที่สกัดได้เทียบกับกราฟมาตรฐานดังหัวข้อ 4.2.2 แล้วนำไปคำนวณ %Recovery ของ CAPs ในซอสครีม ในกรณีนี้ %Recovery หรือเปอร์เซ็นต์การสกัด เป็นร้อยละของปริมาณที่วิเคราะห์ได้ในตัวอย่างที่ผ่านการสกัดเทียบกับปริมาณเริ่มต้นในตัวอย่างก่อนการสกัด ซึ่งค่า %Recovery ที่ใกล้ 100% แสดงว่ามีประสิทธิภาพมากในการสกัด CAPs

ในเบื้องต้นได้เลือกตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้สกัดเป็นเอทิลอะซิเตต (EtOAc) อะซิโตน ไทรล์ (ACN) เอทานอล (EtOH) และเมทานอล (MeOH) ซึ่งเฉพาะ EtOAc เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่ละลายน้ำ อย่างไรก็ตามหลังการสกัดและก่อนการวิเคราะห์ด้วย CE จำเป็นต้องระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ก่อน แล้วละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสม (ให้มีตัวทำละลายอินทรีย์น้อย เช่น 15% v/v อะซิโตน ไทรล์ และ 60 mM SDS) เพราะถ้าเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ 100% ทำให้กระแสไฟฟ้าไหลในระหว่างการให้ศักย์ไฟฟ้าขณะแยกและวิเคราะห์สาร และปีกของสารกว้าง แต่อย่างไรก็ตาม ปัญหาที่พบจากการใช้เอทานอลหรือเมทานอลทั้งแบบที่เติมเกลือและไม่เติมเกลือ คือ ไม่สามารถระเหยส่วนสกัดให้แห้งได้ ในขณะที่ไม่พบปัญหานี้เมื่อใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็น EtOAc หรือ ACN ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่า เอทานอลหรือเมทานอล สกัดน้ำมันที่ระเหยได้ยากที่อยู่ในพริกออกมาด้วย จึงทำให้ระเหยส่วนสกัดได้ยาก หรืออาจเป็นเหตุผลอื่นที่ไม่ทราบแน่ชัด ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงรายงานข้อมูลเฉพาะตัวทำละลายที่สกัดเป็น EtOAc และ ACN เท่านั้น

หลังจากที่ผ่านการสกัดซอสด้วย EtOAc และ ACN ทั้งแบบที่เติมเกลือและไม่เติมเกลือ ได้ผลการทดลองของ %Recovery ดังรูปที่ 4.1 ที่ใช้ซอสครีมที่มี CAPs 50 และ 100 ppm ( $\mu\text{g/g}$ ) (รูปที่ 4.1a และ 4.1b ตามลำดับ) ซึ่งข้อมูลในกลุ่มแรกเป็น CAP กลุ่มที่สองเป็น DCAP และกลุ่มสุดท้ายคือ CAPs (CAP + DCAP) จะเห็นได้ว่าการสกัดด้วย EtOAc แบบไม่เติมเกลือ มี %Recovery มากกว่า (98.5 และ 99.8% สำหรับซอสครีมที่มี CAPs 50 และ 100 ppm ตามลำดับ) การสกัดด้วย ACN แบบไม่เติมเกลือ (78.2 และ 85.0% สำหรับซอสครีมที่มี CAPs 50 และ 100 ppm ตามลำดับ)

สำหรับการสกัดแบบเติมเกลือ ได้ใช้เกลือ anhydrous  $\text{MgSO}_4$  และ  $\text{NaCl}$  ลงไป เพื่อช่วยในการสกัดนี้ดีขึ้นและทำให้เกิด salting-out effect และแยกชั้นน้ำออกจากตัวทำละลายอินทรีย์ได้ดีขึ้น [Morrison and Freiser: 1962, Anastassiades *et. al.*: 2003, Majors: 2008] พบว่าการสกัดด้วย EtOAc แบบเติมเกลือจะให้ %Recovery เป็น 100.9 และ 101.5% สำหรับซอสครีมที่มี CAPs 50 และ 100 ppm ตามลำดับ จึงให้ %Recovery ไม่แตกต่างจากการสกัดด้วย EtOAc แบบไม่เติมเกลือ ในขณะที่

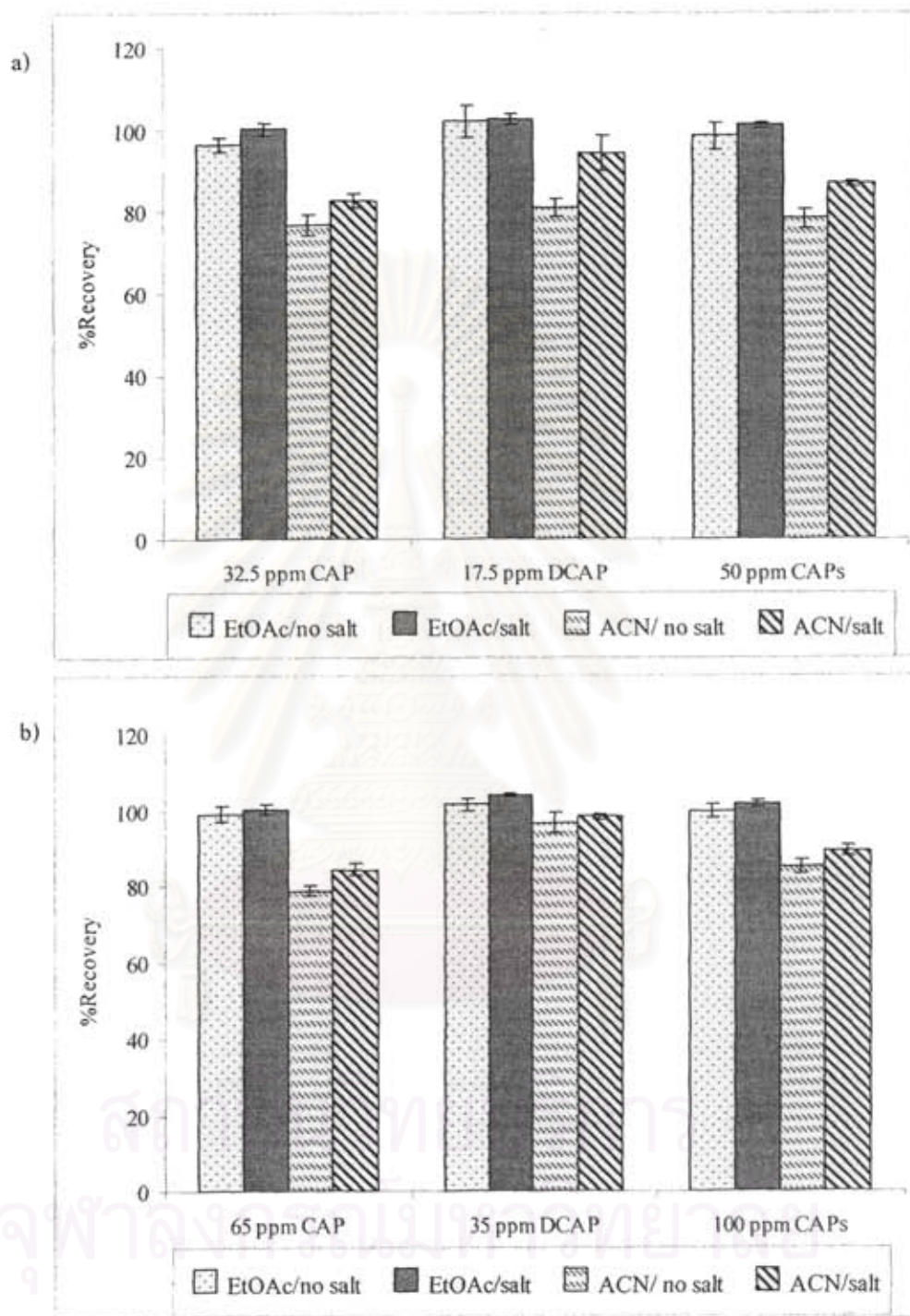


การสกัดด้วย ACN แบบเติมเกลือให้ค่า %Recovery เป็น 86.8 และ 89.1% สำหรับซอสเตรียมที่มี CAPs 50 และ 100 ppm ตามลำดับ ซึ่ง %Recovery มากกว่าการใช้ ACN แบบไม่เติมเกลือ

