สำนักงานวิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์

1) เครื่องคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิส 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 เคมีภัณฑ์

1) capsaicinoid (capsaicin 65 % และ dihydrocapsaicin 35 %) ของบริษัท Aldrich

2) Ethyl acetate (EtOAc) HPLC grade ของบริษัท Fisher Scientific

3) Acetronitrile (ACN) HPLC grade ของบริษัท Merck

4) Sodium dedecyl 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 μm membrane filter

13) น้ำ Milli Q

14) Ethanol ของบริษัท Merck

15) Capsicum oleoresin จากบริษัทอุตสาหกรรมเครื่องหอมไทย-จีน จำกัด (ตัวอย่าง A), บริษัทดิงส์ ฟู้ด เอ็นเทอไพรซ จำกัด (ตัวอย่าง B), บริษัทเคม สตาร์ จำกัด (ตัวอย่าง C) และกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (ตัวอย่าง D)

16) ตัวอย่างซอสพริก ที่มีในท้องตลาด 22 ตัวอย่าง

3.3 วิธีดำเนินการทดลอง

3.3.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานสำหรับเทคนิค MEKC

3.3.1.1 เตรียมสารละลายที่ประกอบด้วย 60 mM SDS ที่มีอะซิโตไนไทรล์ (ACN) 15 % โดยปริมาตร สำหรับเป็นตัวทำละลายและเจือจางสารละลายมาตรฐานในข้อ 3.3.1.2 และ 3.3.1.3 เป็นต้น

3.3.1.2 เตรียมสารละลายมาตรฐานแคปไซซิน (CAP) และไดไฮโดรแคปไซซิน (DCAP) ความเข้มข้นรวม 2000 ppm โดยชั่งแคปไซซินอยด์ (CAPs) น้ำหนักที่แน่นอนและใช้ตัวทำละลายในข้อ 3.3.1.1 จะได้สารละลายมาตรฐานที่ประกอบด้วย 1300 ppm CAP และ 700 ppm DCAP

3.3.1.3 เตรียมสารละลายมาตรฐานของ Bisphenol A (เป็น internal standard) ความเข้มข้น 1000 ppm โดยชั่ง Bisphenol A น้ำหนักแน่นอน และใช้ตัวทำละลายในข้อ 3.3.1.1

3.3.1.4 เตรียมสารละลายมาตรฐาน CAP และ DCAP ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ประกอบด้วย Bisphenol A 50 ppm เป็น internal standard (ISTD) โดยเจือจางสารสารละลายมาตรฐานข้อ 3.3.1.2 และ 3.3.1.3 ด้วยตัวทำละลายในข้อ 3.3.1.1

3.3.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานสำหรับเทคนิค MEEKC

3.3.2.1 เตรียมไมโครอิมัลชันสำหรับเป็นตัวทำละลายและเจือจางสารละลายมาตรฐาน เช่น สำหรับไมโครอิมัลชัน 100 ml ประกอบด้วยเอทิลอะซิเตต (EtOAc) 5.6 ml 1-บิวทานอล 14.8 ml ACN 10 ml และ 16 ml ของ 500 mM SDS และที่เหลือเป็นน้ำ หลังจากผสมในขวดวัดปริมาตรแล้ว แล้วนำไป sonicate ประมาณ 30 นาที เพื่อให้ได้ไมโครอิมัลชันที่เสถียร (ใสเป็นเนื้อเดียวกัน)

3.3.2.2 เตรียมสารละลายมาตรฐาน CAP และ DCAP ความเข้มข้นรวม 2000 ppm โดยชั่ง CAPs น้ำหนักที่แน่นอน และใช้ตัวทำละลายเป็นไมโครอิมัลชันในข้อ 3.3.2.1 จะได้สารละลายมาตรฐานที่ประกอบด้วย 1300 ppm CAP และ 700 ppm DCAP

3.3.3 การเตรียมสารละลายสำหรับบัฟเฟอร์

3.3.3.1 เตรียมสารละลาย 500 mM sodium dodecyl sulfate (SDS) โดยชั่ง SDS น้ำหนักที่แน่นอน ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำ Milli Q

3.3.3.2 เตรียมสารละลาย 100 mM $Na_2B_4O_7$ (บอเรตบัฟเฟอร์) ที่ pH ประมาณ 9.2 โดยชั่ง $Na_2B_4O_7.10H_2O$ น้ำหนักที่แน่นอน ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำ Milli Q จะได้บอเรตบัฟเฟอร์ที่ pH ประมาณ 9.2 โดยไม่ต้องปรับ pH ใดๆ

