

# รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ปีที่ 3 (ต.ค. 2551 ถึง ก.ย. 2552)

การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์และการหาปริมาณ

แคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซินในผลิตภัณฑ์พริกและอาหารรสเผ็ด

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

คณะผู้วิจัย

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

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

<sup>1</sup>ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<sup>2</sup>สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุกรรม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยงบประมาณแผ่นดิน ปี 2552

## บทคัดย่อ

ได้ประยุกต์วิธีการเตรียมตัวอย่างและเทคนิคไมเซลลารีโอเล็กโทรไลเนติกโครมาโทกราฟี (MEKC) ที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยก่อนหน้านี้ สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณแคปไซซินอยด์ (CAPs) ในตัวอย่างจริงที่เป็นซอสพริกและเครื่องแกงสำเร็จรูป เมื่อใช้การทดสอบทางสถิติด้วยวิธี paired *t*-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % พบว่าปริมาณของ CAPs ในซอสพริก 9 ตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค MEKC และ HPLC ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ จากการวิเคราะห์ด้วย MEKC ปริมาณ CAPs ที่พบในซอสพริก 22 ตัวอย่าง อยู่ในช่วง 13 ถึง 262 ppm และปริมาณ CAPs ในเครื่องแกงสำเร็จรูป 5 ตัวอย่าง อยู่ในช่วง 41 ถึง 140 ppm โดยที่ซอสพริก 7 ตัวอย่าง และเครื่องแกงสำเร็จรูป 4 ตัวอย่าง มีปริมาณ CAPs มากกว่า 50 ppm (mg/kg) ซึ่งเป็นปริมาณจำกัดที่สหภาพยุโรป แนะนำในอาหารเผ็ดจัด นอกจากนี้ปริมาณ CAPs ที่วิเคราะห์ได้จากต่างยี่ห้อกัน ไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณพริกและระดับความเผ็ดที่ระบุไว้ ดังนั้น MEKC และวิธีการเตรียมตัวอย่างที่พัฒนาขึ้นนี้ จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของการวิเคราะห์ปริมาณ CAPs เพื่อควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์และเป็นข้อมูลความปลอดภัยของผู้บริโภคได้

## Abstract

Capsaicinoids (CAPs) in real samples of chili sauces and chili pastes were determined using sample preparation and micellar electrokinetic chromatography (MEKC) developed in our previous work. Using paired *t*-test analysis at the 95 % confidence interval of the mean, non-significant difference was obtained for the amounts of CAPs in 9 samples of chili sauces determined by MEKC and HPLC. The amounts of CAPs were found to be 13-262 ppm in 22 chili sauces samples and 41-140 ppm in 5 chili pastes samples. It should be noted that 7 chili sauce samples and 4 chili paste samples contain CAPs higher than 50 ppm that is the limit level recommended by European Commission. In addition, the determined CAPs in different brands of chili sauces and chili pastes are neither correlated with their chili content nor hot degree labeled on each product. Therefore, this developed MEKC method may be used as an alternative method for determination of CAPs in chili sauces and chili pastes for quality control and health safety.

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี โดยได้รับการสนับสนุน คำแนะนำและความช่วยเหลือจากบุคคลและหน่วยงาน ดังต่อไปนี้

ขอขอบพระคุณอย่างยิ่งสำหรับแหล่งเงินทุนสนับสนุนจาก “โครงการวิจัยนวัตกรรมเพื่อยกระดับคุณภาพและความปลอดภัยทางอาหารสู่โครงสร้างเศรษฐกิจใหม่ ปีงบประมาณ 2552” และสถานที่ทำวิจัย และเครื่องมือจากภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบคุณลูกศิษย์นิสิตปริญญาโทและเอก ในกลุ่มวิจัยที่มีส่วนช่วยเหลือในผลงานวิจัย และรายงานวิจัยฉบับนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดาและพี่น้องทุกคนเป็นอย่างสูง ที่เป็นกำลังใจตลอดเวลาในการทำงานวิจัยนี้

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
Abstract	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญรูป	จ
สารบัญตาราง	ฉ
สัญลักษณ์และคำย่อ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทฤษฎี	10
บทที่ 3 การทดลอง	22
บทที่ 4 ผลการทดลองและการวิจารณ์	28
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	40
เอกสารอ้างอิง	41
ภาคผนวก	47

## สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1.1	สูตรโครงสร้างของแคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซิน	1
2.1	ส่วนประกอบอย่างง่ายของเครื่อง CE	10
2.2	Electroosmotic flow (EOF)	13
2.3	ลักษณะการไหลของสารและรูปร่างของพีกใน CE	15
2.4	สารลดแรงตึงผิวและไมเซลล์	16
2.5	ลักษณะการเคลื่อนที่ของสารในเทคนิค MEKC โดยใช้เฟออร์ภาวะที่เป็นเบส	17
3.1	แผนผังการเตรียมตัวอย่าง	27
4.1	กราฟมาตรฐานสำหรับปริมาณวิเคราะห์ของ a) แคปไซซิน และ b) ไดไฮโดรแคปไซซิน ด้วย MEKC	30
4.2	กราฟมาตรฐานสำหรับปริมาณวิเคราะห์ของ a) แคปไซซิน และ b) ไดไฮโดรแคปไซซิน ด้วย HPLC	30
4.3	กราฟแสดงการเปรียบเทียบปริมาณที่วิเคราะห์ได้ของ CAP และ DCAP ในตัวอย่างซอสพริก ระหว่าง MEKC และ HPLC	32
4.4	อิเล็กโทรฟีโรแกรมของตัวอย่างซอสพริกจริงบางตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์ปริมาณ	33
4.5	ความสัมพันธ์ของปริมาณ CAPs และปริมาณของพริกในตัวอย่างซอสพริก	35
4.6	อิเล็กโทรฟีโรแกรมของตัวอย่างเครื่องแกงน้ำพริกแกงส้ม และแบลิ่งค์ของเครื่องแกงน้ำพริกแกงส้มที่ทำการวิเคราะห์ปริมาณ	37
4.7	MEKC อิเล็กโทรฟีโรแกรมของเครื่องแกงสำเร็จรูปชนิดต่างๆ	38

## สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1.1	ข้อกำหนดปริมาณแคปไซซินอยค์ในอาหารประเภทต่างๆ	2
1.2	มูลค่าการส่งออกของซอสพริกและเครื่องแกง	2
1.3	ชนิดของตัวอย่างและเทคนิคการเตรียมตัวอย่างที่ผ่านมา	5
3.1	ตัวอย่างซอสพริกจริงที่ใช้ในการศึกษา	25
3.2	ตัวอย่างเครื่องแกงสำเร็จรูปจริงที่ใช้ในการศึกษา	25
4.1	ปริมาณวิเคราะห์ของแคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซินแต่ละตัวอย่างซอสพริกใน MEKC และ HPLC (แต่ละตัวอย่างทำการฉีดซ้ำ 3 ครั้ง)	31
4.2	ปริมาณของแคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซินในตัวอย่างซอสพริก	34
4.3	ปริมาณของแคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซินในตัวอย่างเครื่องแกงสำเร็จรูป	38

## 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
$C_{org}$	ความเข้มข้นของสารในเฟสตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent)
$C_s$	ความเข้มข้นของสารในเฟสตัวอย่าง (sample)
$d$	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของกะพิลลารี
$e$	ประจุของอิเล็กตรอน ( $1.6 \times 10^{-19}$ คูโลมบ์)
$E$	ความเข้มของสนามไฟฟ้า (electric field strength)
$E$	ประสิทธิภาพของการสกัด (extraction efficiency)
$f$	จำนวนเท่าที่เจือจางสารละลายพริกตัวอย่างจากเริ่มต้น (dilution factor)
$I$	ความแรงไอออนิก (ionic strength)
$k$	รีเทนชันแฟกเตอร์ (retention factor)
$K$	ค่าคงที่ของการกระจาย (distribution constant)
$K_d$	สัมประสิทธิ์ของการกระจาย (distribution coefficient)
$l$	ความยาวจากปลายกะพิลลารีด้านที่บรรจุสารจนถึงเครื่องตรวจวัด
$L$	ความยาวทั้งหมดของกะพิลลารี
$P$	สัมประสิทธิ์ของการแบ่งส่วน (partition coefficient)
$Q$	ปริมาณแคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซินที่มีอยู่ในตัวอย่างในหน่วย g/kg



$r_h$	รัศมีไฮโดรไดนามิกของไอออน (hydrodynamic radius of ion) ซึ่งเป็นรัศมีของไอออนที่มีโมเลกุลของน้ำล้อมรอบขณะที่ไอออนเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้า
$R$	recovery
$R_s$	ค่าการแยกของสาร (resolution)
$S/N$	อัตราส่วนของสัญญาณตรวจต่อสัญญาณรบกวน (signal-to-noise ratio)
$t_{eo}$	ไมเกรชันไทม์ของ EOF marker
$t_{inj}$	injection time
$t_m$	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
$V_{org}$	ปริมาตรของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในการสกัด
$V_s$	ปริมาตรของตัวอย่างที่นำมาสกัด
$W_{org}$	ปริมาณสารในเฟสตัวทำละลายอินทรีย์
$W_0$	ปริมาณสารเริ่มต้น
$z$	ประจุบนไอออน (electronic charge)
ACN	อะซิโตไนไทรล์ (acetonitrile)
BGE	background electrolyte
CAP	แคปไซซิน
CAPs	แคปไซซินอยด์
CE	capillary electrophoresis
CMC	critical micellar concentration
DCAP	ไดไฮโดรแคปไซซิน
EOF	electroosmotic flow
EtOAc	เอทิลอะซิเตต (ethyl acetate)
GC	gas chromatography
HPLC	ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิด โครมาโทกราฟี (high performance liquid chromatography)
ISTD	internal standard

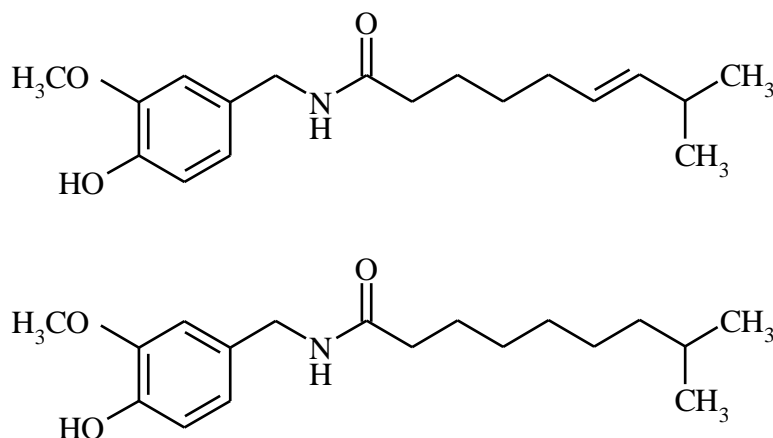
LOD	ขีดจำกัดของการตรวจวัด (limit of detection)
LOQ	ขีดจำกัดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (limit of quantitation)
MEKC	micellar electrokinetic chromatography
MEEKC	microemulsion electrokinetic chromatography
ppm	1 ล้านในล้านส่วน (part per million)
RSD	ค่าส่วนเบี่ยงเบนสัมพัทธ์ (relative standard deviation)
SDS	โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต
SFC	ซูเปอร์คริติคัลฟลูอิดโครมาโทกราฟี (supercritical fluid chromatography)
SFE	supercritical fluid extraction
SPE	solid-phase extraction
SPME	solid-phase microextraction
SQL	ขีดจำกัดของปริมาณวิเคราะห์ของตัวอย่าง (sample quantitation limit)
TLC	ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (thin-layer chromatography)

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

“พริก” เป็นพืชที่มีคุณค่าทางอาหารและยา มีสี รสชาติที่ไม่อาจใช้ผลผลิตจากพืชอื่น ๆ ทดแทนได้ จึงทำให้พริกเป็นพืชผักที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่ง โดยพริกมีกลุ่มสารที่สำคัญที่ทำให้มีรสเผ็ดร้อนและมีกลิ่นฉุน คือ แคปไซซินอยด์ (capsaicinoids, CAPs) โดยองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นแคปไซซิน (capsaicin, CAP) และไดไฮโดรแคปไซซิน (dihydrocapsaicin, DCAP) สูตรโครงสร้างดังรูปที่ 1 ในอัตราส่วน 1:1 ถึง 1:2 ส่วนสารแคปไซซินอยด์อื่นๆ มีในปริมาณน้อย สารเหล่านี้พบมากที่ผนังชั้นในและรกของพริก [บัญญัติ: 2527] แคปไซซินเป็นสารที่มีฤทธิ์ระคายเคืองผิวหนัง ช่วยบรรเทาอาการเจ็บปวดและป้องกันการอักเสบ ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย [มูลนิธิโกมลคีมทอง: 2527] กระตุ้นการทำงานของกระเพาะอาหารให้หลังกรดเกลือเพิ่มมากขึ้น ทำให้อัตราการหายใจ การเต้นของชีพจรและความดันโลหิตเพิ่มขึ้น ทำให้ระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดลดลงได้ แต่พบว่าพริกทำให้เกิดเนื้องอกในตับได้ด้วย [นิจศิริ: 2534]



รูปที่ 1.1 สูตรโครงสร้างของแคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซิน

ได้มีรายงานว่าคนอินเดีย ไทยและเม็กซิกัน นิยมบริโภคอาหารรสเผ็ด คิดเป็นแคปไซซิน 25 ถึง 200 mg/คน/วัน ในขณะที่คนอเมริกาและในยุโรปบริโภคอาหารรสเผ็ด คิดเป็นแคปไซซินประมาณ 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 แต่เพื่อความปลอดภัย คณะกรรมการให้ความเห็นของข้อจำกัดของแคปไซซินอยด์ ซึ่งคิดเป็นแคปไซซินในอาหารรสเผ็ด ดังตารางที่ 1.1 [[http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/index\\_en.html](http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/index_en.html)]

อาหารไทยส่วนใหญ่มีพริกเป็นส่วนประกอบ รวมทั้งเป็นองค์ประกอบในเครื่องปรุงรส เช่น ซอสพริกและเครื่องแกงสำเร็จรูปต่างๆ จากข้อมูลของสถาบันอาหารรายงานว่าในปี 2547 จนถึง 2552 มีมูลค่าการส่งออกรวมของซอสพริกและเครื่องแกงเป็นมูลค่าหลายพันล้านบาท แสดง ดังตารางที่ 1.2 [<http://www2.ops3.moc.go.th/menucomth>]

#### ตารางที่ 1.1 ข้อกำหนดปริมาณแคปไซซินอยด์ในอาหารประเภทต่างๆ

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

#### ตารางที่ 1.2 มูลค่าการส่งออกของซอสพริกและเครื่องแกง

ปี	2547	2548	2549	2550	2551	2552 (ม.ค.-ต.ค.)
มูลค่า (พันล้านบาท)	1.57	1.83	1.94	1.74	2.06	1.79