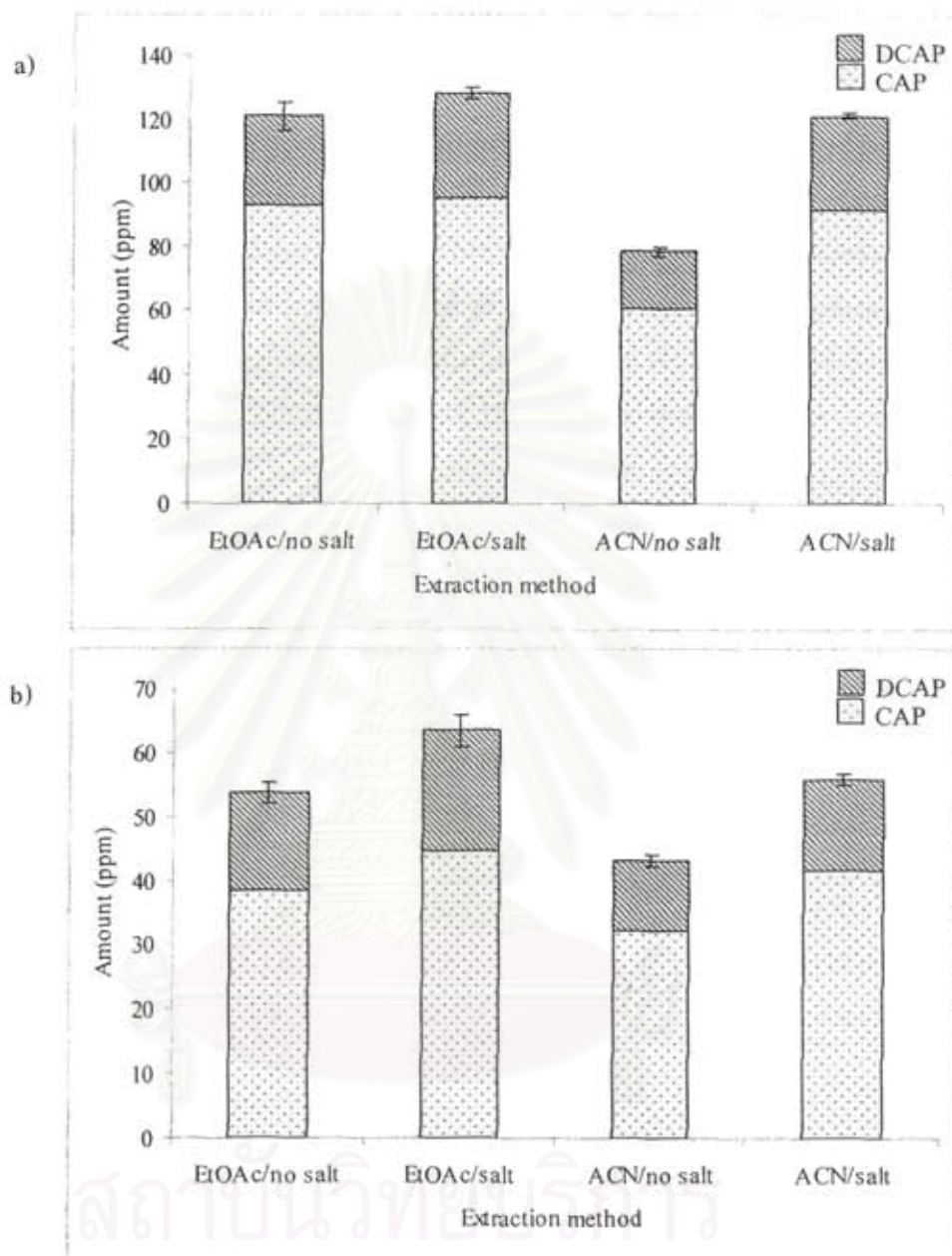
จากนั้นจึงได้ทดลองนำตัวอย่างซอสพริกจริง S1-h45 และ S6-x30 มาสกัดด้วย EtOAc และ ACN ทั้งแบบที่เติมเกลือและไม่เติมเกลือ และได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.2a และ 4.2b เมื่อเปรียบเทียบพบว่าปริมาณ CAPs ที่วิเคราะห์ได้จากการสกัดแบบต่างๆ เป็นดังนี้ คือ EtOAc แบบเติมเกลือ > EtOAc แบบไม่เติมเกลือ  $\approx$  ACN แบบเติมเกลือ > ACN แบบไม่เติมเกลือ

จากผลการทดลองที่ %Recovery และปริมาณ CAPs ที่วิเคราะห์ได้จากการสกัดด้วย EtOAc มากกว่า ACN สามารถอธิบายได้ว่า ACN เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่ละลายน้ำ ในขณะที่ EtOAc เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่ละลายน้ำและไม่มีขั้วมากกว่า ACN ส่วน CAPs เป็นสารที่ละลายน้ำได้น้อยมาก จึงละลายในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วได้ดีกว่า ดังนั้นการสกัด CAPs ด้วย EtOAc จึงให้ประสิทธิภาพที่ดีกว่า ตามหลักการของ “like-dissolve-like” ส่วนการสกัดแบบเติมเกลือมีผลช่วยให้เกิดการแยกชั้นของน้ำออกจากตัวทำละลายอินทรีย์ได้ดีขึ้น จึงทำให้เพิ่มประสิทธิภาพในการสกัด CAPs ได้ดีกว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่เติมเกลือ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เป็น ACN ซึ่งละลายน้ำได้ ในขณะที่ EtOAc แบบเติมเกลือ ให้ประสิทธิภาพในการสกัดเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่า EtOAc ไม่ละลายน้ำจึงแยกออกจากชั้นน้ำได้ดีอยู่แล้ว

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.1 Recovery ของ CAPs ในซอสเตรียมที่ผ่านการสกัดด้วย EtOAc และ ACN แบบเติมเกลือ และไม่เติมเกลือ ที่ใช้ซอสเตรียมที่มี CAPs (a) 50 และ (b) 100 ppm ( $\mu\text{g/g}$ )



รูปที่ 4.2 ปริมาณ CAPs ในตัวอย่างซอสพริกจริง ที่วิเคราะห์ได้จากการสกัดตัวอย่างด้วย EtOAc และ ACN แบบเค็มเกลือและไม่เค็มเกลือ (a) ตัวอย่างซอสพริก S1-h45 และ (b) S6-x30



#### 4.1.2 ปริมาณเกลือที่เหมาะสมในการสกัด

ได้ทำการศึกษาหาปริมาณเกลือที่เหมาะสมในการสกัด ซึ่งเกลือที่ใช้กันได้แก่ anhydrous  $MgSO_4$  และ NaCl ที่ต้องมีการเติมเกลือลงไปเป็นขั้นตอนการสกัดนั้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดและแยกสารออกจากเมทริกซ์ ซึ่งโดยทั่วไปใช้  $MgSO_4$  และ NaCl ในอัตราส่วน 4:1 [Anastassiades *et. al.*: 2003, Majors: 2008] และในช่วง 0.5 ถึง 1.0 เท่าของน้ำหนักตัวอย่าง (ในที่นี้ใช้น้ำหนักตัวอย่างเป็น 2.5 กรัม) โดยนำซอสเตรียมที่มีความเข้มข้นของ CAPs 100 ppm ( $\mu\text{g/g}$ ) และซอสพริกจริง S1-h45 เป็นตัวอย่างทดสอบ จากนั้นสกัดตามวิธีในหัวข้อ 3.7.2 โดยใช้ EtOAc เป็นตัวทำละลายที่ใช้สกัดแบบเติมเกลือในปริมาณต่างๆ ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 เปรียบเทียบปริมาณเกลือที่เหมาะสมในการสกัดซอสพริก

ตัวอย่าง	ปริมาณเกลือ (กรัม)		% Recovery ของ CAPs	ปริมาณ CAPs ที่วิเคราะห์ได้ (ppm, $\mu\text{g/g}$ )
	anhydrous $MgSO_4$	NaCl		
ซอสเตรียม 100 ppm ( $\mu\text{g/g}$ ) CAPs	2.0	0.50	101.5 $\pm$ 2.6	-
	1.0	0.25	99.9 $\pm$ 2.5	-
	0	0	99.8 $\pm$ 1.9	-
ซอสพริกจริง S1-h45	2.0	0.50	-	130.5 $\pm$ 2.5
	1.0	0.25	-	128.0 $\pm$ 4.5
	0	0	-	120.8 $\pm$ 4.2

$n = 3$  batch

จากตารางที่ 4.1 จะเห็นว่าปริมาณของเกลือที่เติมแตกต่างกันนั้นให้ %Recovery ของ CAPs ในซอสเตรียม (ที่มีความเข้มข้นของ CAPs 100 ppm) ไม่แตกต่างกันมากนักในขณะที่ปริมาณ CAPs ที่วิเคราะห์ได้ในตัวอย่างซอสพริกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อปริมาณเกลือเพิ่มขึ้น ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่า ลักษณะของซอสเตรียมมีความแตกต่างจากซอสพริกจริง เช่นในซอสพริกจะมีน้ำมันจากพริกในขณะที่ซอสเตรียมไม่มีน้ำมัน ซึ่งเป็นที่ทราบว่าน้ำมันนั้นจะเกิดอิมัลชันกับน้ำได้ และเกลือจะช่วยลดการเกิดอิมัลชันระหว่างรอยต่อของชั้นน้ำและชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์ ดังที่กล่าวมาแล้วว่าเกลือที่เติมลงไปเป็นชั้นน้ำนั้น ทำให้เกิด salting-out effect และทำให้เกิดการแยกชั้นน้ำและชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ สารที่เราสนใจที่เป็นสารประกอบอินทรีย์จึงออกมาอยู่ในชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้สกัดได้มากขึ้น