3.3.4 การเตรียมสารละลายสำหรับเจือจางตัวอย่าง

3.3.4.1 เตรียมสารละลาย 120 mM SDS โดยชั่ง SDS น้ำหนักที่แน่นอนละลายปรับปริมาตรด้วยน้ำ Milli Q

3.3.5 ภาวะของ CE สำหรับการทดลอง

ภาวะของ CE เริ่มต้นที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ CAP และ DCAP คือ

เครื่อง CE: Beckman รุ่น MDQ

คะพิลลารี: uncoated fused silica capillary 50 μm i.d.× 40.2 cm (30 cm ถึงเครื่องตรวจวัด)

การบรรจุสาร: อัดความดัน 0.5 psi เป็นเวลา 5 วินาที

การตรวจวัด: photodiode array ช่วง 200 ถึง 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 (MeOH) 10 นาที น้ำ Milli Q 10 นาที 0.1 M NaOH 20 นาที และ น้ำ 20 นาที

อุณหภูมิของคะพิลลารี: 25 °C

ศักย์ไฟฟ้า: 25 kV

BGE: สำหรับเทคนิค MEKC ประกอบด้วย 10 mM $Na_2B_4O_7$ ที่ pH 9.2 ที่ประกอบด้วย SDS และตัวทำละลายอินทรีย์ และสำหรับเทคนิค MEEKC ประกอบด้วย 10 mM $Na_2B_4O_7$ ที่ pH 9.2, 0.56 % v/v EtOAc, 162 mM 1-บิวทานอล ที่ประกอบด้วย SDS และตัวทำละลายอินทรีย์

หาภาวะของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณของ CAP และ DCAP ด้วย CE โดยทำการศึกษาผลของชนิดและปริมาณของตัวทำละลายอินทรีย์ และผลของความเข้มข้นของ SDS ทั้งในเทคนิค MEKC และ MEEKC นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาถึงผลของอุณหภูมิและศักย์ไฟฟ้าด้วย

3.3.6 การหาภาวะที่เหมาะสมของ CE

3.3.6.1 ตัวทำละลายอินทรีย์

3.3.6.1.1 ผลของชนิดและปริมาณของตัวทำละลายอินทรีย์สำหรับเทคนิค MEKC

เตรียมบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 10 mM $Na_2B_4O_7$ ที่ pH 9.2, 60 mM SDS และตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็น MeOH หรือ ACN เข้มข้น 5 ถึง 15 % v/v แล้วใช้เป็น BGE สำหรับแยกและวิเคราะห์สารมาตรฐาน และส่วนสกัดพริกด้วย CE โดยใช้ภาวะอื่นของ CE ในหัวข้อ 3.3.5 ผลการทดลองที่ได้ดังหัวข้อ 4.3.1

3.3.6.1.2 ผลของชนิดและปริมาณของตัวทำละลายอินทรีย์สำหรับเทคนิค MEEKC

เตรียมบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 10 mM $Na_2B_4O_7$ ที่ pH 9.2, 0.56 % v/v EtOAc, 162 mM 1-บิวทานอล, 50 mM SDS และตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็น MeOH หรือ ACN เข้มข้น 5 ถึง 15 % v/v แล้วใช้เป็น BGE สำหรับแยกและวิเคราะห์สารมาตรฐาน และส่วนสกัดพริกด้วย CE โดยใช้ภาวะอื่นของ CE ในหัวข้อ 3.3.5 ผลการทดลองที่ได้ดังหัวข้อ 4.4.1

3.3.6.2 ผลของความเข้มข้นของ SDS

3.3.6.2.1 ผลของความเข้มข้นของ SDS สำหรับเทคนิค MEKC

เตรียมบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 10 mM $Na_2B_4O_7$ ที่ pH 9.2, 15 % v/v ACN และ SDS ที่ความเข้มข้นในช่วง 40 ถึง 80 mM แล้วใช้เป็น BGE สำหรับวิเคราะห์สารด้วย CE โดยใช้ภาวะอื่นของ CE ในหัวข้อ 3.3.5 ผลการทดลองที่ได้ดังหัวข้อ 4.3.2