จากนโยบายรัฐบาลในปี 2547 ที่สนับสนุนโครงการครัวไทยสู่ครัวโลก ทำให้มูลค่าการส่งออกของผลิตภัณฑ์เครื่องปรุงรสและสมุนไพร เพิ่มขึ้นร้อยละ 20.1 โดยตลาดที่สำคัญของไทย ได้แก่ ยุโรป อเมริกา ญี่ปุ่น ออสเตรเลียและประเทศอื่นๆ เครื่องแกงสำเร็จรูปเป็นลักษณะเฉพาะของอาหารไทย จึงจัดได้ว่าประเทศไทยต้องแข่งขันกับตัวเองในด้านคุณภาพและความปลอดภัยของเครื่องแกงสำเร็จรูป ในโลกของเศรษฐกิจยุคใหม่จำเป็นต้องตระหนักถึงข้อกำหนดขององค์ประกอบของสารต่างๆ ในอาหาร แม้ว่าในปัจจุบันยังไม่มีข้อกำหนดของการติดฉลากระบุปริมาณแคปไซซินอยด์ในอาหาร แต่มีแนวโน้มว่าองค์การอาหารและยาของอเมริกาและยุโรปจะมีข้อกำหนดดังกล่าว เพื่อความปลอดภัยและสุขภาพของประชาชน ดังนั้นการพัฒนาวิธีการแยกและตรวจวิเคราะห์หา

ปริมาณแคปไซซินอยด์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งแคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซินในผลิตภัณฑ์พริก และอาหารรสเผ็ดเป็นสิ่งที่จำเป็น แม้ว่าจะมีวิธียมาตรฐานของการวิเคราะห์สารดังกล่าวในพริกและ ส่วนสกัดของพริก แต่วิธีการแยกและวิเคราะห์รวมทั้งวิธีการเตรียมตัวอย่างที่รวดเร็วและมี ประสิทธิภาพเป็นสิ่งที่จำเป็น โดยเฉพาะอาหารประเภทแกงต่างๆ ของไทยหรืออาหารไทยอื่นๆ ซึ่ง จัดว่าเป็นตัวอย่างที่มีความซับซ้อนมากกว่าส่วนสกัดของพริก และประเทศไทยน่าจะเป็นผู้ริเริ่ม พัฒนาวิธีการวิเคราะห์สารเหล่านี้ในอาหาร หากมีการกำหนดการติดฉลากระบุปริมาณแคปไซซิน ในอาหารดังกล่าว และประเทศไทยยังไม่มีวิธียมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์ จะทำให้สูญเสีย รายได้ส่งออกหลายร้อยล้านบาทได้ มีผลกระทบกับการส่งออก ผู้ผลิตอาหารรสเผ็ดและเกษตรกรที่ ปลูกพริกได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะพัฒนาวิธีเตรียมตัวอย่าง วิธีการแยกและวิเคราะห์ ปริมาณแคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซินในพริก ส่วนสกัดพริก ผลิตภัณฑ์พริก (เช่น เครื่องแกง และเครื่องปรุงต่างๆ) อาหารเสริมที่มีพริกเป็นองค์ประกอบ และอาหารรสเผ็ดต่างๆ (เช่น แกง ผัด พริกและต้มยำ)

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

## 1.2 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

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

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC ทำได้โดยการ bromination สารที่จะวิเคราะห์ก่อน [Todd *et al.*: 1975, Suzuki *et al.*: 1980, Perucka and Oleszek: 2000] เพื่อให้เกิดการแยกของสารต่างๆ แต่ อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพการแยกไม่ค่อยดีนักและใช้ระยะเวลาานาน ส่วนเทคนิค GC นั้นเนื่องจาก แคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซินเป็นสารที่กลายเป็นไอได้ยาก จึงต้องมีการเตรียมให้อยู่ในรูป

อนุพันธ์ของสารที่กลายเป็นไอได้ง่าย เช่น อนุพันธ์เมทิลเอสเทอร์ [Jurenitsch and Kampelmuhler: 1980, Hawer *et al.*: 1994, Thomas *et al.*: 1998, Spicer and Almirall: 2005, Pino *et al.*: 2007]

เทคนิคที่ใช้ทั่วไปในการแยกและวิเคราะห์หาปริมาณแคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซิน คือ เทคนิค HPLC ซึ่งส่วนใหญ่จะใช้คอลัมน์เป็น reversed phase-HPLC โดยมีเฟสเคลื่อนที่เป็น สารละลายผสม ได้แก่ เมทานอล:น้ำ [Sticher *et al.*: 1978, LopezHernandez *et al.*: 1996] น้ำ:อะซิโตน ไนโตรล:กรดฟอสฟอริก [James and Bradley: 2000], น้ำ:อะซิโตน ไนโตรล [Yao *et al.*: 1994], potassium dihydrogenphosphate:อะซิโตน ไนโตรล [Teruo *et al.*: 1985], เมทานอล:น้ำ:อะซิโตน ไนโตรล:กรดอะซีติก [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

งานวิจัยที่ผ่านมานั้นเกี่ยวข้องกับกระบวนการวิเคราะห์หาปริมาณแคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซินในตัวอย่างพริก (ทั้งพริกสดและพริกแห้ง) ส่วนสกัดพริก (capsicum oleoresin) รวมทั้งผลิตภัณฑ์ที่มีพริกเป็นส่วนประกอบ เช่น สเปรย์พริก ขานวด ซอสพริก 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> : 2006a, 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	สกัดด้วยตัวทำละลาย อะซิโตน: petroleum ether	Perucka and Oleszek: 2000
	GC, GC/MS	สกัดด้วยตัวทำละลายอะซิโตนไนไตรล์	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> : 2006b, Barbero <i>et. al.</i> : 2008a
	HPLC	microwave-assisted extraction เอทานอล	Barbero <i>et. al.</i> : 2006a
	HPLC	SPE ด้วยเมทานอล	Thompson <i>et. al.</i> : 2006
	HPLC	SFE ด้วย <i>n</i> -hexane	Duarte <i>et. al.</i> : 2004
	พริกแห้ง	HPLC	สกัดด้วยตัวทำละลายอะซิโตน
HPLC		สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล	Weaver and Awde: 1986, Batchelor and Jones: 2000
พริก	HPLC	ultrasound-assisted extraction ด้วยเมทานอล	Barbero <i>et. al.</i> : 2008b
	GC	magnetic stirring ด้วยอะซิโตน	Thomas <i>et. al.</i> : 1998
	HPLC	magnetic stirring ด้วยเอทานอล	Davis <i>et. al.</i> : 2007
พริกและส่วน สกัดพริก	HPLC	SPE ด้วยอะซิโตนไนไตรล์ 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 ด้วยเอทิลอะซิเตต	Spicer and Almirall: 2005

พริก ซอสพริก และอาหารเผ็ด	HPLC, LC-MS	สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล	Kozukue <i>et. al.</i> : 2005
ซอสพริก	HPLC	สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล	Batchelor and Jones: 2000
	voltammetry	สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล	Kachosangi <i>et. al.</i> : 2008
ยานวด	LC	สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน	Kaale <i>et. al.</i> : 2002

จะเห็นว่าการวิเคราะห์หาปริมาณแคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซินในตัวอย่างส่วนใหญ่ที่มักจะวิเคราะห์กับตัวอย่างพริกไม่ว่าจะเป็นพริกสด หรือพริกแห้ง อีกทั้งวิธีการเตรียมตัวอย่างส่วนใหญ่ก็มักจะใช้วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย ซึ่งตัวทำละลายที่ใช้กันได้แก่ เอทานอล [Kachosangi *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:ปิโตรเลียมอีเทอร์ [Perucka and Oleszek: 2000], เฮกเซน [Kaale *et. al.*: 2002] เอทิลอะซิเตต [Suzuki *et. al.*: 1980, Schweiggert *et. al.*: 2006b], ไดเอทิลอีเทอร์ [Wei and Zhao: 2008], อะซิโตนไทรล์ [Attuquayefio and Buckle: 1987, Topuz and Ozdemir: 2007, Pino *et. al.*: 2007] แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้ยังอาจต้องการขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างแบบ SPE แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC [Attuquayefio and Buckle: 1987, Cooper *et. al.*: 1991] หรือนำไปผ่านขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างแบบ SPE ก่อนการวิเคราะห์ด้วย CE [Laskaridou-Monnerville: 1999] ซึ่งยังไม่เข้าใจเหตุผลที่ชัดเจน อาจเป็นไปได้ว่าภาวะของ CE ที่เลือกใช้ไม่เหมาะสมต่อการแยกสารที่สนใจออกจากเมทริกซ์ตัวอย่าง หรือการตกตะกอนของเมทริกซ์เนื่องจากความไม่เหมาะสมของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้

จากการสืบค้นข้อมูลพบว่าการวิเคราะห์หาปริมาณแคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซินในตัวอย่างซอสพริกมีการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC [Batchelor and Jones: 2000, Kozukue *et. al.*: 2005] และเทคนิคโวลแทมเมทรี [Kachosangi *et. al.*: 2008] ในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างนั้นจะทำการสกัดด้วยตัวทำละลายก่อน ยกตัวอย่างเช่น สกัดตัวอย่างซอสด้วยเอทานอล จากนั้นนำไปต้มและกวนเป็นเวลา 30 นาที แล้วปล่อยให้ไวให้เย็น [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



นาที่ แล้ว centrifuge ที่อุณหภูมิ 1 °C เป็นเวลา 10 นาที แม้ว่าวิธีการวิเคราะห์ปริมาณด้วยเครื่องมือทางโวลแทมเมทรีจะจัดว่าให้ผลการวิเคราะห์ที่รวดเร็ว แต่ต้องผ่านขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างที่ใช้เวลานานถึง 2.5 ชั่วโมง [Kachooosangi *et. al.*: 2008] ซึ่งนานกว่าการแยกและการวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือ HPLC และ CE ถึงอย่างไรก็ตามการใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายในการสกัดก็ยังมีข้อด้อยอยู่คือ ต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในปริมาณมาก อีกทั้งเอทานอลยังมีราคาแพงเมื่อเทียบกับตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดอื่นที่ใช้ในการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ทั่วไป นอกจากนี้เมทานอลและเอทานอลเป็นตัวทำละลายที่สามารถละลายน้ำได้ และซอสพริกมีน้ำเป็นส่วนประกอบประมาณ 50% น้ำอาจมีผลทำให้ประสิทธิภาพในการสกัดลดลง ดังนั้นงานวิจัยก่อนหน้านี้อาจใช้เวลาในการสกัดนานหรือเพิ่มความร้อนเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัด นอกจากนี้ปริมาตรของส่วนสกัดจะเป็นปริมาตรรวมของตัวทำละลายที่ละลายน้ำได้รวมกับปริมาตรของน้ำ ดังนั้นปริมาตรของส่วนสกัดจะเพิ่มขึ้นตามปริมาตรของน้ำ หากนำส่วนสกัดไปวิเคราะห์โดยตรง ความเข้มข้นของสารในส่วนสกัดจะน้อยกว่าความเป็นจริง เมื่อคำนวณเป็นปริมาณสารในตัวอย่างซอสพริก ค่าที่ได้จะน้อยกว่าความเป็นจริงเช่นกัน ดังนั้นการเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณแคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซินหรือแคปไซซินอยด์ควรจะทำให้ถูกต้องและเป็นที่ยอมรับ

### 1.3 ทฤษฎี สมมุติฐาน หรือกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย

โครงการวิจัยนี้ในปีที่ 1 และ 2 ได้ทำการพัฒนาเทคนิค CE สำหรับแยกและวิเคราะห์แคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซิน และเปรียบเทียบ CE และ HPLC สำหรับปริมาณวิเคราะห์ของแคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซินในตัวอย่างส่วนสกัดพริก และทำการพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างสำหรับปริมาณวิเคราะห์แคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซินในตัวอย่างซอสพริก ส่วนในปีที่ 3 นี้จะเป็นการประยุกต์ใช้กับตัวอย่างซอสพริกเพิ่มเติมจากปีที่ 2 และตัวอย่างเครื่องแกงสำเร็จรูป

จากรายงานวิจัยที่ผ่านมาในปีที่ 1 ได้พัฒนาไมเซลล์าร์อีเล็กโตรไลต์โครมาโทกราฟี (MEKC) เป็นวิธีสำหรับปริมาณวิเคราะห์ของแคปไซซิน (CAP) และไดไฮโดรแคปไซซิน (DCAP) เมื่อนำไปประยุกต์กับตัวอย่างที่เป็นส่วนสกัดพริก พบว่าปริมาณรวมของ CAP และ DCAP ที่วิเคราะห์ได้มีค่าใกล้เคียงกับที่รายงานด้วยไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี โดยที่ MEKC ที่พัฒนาขึ้นมีข้อดี คือ มีความเที่ยงและความแม่นยำสูง และไม่จำเป็นต้องมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างที่ยุ่งยาก ยกเว้นการเจือจางและการกรอง

จากงานวิจัยในปีที่ 2 เป็นการประยุกต์กับตัวอย่างที่เป็นซอสพริก โดยที่ส่วนประกอบหลักในซอสพริก ได้แก่ กระเทียม น้ำตาล เกลือ น้ำส้มสายชู (กรดแอซิติกและน้ำ) น้ำ พริก ซึ่งส่วนใหญ่เป็นน้ำประมาณ 20-50 เปอร์เซ็นต์ (คิดจากน้ำ+น้ำส้มสายชู) เพื่อความปลอดภัยทางอาหาร สหภาพยุโรป (European Commission) แนะนำว่าในซอสพริกควรมีแคปไซซินอยด์ (CAPs) ไม่เกิน 50 ppm

(mg/kg) โดยในปีที่ 2 ได้พัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างซอสพริกสำหรับปริมาณวิเคราะห์ CAPs ในตัวอย่างซอสพริก 8 ตัวอย่าง คือทำการสกัดตัวอย่างซอสพริก 2.5 กรัม ด้วย EtOAc 10 ml แบบเติมเกลือ (anhydrous  $MgSO_4$  1.0 กรัม และ NaCl 0.25 กรัม) และทำการสกัด 1 ครั้ง จากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณ CAPs ด้วย MEKC ที่ได้พัฒนาขึ้นในปีที่ 1 ซึ่งวิธีการเตรียมตัวอย่างที่ได้พัฒนาขึ้นนี้มีขั้นตอนที่ไม่ยุ่งยาก ใช้ปริมาณตัวอย่างและปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์ในปริมาณน้อย และใช้เวลาในการเตรียมตัวอย่างน้อย