จากผลการทดลองที่ใช้เกลือ 0.5 และ 1.0 เท่าของน้ำหนักสารตัวอย่างนั้น ปริมาณของ CAPs ที่วิเคราะห์ได้ในซอสพริกจริง S1-h45 ไม่แตกต่างกันมากนัก (128.0 และ 130.5 ppm) ภายในค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน หรือปริมาณที่วิเคราะห์เพิ่มขึ้นเพียง 2.0% เท่านั้น และการใช้เกลือปริมาณมากทำให้เกลือติดค้างอยู่ตามข้างหลอดและสังเกตการแยกของชั้นน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ได้ยาก ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้เกลือ 0.5 เท่าของน้ำหนักสารตัวอย่าง คือ เติม anhydrous  $MgSO_4$  1.0 กรัม + NaCl 0.25 กรัม

#### 4.1.3 การสกัดซ้ำ 2 ครั้ง เทียบกับ 1 ครั้ง

แม้ว่าการสกัดซอสเครียมด้วย EtOAc แบบเติมเกลือที่ทำการสกัด 1 ครั้ง พบว่า %Recovery ที่ได้เกือบ 100% แต่ลักษณะของซอสเครียมและซอสพริกจริงมีความแตกต่างกัน ดังนั้นจึงต้องการตรวจสอบว่าในการสกัดตัวอย่างซอสพริกจริงเพียง 1 ครั้ง ยังมีปริมาณ CAPs เหลือจากการสกัดครั้งแรกมากหรือน้อยเพียงใด โดยนำส่วนที่เหลือจากการสกัดครั้งที่ 1 มาสกัดซ้ำด้วยตัวทำละลายอีก 1 ครั้ง ตามวิธีการในหัวข้อ 3.7.2 ซึ่งตัวอย่างซอสพริกจริง ได้แก่ S1-h45 และ S6-x30 และสกัดด้วย EtOAc ทั้งแบบเติมเกลือ (0.5 เท่าของน้ำหนักตัวอย่าง) และแบบไม่เติมเกลือ (แบบไม่เติมเกลือใช้ในการเปรียบเทียบว่ามีสารเหลือจากการสกัดครั้งที่ 1 มากน้อยเพียงใด) จากนั้นคำนวณอัตราส่วน ( $E_{ratio}$ ) ของปริมาณ CAPs ที่สกัดได้ 2 ครั้ง เทียบกับ 1 ครั้ง ดังสมการที่ 4.1

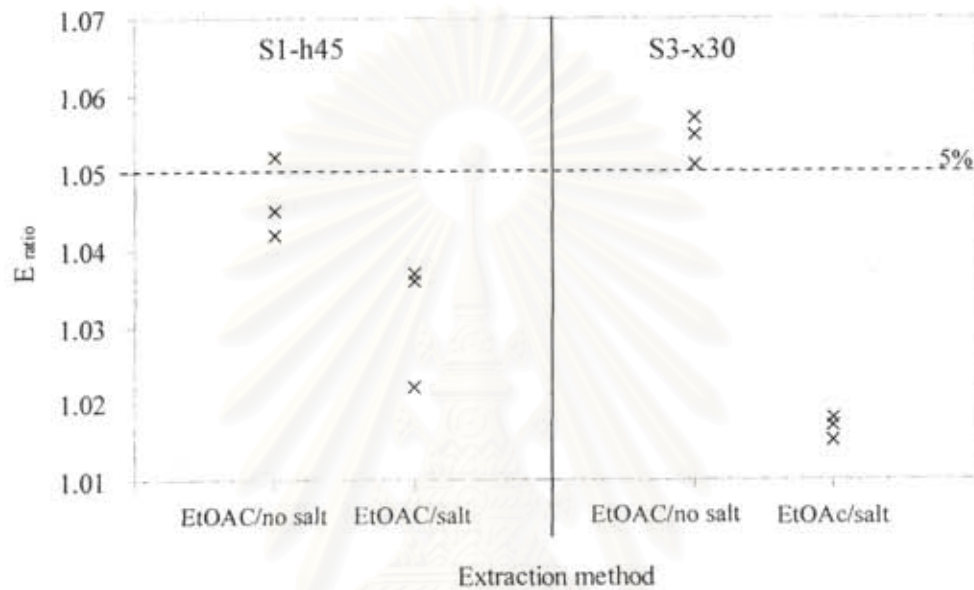
$$E_{ratio} = \frac{x_1 + x_2}{x_1} \quad (4.1)$$

โดยที่  $x_1$  คือ ปริมาณของ CAPs จากการสกัดครั้งที่ 1

$x_2$  คือ ปริมาณของ CAPs จากการสกัดครั้งที่ 2

ปริมาณของ CAPs ที่วิเคราะห์ได้จากการสกัดตัวอย่างซอสพริกจริง (S1-h45 และ S6-x30) ที่สกัดซ้ำ 2 ครั้ง เทียบกับ 1 ครั้ง แสดงการเปรียบเทียบให้เห็นดังรูปที่ 4.3 โดยเทียบใน batch เดียวกัน จำนวน 3 batch และที่ค่าอัตราส่วน ( $E_{ratio}$ ) เป็น 1.05 หมายความว่า การสกัดซ้ำ 2 ครั้งได้ปริมาณสารเพิ่มขึ้น 5% เทียบกับการสกัด 1 ครั้ง จากผลการทดลองในรูปที่ 4.3 เมื่อสกัดตัวอย่างซอสพริกด้วย EtOAc แบบเติมเกลือ พบว่าการสกัดซ้ำ 2 ครั้ง ได้ปริมาณ CAPs เพิ่มขึ้น (เทียบกับการสกัด 1 ครั้ง) น้อยกว่า 4 และ 2% สำหรับ S1-h45 และ S6-x30 ตามลำดับ ในขณะที่เพิ่มขึ้นมากกว่า 4 และ 5% สำหรับการสกัดแบบไม่เติมเกลือ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการสกัดซ้ำ 2 ครั้งด้วย EtOAc แบบเติมเกลือได้ปริมาณ CAPs เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ซึ่งค่าที่น้อย 4 หรือ 2% อาจ

เป็นไปได้สำหรับสารที่ตกค้างในภาชนะ หรือร้อยละค่าเบี่ยงเบนสัมพัทธ์ของการทดลอง ดังนั้นเพื่อประหยัดเวลาในการสกัดและการระเหยตัวทำละลายหลังการสกัด ในงานวิจัยนี้จึงเลือกการสกัดเพียง 1 ครั้งด้วย EtOAc แบบเติมเกลือ (anhydrous  $MgSO_4$  1.0 กรัม + NaCl 0.25 กรัม)



รูปที่ 4.3 อัตราส่วนของปริมาณ CAPs ที่วิเคราะห์ได้จากการสกัดตัวอย่างซอสพริกซ้ำ 2 ครั้งเทียบกับ การสกัด 1 ครั้ง ( $E_{ratio}$ ) ด้วย EtOAc แบบเติมเกลือและไม่เติมเกลือ

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## 4.2 การตรวจสอบวิธีการวิเคราะห์ (Validation of the method)

### 4.2.1 ขีดจำกัดของปริมาณวิเคราะห์ในตัวอย่าง

ขีดจำกัดของการตรวจวัด (limit of detection, LOD) หมายถึง ความเข้มข้นของสารต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ด้วยเครื่องมือตามภาวะที่ใช้ ส่วนขีดจำกัดของปริมาณวิเคราะห์ (limit of quantitation, LOQ) หมายถึง ความเข้มข้นของสารต่ำสุดที่สามารถรายงานได้อย่างน่าเชื่อถือจากผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือตามภาวะที่ใช้ [Swartz and Krull: 1997] ในทางปฏิบัตินั้นเป็นที่ยอมรับกันว่า LOD และ LOQ นิยามเป็นความเข้มข้นของสารที่ให้อัตราส่วนของค่าสัญญาณตรวจวัดต่อค่าสัญญาณรบกวน (signal-to-noise ratio) เท่ากับ 3 และ 10 ตามลำดับ สำหรับ LOD และ LOQ ของ CAP และ DCAP ได้ทำการหาไว้แล้วจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ ส่วนขีดจำกัดของปริมาณวิเคราะห์ในตัวอย่าง (sample quantitation limit, SQL) หมายถึง ความเข้มข้นของสารต่ำสุดในตัวอย่างจริงที่สามารถรายงานผลการวิเคราะห์ได้อย่างน่าเชื่อถือได้ ซึ่งจะคล้ายกับ LOQ สำหรับวิธีการหา SQL ของ CAP และ DCAP อาจทำได้โดยดั่งที่อธิบายไว้ในหัวข้อ 3.10 และคำนึงถึงปริมาณของตัวอย่าง (sample quantity) การเจือจาง (dilution factor) หรือการเพิ่มความเข้มข้น (concentration factor) และวิธีการเตรียมตัวอย่าง เป็นต้น