3.3.6.2.2 ผลของความเข้มข้นของ SDS สำหรับเทคนิค MEEKC

เตรียมบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 10 mM $Na_2B_4O_7$ ที่ pH 9.2, 0.56 % v/v EtOAc, 162 mM 1-บิวทานอล, 10 % v/v ACN และ SDS ที่ความเข้มข้นในช่วง 50 ถึง 80 mM แล้วใช้เป็น BGE สำหรับวิเคราะห์สารด้วย CE โดยใช้ภาวะอื่นของ CE ในหัวข้อ 3.3.5 ผลการทดลองที่ได้ดังหัวข้อ 4.4.2

3.3.6.3 อุณหภูมิและศักย์ไฟฟ้า

3.3.6.3.1 ผลของอุณหภูมิ

เตรียมบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 10 mM $Na_2B_4O_7$ ที่ pH 9.2, 60 mM SDS และ 15 % v/v ACN ใช้เป็น BGE สำหรับวิเคราะห์สารด้วย CE โดยใช้ภาวะอื่นของ CE ในหัวข้อ 3.3.5 แต่ใช้อุณหภูมิตั้งแต่ 25 ถึง 35 °C ผลการทดลองที่ได้ดังหัวข้อ 4.3.3

3.3.6.3.2 ผลของศักย์ไฟฟ้า

เตรียมบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 10 mM $Na_2B_4O_7$ ที่ pH 9.2, 60 mM SDS และ 15 % v/v ACN ใช้เป็น BGE สำหรับวิเคราะห์สารด้วย CE โดยใช้ภาวะอื่นของ CE ในหัวข้อ 3.3.5 แต่ใช้ศักย์ไฟฟ้าตั้งแต่ 15 ถึง 25 kV ผลการทดลองที่ได้ดังหัวข้อ 4.3.4

3.3.7 ขีดจำกัดของการวิเคราะห์สารมาตรฐาน

เตรียมสารละลายมาตรฐาน CAP และ DCAP ที่เจือจางตามความเหมาะสม ($C_{diluted}$) นำไปวิเคราะห์ด้วย CE แล้ววัดอัตราส่วนของสัญญาณต่อสัญญาณรบกวน (S/N) จนกระทั่งได้ค่า S/N ใกล้เคียงกับ 3 และ 10 จากนั้นคำนวณขีดจำกัดของการตรวจวัด ((limit of detection, LOD) และขีดจำกัดของปริมาณวิเคราะห์ (limit of qauntitation, LOQ) ดังผลการทดลองที่ 4.5.1

$$LOD = \frac{3}{S/N} \times C_{diluted} \qquad \text{และ} \qquad LOQ = \frac{10}{S/N} \times C_{diluted}$$

3.3.8 กราฟมาตรฐาน

ทำการทดลองโดยใช้ภาวะของ CE ที่เหมาะสม และใช้สารละลายมาตรฐานในข้อ 3.3.1.4 ซึ่งประกอบด้วย CAP และ DCAP ที่ความเข้มข้นต่างๆ และประกอบด้วย 50 ppm Bisphenol A เป็น internal standard จากนั้นสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับปริมาณวิเคราะห์ ดังผลการทดลองหัวข้อ 4.5.2

3.3.9 ความแม่นและความเที่ยงของการวิเคราะห์

3.3.9.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน CAP : DCAP ที่ความเข้มข้น (ppm) 81.2 : 43.8, 390 : 210 และ 780 : 420 โดยแต่ละสารละลายมาตรฐานประกอบด้วย 50 ppm Bisphenol A เป็น internal standard ในเมทริกซ์ที่เป็นบัฟเฟอร์ซึ่งประกอบด้วย 60 mM SDS ที่มี 15 % v/v ACN

3.3.9.2 นำสารละลายมาตรฐานในข้อ 3.3.11.1 มาวิเคราะห์ด้วย CE โดยใช้บัฟเฟอร์ที่เหมาะสมและภาวะของ CE ดังหัวข้อ 3.3.6 โดยทำการทดลองซ้ำ 5 ครั้ง จากนั้นคำนวณหาปริมาณสารโดยใช้กราฟมาตรฐานในข้อ 3.3.10 แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความถูกต้องและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

3.3.9.3 เตรียมสารละลายตัวอย่างที่เติม (spike) CAP และ DCAP คิดเป็นความเข้มข้นหลังเติม 81.2 : 43.8 และ 390 : 210 ppm และสารละลายสุดท้ายประกอบด้วย 50 ppm Bisphenol A, 60 mM SDS ที่มี 15 % v/v ACN