ดังนั้นเทคนิค CE แบบ MEKC น่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของการวิเคราะห์หาปริมาณแคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซินในตัวอย่างซอสพริก และอาหารรสเผ็ด ซึ่งคาดว่าตัวอย่างต่างๆ กันจะมีปริมาณของสารดังกล่าวแตกต่างกันและหากมีการระบุหรือติดตามปริมาณของสารในตัวอย่างดังกล่าวจะเป็นประโยชน์กับผู้ผลิตอาหารและผู้บริโภค

#### 1.4 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 1) พัฒนาเทคนิคอะนาลิติกัลโครมาโตกราฟีสำหรับแยกและวิเคราะห์แคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซิน
- 2) เปรียบเทียบอะนาลิติกัลโครมาโตกราฟีและไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟีสำหรับปริมาณวิเคราะห์ของแคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซิน
- 3) พัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างสำหรับปริมาณวิเคราะห์แคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซินในผลิตภัณฑ์พริกและอาหารรสเผ็ด
- 4) ประยุกต์เทคนิคที่พัฒนาขึ้นสำหรับวิเคราะห์และเปรียบเทียบปริมาณแคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซินในตัวอย่างผลิตภัณฑ์พริกและอาหารรสเผ็ดต่างๆ

สำหรับงานวิจัยปีที่ 3 ในรายงานนี้ ตามวัตถุประสงค์ที่ 4) ส่วนวัตถุประสงค์ที่ 1), 2) และ 3) ได้ทำสำเร็จแล้วในปีที่ 1 และ 2

#### 1.5 ขอบเขตของโครงการวิจัย

งานวิจัยนี้แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน ขั้นตอนแรก (ที่ผ่านมาในปีที่ 1) 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 ที่ผ่านมา) เป็นการศึกษาและหาวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมตัวอย่างสำหรับปริมาณวิเคราะห์แคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซิน โดยประกอบด้วยการสกัดด้วยตัวทำละลาย (organic extraction) และ SPE โดยเป็นการหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดและการชะใน SPE ตัวอย่างที่ใช้ได้แก่ พริก ผลิตรักข์พริก (เครื่องแกงและเครื่องปรุงต่างๆ) อาหารเสริม อาหารรสเผ็ด (แกงผัดพริกและต้มยำ เป็นต้น) เปรียบเทียบการวิเคราะห์ตัวอย่างแบบที่ผ่านและไม่ผ่าน SPE

ขั้นตอนที่ 3 (ปีที่ 3 ในรายงานนี้) ดำรง วิเคราะห์และเปรียบเทียบปริมาณแคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซินในตัวอย่างของผลิตรักข์พริกและอาหารรสเผ็ด และจัดกลุ่มของอาหาร โดยใช้หลักเกณฑ์ของ European Commission

## 1.6 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

ได้วิธีการของกะปิลาริโอเล็ก โทรฟอริซิสสำหรับปริมาณวิเคราะห์ของแคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซินในซอสพริกและเครื่องแกงสำเร็จรูป เพื่อที่จะนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ในการอ้างอิงปริมาณของสารทั้งสองในผลิตรักข์พริกและอาหารรสเผ็ดต่างๆ รวมถึงการนำไปใช้เป็นวิธีการตรวจสอบคุณภาพของผลิตรักข์ได้

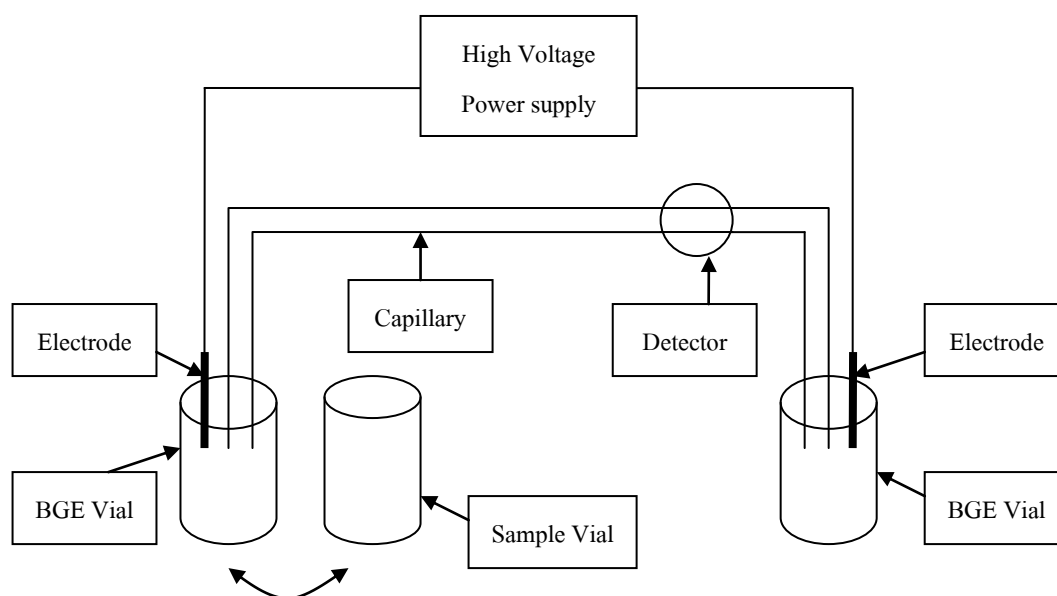
## บทที่ 2

### ทฤษฎี

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

กะพิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส (capillary electrophoresis, CE) เป็นเทคนิคที่มีการแยกสารภายใต้อิทธิพลของสนามไฟฟ้าในหลอดกะพิลลารีที่บรรจุสารละลายอิเล็กโทรไลต์ หลักการแยกสารอาศัยความแตกต่างของความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้า (electrophoretic mobility,  $\mu$ ) ซึ่งขึ้นอยู่กับความแตกต่างของอัตราส่วนของค่าประจุต่อขนาดของไอออน

#### 2.2 ส่วนประกอบของเครื่อง CE



รูปที่ 2.1 ส่วนประกอบอย่างง่ายของเครื่อง CE: คัดแปลงจาก [Weinberger: 2000]

##### 1) คะพิลลารี (capillary)

กะพิลลารีที่ใช้ทั่วไปในปัจจุบันเป็น 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) ภายนอกของกะพิลลารีเคลือบด้วยพอลิเอไมด์เพื่อป้องกันการแตกหักของกะพิลลารี และลอกพอลิเอไมด์ออกเฉพาะตรงบริเวณตรวจวัดในกรณีที่ใช้เครื่องตรวจวัดประเภทแสง เช่น ยูวี-วิสิเบิล (UV-visible) หรือ ฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescence)

## 2) เครื่องกำเนิดศักย์ไฟฟ้า (voltage supply)

เครื่องกำเนิดศักย์ไฟฟ้ากระแสตรงที่ให้ค่าต่างศักย์ -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 อะซิเตต หรือ บอเรต 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  $m^2 V^{-1} s^{-1}$  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  $\text{mol l}^{-1}$ ) ของสารละลายอิเล็กโทรไลต์มีค่าใกล้เคียงเรียกความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้านี้ว่า 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  $\alpha$

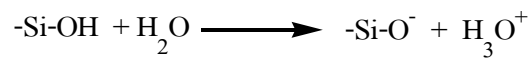
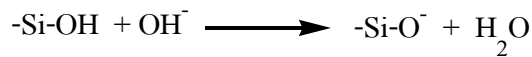
4) ผลของตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) โดยทั่วไปเมื่อเติมตัวทำละลายอินทรีย์เพิ่มขึ้นจะทำให้ค่า  $\mu$  ลดลง แล้วเมื่อเติมตัวทำละลายอินทรีย์เพิ่มจนถึงปริมาณหนึ่งค่า  $\mu$  จะเพิ่มขึ้นได้

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

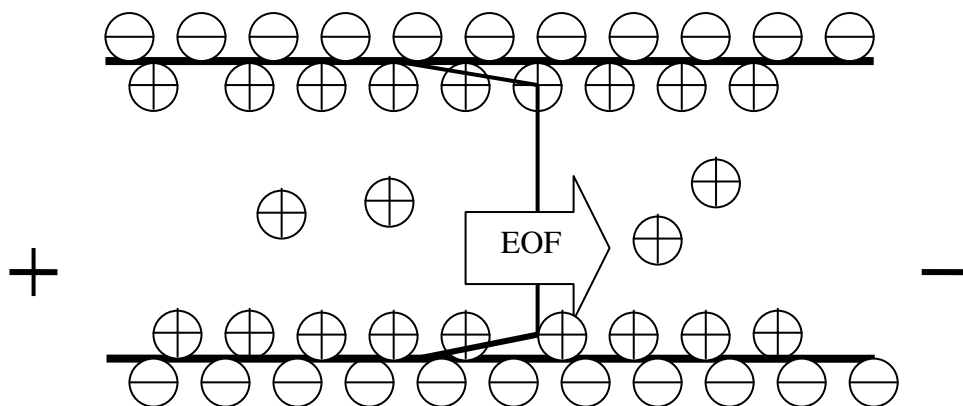
## 2.4 อิเล็กโทรออสโมซิส (electroosmosis)

### 2.4.1 การเกิดอิเล็กโทรออสโมซิส

ที่ผิวด้านในของกะพิลลารีประกอบด้วยหมู่ซิลานอล (-Si-OH) เมื่อสัมผัสกับสารละลายอิเล็กโทรไลต์หรือบัฟเฟอร์ที่มี  $\text{pH} > 2$  จะเกิดการไอออนไนซ์ขึ้น ทำให้ผิวด้านในของกะพิลลารีมีประจุลบ (-Si-O<sup>-</sup>) ดังสมการ



การไอออนไนซ์ดังกล่าวทำให้เกิด  $\text{H}^+$  กระจายอยู่ในสารละลายหรือรวมกับ  $\text{OH}^-$  เกิดเป็นโมเลกุลของน้ำ แคทไอออนจากสารละลายอิเล็กโทรไลต์ในกะพิลลารีจะเกิดเป็น double electric layer ขึ้นดังรูปที่ 2.2 โดยมีปริมาณแคทไอออนในสารละลายมากกว่าแอนไอออนจำนวนมาก แคทไอออนบางส่วนจะติดอยู่ที่ผิวของกะพิลลารี เกิดเป็น stern layer ซึ่งจะไม่เคลื่อนที่เนื่องจากอิทธิพลของไฟฟ้าสถิต (electrostatic force) และ/หรือ แรงแวนเดอร์วาลส์ (Van der Waals force) แคทไอออนบางส่วนจะกระจายอยู่ในสารละลาย เรียกว่า diffusion layer และไอออนบวกที่เหลือจะอยู่ใน bulk solution เมื่อให้ศักย์ไฟฟ้าที่ปลายทั้งสองข้างของกะพิลลารี (โดยปลายด้านเครื่องตรวจจับเป็นขั้วแคโทดหรือขั้วลบ) ไอออนบวกในสารละลาย ซึ่งมีจำนวนมากกว่าไอออนลบจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วลบ และพาเอาโมเลกุลของน้ำหรือตัวทำละลายที่ล้อมรอบไอออนบวกเคลื่อนที่ไปด้วย เรียกปรากฏการณ์ของการเคลื่อนที่ของน้ำหรือสารละลายนี้ว่า อิเล็กโทรออสโมซิส (electroosmosis) และเรียกการเคลื่อนที่ของน้ำหรือตัวทำละลายว่า electroosmotic flow (EOF)



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

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

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

$\varepsilon$  คือ permittivity ของตัวกลาง

$\zeta$  คือ ค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า

#### 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 ด้วยเหตุนี้ฟังก์ชันของสารใน 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 จะทำให้การไอออนไนซ์ของหมู่ซิลานอลบริเวณผิวคะพิลลารีลดลง 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 เช่นเดียวกันกับค่า  $\mu$





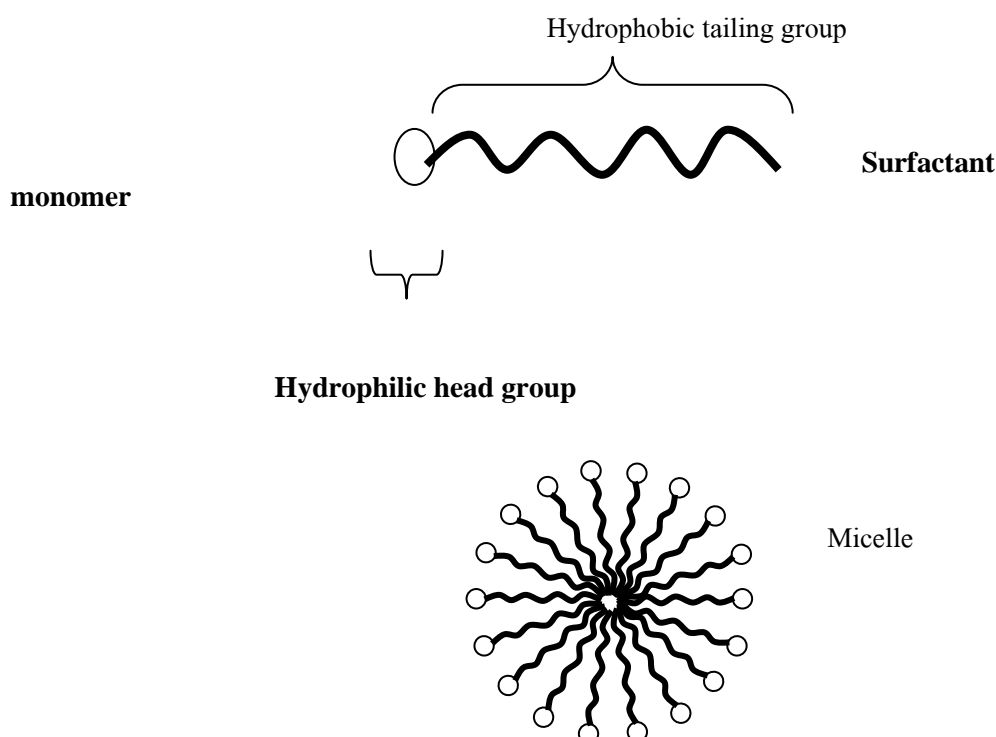
รูปที่ 2.3 ลักษณะการไหลของสารและรูปร่างของพีคใน CE : คัดแปลงจาก [Li: 1992]