ผลของการทดลองของค่าขีดจำกัดของการวิเคราะห์ของ CAP และ DCAP แสดงไว้ดังในตาราง 4.2 จากการใช้ข้อเตรียมพบว่าได้ SQL ของ CAP และ DCAP เป็น 4.9 และ 3.6 ppm ( $\mu\text{g/g}$ ) (ดังตารางที่ 4.2) ตามลำดับ การปรับปรุง SQL ให้ดีขึ้นหรือการเพิ่มขีดจำกัดของการวิเคราะห์ (ทำให้ค่า SQL ลดลงหรือน้อยลง) อาจทำได้โดยการเพิ่มปริมาณตัวอย่างหรือลดปริมาณสุดท้ายที่ละลายตัวอย่าง เป็นต้น อย่างไรก็ตาม SQL ที่ได้นี้เพียงพอสำหรับวิเคราะห์ตัวอย่างซอสพริกจริง เพราะไม่ได้เป็นการวิเคราะห์สารที่ความเข้มข้นต่ำๆ (trace analysis)

ตารางที่ 4.2 ขีดจำกัดของการวิเคราะห์

สาร	LOD (ppm, $\mu\text{g/ml}$ ) <sup>a</sup>	LOQ (ppm, $\mu\text{g/ml}$ ) <sup>a</sup>	SQL (ppm, $\mu\text{g/g}$ ) <sup>b</sup>
CAP	5.2	16.3	4.9
DCAP	2.8	8.8	3.6

หมายเหตุ: <sup>a</sup> ความเข้มข้นในสารละลายมาตรฐานและได้มาจากการทดลองในรายงานปีที่ 1

<sup>b</sup> ปริมาณ CAP และ DCAP ในตัวอย่างซอส

#### 4.2.2 กราฟมาตรฐาน

งานวิจัยนี้ได้ทำกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ CAP และ DCAP โดยความเข้มข้นของ CAP ที่ใช้อยู่ในช่วง 16.3 ถึง 520 ppm ( $\mu\text{g/ml}$ ) และ DCAP ในช่วง 8.8 ถึง 280 ppm ( $\mu\text{g/ml}$ ) เนื่องจาก CAP และ DCAP ที่มีอยู่ในตัวอย่างซอฟต์แวร์มือถือต่างๆ

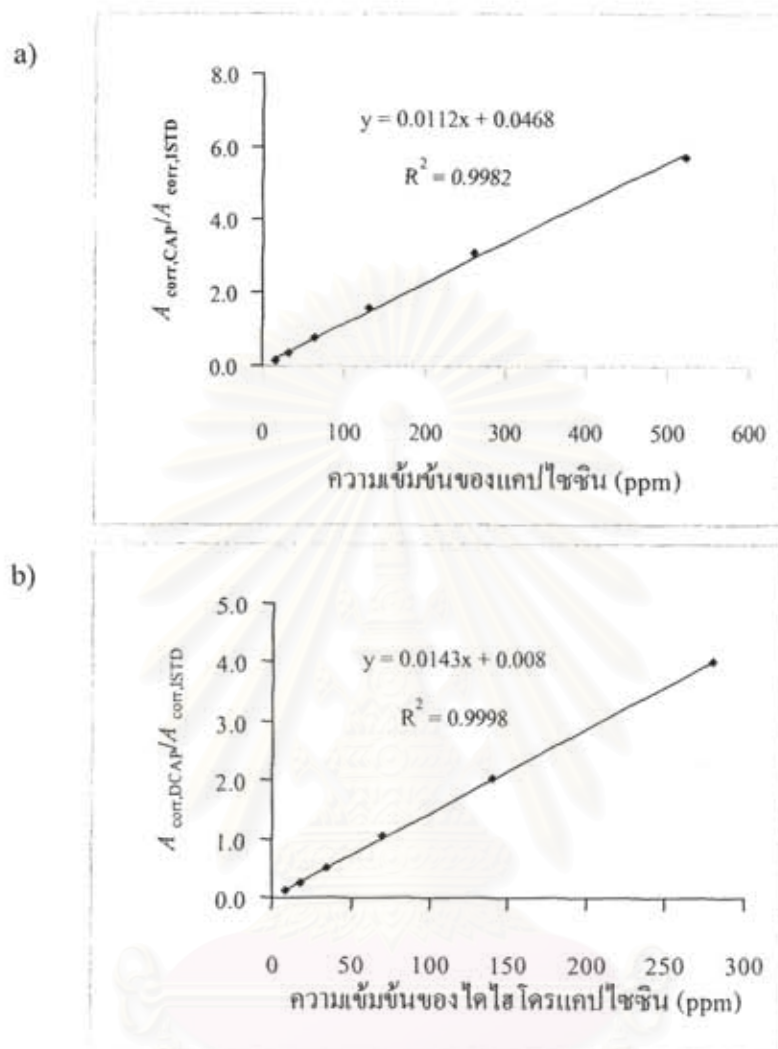
การทำกราฟมาตรฐานใช้วิธี internal standard เพื่อลดความผิดพลาดเนื่องจากการฉีดสารที่ไม่เท่ากันในแต่ละครั้ง (ดังที่กล่าวไว้ในหัวข้อ 2.7 หน้า 16) โดยในการทดลองได้เลือก bisphenol A เป็น internal standard (ISTD) เนื่องจากสารตัวนี้ไม่มีอยู่ในตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ ไม่ทำปฏิกิริยากับ CAP และ DCAP และมีการดูดกลืนแสงในช่วงเดียวกับ CAP และ DCAP นอกจากนี้โมเลกุลใหม่ของ bisphenol A ไม่รบกวนพีคของ CAP และ DCAP โดยเติมสารละลาย bisphenol A ลงไปในสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างในปริมาณที่เท่ากันและให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของ bisphenol A เป็น 50 ppm ( $\mu\text{g/ml}$ ) โดยแต่ละความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานทำการฉีดซ้ำ 2 ครั้ง

รูปที่ 4.4 เป็นกราฟมาตรฐานของความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนของ corrected peak area ของ CAP ต่อ ISTD ( $A_{\text{corr,CAP}}/A_{\text{corr,ISTD}}$ ) และ DCAP ต่อ ISTD ( $A_{\text{corr,DCAP}}/A_{\text{corr,ISTD}}$ ) กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (ใน CE นิยมใช้ corrected peak area ดังที่กล่าวไว้ในหัวข้อ 2.7 หน้า 16) โดยค่า  $r^2$  จะมีค่าใกล้เคียง 1.0 ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าความสัมพันธ์ระหว่าง  $A_{\text{corr,CAP}}/A_{\text{corr,ISTD}}$  และ  $A_{\text{corr,DCAP}}/A_{\text{corr,ISTD}}$  กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานมีความสัมพันธ์ในลักษณะเชิงเส้นตรง

ตารางที่ 4.3 ช่วงความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่ใช้และสมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐาน

สาร	ช่วงความเข้มข้น (ppm, $\mu\text{g/ml}$ )	สมการเส้นตรง		
		ความชัน	จุดตัดแกน y	$R^2$
CAP	16.3 ถึง 520	0.0112	0.0468	0.9982
DCAP	8.8 ถึง 280	0.0143	0.0080	0.9998





รูปที่ 4.4 กราฟมาตรฐานสำหรับปริมาณวิเคราะห์ของ a) แคปไซซิน และ b) ไดไฮโดรแคปไซซิน

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

#### 4.2.3 ความเที่ยงของการสกัด

ได้ศึกษาผลของความเที่ยงของวิธีการสกัดซอสพริกเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ CAP และ DCAP โดยใช้ซอสเตรียม คือ ซอสเบลงค์ที่ได้ทำการเติมสารละลายมาตรฐาน CAPs ลงไปความเข้มข้นที่แน่นอน ประกอบด้วย CAPs ที่ความเข้มข้น 20, 50 และ 100 ppm ( $\mu\text{g/g}$ ) ดังหัวข้อ 3.10 ทำการสกัดตัวอย่างซอสเตรียมแต่ละความเข้มข้น CAPs ด้วย EtOAc แบบเดิมเกลือ โดยทำการสกัดความเข้มข้นของ CAPs ละ 5 batch ในแต่ละวัน เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MEKC ที่ได้พัฒนาขึ้นในงานวิจัยก่อนหน้า ดังหัวข้อ 3.6 ดังผลการทดลองในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ความเที่ยงของการวิเคราะห์แคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซิน

	%RSD (%Recovery)		
	20 ppm ( $\mu\text{g/g}$ ) CAPs	50 ppm ( $\mu\text{g/g}$ ) CAPs	100 ppm ( $\mu\text{g/g}$ ) CAPs
ภายในวัน (intraday) <sup>a</sup>			
วันที่ 1	1.1 (100.2)	1.1 (101.4)	0.7 (101.1)
วันที่ 2	2.1 (101.4)	2.6 (98.7)	1.0 (99.9)
วันที่ 3	2.7 (100.0)	2.0 (101.2)	1.7 (101.0)
วันที่ 4	2.9 (99.7)	1.8 (99.3)	2.5 (99.9)
วันที่ 5	2.8 (101.5)	3.7 (101.3)	2.1 (100.6)
ต่างวัน (interday) <sup>b</sup>			
รวม	2.3 (100.6)	2.5 (100.4)	1.7 (100.6)

หมายเหตุ : <sup>a</sup> 5 batch ในแต่ละวัน ( $n = 5$ )

: <sup>b</sup> 5 วัน วันละ 5 batch ( $n = 25$ )

จากการตรวจสอบความเที่ยงของวิธีการสกัดซอสเตรียมภายในวัน (intraday precision,  $n = 5$  batch) และต่างวันกัน (interday precision,  $n = 5$  วัน) โดยใช้ซอสเตรียมที่มี CAPs ที่ความเข้มข้น 20, 50 และ 100 ppm ( $\mu\text{g/g}$ ) พบว่า %RSD ของ %Recovery ที่วิเคราะห์ได้แต่ละวันน้อยกว่า 2.9, 3.7 และ 2.5% ตามลำดับ และ %RSD ของค่าเฉลี่ย %Recovery ต่างวันกัน 5 วัน ( $n = 25$ ) เป็น 2.3, 2.5 และ 1.7% ตามลำดับ แสดงว่าการสกัดภายในวันและต่างวันมีความเที่ยงสูง (%RSD < 5) และ %Recovery โดยรวมอยู่ในช่วง 96-105% ตามลำดับ แสดงว่าประสิทธิภาพในการสกัดสูง เป็นต้น

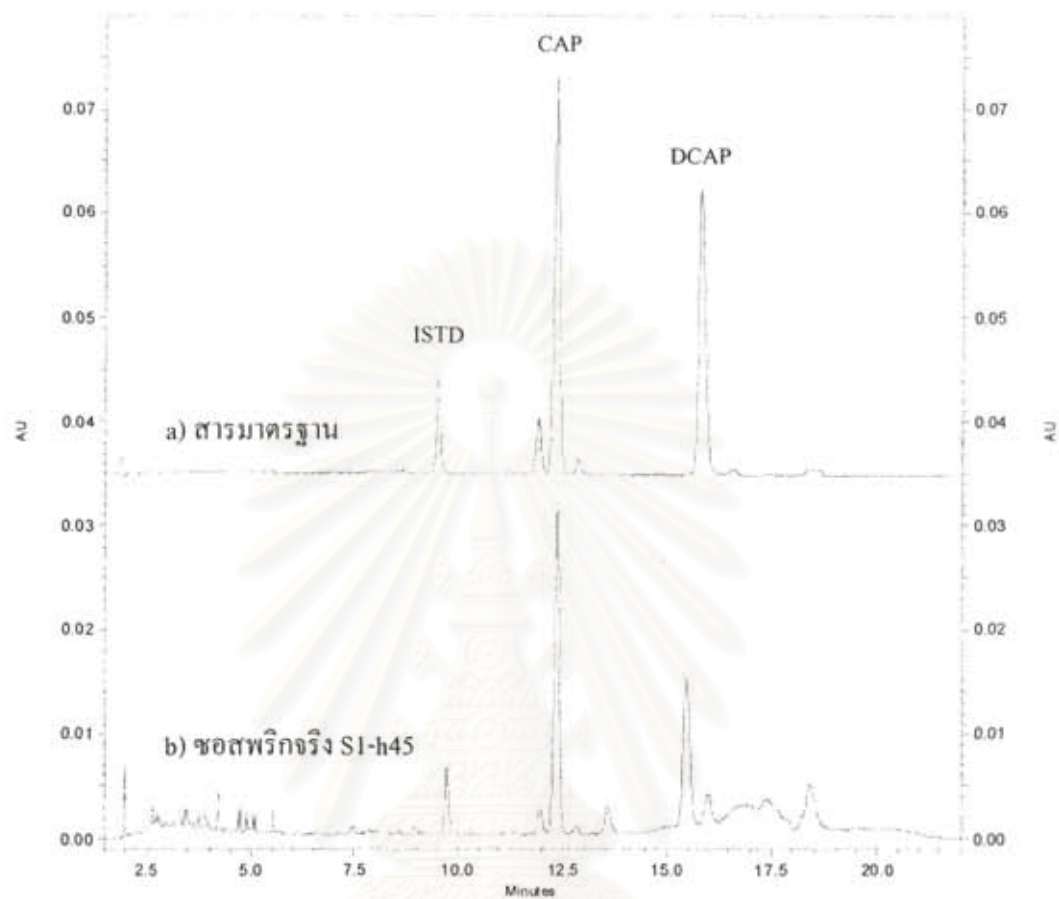
ช่วง %Recovery และ %RSD ที่ยอมรับได้นั้นพิจารณาโดยใช้หลักการของ Horwitz [Horwitz: 1982 และ Gonzalez *et al.*: 2007] ตัวอย่างแบบง่ายๆ เช่น ในกรณีที่วิเคราะห์สารที่มีความเข้มข้น 10 และ 100 ppm ค่าที่ยอมรับได้ คือ %Recovery ในช่วง 80 ถึง 110 และ 90 ถึง 107% ตามลำดับ ส่วน %RSD < 7.3 และ < 5.3 ตามลำดับ สำหรับที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 10 ppm นั้น ค่า %Recovery ที่ยอมรับได้จะอยู่ในช่วงกว้างกว่านี้ และ %RSD จะมากกว่านี้ งานวิจัยนี้ได้วิเคราะห์สารที่มีความเข้มข้นน้อยกว่า 100 ppm และจากการทดลองพบว่า %RSD < 3.7 และ %Recovery อยู่ในช่วง 96 ถึง 105% ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าปริมาณวิเคราะห์ของวิธีการนี้มีความเที่ยงและความแม่นยำสูง (หมายเหตุ: เป็นที่ทราบกันอยู่แล้วว่าถ้าการทดลองที่ได้มี %Recovery ในช่วง 95 ถึง 105% และ %RSD < 5% สามารถสรุปได้ว่ามีความแม่นยำและความเที่ยงที่ยอมรับได้ โดยไม่จำเป็นต้องคำนวณค่าอย่างละเอียดด้วยสมการของ Horwitz)

#### 4.3 การหาปริมาณแคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซินในตัวอย่างซอสพริก

ทำการเตรียมตัวอย่างซอสพริกจริงดังหัวข้อ 3.11 ทำการสกัดซ้ำ 3 batch ในแต่ละตัวอย่าง แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MEKC ที่ภาวะเหมาะสมที่หาได้จากงานวิจัยก่อนนี้ (หัวข้อ 3.6) ตัวอย่างอิเล็กโทรฟีโรแกรมของซอสพริก แสดงดังรูปที่ 4.5 สำหรับการหาปริมาณสารที่สนใจ นำอัตราส่วนของ corrected peak area ที่ได้ไปคำนวณหาความเข้มข้นของ CAP และ DCAP ที่มีอยู่ในตัวอย่างโดยใช้กราฟมาตรฐาน (รูปที่ 4.4) และสมการที่ 3.1

ตารางที่ 4.5 ปริมาณของแคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซินในตัวอย่างซอสพริก

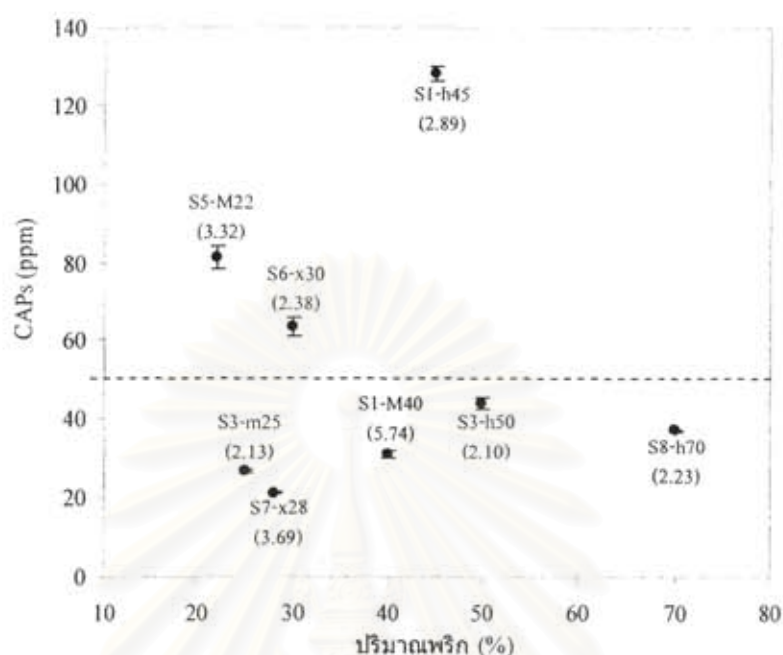
ตัวอย่างซอสพริก	พริกในซอส (%w/w)	ปริมาณสาร (ppm, µg/g)		
		CAP	DCAP	CAPs
S1-h45	45	95.1 ± 1.1	32.9 ± 0.9	128.0 ± 2.0
S1-M40	40	26.4 ± 0.7	4.6 ± 0.9	31.0 ± 0.8
S3-h50	50	29.8 ± 1.3	14.2 ± 0.1	44.0 ± 1.4
S3-m25	25	18.3 ± 0.1	8.6 ± 0.4	26.9 ± 0.4
S5-M22	22	62.4 ± 2.7	18.8 ± 1.0	81.1 ± 2.5
S6-X30	30	44.8 ± 1.8	18.8 ± 1.1	63.6 ± 2.3
S7-x28	28	16.6 ± 0.3	4.5 ± 0.2	21.1 ± 0.3
S8-h70	70	25.7 ± 0.5	11.5 ± 0.3	37.1 ± 0.2