3.3.9.4 นำสารละลายตัวอย่างก่อนและหลังเติม CAP และ DCAP ไปทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค CE เช่นเดียวกับหัวข้อ 3.3.11.2 แล้วคำนวณผลต่างของปริมาณ CAP และ DCAP ก่อนและหลังเติม เปรียบเทียบกับปริมาณ CAP และ DCAP ที่เติมลงไป

3.3.9.5 นำข้อมูลของไมเกรชันไทม์ที่ได้จากการทดลอง 3.3.11.2 และ 3.3.11.4 ไปคำนวณความเที่ยงของไมเกรชันไทม์

3.3.10 การหาปริมาณแคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซินในตัวอย่างส่วนสกัดพริก

ชั่งส่วนสกัดจากพริกตัวอย่างน้ำหนักที่แน่นอนใกล้เคียง 0.5 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยอะซิโตไนไทรล์ ในขวดวัดปริมาตร 10 ml แล้วดูดสารละลายตัวอย่างมา 1.5 ml เติม 500 mM SDS 1.2 ml และปรับปริมาตรด้วยน้ำในขวดวัดปริมาตร 10 ml จากนั้นเจือจางด้วยตัวทำละลาย ข้อ 3.3.3.1 โดยที่สารละลายตัวอย่างประกอบด้วย 50 ppm ISTD จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองธรรมดาเบอร์ 1 และ syringe filter ขนาด 0.45 μm แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค CE ที่ภาวะ

เหมาะสมที่หาได้จากการทดลอง แล้วคำนวณหาปริมาณ CAP และ DCAP โดยใช้กราฟมาตรฐาน ในหัวข้อ 3.3.8

3.3.11 การหาชนิดและปริมาณของตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดแคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซิน และการกำจัดเมทริกซ์ในตัวอย่างที่เป็นผลิตภัณฑ์พริก

3.3.11.1 ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษามี 3 ชนิด คือ

3.3.11.1.1 ซอสแบล็งค์ (sauce blank) หมายถึง ซอสที่ไม่มีส่วนผสมของ CAPs เตรียมจากการผสมของ น้ำตาล, กระเทียม, น้ำส้มสายชู, เกลือและน้ำ ในอัตราส่วนผสมโดยน้ำหนัก 35 : 10 : 15 : 5 : 35

3.3.11.1.2 ซอสพริกเตรียม (prepared chili sauce) คือ ซอสแบล็งค์ที่มีการเติมสารมาตรฐาน CAPs ลงไปในประมาณที่แน่นอน

3.3.11.1.3 ซอสพริกจริง (real chili sauce) ซื้อจากท้องตลาดและไม่สามารถเปิดเผยยี่ห้อได้

3.3.11.2 ขั้นตอนการสกัดซอสด้วยตัวทำละลาย (รูปที่ 3.1)

3.3.11.2.1 ชั่งตัวอย่าง 2.50 กรัม (ซอสพริกจริง ซอสพริกเตรียมเองหรือซอสแบลงค์) ใส่ลงในหลอดพลาสติกขนาด 50 ml

3.3.11.2.2 ปิเปตตัวทำละลายอินทรีย์ 10 ml ลงไป (ได้แก่ ACN หรือ EtOAc โดยที่แต่ละตัวทำละลายของแต่ละตัวอย่างทำซ้ำ 3 ถึง 5 ชุด)

3.3.11.2.3 นำไป vortex เป็นเวลา 3 นาที และ sonicate เป็นเวลา 10 นาที

3.3.11.2.4 เติม anhydrous $MgSO_4$ 1.0 กรัม และ NaCl 0.25 กรัม ลงในหลอดพลาสติกขนาด 50 ml (ในกรณีที่สกัดแบบไม่เติมเกลือ ไม่ต้องทำขั้นตอนนี้)

3.3.11.2.5 นำไป vortex ให้เข้ากันเป็นเวลา 2 นาที และตั้งทิ้งไว้สักครู่ (1 ถึง 2 นาที) เพื่อให้เกิดการแยกชั้นของน้ำและชั้นของตัวทำละลายอย่างชัดเจน

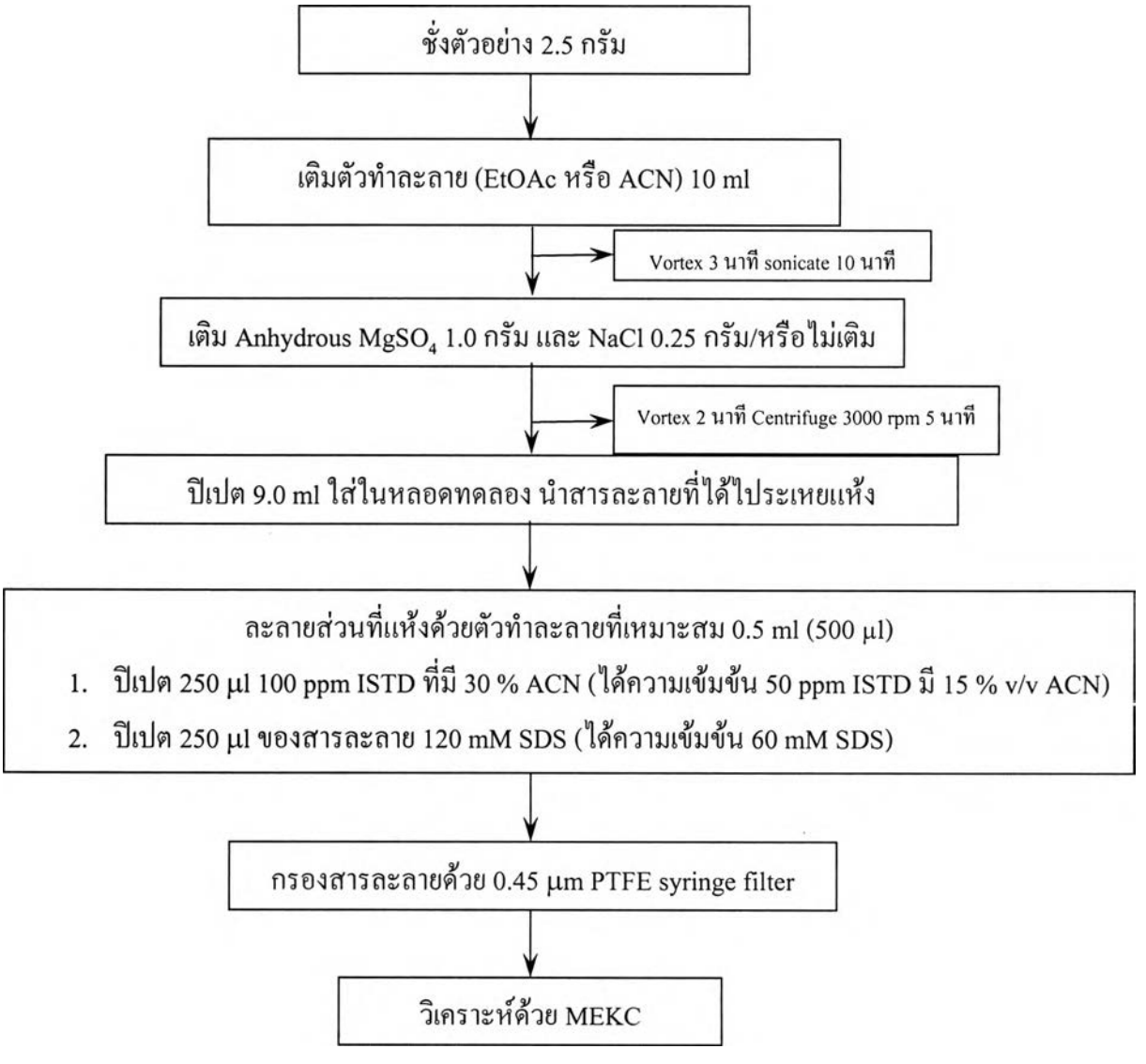
3.3.11.2.6 นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

3.3.11.2.7 ปิเปตชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ 9.0 ml ใส่ในหลอดทดลอง แล้วนำไประเหยแห้ง ด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบหมุน (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 50 °C

3.3.11.2.8 นำส่วนที่ระเหยแห้งแล้ว มาละลายด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม 500 µl คือ ปิเปต 250 µl ของสารละลายมาตรฐาน 100 ppm ISTD ใน 30 % v/v ACN จนละลายหมด แล้วจึงปิเปตอีก 250 µl ของสารละลาย 120 mM SDS จะได้สารละลายตัวอย่างสุดท้ายที่มี 15 % v/v ACN, 50 ppm ISTD และ 60 mM SDS

3.3.11.2.9 กรองสารละลายตัวอย่างด้วย 0.45 μm PTFE syring filter ก่อนการวิเคราะห์ด้วย MEKC

หมายเหตุ: ในกรณีที่สกัดซ้ำ 2 ครั้ง นำส่วนที่เหลือจากข้อที่ 3.3.11.2.7 ดูดชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์ออกให้หมด แล้วปิเปตตัวทำละลายอินทรีย์ลงไปสกัดอีก 10 ml ตามข้อ 3.3.11.2.3 ถึง 3.3.11.2.9 (ยกเว้นไม่ต้องเติมเกลืออีก) โดยในข้อที่ 3.3.11.2.8 ปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 μl ที่มีการเติม CAPs ให้เข้มข้นเป็น 25 ppm (μg/ml) เพื่อให้สามารถตรวจวัด CAPs ได้



รูปที่ 3.1 แผนผังการเตรียมตัวอย่าง

3.3.12 ขีดจำกัดของปริมาณวิเคราะห์ในตัวอย่าง

เตรียมซอสพริกเตรียมจากซอสแบล็งค์ที่มีการเติมสารมาตรฐาน CAPs ลงไปตามความเหมาะสม (C) นำไปวิเคราะห์ด้วย CE แล้ววัดอัตราส่วนของสัญญาณต่อสัญญาณรบกวน (S/N) จนกระทั่งได้ค่า S/N ใกล้เคียงกับ 10 จากนั้นคำนวณขีดจำกัดของปริมาณวิเคราะห์ในตัวอย่าง (sample quantitation limit, SQL) ดังผลการทดลองในหัวข้อ 4.5.1

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

3.3.13 ความแม่นและความเที่ยงของการสกัดด้วยตัวทำละลาย

3.3.13.1 เตรียมซอสพริกที่มีความเข้มข้นของแคปไซซินอยด์เป็น 20, 50 และ 100 ppm (μg/g) โดยแต่ละความเข้มข้นของซอสพริกเตรียม ประกอบด้วย 50 ppm ISTD และ 60 mM SDS ที่มี 15 % v/v ACN

3.3.13.2 นำสารตัวอย่างในข้อ 3.3.13.1 มาวิเคราะห์ด้วย MEKC โดยใช้บัฟเฟอร์และภาวะดังหัวข้อ 3.3.6 (ที่ได้ทำการพัฒนาขึ้น) ทำการทดลองซ้ำวันละ 5 batch เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นคำนวณหาปริมาณสารโดยใช้กราฟมาตรฐานข้อ 3.3.8 แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความแม่นและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ดังผลการทดลองหัวข้อ 4.7.4

3.3.14 การหาปริมาณแคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซินในตัวอย่างซอสพริก

ชั่งซอสพริกจริงน้ำหนักที่แน่นอนใกล้เคียง 2.50 กรัม ใส่ลงในหลอดพลาสติกขนาด 50 ml แล้วปิเปต EtOAc ลงไป 10 ml จากนั้นนำไป vortex เป็นเวลา 3 นาที และ sonicate เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปเติมหรือไม่เติมเกลือลงไป (anhydrous $MgSO_4$ 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 °C จากนั้นเติมตัวทำละลายที่เหมาะสม 500 μl ที่ประกอบด้วยปิเปต 250 μl (0.250 ml) ของสารละลายมาตรฐาน 100 ppm ISTD ใน 30 % v/v ACN จนละลายหมด แล้วจึงปิเปตอีก 250 μl (0.250 ml) ของสารละลาย 120 mM SDS จะได้สารละลายตัวอย่างสุดท้ายที่มี 15 % v/v ACN, 50 ppm ISTD และ 60 mM SDS จากนั้นกรองสารละลายตัวอย่างด้วย syringe filter ขนาด 0.45 μm แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MEKC ที่ภาวะเหมาะสมที่หาได้จากการทำการทดลองก่อนหน้านี้ แล้วคำนวณหาปริมาณ CAP และ DCAP โดยใช้กราฟมาตรฐานในหัวข้อ 3.3.10 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, µg/g)

C_1 คือ ความเข้มข้นของสารในส่วนสกัดสุดท้ายที่วิเคราะห์ได้เทียบจากกราฟมาตรฐาน (ppm, µg/ml)

V_1 คือ ปริมาตรของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้สกัด (ml) ในที่นี้คือ 10.00 ml

V_2 คือ ปริมาตรของส่วนสกัดที่นำไประเหย (ml) ในที่นี้คือ 9.00 ml

V_3 คือ ปริมาตรสุดท้ายก่อนการวิเคราะห์ด้วย MEKC (ml) ในที่นี้คือ 0.500 ml

W คือ น้ำหนักของซอสพริก (g)

I 37573455