## 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)

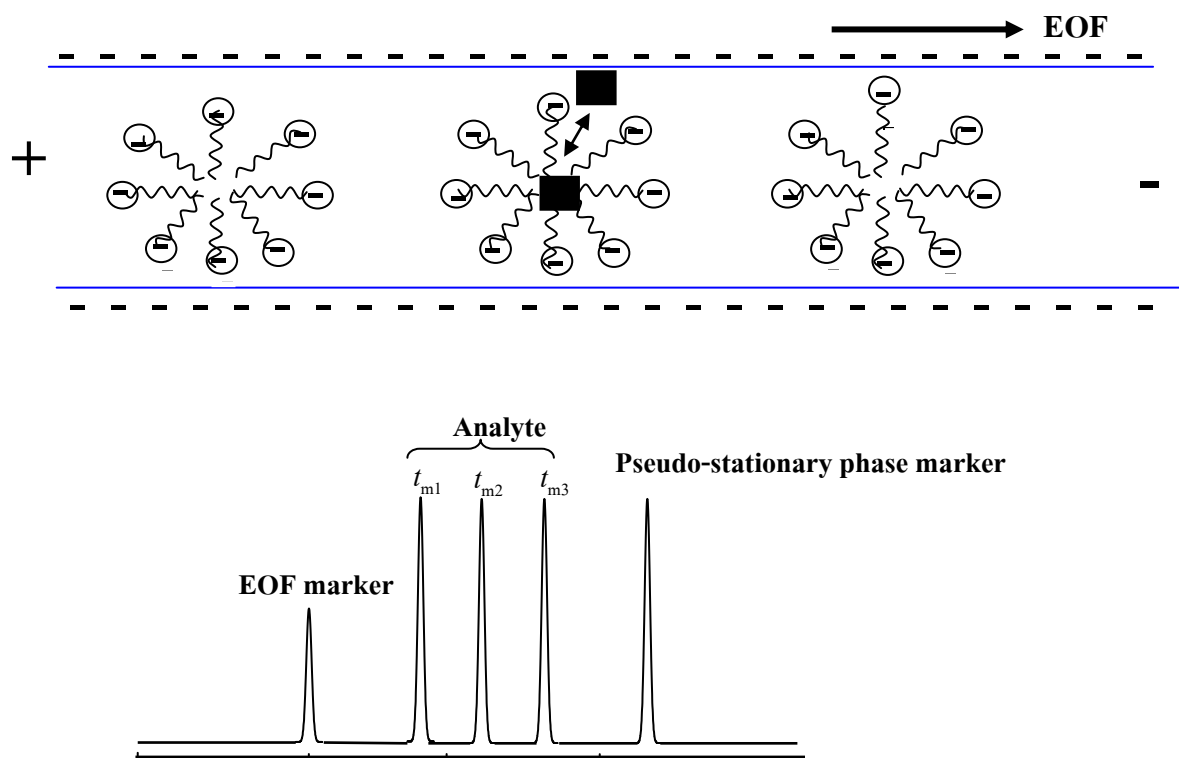
งานวิจัยนี้จะเกี่ยวข้องกับเทคนิค CE แบบ MEKC โดยเทคนิค MEKC จะมีการเติมสารลดแรงตึงผิว (surfactant) ลงไปใน BGE ให้มีความเข้มข้นสูงกว่า critical micellar concentration (CMC) ของสารลดแรงตึงผิวชนิดนั้นๆ โมเลกุลเดี่ยวๆ ของสารลดแรงตึงผิวจะรวมตัวกันเป็นไมเซลล์ (micelle) ดังรูปที่ 2.4 และทำหน้าที่เป็น pseudo-stationary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



รูปที่ 2.4 สารลดแรงตึงผิวและไมเซลล์: ดัดแปลงจาก [Patrick: 1993]

## 2.6 การเคลื่อนที่ของสารในเทคนิค MEKC ในภาวะที่มี EOF มาก

สำหรับกรณีแยกสารที่ไม่มีประจุและใช้สารลดแรงตึงผิวประเภทแอนไอออนภายใต้ภาวะที่มี EOF มาก ซึ่งมีทิศทางไปทางขั้วแคโทด (ขั้วลบ) ใน MEKC ดังรูปที่ 2.5 ตามลำดับ pseudo-stationary phase จึงมีค่า  $\mu$  เป็นลบ แต่อย่างไรก็ตาม pseudo-stationary phase สามารถเคลื่อนที่ไปยังขั้วแคโทดได้เนื่องจาก  $\mu_{\infty}$  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 ซึ่งใช้เมื่อสงสัยว่าพีคไหนเป็นพีคของสารที่ต้องการวิเคราะห์ โดยทำการเติมสารที่ต้องการวิเคราะห์ลงไป ถ้าพีคใดมีพื้นที่ใต้พีคเพิ่มขึ้นแสดงว่าพีคนั้นเป็นพีคของสารที่ต้องการวิเคราะห์ และสำหรับในกรณีที่ใช้ photodiode array detector สามารถเปรียบเทียบยูวีสเปกตรัมได้

ปริมาณของสารที่เคลื่อนที่ผ่านเครื่องตรวจวัด ( $Q$ ) มีความสัมพันธ์กับตัวแปรต่างๆ ดังสมการที่ 2.3

$$Q_{\text{det}}(\text{mole}) = \frac{\text{PA}(\text{AU s}) \times V_F(\text{m}^3\text{s}^{-1})}{\text{Response factor} (\text{AU mol}^{-1}\text{m}^3)} \quad (2.3)$$

PA คือ พื้นที่ใต้พีค (Peak area)

$V_F$  คือ อัตราการไหลเชิงปริมาตร (Volume Flow) ของสารละลายตัวอย่างที่เคลื่อนที่ผ่านเครื่องตรวจวัด

Response factor คือ แฟกเตอร์ของการตอบสนองในหน่วยค่าการดูดกลืนแสงต่อความเข้มข้น

สำหรับกรณีของ HPLC ปริมาณสารที่เคลื่อนที่ผ่านเครื่องตรวจวัด ( $Q_{\text{det}}$ ) จะแปรผันตรงกับ peak area ดังนั้นปริมาณวิเคราะห์จึงใช้ peak area เป็นตัวแทนของปริมาณสารได้ เนื่องจากสารตัวอย่างจะเคลื่อนที่ผ่านเครื่องตรวจวัดด้วยความเร็วของเฟสเคลื่อนที่ และถ้าใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่คงที่ สารตัวอย่างแต่ละชนิดจะเคลื่อนที่ด้วยความเร็วที่เท่ากัน

แต่ใน CE ปริมาณสารที่เคลื่อนที่ผ่านเครื่องตรวจวัด ( $Q_{\text{det}}$ ) จะไม่ขึ้นกับ peak area เนื่องจากสารตัวอย่างแต่ละชนิดเคลื่อนที่ผ่านเครื่องตรวจวัดด้วยความเร็วไม่เท่ากัน เมื่อสารชนิดหนึ่งเคลื่อนที่ด้วยความเร็วคงที่ผ่านกะพิลลารียาว  $l$  เป็นเวลา  $t_m$  ค่า  $V_F$  ของสารใน CE ดังสมการ

$$V_F = \frac{\pi r^2 l}{t_m} \quad (2.4)$$

จากสมการ 2.3 และ 2.4 จะได้ว่า

$$Q_{\text{det}} \propto \frac{\text{PA}(\text{AU s})}{t_m (\text{s})} \quad (2.5)$$

จะเห็นได้ว่าค่า  $Q_{\text{det}}$  ขึ้นกับอัตราส่วนของ peak area กับไมเกรชันไทม์ ซึ่งนิยามเป็น corrected peak area ดังนั้นถ้าสารมีปริมาณและ analyte response เท่ากันแต่เคลื่อนที่ได้ไม่เท่ากัน สารที่เคลื่อนที่ได้ช้ากว่าจะให้ peak area ที่มากกว่าสารที่เคลื่อนที่เร็วกว่า แต่ควรจะมี corrected peak area ที่เท่ากัน ดังนั้นใน CE ควรใช้ corrected peak area แทน peak area ในการทำปริมาณวิเคราะห์

แม้จะมีงานวิจัยกล่าวว่าปริมาตรของสารที่บรรจุด้วยการอัดความดันในเทคนิค CE มีความเที่ยงสูง [Mayer: 2001] แต่อย่างไรก็ตามความไม่เที่ยงของปริมาตรที่บรรจุขึ้นกับความเที่ยงของความดัน เวลา และความหนืดของบัฟเฟอร์ในกะพิลลารีที่เกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของกะพิลลารีในส่วนที่ไม่ได้ควบคุมอุณหภูมิ 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 จะเป็นสารมาตรฐานอีกชนิดหนึ่งที่ไม่ใช่สารตัวที่ต้องการวิเคราะห์และเติมลงไปในการตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐานในปริมาณที่เท่ากัน การทำกราฟมาตรฐานทำได้โดยสร้างกราฟความสัมพันธ์โดยที่แกน y เป็นสัดส่วนของ corrected peak area ของสารตัวอย่างต่อ corrected peak area ของ internal standard และแกน x เป็นความเข้มข้นของสารตัวอย่าง ดังนั้นในการฉีดสารแต่ละครั้ง ถ้าสารมีความเข้มข้นเท่ากัน อัตราส่วนของปริมาณสารต่อ internal standard จะคงที่

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

การสกัดด้วยตัวทำละลาย หมายถึง การแยกกลุ่มของสารที่สนใจออกจากเมทริกซ์ของตัวอย่าง 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 เนื่องจากซอสฟริกมีลักษณะเป็นของเหลวชั้น หลักการของการสกัดด้วยตัวทำละลายอาจสามารถอธิบายได้ เช่นเดียวกับ liquid-liquid extraction โดยทั่วไปเฟสตัวอย่างจะเป็นน้ำและอีกเฟสหนึ่งเป็นเฟสตัวทำละลายอินทรีย์

สมดุลของการกระจายตัวของสารในเฟสตัวอย่าง เช่น ของเหลว กับเฟสตัวทำละลายอินทรีย์ ดังสมการ

$$A_s \longleftrightarrow A_{org} \quad (2.6)$$

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]

$$K_d = \frac{C_{\text{org}}}{C_s} \quad (2.7)$$

$C_{\text{org}}$  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

$$E = \frac{W_{\text{org}}}{W_0} \quad (2.8)$$

$W_{\text{org}}$  คือ ปริมาณสารในเฟสตัวทำละลายอินทรีย์

$W_0$  คือ ปริมาณสารเริ่มต้น

ประสิทธิภาพของการสกัดสามารถคำนวณจากปริมาณของสารในตัวทำละลายอินทรีย์ต่อปริมาณสารเริ่มต้น ถ้าตัวทำละลายอินทรีย์สามารถสกัดสารออกมาได้มาก ประสิทธิภาพของการสกัดก็จะมีค่ามาก ดังนั้นค่าประสิทธิภาพการสกัดนี้ จะบ่งบอกถึงความสามารถของตัวทำละลายอินทรีย์ในการสกัดสาร

$$E = \frac{C_{\text{org}} V_{\text{org}}}{(C_{\text{org}} V_{\text{org}} + C_s V_s)} \quad (2.9)$$

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

$V_s$  คือ ปริมาตรของตัวอย่างที่นำมาสกัด

$$E = \frac{K_d \beta}{(1 + K_d \beta)} \quad (2.10)$$

$\beta$  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 2.7 ถึง 2.10

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

## บทที่ 3

### การทดลอง

#### 3.1 เครื่องมือ

- 1) เครื่องกะปริมาตรอิเล็กทรอนิกส์ โทรฟอริชิส 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) AR 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  $\mu m$  PTFE membrane filter
- 13) น้ำ Milli Q
- 14) ตัวอย่างซอสพริก ที่มีในท้องตลาด 22 ตัวอย่าง
- 15) ตัวอย่างเครื่องแกงที่มีในท้องตลาด 5 ตัวอย่าง



### 3.3 การเตรียมสารละลายมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์

3.3.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานแคปไซซิน (CAP) และไดไฮโดรแคปไซซิน (DCAP) ความเข้มข้นรวม 2500 ppm โดยชั่งแคปไซซินอยด์น้ำหนักที่แน่นอนและละลายด้วยอะซิโตนไทรล์ จะได้สารละลายมาตรฐาน CAPs ที่ประกอบด้วย 1625 ppm CAP และ 875 ppm DCAP

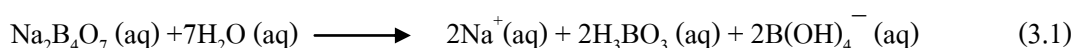
3.3.2 เตรียมสารละลายมาตรฐานของ Bisphenol A (เป็น internal standard) ความเข้มข้น 1000 ppm โดยชั่ง Bisphenol A น้ำหนักแน่นอน และละลายด้วยอะซิโตนไทรล์

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

### 3.4 การเตรียมสารละลายสำหรับบัฟเฟอร์

3.4.1 เตรียมสารละลาย 500 mM sodium dodecyl sulfate (SDS) 25 มิลลิลิตร โดยชั่ง SDS 3.6048 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำ Milli Q จนถึงขีดวัดปริมาตรในขวดวัดปริมาตร

3.4.2 เตรียมสารละลาย 100 mM  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  (บอเรตบัฟเฟอร์) ที่ pH 9.2 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร โดยชั่ง  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  0.9534 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำ Milli Q จนถึงขีดวัดปริมาตรในขวดวัดปริมาตร จะได้บอเรตบัฟเฟอร์ที่ pH 9.2 โดยไม่ต้องปรับ pH ใดๆ แสดงดังสมการที่ 3.1



### 3.5 การเตรียมสารละลายสำหรับเจือจางตัวอย่าง

3.5.1 เตรียมสารละลาย 120 mM SDS ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยชั่ง SDS 3.4606 กรัม ละลายปรับปริมาตรด้วยน้ำ Milli Q จนถึงขีดวัดปริมาตรในขวดวัดปริมาตร

### 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 และทำการ rinse ด้วยน้ำ Milli Q 2 นาที 0.1 M NaOH 3 นาที และ BGE 3 นาที ก่อนการวิเคราะห์แต่ละครั้ง และหลังการทดลองในแต่ละวัน rinse ด้วยเมทานอล 10 นาที น้ำ Milli Q 10 นาที 0.1 M NaOH 20 นาที และ น้ำ Milli Q 20 นาที

อุณหภูมิของอะพิลลารี: 25 °C

ศักย์ไฟฟ้า: 25 kV

BGE: 10 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> ที่ pH 9.2 ที่ประกอบด้วย 60 mM SDS และ 15%v/v อะซิโตนไนไตรล์

### 3.7 การวิเคราะห์ด้วย HPLC

ในการทดลองใช้เครื่อง HPLC ของบริษัท Thermo (Spectra SYSTEM) และเครื่องตรวจวัดชนิด photodiode array detector รุ่น UV 6000LP โดยทำการตรวจวัดในช่วงความยาวคลื่น 200 ถึง 400 นาโนเมตร และทำปริมาณวิเคราะห์ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร คอลัมน์ HPLC ที่ใช้ขนาด 250 × 4.6 mm i.d. ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร เฟสคงที่เป็น BDS hypersil C<sub>18</sub> ของบริษัท Thermo Scientific ใช้ระบบเฟสเคลื่อนที่เป็น อะซิโตนไนไตรล์ และ 1% กรดอะซิติกในน้ำ แบบ gradient ได้ทำการปรับสัดส่วนเฟสเคลื่อนที่พบว่าอัตราส่วนเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมที่สามารถแยกสารที่สนใจทั้ง 2 ชนิดออกจากพิกสารอื่นๆ คือ อัตราส่วน อะซิโตนไนไตรล์ : 1% กรดอะซิติกในน้ำ เริ่มต้นที่ 58 : 42 เปอร์เซ็นต์ โปรแกรมให้เป็น 100 : 0 เปอร์เซ็นต์ที่ 35 นาที แล้วคงที่ไว้นาน 15 นาที จากนั้นปรับเป็นอัตราส่วนเริ่มต้นและคงที่ไว้ 10 นาที รวมเวลาทั้งหมด 60 นาที ใช้อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาณสารที่ฉีดเป็น 60 ไมโครลิตร แต่ละตัวอย่างทำการวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้ง

### 3.8 กราฟมาตรฐาน

#### 3.8.1 กราฟมาตรฐานสำหรับ MEKC

สร้างกราฟมาตรฐานสำหรับปริมาณวิเคราะห์ โดยใช้สารละลายมาตรฐานในหัวข้อ 3.3.1 และ 3.3.2 ซึ่งประกอบด้วยสารมาตรฐาน CAP และDCAP ที่ความเข้มข้นต่างๆ (ช่วงความเข้มข้น 25 ถึง 1500 ppm) และแต่ละความเข้มข้นของสารมาตรฐานประกอบด้วย 50 ppm ของ Bisphenol A เป็น ISTD เจือจางสารละลายผสมดังกล่าวด้วยบัฟเฟอร์โดยมีองค์ประกอบสุดท้ายเป็น 10 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> และ 15% v/v ของอะซิโตนไนไตรล์ จากนั้นสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับปริมาณวิเคราะห์ ดังผลการทดลองหัวข้อ 4.1

### 3.8.2 กราฟมาตรฐานสำหรับ HPLC

เตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ (ช่วงความเข้มข้น 25 ถึง 500 ppm) โดยเจือจางสารละลายมาตรฐาน CAP และ DCAP ในหัวข้อ 3.3.1 ด้วยอะซิโตนไทรล์ กราฟมาตรฐานแสดงดังผลการทดลองหัวข้อ 4.1

## 3.9 การหาปริมาณแคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซินในตัวอย่างด้วย MEKC และ HPLC

### 3.9.1 ตัวอย่างที่ใช้ศึกษามี 2 ชนิด ได้แก่

- 1) ซอสพริก (chili sauce) ซึ่งจากท้องตลาดและไม่สามารถเปิดเผยชื่อได้
- 2) เครื่องแกงสำเร็จรูป ซึ่งจากท้องตลาดและไม่สามารถเปิดเผยชื่อได้

#### ตารางที่ 3.1 ตัวอย่างซอสพริกที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่างซอสพริก	ระดับความเผ็ดที่ระบุไว้	ปริมาณพริกที่ระบุไว้ (%)
S1-E45	เผ็ดมาก	45
S5-M22	เผ็ดปานกลาง	22
S7-E36	เผ็ดมาก	36
S5-E22	เผ็ดมาก	22
S22-x28	ไม่ได้ระบุ	28
S21-x25	ไม่ได้ระบุ	25
S8-E70	เผ็ดมาก	70

#### ตารางที่ 3.2 ตัวอย่างเครื่องแกงสำเร็จรูปที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่างเครื่องแกง	ปริมาณพริกที่ระบุไว้ (%)
P-SC-A27	27
P-PC-A36	36
P-TY-B30	30
P-GC-A30	30
P-GC-C31	31

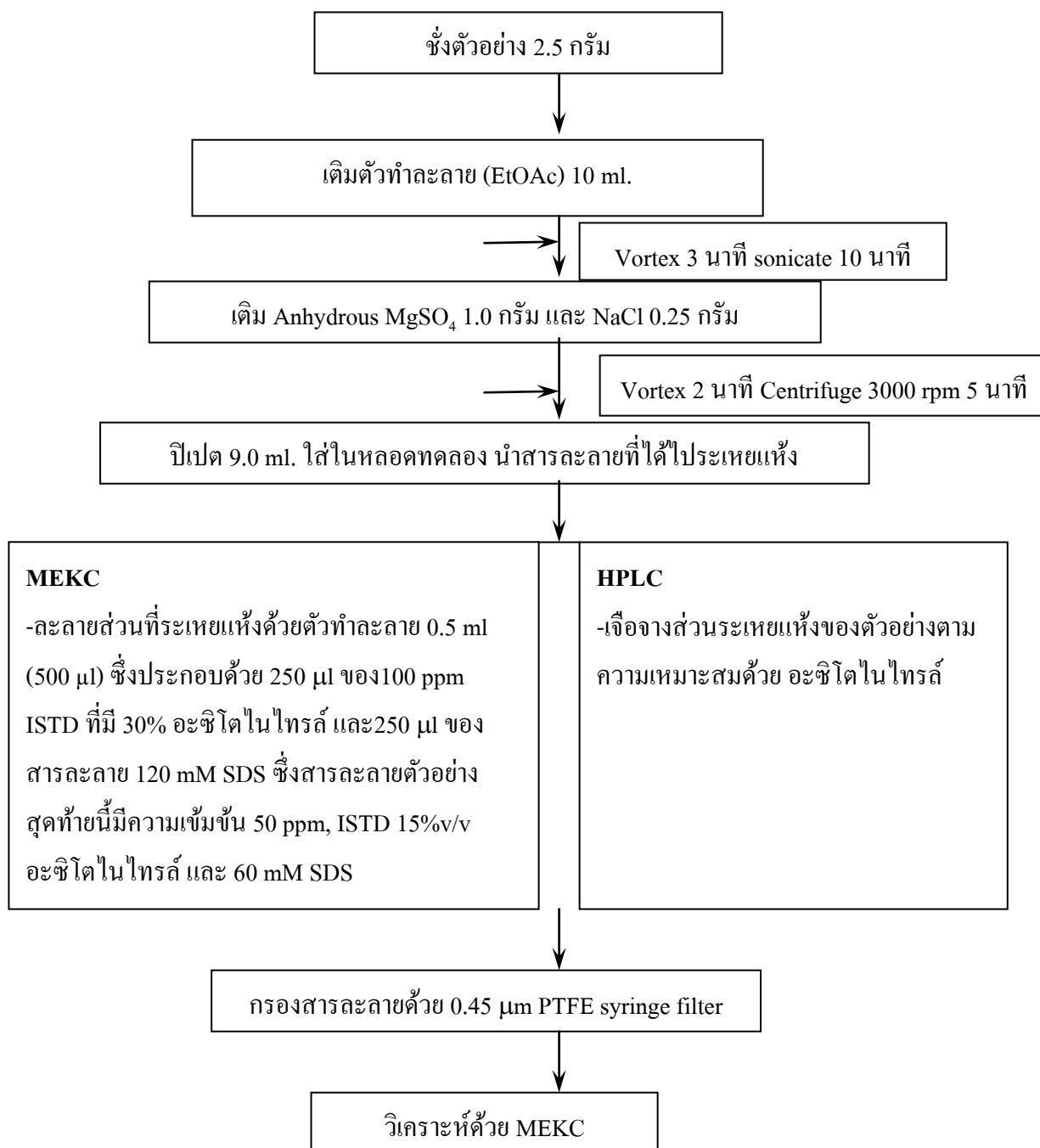
### 3.9.2 ขั้นตอนการสกัดซอสพริกและเครื่องแกงสำเร็จรูปด้วยตัวทำละลาย (รูปที่ 3.1)

1) ชั่งตัวอย่าง 2.50 กรัม (ซอสพริก เครื่องแกงน้ำพริกแกงเผ็ด เครื่องแกงน้ำพริก หรือแกงส้ม) ใส่ลงในหลอดพลาสติกขนาด 50 ml

- 2) ปิเปตตัวทำละลายอินทรีย์ (EtOAc) 10 ml ลงไป (โดยที่แต่ละตัวอย่างทำซ้ำ 3 ชุด)
- 3) นำหลอดที่มีตัวอย่างและตัวทำละลายอินทรีย์ไป vortex เป็นเวลา 3 นาที และ sonicate เป็นเวลา 10 นาที
- 4) นำหลอดที่มีตัวอย่างและตัวทำละลายอินทรีย์ มาเติม anhydrous  $MgSO_4$  1.0 กรัม และ NaCl 0.25 กรัม
- 5) นำไป vortex ให้เข้ากันเป็นเวลา 2 นาที และตั้งทิ้งไว้สักครู่ (1-2 นาที) เพื่อให้เกิดการแยกชั้นของน้ำและชั้นของตัวทำละลายอย่างชัดเจน
- 6) นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
- 7) ปิเปตชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ 9.0 ml ใส่ในหลอดทดลอง แล้วนำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบหมุน (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ  $50^{\circ}C$

### 3.9.3 การเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณด้วย MEKC และ HPLC

เตรียมตัวอย่างดังหัวข้อ 3.9.2 สำหรับการวิเคราะห์ด้วย MEKC นำส่วนที่ระเหยแห้งแล้ว มาละลายด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม 500  $\mu$ l คือ ปิเปต 250  $\mu$ l ของสารละลายมาตรฐาน 100 ppm ISTD 30%v/v อะซิโตไนโตรล์ จนละลายหมด แล้วจึงปิเปตอีก 250  $\mu$ l ของสารละลาย 120 mM SDS จะได้สารละลายตัวอย่างสุดท้ายที่มี 15%v/v อะซิโตไนโตรล์, 50 ppm ISTD และ 60 mM SDS สำหรับ HPLC เจือจางส่วนระเหยแห้งของตัวอย่างตามความเหมาะสมด้วยอะซิโตไนโตรล์ จากนั้นกรองสารละลายตัวอย่างด้วย 0.45  $\mu$ m PTFE syring filter ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย MEKC และ HPLC โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมที่หาได้จากกรรทดลอง แล้วคำนวณหาปริมาณสารที่สนใจทั้ง 2 ชนิด โดยเทียบจากกราฟมาตรฐานในหัวข้อ 3.8.1 และ 3.8.2 สำหรับ MEKC และ HPLC ตามลำดับ



รูปที่ 3.1 แผนผังการเตรียมตัวอย่าง

## บทที่ 4

### ผลการทดลองและการวิจารณ์

งานวิจัยปีที่ 1 ได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์และเปรียบเทียบการหาปริมาณของแคปไซซิน (CAP) และไดไฮโดรแคปไซซิน (DCAP) ด้วยไมเซลล์าร์อีเล็กโทรโครมาโทกราฟี (MEKC) โดยใช้ uncoated fused silica capillary ขนาด  $50 \mu\text{m i.d.} \times 40.2 \text{ cm}$  (30 cm ถึงเครื่องตรวจวัด) บรรจุสารด้วยความดัน 0.5 psi เป็นเวลา 5 วินาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 214 nm ใช้ศักย์ไฟฟ้า 25 kV และอุณหภูมิ 25 °C การแยกของพีก CAP และ DCAP ออกจากสารอื่นๆ ในตัวอย่างส่วนสกัดจากพริกได้สมบูรณ์โดยบัฟเฟอร์ของ MEKC ประกอบด้วยความเข้มข้นของบอเรตบัฟเฟอร์ 10 mM ที่ pH 9.2 ความเข้มข้นของโซเดียมโคเดกซิลซัลเฟต 60 mM เป็นไมเซลล์าร์เฟส และอะซิโตนไทรล์ 15% โดยปริมาตร ได้ทดสอบใช้ MEKC สำหรับปริมาณวิเคราะห์ของ CAP และ DCAP ในตัวอย่างส่วนสกัดจากพริก สำหรับปริมาณรวมของ CAP และ DCAP ในตัวอย่างส่วนสกัดจากพริกที่วิเคราะห์ได้ด้วย MEKC มีค่าใกล้เคียงกับที่รายงานด้วยไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) ซึ่งวิธี MEKC ที่พัฒนาขึ้นมีข้อดี คือ มีความเที่ยงและความแม่นยำสูง และไม่จำเป็นต้องมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างที่ยุ่งยากเกี่ยวกับการเจือจางและการกรอง

งานวิจัยปีที่ 2 ได้พัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างซอสพริก สำหรับปริมาณวิเคราะห์แคปไซซินอยด์ (CAPs) ด้วย MEKC ที่ได้พัฒนาแล้วในงานวิจัยปีที่ 1 พบว่าการสกัดตัวอย่างด้วยเอทิลอะซิเตตแบบเดิมก่อให้เกิดประสิทธิภาพของการสกัด 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) เมื่อทดลองนำ MEKC ไปวิเคราะห์ตัวอย่างซอสพริกจริง 8 ตัวอย่าง ด้วย MEKC โดยเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น พบว่ามีปริมาณ CAPs ในช่วง 21-128 ppm โดยที่ 3 ตัวอย่างมีปริมาณ CAPs มากกว่า 50 ppm ซึ่งเกินปริมาณจำกัดของสหภาพยุโรป (European Commission)

ส่วนงานวิจัยปีที่ 3 นี้ ได้ทำการเปรียบเทียบปริมาณวิเคราะห์ของ CAPs ที่วิเคราะห์ได้จาก MEKC และ HPLC และประยุกต์สำหรับตัวอย่างซอสพริก 22 ตัวอย่างและเครื่องแกงชนิดต่างๆ อีก 5 ตัวอย่าง ดังรายละเอียดต่อไปนี้

#### 4.1 การเปรียบเทียบปริมาณวิเคราะห์ของแคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซินในซอสพริกด้วย

##### MEKC และ HPLC

ตัวอย่างซอสพริกที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นซอสพริกที่มีขายตามท้องตลาดทั่วไปโดยมีระดับความเผ็ดและ/หรือปริมาณพริกเท่ากันหรือแตกต่างกัน ทำการเปรียบเทียบปริมาณวิเคราะห์ของแคปไซซิน (CAP) และไดไฮโดรแคปไซซิน (DCAP) ในตัวอย่างซอสพริก 9 ตัวอย่าง ด้วย MEKC และ HPLC โดยทำการเตรียมตัวอย่างดังหัวข้อ 3.9.2 และแผนผังในรูปที่ 3.1 ทำการสกัดซ้ำ 3 batch ในแต่ละตัวอย่างและทำการเจือจางตามความเหมาะสม แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MEKC และ HPLC ที่ภาวะเหมาะสมที่ได้ตั้งหัวข้อ 3.6 และ 3.7 ตามลำดับ ได้ทำการยืนยันฟีกของสารที่สนใจแต่ละชนิดด้วยวิธี spiking technique และทำการเปรียบเทียบยูวีสเปกตรัมของฟีกสารในตัวอย่างกับสารมาตรฐาน

สำหรับ MEKC นำอัตราส่วนของ corrected peak area ( $A_{\text{cor}}$ ) ที่ได้ของสารมาตรฐานกับ ISTD ( $A_{\text{cor, สารมาตรฐาน}}/A_{\text{cor, Bisphenol A}}$ ) กับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (ใน CE นิยมใช้ corrected peak area ดังที่กล่าวไปแล้วในหัวข้อ 2.7) ไปคำนวณหาความเข้มข้นของ CAP และ DCAP ที่มีอยู่ในตัวอย่างโดยใช้กราฟมาตรฐานแสดงดังรูปที่ 4.1 สำหรับ HPLC การวิเคราะห์ปริมาณไม่ได้ใช้ ISTD เนื่องจากเป็นที่ยอมรับกันว่าปริมาณที่ฉีดใน HPLC มีความเที่ยงสูง สามารถหาความเข้มข้นของสารจากการนำพื้นที่ใต้กราฟเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารแต่ละชนิดแสดงดังรูปที่ 4.2 จากนั้นนำค่าความเข้มข้นที่ได้มาคำนวณเป็นปริมาณสารในหน่วยไมโครกรัมต่อน้ำหนักส่วนตัวอย่าง 1 กรัม ( $\mu\text{g/g}$ ) ดังสมการที่ 1

$$C_A = \frac{C_1 \times V_3}{W} \times \frac{V_1}{V_2} \quad (1)$$

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

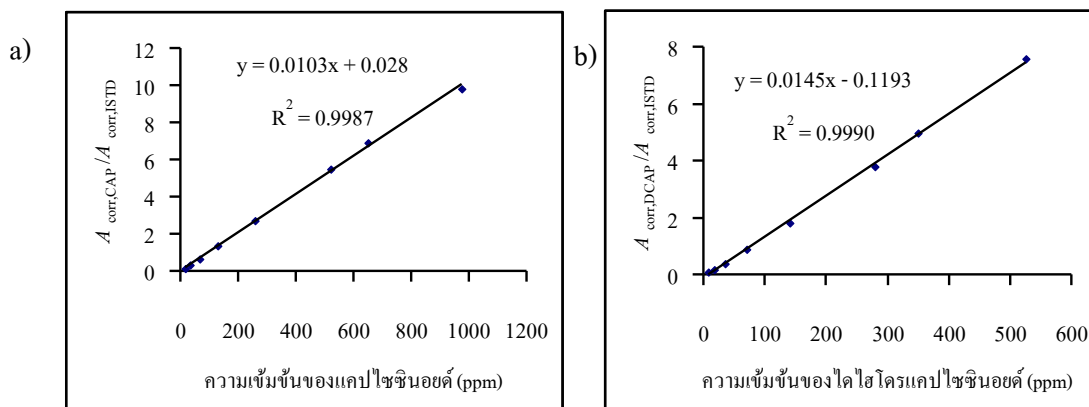
$C_1$  คือ ความเข้มข้นของสารในส่วนสกัดสุดท้ายที่วิเคราะห์ได้เทียบจากกราฟมาตรฐาน (ppm,  $\mu\text{g/ml}$ )

$V_1$  คือ ปริมาตรของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้สกัด (ml) ในที่นี้คือ 10.00 ml

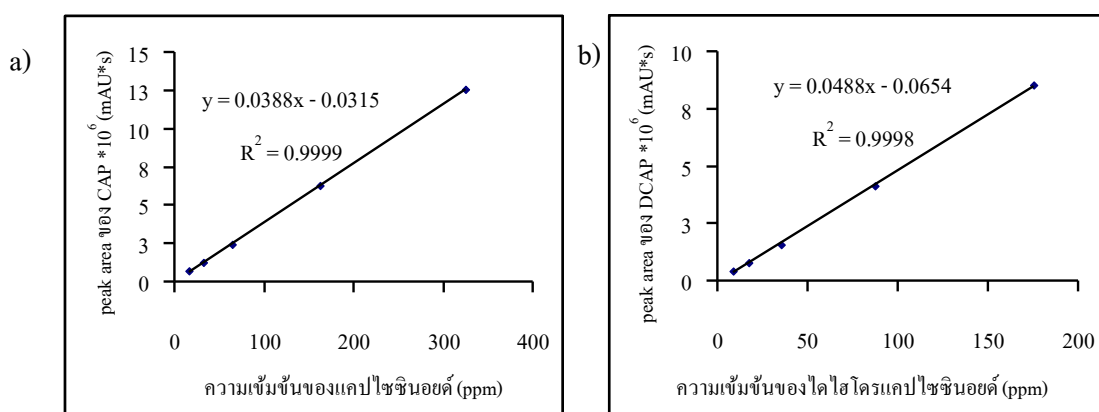
$V_2$  คือ ปริมาตรของส่วนสกัดที่นำไปประเหย (ml) ในที่นี้คือ 9.00 ml

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

$W$  คือ น้ำหนักของตัวอย่าง (g)



รูปที่ 4.1 กราฟมาตรฐานสำหรับปริมาณวิเคราะห์ของ a) แคปไซซิน และ b) ไดไฮโดรแคปไซซิน ด้วย MEKC



รูปที่ 4.2 กราฟมาตรฐานสำหรับปริมาณวิเคราะห์ของ a) แคปไซซิน และ b) ไดไฮโดรแคปไซซิน ด้วย HPLC

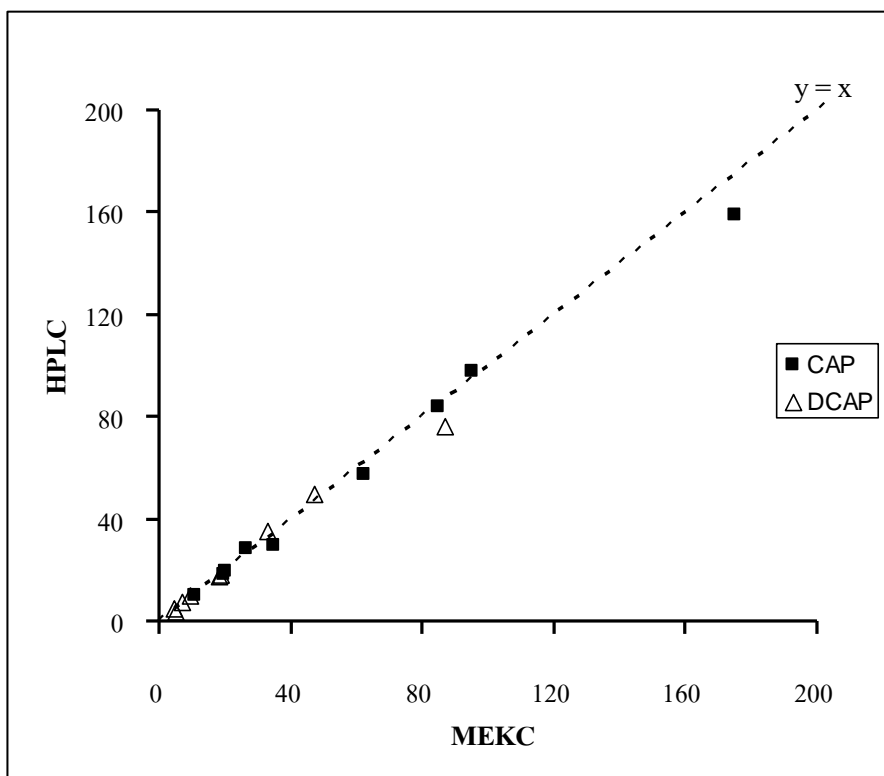


จากตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.3 จะเห็นว่าปริมาณของ CAP และ DCAP ที่วิเคราะห์ได้จาก ตัวอย่างซอสพริกทั้ง 9 ตัวอย่าง ด้วย MEKC ที่พัฒนาขึ้นสอดคล้องกับที่วิเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค HPLC และจากการเปรียบเทียบเชิงสถิติของปริมาณวิเคราะห์ระหว่าง MEKC และ HPLC ด้วยวิธี paired t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ดังภาคผนวก) พบว่าค่า t-stat มีค่าน้อยกว่า t-critical two tail ในทุกกรณี ดังนั้นปริมาณวิเคราะห์ที่ได้จาก MEKC และ HPLC ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในเชิงสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ใน CE สามารถกำจัดสารที่ออกมาที่หลังสารที่สนใจโดยการไล่ที่ความดันสูง 1 ถึง 2 นาที ในขณะที่ HPLC ไล่สารอื่นที่ค้างในคอลัมน์ด้วยการเพิ่มเปอร์เซ็นต์ของตัวทำละลายอินทรีย์ซึ่งใช้เวลาประมาณ 20 ถึง 25 นาที ดังนั้น MEKC จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณแคปไซซินอยด์ ในตัวอย่างซอสพริก โดย MEKC มีข้อได้เปรียบเหนือ HPLC คือใช้เวลาในการวิเคราะห์ที่สั้นเนื่องจากไม่เสียเวลาไล่สารออกจากคอลัมน์

**ตารางที่ 4.1** ปริมาณวิเคราะห์ของแคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซินแต่ละตัวอย่างซอสพริกใน MEKC และ HPLC (ค่าเฉลี่ยจาก 3 ตัวอย่างซ้ำที่แต่ละตัวอย่างทำการฉีดซ้ำ 2 ครั้ง)

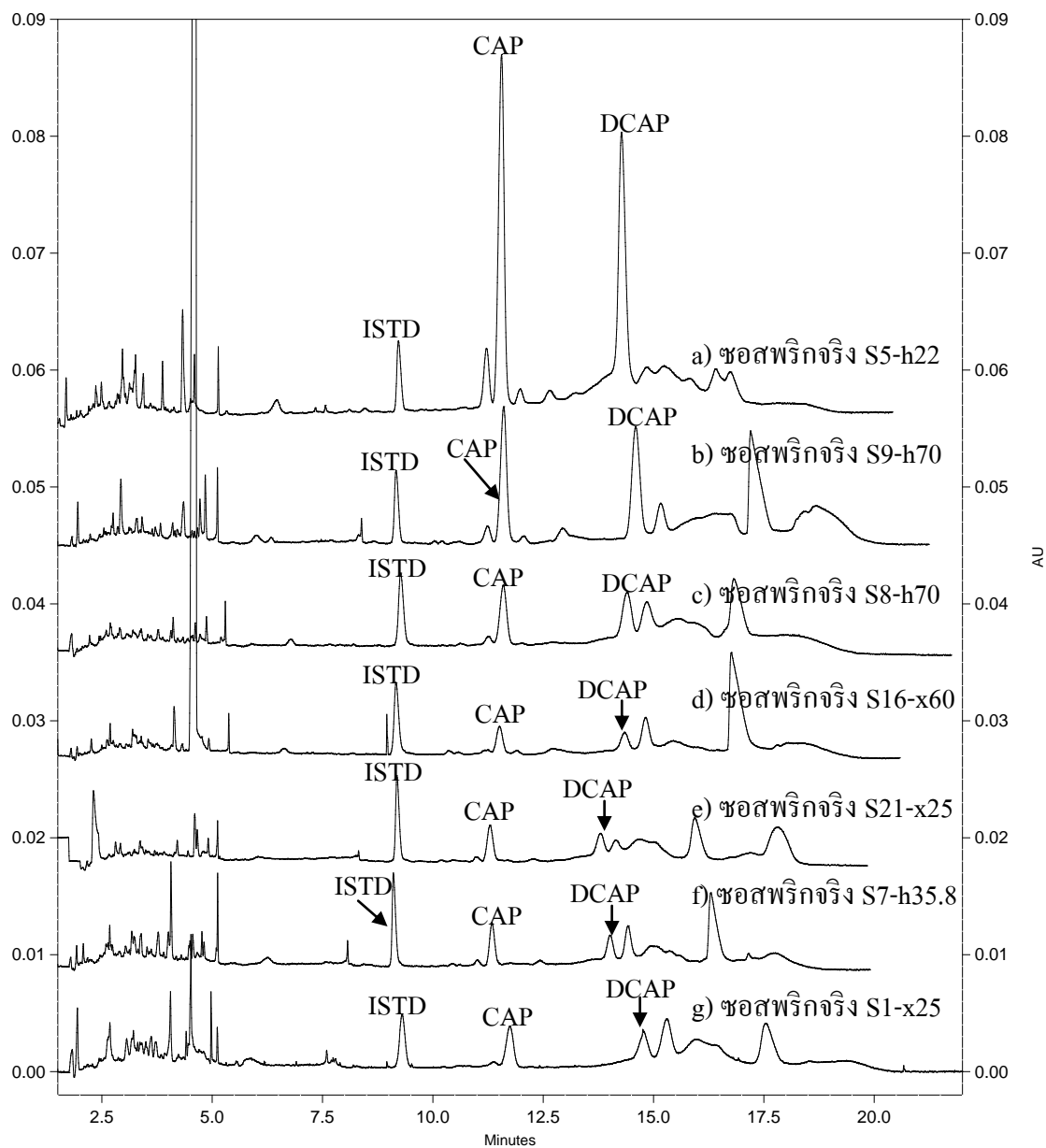
ตัวอย่าง	พริกในซอส (%)	ปริมาณสาร (ppm, µg/g)					
		CAP		DCAP		CAPs	
		MEKC	HPLC	MEKC	HPLC	MEKC	HPLC
S1-E45	45	95.1 ± 1.1	98.0 ± 1.4	32.9 ± 0.9	35.6 ± 0.5	128.0 ± 1.4	133.6 ± 1.5
S1-M40	40	26.4 ± 0.7	28.3 ± 0.8	4.6 ± 0.9	5.2 ± 0.6	31.0 ± 1.1	33.5 ± 1.0
S5-M22	22	62.4 ± 2.7	57.1 ± 1.2	18.8 ± 1.0	18.4 ± 0.7	81.2 ± 2.9	75.5 ± 1.4
S5-E22	22	175.0 ± 2.6	158.8 ± 4.0	86.9 ± 1.1	76.3 ± 0.6	261.9 ± 2.8	235.1 ± 4.0
S9-E70	70	84.6 ± 2.1	83.6 ± 1.3	47.2 ± 2.8	49.6 ± 1.1	131.8 ± 3.5	133.2 ± 1.7
S7-E36	36	19.6 ± 1.3	18.0 ± 0.2	6.8 ± 0.2	7.3 ± 0.6	26.4 ± 1.3	25.3 ± 0.6
S17-x14	14	35.0 ± 0.6	29.8 ± 0.9	17.9 ± 0.4	17.4 ± 0.3	52.9 ± 0.7	47.2 ± 0.9
S21-x25	25	20.0 ± 1.1	19.3 ± 0.5	9.5 ± 0.3	10.2 ± 0.2	29.5 ± 1.1	29.5 ± 0.5
S22-x28	28	10.8 ± 0.4	10.0 ± 0.4	5.0 ± 0.2	3.9 ± 0.3	15.8 ± 0.4	13.9 ± 0.9



รูปที่ 4.3 กราฟแสดงการเปรียบเทียบปริมาณที่วิเคราะห์ได้ของ CAP และDCAP ในตัวอย่างซอสพริก ระหว่าง MEKC และ HPLC

#### 4.2 การหาปริมาณแคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซินในตัวอย่างซอสพริกจริง

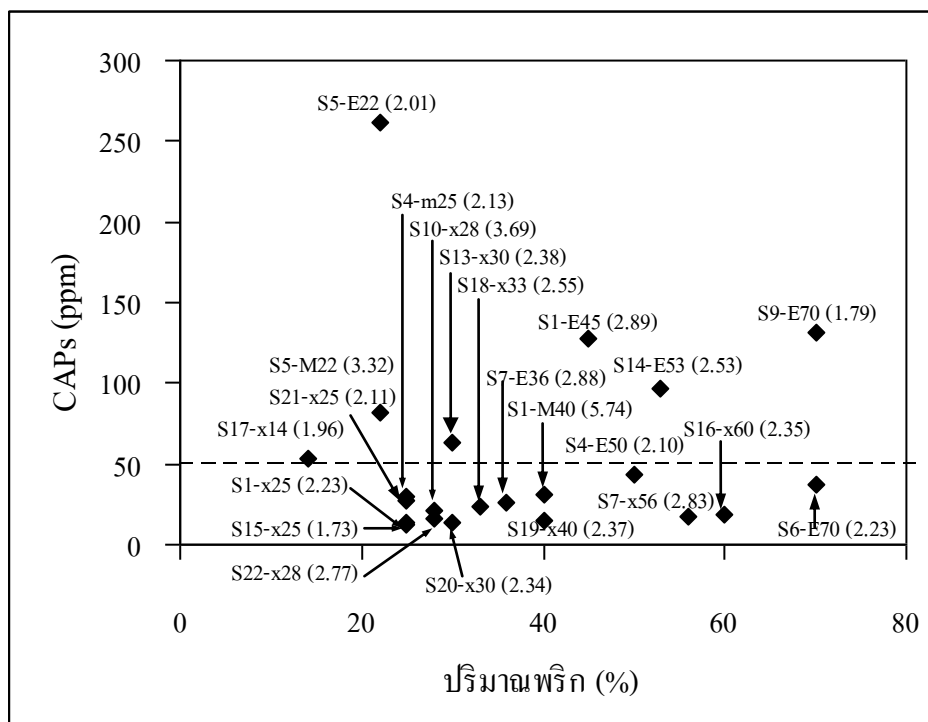
ประยุกต์ใช้เทคนิค MEKC สำหรับปริมาณวิเคราะห์ของ CAP และ DCAP ในซอสพริกจริง 22 ตัวอย่างโดยใช้ bisphenol A เป็น internal standard ได้ทำการวิเคราะห์และเปรียบเทียบปริมาณของ CAPs ในตัวอย่างซอสพริกต่างๆ ตัวอย่างอิเล็กทรอนิกส์โปรแกรมของซอสพริกแสดงดังรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.4 อิเล็กโทรฟีโรแกรมของตัวอย่างซอสพริกจริงบางตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์ปริมาณ; ISTD = Internal Standard, CAP = แคปไซซิน และ DCAP = ไดไฮโดรแคปไซซิน

ตารางที่ 4.2 ปริมาณของแคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซินในตัวอย่างซอสพริก

ตัวอย่างซอสพริก	พริกในซอส (%)	ปริมาณสาร (ppm, $\mu\text{g/g}$ )		
		CAP	DCAP	CAPs
S1-E45	45	95.1 $\pm$ 1.1	32.9 $\pm$ 0.9	128.0 $\pm$ 1.4
S1-M40	40	26.4 $\pm$ 0.7	4.6 $\pm$ 0.9	31.0 $\pm$ 1.1
S1-x25	25	9.8 $\pm$ 0.9	4.4 $\pm$ 0.2	14.2 $\pm$ 0.9
S4-E50	50	29.8 $\pm$ 1.3	14.2 $\pm$ 0.1	44.0 $\pm$ 1.3
S4-m25	25	18.3 $\pm$ 0.1	8.6 $\pm$ 0.4	26.9 $\pm$ 0.4
S5-M22	22	62.4 $\pm$ 2.7	18.8 $\pm$ 1.0	81.2 $\pm$ 2.9
S5-E22	22	175.0 $\pm$ 2.6	86.9 $\pm$ 1.1	261.9 $\pm$ 2.8
S6-E70	70	25.7 $\pm$ 0.5	11.5 $\pm$ 0.3	37.2 $\pm$ 0.6
S7-E36	36	19.6 $\pm$ 1.3	6.8 $\pm$ 0.2	26.4 $\pm$ 1.3
S7-x56	56	13.0 $\pm$ 0.2	4.6 $\pm$ 0.1	17.6 $\pm$ 0.2
S9-E70	70	84.6 $\pm$ 2.1	47.2 $\pm$ 2.8	131.8 $\pm$ 3.5
S10-x28	28	16.6 $\pm$ 0.3	4.5 $\pm$ 0.2	21.1 $\pm$ 0.4
S13-x30	30	44.8 $\pm$ 1.8	18.8 $\pm$ 1.1	63.6 $\pm$ 2.1
S14-E53	53	69.5 $\pm$ 1.6	27.5 $\pm$ 1.3	97.0 $\pm$ 2.1
S15-x25	25	8.3 $\pm$ 0.3	4.8 $\pm$ 0.7	13.0 $\pm$ 0.8
S16-x60	60	12.7 $\pm$ 0.5	5.4 $\pm$ 0.4	18.1 $\pm$ 0.6
S17-x14	14	35.0 $\pm$ 0.6	17.9 $\pm$ 0.4	52.9 $\pm$ 0.7
S18-x33	33	16.6 $\pm$ 0.1	6.5 $\pm$ 0.3	23.1 $\pm$ 0.3
S19-x40	40	10.2 $\pm$ 0.5	4.3 $\pm$ 0.3	14.5 $\pm$ 0.6
S20-x30	30	9.6 $\pm$ 0.1	4.1 $\pm$ 0.3	13.7 $\pm$ 0.3
S21-x25	25	20.0 $\pm$ 1.1	9.5 $\pm$ 0.3	29.5 $\pm$ 1.1
S22-x28	28	10.8 $\pm$ 0.4	5.0 $\pm$ 0.2	15.8 $\pm$ 0.4



**รูปที่ 4.5** ความสัมพันธ์ของปริมาณ CAPs และปริมาณของพริกในตัวอย่างซอสพริก (โดยที่ E, M, m และ x หมายถึงสูตรความเผ็ดมาก (extreme hot) เผ็ดปานกลาง (medium hot) เผ็ดน้อย (mind hot) และไม่ได้ระบุ ตามลำดับ สำหรับตัวเลขท้ายสูตรความเผ็ดหมายถึงปริมาณพริกที่ระบุไว้ ส่วนตัวเลขที่อยู่ในวงเล็บเป็นอัตราส่วนของ CAP : DCAP ที่วิเคราะห์ได้)

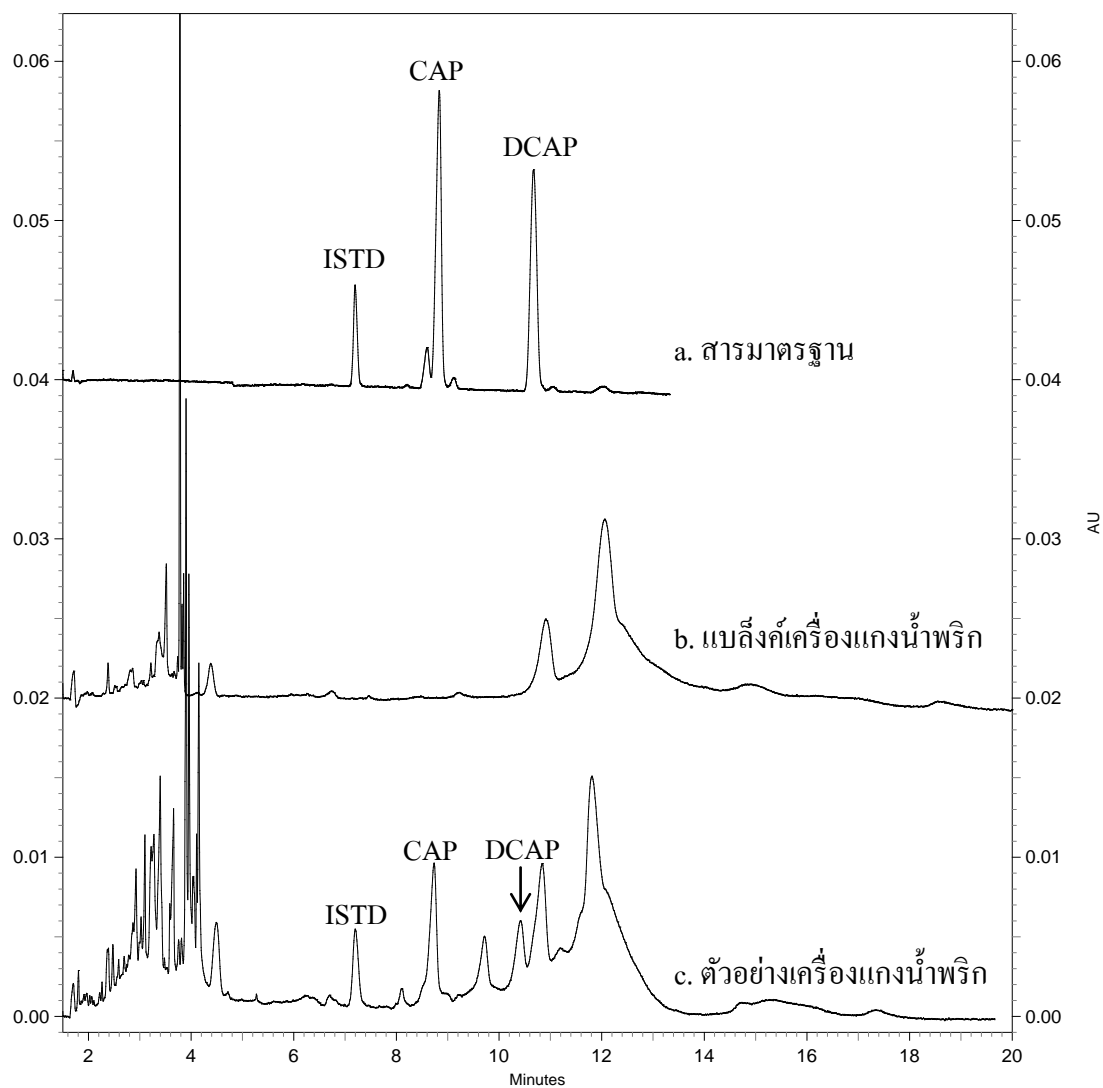
จากผลการทดลองในตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.5 จะเห็นได้ว่าปริมาณ CAPs ไม่มีแนวโน้มความสัมพันธ์แปรตามปริมาณพริกที่ระบุไว้ ทั้งนี้เนื่องจากความแตกต่างของสายพันธุ์ และ/หรือ แหล่งพริกที่ใช้ในการผลิตซอสพริก แม้แต่สูตรความเผ็ดเหมือนกัน แต่ปริมาณ CAPs ที่ตรวจพบต่างกัน เช่น ซอสพริกสูตรเผ็ดมาก S1-E45, S4-E50, S5-E22, S6-E70, S7-E36, S9-E70 และ S14-E53 พบว่ามี 128, 44, 262, 37, 26, 132 และ 97 ppm CAPs ตามลำดับ นอกจากนี้ซอสพริกยี่ห้อเดียวกันแต่สูตรเผ็ดต่างกันพบว่ามีอัตราส่วนของ CAP : DCAP ที่ตรวจพบใกล้เคียงกัน เช่น S7-E36 กับ S7-x56 และ S4-m25 กับ S4-E50 เป็นต้น แสดงว่าน่าจะใช้พริกสายพันธุ์เดียวกันหรือปลูกในแหล่งเดียวกัน และหากพิจารณาตามข้อกำหนดของปริมาณจำกัดของ CAPs ในซอสพริกแล้ว จะเห็นได้ว่ามี 7 ตัวอย่างที่มี CAPs เกิน 50 ppm ( $\mu\text{g/g}$ ) ซึ่งน่าจะจัดเป็นซอสพริกสูตรเผ็ดจัดมาก (extremely hot chili sauce)

#### 4.3 หาปริมาณแคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซินในตัวอย่างเครื่องแกง

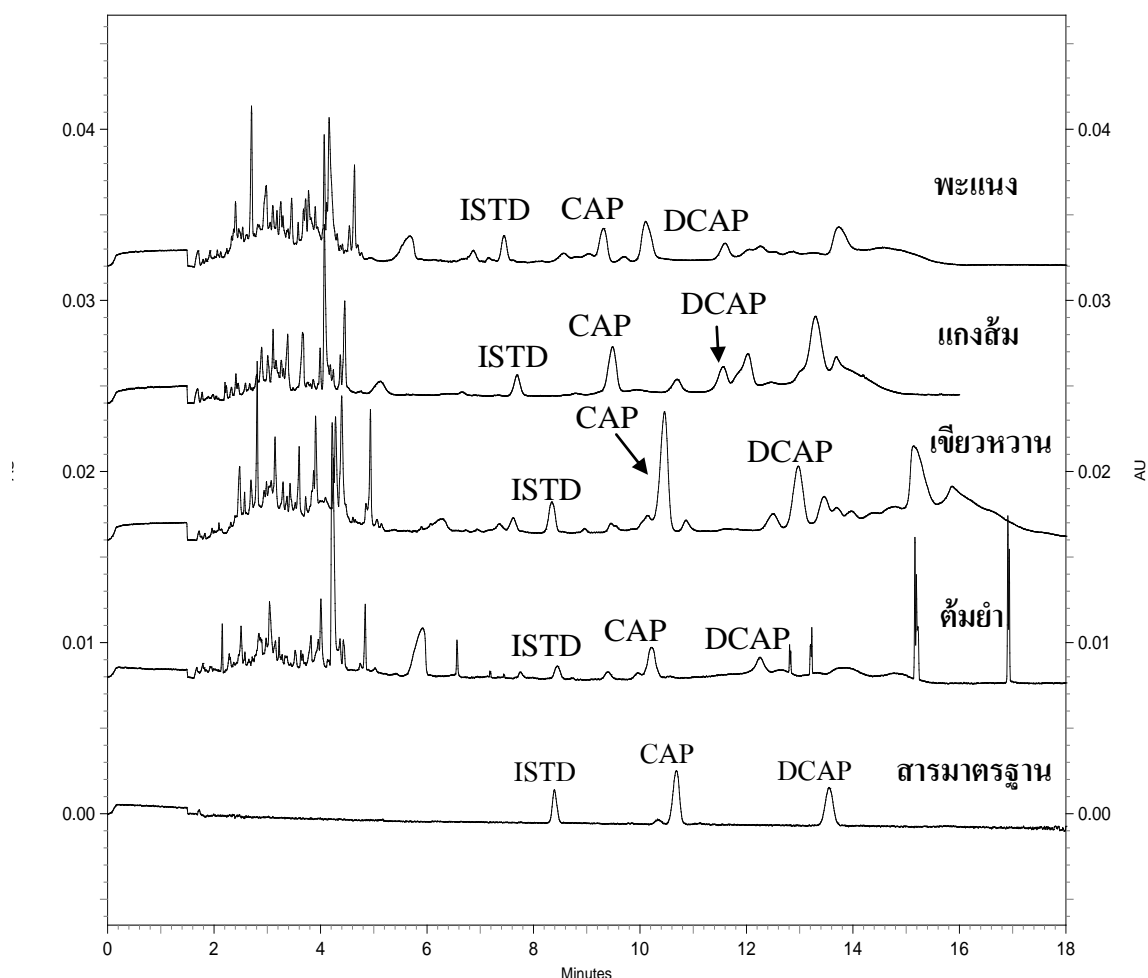
ทำการประยุกต์วิธีการเตรียมตัวอย่าง และภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกและวิเคราะห์หาปริมาณแคปไซซินอยด์ที่ได้พัฒนาในงานวิจัยนี้มาใช้กับตัวอย่างเครื่องแกงสำเร็จรูปชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำพริกแกงส้ม เครื่องต้มยำ น้ำพริกพะแนง และน้ำพริกแกงเขียวหวาน เป็นต้น

ทำการเตรียมตัวอย่าง blank เครื่องแกงโดยเตรียมจากการผสมเครื่องแกงตามอัตราส่วนผสมที่ระบุในฉลากแต่ละชนิดและแต่ละยี่ห้อที่ไม่มีส่วนผสมของพริกซึ่งมีแคปไซซินอยด์ (CAPS) และตัวอย่างเครื่องแกงน้ำพริกแกงชนิดต่างๆ ดังหัวข้อ 3.9.2 และแผนผังรูปที่ 3.1 ทำการสกัดซ้ำ 3 batch ในแต่ละตัวอย่าง แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MEKC ที่ภาวะเหมาะสมที่หาได้สำหรับการหาปริมาณสารที่สนใจ นำอัตราส่วนของ corrected peak area ที่ได้ไปคำนวณหาความเข้มข้นของ CAP และ DCAP ที่มีอยู่ในตัวอย่างโดยใช้กราฟมาตรฐาน (รูปที่ 4.1) และคำนวณเป็นปริมาณสารในเครื่องแกง ดังสมการที่ 1

เครื่องแกงเป็นตัวอย่างที่มีองค์ประกอบหลายอย่างได้แก่ พริก หอมแดง กระเทียม เกลือ กะปิ และตะไคร้ เป็นต้น พบว่าการเตรียม blank ของเครื่องแกงชนิดต่างๆ (มีองค์ประกอบทุกอย่างเช่นเดียวกับตัวอย่างเครื่องแกงจริง ยกเว้นไม่มีพริกเป็นส่วนประกอบ) ไม่มีเมทริกซ์ที่รบกวนการวิเคราะห์ ตัวอย่างอิเล็กโทรฟีโรแกรมแสดงดังรูปที่ 4.6 และ 4.7 โดยทำการยืนยันพิกสารโดยใช้ spiking techniques และสามารถวิเคราะห์หาปริมาณของ CAP และ DCAP ได้ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.3



**รูปที่ 4.6** อิเล็กโทรโฟโแกรมของตัวอย่างเครื่องแกงน้ำพริกแกงส้ม และแบล็งค์ของเครื่องแกงน้ำพริกแกงส้มที่ทำการวิเคราะห์ห้ปริมาณ; ISTD = Internal Standard, CAP = แคปไซซิน และDCAP = ไดไฮโดรแคปไซซิน



รูปที่ 4.7 MEKC อิเล็กโทรโฟโกราฟีของเครื่องแกงสำเร็จรูปชนิดต่างๆ

ตารางที่ 4.3 ปริมาณของแคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซินในตัวอย่างเครื่องแกงสำเร็จรูป

ตัวอย่าง	พริกในเครื่องแกง (%)	ปริมาณสาร (ppm, $\mu\text{g/g}$ )		
		CAP	DCAP	CAPs
P-SC-A27	27	$52.5 \pm 1.7$	$14.7 \pm 0.6$	$67.2 \pm 1.8$
P-PC-A36	36	$30.1 \pm 0.5$	$11.0 \pm 0.5$	$41.1 \pm 0.7$
P-TY-B30	30	$44.4 \pm 2.0$	$19.9 \pm 1.0$	$64.3 \pm 2.2$
P-GC-A30	30	$103.1 \pm 2.2$	$36.8 \pm 1.7$	$139.9 \pm 2.8$
P-GC-C31	31	$75.8 \pm 4.2$	$22.3 \pm 3.8$	$98.2 \pm 5.7$

SC = แกงส้ม, PC = พะเนาง, TY = ต้มยำ, GC = แกงเจียวหวาน



จากผลการทดลอง จะเห็นว่าปริมาณ CAPs ไม่มีแนวโน้มความสัมพันธ์แปรตามปริมาณ  
พริกที่ระบุไว้ แม้ว่าเปอร์เซ็นต์พริกที่ระบุไว้มากกว่าแต่ปริมาณ CAPs ที่ได้กลับน้อยกว่า หรือใน  
กรณีที่เปอร์เซ็นต์พริกที่ระบุไว้เท่ากันแต่ปริมาณ CAPs ที่วิเคราะห์ได้ไม่เท่ากัน ทั้งนี้เนื่องจากความ  
แตกต่างของสายพันธุ์ และ/หรือ แหล่งพริกที่ใช้ในการผลิตเครื่องแกงแต่ละยี่ห้อ นอกจากนี้ลักษณะ  
พริกที่แตกต่างกัน เช่น พริกสด พริกแห้ง ก็อาจส่งผลต่อปริมาณ CAPs ได้ด้วยเช่นกัน

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลอง

ได้ประยุกต์เทคนิคไมเซลล์าร์อิเล็กโทรโครมาโทกราฟี (micellar electrokinetic chromatography, MEKC) และวิธีการเตรียมตัวอย่างสำหรับแยกและหาปริมาณแคปไซซิน (CAP) และไดไฮโดรแคปไซซิน (DCAP) ที่พัฒนาขึ้นกับตัวอย่างซอสพริกจริงและเครื่องแกงสำเร็จรูป สำหรับภาวะการสกัดที่เหมาะสมคือ สกัดตัวอย่าง 2.5 กรัม ด้วย เอทิลอะซิเตต 10 ml และเติมเกลือ (NaCl 0.5 กรัม และ anhydrous MgSO<sub>4</sub> 1.0 กรัม) โดยทำการสกัด 1 ครั้ง และภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์แยก CAP และ DCAP ที่เหมาะสมด้วย MEKC คือ คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50  $\mu$ m ความยาว 40.2 cm (30 cm ถึงเครื่องตรวจวัด), ศักย์ไฟฟ้า 25 kV, ตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัด UV ที่ความยาวคลื่น 214 nm และบัฟเฟอร์ที่ใช้ประกอบด้วย 10 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> ที่ pH 9.2, 60 mM SDS, 15% ACN และใช้ bisphenol A เป็น internal standard

จากตัวอย่างซอสพริก 22 ตัวอย่าง และตัวอย่างเครื่องแกงสำเร็จรูป 5 ตัวอย่าง พบว่าปริมาณ CAPs ของตัวอย่างซอสพริกและเครื่องแกงสำเร็จรูปอยู่ในช่วง 13 ถึง 262 ppm และ 41 ถึง 140 ppm ตามลำดับ โดยที่ใน 7 ตัวอย่างซอสพริก และใน 4 ตัวอย่างเครื่องแกง มีปริมาณ CAPs มากกว่า 50 ppm (mg/kg) ซึ่งเกินปริมาณจำกัดที่สหภาพยุโรป (European Commission)แนะนำ นอกจากนี้ ปริมาณ CAPs ที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างอื่น ๆ ไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณพริกที่ระบุไว้ในซอสพริก และไม่มีแนวโน้มความสัมพันธ์แปรตามปริมาณพริกและระดับความเผ็ดที่ระบุไว้ เนื่องจากความแตกต่างของสายพันธุ์ และ/หรือ แหล่งพริกที่ใช้ในการผลิตซอสพริก และเครื่องแกงสำเร็จรูป เมื่อเปรียบเทียบปริมาณวิเคราะห์ตัวอย่างซอสพริกที่หาได้ด้วย MEKC และ HPLC ด้วยวิธี pair t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตาม HPLC มีข้อเสียคือต้องเสียเวลาในขั้นตอนของการได้สารประกอบอื่นๆออกไปจากคอลัมน์หลังจากที่ทำการตรวจวัดสารตัวอย่างแล้ว อีกทั้งสิ้นเปลืองปริมาณของเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้

ดังนั้น MEKC และวิธีการสกัดที่พัฒนาขึ้นนี้ จึงน่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของการวิเคราะห์ปริมาณ CAPs ในซอสพริกและเครื่องแกงได้ เพื่อใช้ควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์และเป็นข้อมูลความปลอดภัยของผู้บริโภคได้

## เอกสารอ้างอิง

- นิจศิริ เรืองรังษี. (2534). เครื่องเทศ. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 103-107.
- บัญญัติ สุขศรีงาม. (2527). เครื่องเทศที่ใช้เป็นสมุนไพร เล่ม 1. พิมพ์ครั้งที่ 1. โรงพิมพ์อมรรการพิมพ์. กรุงเทพมหานคร. 50-56.
- มูลนิธิโกมลคีมทอง. (2527). สมุนไพรชาวบ้าน. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร. 4-6.
- Anastassiades, M., Lehotay, S.J., Stajnbaher, and D. Schenck, F.J. (2003). Fast and Easy Mutiresidue 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.
- Barbero, G.F., Liazid, A., Palma, M. and Barroso, C.G. (2008a). 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. (2008b). Ultrasound-assisted extraction of capsaicinoids from peppers. *Talanta* **75**, 1332-1337.
- Barbero, G.F., Palma, M. and Barroso, C.G. (2006a). 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. (2006b). 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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 2<sup>nd</sup> Edn. 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. Elseveir. 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.
- Miller, J.C. and Miller J.N. (1993). Statistics for Analytical Chemistry 3<sup>rd</sup> Edn. Ellis Horwood PTR Prentice Hall. UK. pp 58-59.
- 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., Latournerie-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., Carle, R. and Schieber, A. (2006a). 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.
- Schweiggert, U., Schieber, A. and Carle, R. (2006b). 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.
- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J. and Crouch, S. R. *Fundamentals of Analytical Chemistry*. 8<sup>th</sup> Edn. Brooks/Cole. USA. pp 154-157.
- 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 capsicin. *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.
- 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.
- Thailand Trading Report.; Major destinations. (n.d.) available on the website at <http://www2.ops3.moc.go.th/menucomth>. 23 November 2009.
- 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 <sup>13</sup>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.
- 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

**ภาคผนวก**  
**การทดสอบทางสถิติ**

ตาราง ผ1 เปรียบเทียบปริมาณของแคปไซซินที่วิเคราะห์ได้จาก MEKC และ HPLC

t-Test: Paired Two Sample for Means				
MEKC	HPLC		Variable 1 MEKC	Variable 2 HPLC
95.1	98.0	Mean	58.76666667	55.87777777
26.4	28.3	Variance	2807.625	2431.91194
62.4	57.1	Observations	9	9
175.0	158.8	Pearson Correlation	0.996381958	
84.6	83.6	Hypothesized Mean Difference	0	
19.6	18.0	df	8	
35.0	29.8	t Stat	<b>1.522669516</b>	
20.0	19.3	P(T<=t) one-tail	0.083170401	
10.8	10.0	t Critical one-tail	1.859548033	
		P(T<=t) two-tail	0.166340802	
		t Critical two-tail	<b>2.306004133</b>	

จากตารางข้างต้น  $t$  Stat (1.522669516) น้อยกว่า  $t$  critical two tail (2.306004133) สรุปได้ว่าปริมาณวิเคราะห์ที่ได้จาก MEKC และ HPLC ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

หมายเหตุ ในตาราง ผ1, ผ2 และ ผ3 นั้น ค่า  $t$  stat ของ paired t-test คำนวณโดยใช้โปรแกรม Excel ซึ่งมีค่าดังสมการ [Miller and Miller: 1993, Skoog *et al.*: 2004]

$$t = \frac{\bar{d}}{s_d / \sqrt{N}}$$

ในที่นี้  $d$  คือ ค่าความต่างที่วิเคราะห์ได้จากทั้งสองวิธีที่ใช้ตัวอย่างเดียวกัน

$\bar{d}$  คือ ค่าเฉลี่ยของความแตกต่างข้างต้น

$s_d$  คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของ  $d$

$N$  คือ จำนวนของจำนวนคู่ที่เปรียบเทียบ

ตาราง พ2 เปรียบเทียบปริมาณของไดไฮโดรแคปไซซินที่วิเคราะห์ได้จาก MEKC และ HPLC

t-Test: Paired Two Sample for Means

			Variable 1	Variable 2
MEKC	HPLC		MEKC	HPLC
32.9	35.6	Mean	25.51111111	24.87778
4.6	5.2	Variance	732.6261111	602.4969
18.8	18.4	Observations	9	9
86.9	76.3	Pearson Correlation	0.993070054	
47.2	49.6	Hypothesized Mean Difference	0	
6.8	7.3	df	8	
17.9	17.4	t Stat	<b>0.48159175</b>	
9.5	10.2	P(T<=t) one-tail	0.321496842	
5.0	3.9	t Critical one-tail	1.859548033	
		P(T<=t) two-tail	0.642993684	
		t Critical two-tail	<b>2.306004133</b>	

จากตารางข้างต้น  $t$  Stat (0.48159175) น้อยกว่า  $t$  critical two tail (2.306004133) สรุปได้ว่าปริมาณวิเคราะห์ที่ได้จาก MEKC และ HPLC ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตาราง ผ3 เปรียบเทียบปริมาณของ CAPs ที่วิเคราะห์ได้จาก MEKC และ HPLC

t-Test: Paired Two Sample for Means

			Variable 1	Variable 2
MEKC	HPLC		MEKC	HPLC
128.0	133.6	Mean	84.27777778	80.75555556
31.0	33.5	Variance	6323.981944	5365.495278
81.2	75.5	Observations	9	9
261.9	235.1	Pearson Correlation	0.995696842	
131.8	133.2	Hypothesized Mean Difference	0	
26.4	25.3	df	8	
52.9	47.2	t Stat	<b>1.11696604</b>	
29.5	29.5	P(T<=t) one-tail	0.148214655	
15.8	13.9	t Critical one-tail	1.859548033	
		P(T<=t) two-tail	0.296429309	
		t Critical two-tail	<b>2.306004133</b>	

จากตารางข้างต้น t Stat (1.11696604) น้อยกว่า t critical two tail (2.306004133) สรุปได้ว่าปริมาณวิเคราะห์ที่ได้จาก MEKC และ HPLC ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%