รูปที่ 4.5 อิเล็กโทรฟีโรแกรมของ a) สารละลายมาตรฐาน และ b) ซอสพริกจริง SI-h45 โดยทำการสกัดด้วย EtOAc แบบเดิมเกลือ (anhydrous  $MgSO_4$  1.0 กรัม และ  $NaCl$  0.25 กรัม); ISTD = Internal Standard, CAP = แคปไซซิน และ DCAP = ไดไฮโดรแคปไซซิน

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





รูปที่ 4.6 ความสัมพันธ์ของปริมาณ CAPs และปริมาณของพริกในตัวอย่างซอสพริก (โดยที่ h, M, m และ x หมายถึงระดับความเผ็ดมาก (hot) เผ็ดปานกลาง (medium) เผ็ดน้อย (mild) และไม่ได้รับระบุตามลำดับ ส่วนตัวเลขท้ายสูตรหมายถึงปริมาณพริก (%) ที่ระบุไว้และตัวเลขที่อยู่ในวงเล็บเป็นอัตราส่วนของ CAP : DCAP ที่วิเคราะห์ได้)

จากการประยุกต์เทคนิค MEKC สำหรับปริมาณวิเคราะห์ของ CAP และ DCAP ในซอสพริกจริง โดยใช้ bisphenol A เป็น internal standard ได้ทำการวิเคราะห์และเปรียบเทียบปริมาณของ CAPs ในตัวอย่างซอสพริกต่างๆ จากผลการทดลองในตารางที่ 4.4 และรูปที่ 4.6 จะเห็นได้ว่าปริมาณ CAPs ไม่มีแนวโน้มความสัมพันธ์แปรตามปริมาณพริกที่ระบุไว้ ทั้งนี้เนื่องจากความแตกต่างของสายพันธุ์ และ/หรือ แหล่งพริกที่ใช้ในการผลิตซอสพริก แม้แต่สูตรความเผ็ดเหมือนกัน แต่ปริมาณ CAPs ที่ตรวจพบต่างกัน เช่น ซอสพริกสูตรเผ็ดมาก S1-h45, S3-h50 และ S8-h70 พบว่ามี 128, 44 และ 37 ppm CAPs หรือซอสสูตรเผ็ดปานกลาง S1-M40 และ S5-M22 พบว่ามี 31 และ 81 ppm CAPs นอกจากนี้ S3-h50 และ S3-m25 เป็นซอสพริกที่เผ็ดเหมือนกันแต่สูตรเผ็ดต่างกันและพบว่ามีอัตราส่วนของ CAP:DCAP ที่ตรวจพบเท่ากันคือ 2.1 แสดงว่าพริกที่ใช้น่าจะเป็นสายพันธุ์เดียวกัน ในขณะที่ S1-h45 และ S1-M40 ซึ่งเป็นซอสพริกที่เผ็ดเหมือนกันแต่อัตราส่วนของ CAP : DCAP ที่พบต่างกันคือ 2.9 และ 5.7 จึงน่าจะใช้พริกต่างสายพันธุ์หรือต่างแหล่งกัน และหากพิจารณาตามข้อกำหนดของปริมาณจำกัดของ CAPs ในซอสพริกแล้ว จะเห็นได้ว่ามี 3 ตัวอย่างที่มี CAPs เกิน 50 ppm ( $\mu\text{g/g}$ ) ซึ่งน่าจะถูกจัดเป็นซอสพริกสูตรเผ็ดจัดมาก (hottest hot chili sauce)

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลอง

ซอสพริกมีลักษณะเป็นของเหลวข้น มีส่วนประกอบเป็น กระจะเทียม น้ำตาล เกลือ น้ำส้มสายชู (กรดแอซิติกและน้ำ) น้ำ และพริก ซึ่งส่วนใหญ่เป็นน้ำประมาณ 20-50 เปอร์เซ็นต์ (คิดจากน้ำ+น้ำส้มสายชู) เพื่อความปลอดภัยทางอาหาร สหภาพยุโรป (European Commission) แนะนำว่าในซอสพริกควรมีแคปไซซินอยด์ (CAPs) ไม่เกิน 50 ppm (mg/kg) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้พัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างซอสพริกสำหรับปริมาณวิเคราะห์ CAPs ด้วยเทคนิคไมเซลล์อิเล็กโตรโครมาโตกราฟี (micellar electrokinetic chromatography, MEKC) ที่ได้พัฒนาแล้วจากงานวิจัยในปีที่ 1

ได้ทำการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมสำหรับการสกัดซอสพริกด้วยตัวทำละลายอินทรีย์เพื่อวิเคราะห์ปริมาณ CAPs ด้วยเทคนิค MEKC ได้แก่ ชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้สกัดและผลของการเติมเกลือ จากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการสกัดของเอทิลอะซิเตต (EtOAc) และอะซิโตไนไทรล์ (ACN) ทั้งแบบที่เติมเกลือและไม่เติมเกลือ โดยใช้ซอสพริกเตรียมที่มี CAPs 50 และ 100 ppm ( $\mu\text{g/g}$ ) และตัวอย่างซอสพริกจริง (S1-h45 และ S6-x30) อย่างละ 3 ชุด พบว่าการสกัดตัวอย่างด้วย EtOAc แบบเติมเกลือ ให้ประสิทธิภาพในการสกัด CAPs ดีกว่าการสกัดด้วย ACN เนื่องจาก ACN เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่ละลายน้ำ ในขณะที่ EtOAc เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่ละลายน้ำและไม่มีขั้วมากกว่า ACN ส่วน CAPs เป็นสารที่ละลายน้ำได้น้อยมาก จึงละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้วได้ดีกว่า ดังนั้นการสกัด CAPs จากซอสพริกด้วย EtOAc จึงให้ประสิทธิภาพที่ดีกว่า และการเติมเกลือช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดเนื่องจากผลของ salting-out effect และช่วยแยกชั้นน้ำออกจากตัวทำละลายอินทรีย์ได้ดีขึ้น

ในการศึกษาหาปริมาณเกลือที่เหมาะสมสำหรับการสกัดตัวอย่างซอส โดยใช้ซอสเตรียมที่มี CAPs 100 ppm และซอสพริกจริง S1-h45 เป็นตัวอย่างทดสอบ พบว่าปริมาณของเกลือที่เติมลงไป 0.5 เท่าของน้ำหนักสารตัวอย่าง (เติม anhydrous  $\text{MgSO}_4$  1.0 กรัม และ NaCl 0.25 กรัม) ก็เพียงพอสำหรับการสกัดตัวอย่างซอส 2.5 กรัม และได้ทำการสกัดซอสพริกจริงซ้ำ 2 ครั้งเทียบกับการสกัด 1 ครั้ง พบว่าการสกัดซ้ำ 2 ครั้ง ด้วย EtOAc แบบเติมเกลือ (0.5 เท่าของน้ำหนักซอสพริกจริง) ได้ปริมาณ CAPs เพิ่มขึ้นเล็กน้อยเท่านั้น (เพิ่มน้อยกว่า 4% สำหรับตัวอย่างซอสพริก S1-h45 และเพิ่มน้อยกว่า 2% สำหรับ ตัวอย่างซอสพริก S6-x30) ดังนั้นจึงไม่จำเป็นต้องสกัดซ้ำ 2 ครั้ง เพื่อความสะดวกและประหยัดเวลา

ดังนั้นภาวะการสกัดที่เหมาะสมสำหรับการแยกและวิเคราะห์ CAPs ในตัวอย่างซอสพริกที่ได้พัฒนาขึ้นคือ สกัดตัวอย่างซอสพริก 2.5 กรัม ด้วย EtOAc 10 ml แบบเติมเกลือ (anhydrous  $MgSO_4$  1.0 กรัม และ NaCl 0.25 กรัม) และทำการสกัด 1 ครั้ง

จากการตรวจสอบความเที่ยงของวิธีการสกัดซอสพริก ได้ทำการหาความเที่ยงของการสกัดภายในวัน (intraday precision,  $n = 5$  batch) และต่างวันกัน (interday precision,  $n = 5$  วัน โดยใช้ซอสเตรียมที่มี CAPs ที่ความเข้มข้น 20, 50 และ 100 ppm พบว่า %RSD ของ %Recovery ที่วิเคราะห์ได้แต่ละวันน้อยกว่า 3.7% และ %RSD ของค่าเฉลี่ย %Recovery ทั้ง 5 วัน ( $n = 25$ ) น้อยกว่า 2.5% เช่นกัน แสดงว่ามีความเที่ยงสูงของการสกัดภายในวันและต่างวัน และ %Recovery โดยรวมอยู่ในช่วง 96-105% แสดงว่ามีประสิทธิภาพในการสกัดสูง

จากการประยุกต์เทคนิค MEKC สำหรับปริมาณวิเคราะห์ของ CAPs ในซอสพริกจริง ตัวอย่าง โดยเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น พบว่ามีปริมาณ CAPs ในช่วง 21-128 ppm โดยที่ 3 ตัวอย่างมีปริมาณ CAPs มากกว่า 50 ppm ซึ่งเกินปริมาณจำกัด นอกจากนี้ปริมาณ CAPs ที่วิเคราะห์ได้จากต่างยี่ห้อกัน ไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณพริกที่ระบุไว้ในซอสพริก และระดับความเผ็ดที่ระบุไว้ ดังนั้น MEKC และวิธีการเตรียมตัวอย่างที่พัฒนาขึ้นนี้ จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของการวิเคราะห์ปริมาณ CAPs ในซอสพริก เพื่อควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์และเป็นข้อมูลความปลอดภัยของผู้บริโภคได้

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



### เอกสารอ้างอิง

- นิจศิริ เรืองรังษี. (2534). เครื่องเทศ. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 103-107.
- บัญญัติ สุขศรีงาม. (2527). เครื่องเทศที่ใช้เป็นสมุนไพร เล่ม 1. พิมพ์ครั้งที่ 1. โรงพิมพ์อมรการพิมพ์. กรุงเทพมหานคร. 50-56.
- มูลนิธิโกมลคีมทอง. (2527). สมุนไพรชาวบ้าน. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร. 4-6.
- Altria, K. D. (2000). Background theory and applications of microemulsion electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A* **892**, 171-186.
- Altria, K.D., Clark, B.J. and Mahuzier, P.E. (2000). The effect of operating variables microemulsion electrokinetic capillary chromatography. *Chromatographia* **52**, 758-764.
- Altria, K.D. and Fabre, H. (1995). Approaches to optimization of precision in capillary electrophoresis. *Chromatographia* **40**, 313-320.
- Anastassiades, M., Lehotay, S.J., Stajnbaher, and D. Schenck, F.J. (2003). Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and "Dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International* **86**, 412-431.
- Attuquayefio, V.K. and Buckle, K.A. (1987). Rapid sample preparation method for HPLC analysis of capsaicinoids in Capsicum fruits and oleoresins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **35**, 777-779.
- Aurora-Prado, M. S., Silva, C. A., Tavares, M. F. M., and Altria, K. D. (2004). Determination of folic acid in tablets by microemulsion electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A* **1051**, 291-296.
- Barbero, G.F., Liazid, A., Palma, M. and Barroso, C.G. (2008). Fast determination of capsaicinoids from peppers by high performance liquid chromatography using a reversed phase monolithic column. *Food Chemistry* **107**, 1276-1282.
- Barbero, G.F., Liazid, A., Palma, M. and Barroso, C.G. (2008). Ultrasound-assisted extraction of capsaicinoids from peppers. *Talanta* **75**, 1332-1337.



- Barbero, G.F., Palma, M. and Barroso, C.G. (2006). Determination of capsaicinoids in peppers by microwave-assisted extraction-high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta* **578**, 227-233.
- Barbero, G.F., Palma, M. and Barroso, C.G. (2006). Pressurized liquid extraction of capsaicinoids from peppers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 3231-3236.
- Batchelor, J.D. and Jones, B.T. (2000). Determination of the Scoville heat value for hot sauces and chilies: an HPLC experiment. *Journal of Chemical Education* **77**, 266-267.
- Chang, R. (1991). Chemistry. New York. McGraw-Hill. Inc. p.692.
- Chankvetadze, B. (1997). Capillary Electrophoresis in Chiral Analysis. Chichester. John Wiley and Sons. pp. 5-72.
- Cisneros-Pineda, O. Torres-Tapia L.W., Gutiérrez-Pacheco, L.C. Contreras-Martín, F. González-Estrada, T. and Peraza-Sánchez, S.R. (2007). Capsaicinoids quantification chili pepper cultivated in state of Yucatan, Mexico. *Food Chemistry* **104**, 1755-1760.
- Constant, H., Cordell, G., West, D. and Johnson, J. (1995). Separation and quantification of capsaicinoids using complexation chromatography. *Journal of Natural Products* **58**, 1925-1928.
- Cooper, T.H., Guzinski, J.A. and Fisher, C. (1991). Improved high performance liquid chromatography method for the determination of major capsaicinoids in capsicum oloresin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **39**, 2253-2256.
- Davis, C.B., Markey, C.E., Busch, M.A. and Busch, K.W. (2007). Determination of capsaicinoids in habanero peppers by chemometric analysis of UV spectral data. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 5925-5933.
- Duarte, C., Moldão-Martins, M., Gouveia, A.F., Costa, S.B., Leitão, A.E. and Bernardo-Gil, M.G. (2004). Supercritical fluid extraction of red pepper (*Capsicum frutescens* L.). *The Journal of Supercritical Fluids* **30**, 155-161.
- Gonzalez, A.G., and Herrador, M.A. (2007). A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *Trends in Analytical Chemistry* **26**, 227-238.

- Hawer, W. S., Ha, J., Hwang, J., and Nam, Y. (1994). Effective separation and quantitative analysis of major heat principles in red pepper by capillary gas chromatography. *Food Chemistry* **49**, 99-103.
- Horwitz, W. (1982). Evaluations analytical methods used for regulation of foods and drugs. *Analytical Chemistry* **54**, 67A-76A.
- James, D. and Bradley, T. (2000). Determination of the Scoville heat value for hot sauces and chilies. *Journal of Chemical Education* **77**, 266-267.
- Jurenitsch, J., and Kampelmuhler, I. (1980). Rapid determination of nonylic acid vanillylamide and other capsaicinoids in capsicum fruits and extracts by means of  $\text{Ag}^+$ -complexation high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* **193**, 101-110.
- Jurenitsch, J., and Leinmuller, R. (1980). Quantification of nonylic acid vanillylamide and other capsaicinoids in the pungent principle of capsicum fruits and preparations by gas-liquid chromatography on glass capillary columns. *Journal of Chromatography* **189**, 389-397.
- Kaale, E., Van Schepdael, A., Roets, E., and Hoogmartens, J. (2002). Determination of capsaicinoids in topical cream by liquid-liquid extraction and liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **30**, 1331-1337.
- Kachoosangi, R.T., Wildgoose, G.G. and Compton, R.G. (2008). Carbon nanotube-based electrochemical sensors for quantifying the heat of chilli peppers: the adsorptive stripping voltammetric determination of capsaicin. *The Analyst* **133**, 888-895.
- Kenndler, E. (1998). Dependence of analyte separation on electroosmotic flow in capillary zone electrophoresis: Quantitative description by the reduced mobility. *Journal of Microcolumn Separation* **10**, 273-279.
- Khaledi, M.G. (Ed.). (1998). High Performance Capillary Electrophoresis: Theory Technique and Applications. New York. John Wiley and Sons. Inc., pp. 35-38, 77-78, 330-401, 449-464.
- Klampfl, C.W. (2003). Solvent effects in microemulsion electrokinetic chromatography. *Electrophoresis* **24**, 1537-1543.
- Kozukue, N., Han, J.S., Kozukue, E., Lee, S.J., Kim, J.A., Lee, K.R., Levin, C.E. and Friedman, M. (2005). Analysis of eight capsaicinoids in peppes and pepper-containing foods by high performance liquid chromatography and liquid chromatography mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 9172-9181.

- Kuhr, W.G. (1993). Capillary Electrophoresis. Camilleri, P. (Editor). CRC Press. Boca Raton, p.66.
- Landers, J.P. (1997). Handbook of Capillary Electrophoresis. Edn 2<sup>nd</sup>. CRC Press. Boca Raton.
- Laskaridou-Monnerville, A. (1999). Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin by micellar electrokinetic capillary chromatography and its application to various species of Capsicum, Solanaceae. *Journal of Chromatography A* **838**, 293-302.
- Li, S.F.Y. (1992). Capillary Electrophoresis. Elsevier. Amsterdam. pp. 15-16, 249.
- LopezHernandez, J., OrunaConcha, M., SimalLozano, J., GonzalezCastro, M. and VazquezBlanco, M. (1996). Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in cayenne pepper and padron peppers by HPLC. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* **92**, 393-395.
- Majors, R.E. (2008). QuEChERS—A new technique for multiresidue analysis of pesticides in foods and agricultural samples. *LCGC Asia Pacific* **11**, 1-7.
- Mayer, B.X. (2001). How to increase precision in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **907**, 21-37.
- Morrison, G.H. and Freiser, H. (1962). Solvent Extraction in Analytical Chemistry. John Wiley & Sons, Inc. United States of America. pp 7-8.
- Opinion of the scientific committee on food on capsaicin. 26 February 2002. available on the website at [http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/index\\_en.html](http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/index_en.html). 29 November 2005.
- Patrick, C. (1993). Capillary Electrophoresis: Theory and Practice. Boca Raton. CRC press. pp. 133-161.
- Perucka, I. and Oleszek, W. (2000). Extraction and determination of capsaicinoids in fruit of hot pepper *Capsicum annuum* L. by spectrophotometry and high-performance liquid chromatography. *Food Chemistry* **71**, 287-291.
- Pino, J., Gonzáles, M., Ceballos, L., Centurión-Yah, A.R., Trujillo-Aguirre, J., Latourmerie-Moreno, L. and Sauri-Duch, E. (2007). Characterization of total capsaicinoids, colour and volatile compounds of Habanero chilli pepper (*Capsicum chinense* Jack.) cultivars grown in Yucatan. *Food Chemistry* **104**, 1682-1686.
- Reilly, C.A., Crouch, D.J., Yost, G.S. and Fatah, A.A. (2001). Determination of capsaicin, dihydrocapsaicin and nonivamide in self-defense weapons by liquid chromatography-mass



- spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **912**, 259-267.
- Sato, K., Sasaki, S., Goda, Y., Yamada, T., Nunomura, O., Ishikawa, K. and Maitani, T. (1999). Direct connection of supercritical fluid extraction and supercritical fluid chromatography as a rapid quantitative method for capsaicinoids in placentas of capsicum. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**, 4665-4668.
- Schweiggert, U., Schieber, A. and Carle, R. (2006). Effect of blanching and storage on capsaicinoids stability and peroxidase activity of hot chili peppers (*Capsicum frutescens* L.). *Innovative Food Science and Emerging Technology* **7**, 217-224.
- Schweiggert, U., Carle, R. and Schieber, A. (2006). Characterization of major and minor capsaicinoids and related compounds in chili pods (*Capsicum frutescens* L.) by high performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **557**, 236-244.
- Spicer, J.O. and Almirall, J.R. (2005). Extraction of capsaicins in aerosol defense sprays from fabrics. *Talanta* **67**, 377-382.
- Sticher, O., Soldat, F. and Joshi, R. (1978). High-performance liquid chromatographic separation and quantitative determination of capsaicin, dihydrocapsaicin, nordihydrocapsaicin and homodihydrocapsaicin in natural capsaicinoid mixtures and fructus capsaicin. *Journal of Chromatography* **166**, 211-231.
- Suzuki, T., Kawada, T., and Iwai, K. (1980). Effective separation of capsaicin and its analogues by reversed-phase high-performance thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography* **198**, 217-223.
- Swartz, M.E. and Krull, I.S. (1997). Analytical Method Development and Validation. Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 61-63.
- Teruo, K., Tatsuo, W., Keiko, K., Hisayo, T. and Kazuo, I. (1985). Microdetermination of capsaicin by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography* **329**, 99-105.
- Thomas, B.V., Schreiber, A.A. and Weisskopf, C.P. (1998). Simple method for quantitation of Capsaicinoids in peppers using capillary gas chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**, 2655-2663.



- Thompson, R.Q., Pennino, M.J., Brenner, M.J. and Mehta, M.A. (2006). Isolation of individual capsaicinoids from a mixture and their characterization by  $^{13}\text{C}$  NMR spectrometry. *Talanta* **20**, 315-322.
- Todd, P., Bensinger, M. and Biftu, T. (1975). TLC screening techniques for the qualitative determination of natural and synthetic capsaicinoids. *Journal Chromatographic Science* **13**, 577-579.
- Topuz, A. and Ozdemir, F. (2007). Assessment of carotenoids, capsaicinoids and ascorbic acid composition of some selected pepper cultivars (*Capsicum frutescens* L.) grown in Turkey. *Journal of Food Composition and Analysis* **20**, 596-602.
- Tucker, S. (2001). Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in air in a pickle and pepper processing plant. *AIHAJ*. **62**, 45-48.
- Uquiche, E., Valle, J.M. and Ortiz, J. (2004). Supercritical carbon dioxide extraction of red pepper (*Capsicum frutescens* L.) oleoresin. *Journal of Food Engineering* **65**, 55-66.
- Weaver, K.M. and Awde, D.B. (1986). Rapid high performance liquid chromatography method for the determination of very low capsaicin levels. *Journal of Chromatography* **367**, 438-442.
- Weaver, K.M., Luker, R.G. and Neale, M.E. (1984). Rapid quality control procedure for the determination of Scoville heat units and the detection of chillies in black pepper, via high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* **301**, 288-291.
- Wei, F. and Zhao, Y. (2008). Separation of capsaicin from capsaicinoids by simulated moving bed chromatography. *Journal of Chromatography A* **1187**, 281-284.
- Weinberger, R. (2000). Practical Capillary Electrophoresis. Academic Press. San Diego. p.17.  
www.ops.moc.go.th. 23 November 2008.
- Yao, J., Nair, M. and Chandra, A. (1994). Supercritical carbon-dioxide extraction of scotch bonnet (*Capsicum Annuum*) and quantification of capsaicin and dihydrocapsaicin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **42**, 1303-1305.

## ภาคผนวก

## แผนการดำเนินการวิจัย

	ปี 1						ปี 2-3		
	เดือนที่						2	3	
	2	4	6	8	10	12			
1. การพัฒนาวิธีการแยกและวิเคราะห์แคปไซซิน (CAP) และไดไฮโดรแคปไซซิน (DCAP) โดยใช้สารมาตรฐานและส่วนสกัดพริกเป็นสารทดสอบ (test analyte)	←————→								
1.1 คั้นคว่ำและรวบรวมข้อมูล	←→								
1.2 หากภาวะของ CE แบบ MEKC สำหรับแยกสารมาตรฐานและส่วนสกัดพริก	←→								
1.3 หากภาวะของ CE แบบ MEEKC สำหรับแยกสารมาตรฐานและส่วนสกัดพริก			←→						
1.4 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการ (validation of method)				←→					
1.5 การเปรียบเทียบปริมาณวิเคราะห์จาก MEKC, MEEKC และ HPLC					←→				
1.6 วิเคราะห์ข้อมูลและสรุปผลการทดลอง						←→			
2. การศึกษาและหาวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมตัวอย่าง สำหรับปริมาณวิเคราะห์ CAP และ DCAP							←→		
3. วิเคราะห์และเปรียบเทียบปริมาณ CAP และ DCAP ในตัวอย่างๆ ของผลิตภัณฑ์พริกและอาหารรสเผ็ด								←→	
4. ร่วมมือกับหน่วยงานหรือบริษัทที่ผลิตอาหารรสเผ็ดจัด เพื่อควบคุมคุณภาพของอาหารรสเผ็ด								←→	

←→ แผนงานวิจัยที่ได้ดำเนินการแล้ว

←→→ แผนงานวิจัยตามที่ได้เสนอไว้ในโครงการ

	ปี 1	ปี 2						ปี 3
		เดือนที่						
		2	4	6	8	10	12	
1. การพัฒนาวิธีการแยกและวิเคราะห์แคปไซซิน (CAP) และไดไฮโดรแคปไซซิน (DCAP) โดยใช้สารมาตรฐานและส่วนสกัดพริกเป็นสารทดสอบ	←→							
2. การศึกษาและหาวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมตัวอย่าง สำหรับปริมาณวิเคราะห์ CAP และ DCAP	←→							
2.1 หาชนิดและปริมาณของตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด CAP และ DCAP และการกำจัดเมทริกซ์ในตัวอย่างที่เป็นผลิตภัณฑ์พริก	←→							
2.2 หาความแม่นยำและความเที่ยงของการสกัดด้วยตัวทำละลาย			←→					
2.3 ประยุกต์กับตัวอย่างจริง (ซอสพริก)					←→			
3. วิเคราะห์และเปรียบเทียบปริมาณ CAP และ DCAP ในตัวอย่างของผลิตภัณฑ์พริกและอาหารรสเผ็ด								←→
4. ร่วมมือกับหน่วยงานหรือบริษัทที่ผลิตอาหารรสเผ็ด จัด เพื่อควบคุมคุณภาพของอาหารรสเผ็ด								←→

←→ แผนงานวิจัยตามที่เสนอไว้ในโครงการ

←→ แผนงานวิจัยที่ได้ดำเนินการแล้ว

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย