



บทที่ 4

ผลการทดลองและการวิจารณ์

4.1 การเลือกภาวะของ CE

4.1.1 ขนาดและความยาวของคะพิลลารี

งานวิจัยนี้ได้เลือกใช้ uncoated fused silica capillary ขนาด $50\ \mu\text{m i.d.} \times 40.2\ \text{cm}$ (30 cm ถึงเครื่องตรวจวัด) เพราะ uncoated fused silica capillary สามารถหาได้ง่าย และราคาถูก โดยทั่วไปขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางคะพิลลารีที่นิยมใช้ใน CE คือ 50 และ $75\ \mu\text{m}$ สำหรับคะพิลลารีที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง $75\ \mu\text{m}$ จะดีกว่าตรงที่จะให้สภาพไว (sensitivity) ที่สูงกว่า เนื่องจากเครื่องตรวจวัดที่ใช้จะเป็น UV-Visible detector และตรวจวัดบนคอลัมน์ (on-column detection) ดังนั้นถ้า cell pathlength ยิ่งมากจะทำให้สภาพไวสูงตามไปด้วย แต่งานวิจัยนี้ไม่ได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารที่ความเข้มข้นน้อย (trace analysis) ดังนั้นจึงเลือกใช้คะพิลลารีที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง $50\ \mu\text{m}$ ถึงแม้ว่าจะให้สภาพไวที่น้อยกว่าคะพิลลารีที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง $75\ \mu\text{m}$ ก็ตาม แต่คะพิลลารีที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง $50\ \mu\text{m}$ จะทำให้เกิด Joule Heating น้อยกว่า [Mayer, 2001] ทำให้สามารถเลือกภาวะของ CE ที่ศักย์ไฟฟ้าสูงและความเข้มข้นของบัฟเฟอร์สูงๆ ได้และทำให้ค่าการแยกของสาร (resolution) มากขึ้น และเลือกใช้ความยาวของคะพิลลารีที่เลือกใช้ $40.2\ \text{cm}$ เพื่อให้สารเกิดการแยกและเวลาวิเคราะห์ไม่นานมากนัก [Landers, 1997]

4.1.2 ความยาวคลื่นของการตรวจวัด

สำหรับงานวิจัยนี้ที่ทำการวิเคราะห์หาปริมาณแคปไซซิน (CAP) และไดไฮโดรแคปไซซิน (DCAP) โดยมี bisphenol A เป็น Internal Standard จากการศึกษาวิสเปกตรัมของสารทั้งสองชนิดพบว่าจะมีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง UV ความยาวคลื่น 200 ถึง $300\ \text{nm}$ และมีค่าการดูดกลืนแสงมากที่สุด ที่ความยาวคลื่น $214\ \text{nm}$ และจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ทำการหาปริมาณ CAP และ DCAP ด้วยเทคนิค MEKC ได้ทำการตรวจวัดที่ความยาวคลื่น $214\ \text{nm}$ [Laskaridou-Monncerville, 1999] ดังนั้นจึงเลือกวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น $214\ \text{nm}$

4.2 องค์ประกอบของบัฟเฟอร์

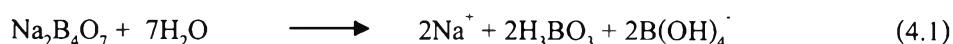
งานวิจัยนี้จะทำการวิเคราะห์หาปริมาณ CAP และ DCAP ด้วยเทคนิค MEKC และ MEEKC โดยใช้บัฟเฟอร์ภาวะที่เป็นเบส

สำหรับเทคนิค MEKC บัฟเฟอร์ประกอบด้วยบอเรตบัฟเฟอร์ที่มีการเติมสารลดแรงดึงผิว และตัวทำละลายอินทรีย์ โดยเลือกใช้เป็น 10 mM บอเรตบัฟเฟอร์ที่ pH 9.2 ที่มีสารลดแรงดึงผิวเป็น SDS และตัวทำละลายอินทรีย์เป็นอะซิโตนไนไตรล์ (ACN) หรือเมทานอล (MeOH)

สำหรับเทคนิค MEEKC บัฟเฟอร์ประกอบด้วยบอเรตบัฟเฟอร์ที่มีการเติมหยคน้ำมัน สารลดแรงดึงผิว สารลดแรงดึงผิวร่วมและตัวทำละลายอินทรีย์ โดยเลือกใช้เป็น 10 mM บอเรตบัฟเฟอร์ที่ pH 9.2 ที่มีหยคน้ำมันเป็น 0.56 % v/v เอทิลอะซิเตต (EtOAc) สารลดแรงดึงผิวเป็น SDS ซึ่งเป็นสารลดแรงดึงผิวประเภทแอนไอออนิก สารลดแรงดึงผิวร่วมเป็น 162 mM 1-บิวทานอลและตัวทำละลายอินทรีย์เป็น ACN หรือ MeOH

4.2.1 pH ของบัฟเฟอร์

งานวิจัยนี้ได้ทำการวิเคราะห์ CAP และ DCAP ในภาวะที่เป็นเบส โดยใช้สารละลายอิเล็กโทรไลต์ (Background Electrolyte, BGE) เป็นบอเรตบัฟเฟอร์ที่ pH 9.2 เพื่อทำให้เกิด EOF มาก ซึ่งใช้ในการขับเคลื่อนสารที่ partitioning เข้าไปในไมเซลล์ที่มีประจุลบ ผ่านด้านเครื่องตรวจวัดที่เป็นขั้วแคโทด (ขั้วไฟฟ้าลบ) ได้ เพราะในกรณีนี้ effective electrophoretic mobility มีทิศตรงกันข้ามกับ EOF ทั้งความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสารและ EOF ขึ้นกับ pH ของ BGE และมีผลต่อไมเกรชันไทม์ของสารตัวอย่าง ดังนั้นสารละลายบัฟเฟอร์จึงมีความสำคัญสำหรับการวิเคราะห์ใน CE เพื่อให้ pH ของสารละลายบัฟเฟอร์คงที่ ในการเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์จึงนิยมเตรียมโดยละลาย $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ด้วยน้ำ จะได้บัฟเฟอร์ที่ pH ประมาณ 9.2 โดยไม่ต้องปรับ pH ใดๆ [Altria and Fabre, 1995] ซึ่งสามารถอธิบายได้ดังสมการที่ 4.1



ในสารละลายบัฟเฟอร์ประกอบด้วยกรดอ่อน (HA) และเกลือของกรดอ่อน (A^-) ดังสมการของ Henderson-Hasselbalch [Chang, 1991]

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \quad (4.2)$$

ในกรณีนี้ HA คือ H_3BO_3 และ A^- คือ $\text{B}(\text{OH})_4^-$ จากสมการที่ (4.1) และ (4.2) ความเข้มข้นที่เท่ากันของ H_3BO_3 และ $\text{B}(\text{OH})_4^-$ จะให้ buffer capacity ที่ดี นั่นคือถ้าความเข้มข้นของบอเรตบัฟเฟอร์ที่เตรียมจาก $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ในแต่ละครั้งเท่ากัน จะได้ความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสาร ไมเกรชันไทม์ และ EOF มีความเที่ยง และถ้าใช้ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ที่มีความบริสุทธิ์สูง จะเตรียมบอเรตบัฟเฟอร์ได้ง่ายและมีความเสถียร [Chankvetadze, 1997]

4.2.2 สารลดแรงตึงผิว (surfactant)

สารลดแรงตึงผิวที่นิยมใช้กันมากใน CE คือ sodium dodecyl sulphate (SDS) [Khaledi, 1998] ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวที่มีประจุลบต่ออยู่กับสายโซ่คาร์บอนที่เป็น C_{12} เนื่องจาก SDS เป็นสารที่มีความบริสุทธิ์สูง หาง่ายและราคาถูก นอกจากนี้สำหรับไมโครอิมัลชันของเทคนิค MEEKC โครงสร้างของ SDS ยังเหมาะสมที่จะให้หมู่แอลคิล partitioning เข้าไปในหยดน้ำมันได้ดี สำหรับสารลดแรงตึงผิวประเภทอื่นๆ อาจเลือกใช้เป็น sodium cholate ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวที่มีประจุลบเช่นเดียวกัน แต่ว่ามีราคาแพง หรืออาจใช้เป็นสารลดแรงตึงผิวที่มีประจุบวก เช่น cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) [Altria, 2000] แต่ Br^- ที่เป็น counter ion จะดูดกลืนแสง UV ในช่วงความยาวคลื่น 200 ถึง 230 nm ซึ่งจะรบกวนการวิเคราะห์ได้ นอกจากนี้สารลดแรงตึงผิวที่มีประจุบวกอาจเกิดการดูดซับที่ผิวของคะปิลลารีไปบางส่วน ทำให้ต้องใช้ปริมาณสารลดแรงตึงผิวมากขึ้น

4.2.3 หยดน้ำมัน

หยดน้ำมันที่ใช้ทั่วไปใน MEEKC ได้แก่ เฮปเทน และออกเทน ซึ่งเฮปเทนจะมีข้อดีตรงที่มีความเป็นพิษน้อยกว่าออกเทน แต่เฮปเทนจะระเหยได้ง่ายกว่า และมีรายงานว่า การใช้หยดน้ำมันเป็นออกเทน เมื่อทำการทดลองซ้ำๆ จะให้ผลที่ใกล้เคียงกันมากกว่าการใช้เฮปเทน [Altria, 2000] ส่วนใหญ่จึงนิยมใช้หยดน้ำมันเป็นออกเทน นอกจากนี้อาจเลือกใช้เป็นหยดน้ำมันที่มีแรงตึงผิวดำ เช่น ได-*n*-บิวทิล ทาร์ทาเรต หรือ EtOAc เพื่อให้ได้เป็นไมโครอิมัลชันโดยที่ใช้ปริมาณสารลดแรงตึงผิวที่ต่ำกว่า [Aurora-Prado *et al.*, 2004] ทำให้สามารถใช้ศักย์ไฟฟ้าสูงๆ ได้ และในการเปลี่ยนชนิดของหยดน้ำมันจะไม่มีผลต่อค่า selectivity ของสาร [Klampfl, 2003] ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้หยดน้ำมันเป็น EtOAc 0.56 % v/v ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่นิยมใช้ในไมโครอิมัลชันบัฟเฟอร์สำหรับเทคนิค MEEKC [Aurora-Prado *et al.*, 2004]

4.2.4 สารลดแรงตึงผิวร่วม (co-surfactant)

สารลดแรงตึงผิวร่วมใน MEEKC จะช่วยให้ระบบไมโครอิมัลชันเสถียรมากขึ้น โดยทำหน้าที่ร่วมกับสารลดแรงตึงผิว ส่วนใหญ่จะใช้เป็นแอลกอฮอล์ที่มีสายคาร์บอนสั้นๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง 1-บิวทานอล ในการเติมสารลดแรงตึงผิวลงไป ในไมโครอิมัลชันบัฟเฟอร์จะเติมในปริมาณที่มากเมื่อเทียบกับหยดน้ำมัน ซึ่งถ้าใช้แอลกอฮอล์ที่มีสายคาร์บอนยาวกว่านี้ สารที่เติมลงไปอาจจะไปทำหน้าที่เป็นหยดน้ำมันแทนหรืออาจจะไม่ละลายรวมกับสารละลายชนิดอื่น (เนื่องจากต้องเติมไปในปริมาณที่มาก) ทำให้สารละลายไม่เป็นไมโครอิมัลชัน นอกจากนี้สายคาร์บอนของแอลกอฮอล์ที่ใช้จะต้องเป็นโซ่ตรง เนื่องจากมีรายงานว่า เมื่อใช้สารลดแรงตึงผิวเป็น 2-บิว

ทานอลหรือ 2-โพรพานอล จะทำให้สารละลายไม่เกิดเป็นไมโครอิมัลชัน [Altria *et al.*, 2000] สำหรับงานวิจัยนี้เลือกใช้สารลดแรงตึงผิวร่วมเป็น 1-บิวทานอล 162 mM ซึ่งเป็นปริมาณสารลดแรงตึงผิวที่นิยมใช้กันมากในไมโครอิมัลชันบัฟเฟอร์ของเทคนิค MEEKC [Aurora-Prado *et al.*, 2004]

4.3 การหาภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค MEKC

ในงานวิจัยนี้ทำการหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณ CAP และ DCAP โดยศึกษาผลของชนิดและปริมาณของตัวทำละลายอินทรีย์ ผลของความเข้มข้น SDS ผลของอุณหภูมิและผลของศักย์ไฟฟ้า ที่มีต่อพฤติกรรมเคลื่อนที่และการแยกของสาร

โดยในการหาและเลือกภาวะที่เหมาะสมนั้น พิจารณาจากการแยกของพีกสารที่สนใจ คือ CAP และ DCAP แยกออกจากกันชัดเจน โดยที่ไม่รบกวนจากพีกอื่นในเมทริกซ์หรือตัวอย่าง และเวลาที่วิเคราะห์ไม่นานเกินไป

4.3.1 ผลของชนิดและปริมาณของตัวทำละลายอินทรีย์

ในช่วงแรกของการทดลองได้ใช้บัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 10 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, 60 mM SDS และตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็น MeOH หรือ ACN ปริมาณ 5, 10 หรือ 15 % v/v โดยใช้อุณหภูมิ 25 °C สำหรับแยกและวิเคราะห์ส่วนสกัดพริก ผลการทดลองดังอิเล็กทรอนิกส์โทรฟีโรแกรมในรูปที่ 4.1 ในภาวะที่ไม่มีการเติมตัวทำละลายอินทรีย์ลงไปบัฟเฟอร์ (รูปที่ 4.1a) พบว่า CAP และ DCAP ไม่แยกออกจากกัน เนื่องจากการ partitioning ระหว่าง micellar phase กับ aqueous phase ของสารทั้งสองจะใกล้เคียงกันมาก ทั้งนี้ CAP และ DCAP เป็นสารที่ละลายน้ำได้น้อยทั้งคู่ ทำให้ชอบ partitioning เข้าไปอยู่ใน micellar phase มากกว่าที่จะอยู่ใน aqueous phase (ในภาวะที่ไม่มีตัวทำละลายอินทรีย์)

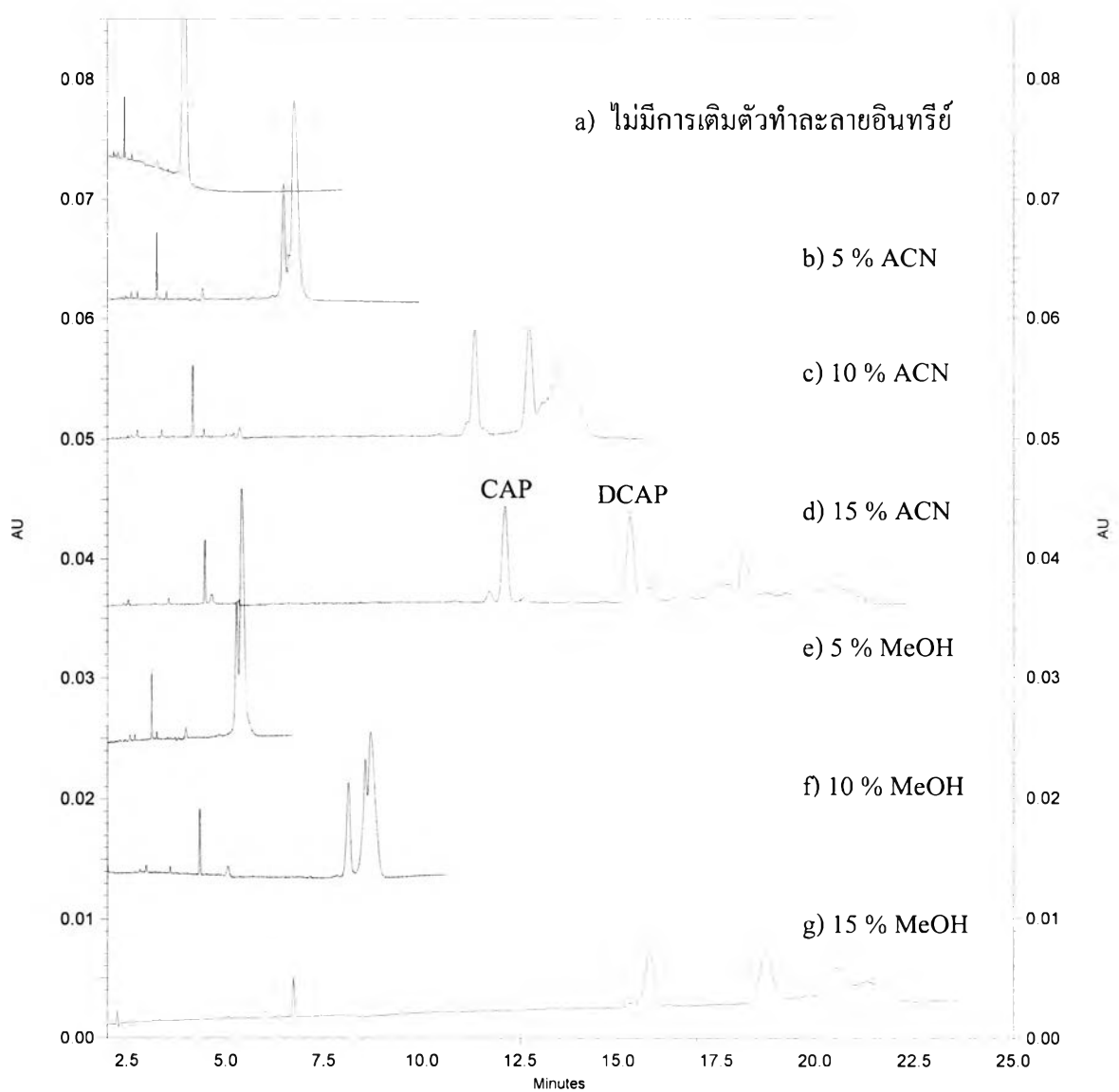
การที่จะทำให้สาร partitioning ออกมาใน aqueous phase เพิ่มขึ้น อาจทำได้โดยการเติมตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งที่นิยมใช้กันทั่วไป ได้แก่ ACN และ MeOH [Altria *et al.*, 2000] ดังนั้นในการทดลองนี้ได้ทำการเติมตัวทำละลายอินทรีย์ 2 ชนิดดังกล่าว ในปริมาณที่แตกต่างกันตั้งแต่ 5 ถึง 15 % v/v ลงในบัฟเฟอร์โดยที่ความเข้มข้นขององค์ประกอบอื่น ๆ เท่าเดิม รูปที่ 4.1b ถึง 4.1g แสดงตัวอย่างของอิเล็กทรอนิกส์โทรฟีโรแกรมที่บัฟเฟอร์ประกอบด้วย 5, 10 หรือ 15 % v/v ของ ACN และ 5, 10 หรือ 15 % v/v ของ MeOH โดยพีกที่ออกมาแรกสุด คือ พีกของ CAP และพีกของ DCAP ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากสารทั้งสองจะสามารถ partitioning ออกมาที่ aqueous phase ได้มากขึ้น ทำให้แยกออกจากกันได้ และเนื่องจากสารทั้งสองชนิดมีความแตกต่างของ partitioning ระหว่าง micellar phase และ aqueous phase ดังนั้นพีกของ CAP และ DCAP จึงแยกออกจากกัน เมื่อพิจารณา

โครงสร้างของสารดังรูปที่ 1.1 CAP มีอยู่หนึ่งตำแหน่งบนสายโซ่คาร์บอนที่เป็นพันธะคู่ ส่วน DCAP ที่ตำแหน่งนั้นจะเป็นพันธะเดี่ยว DCAP จึงเป็นสารที่มีขั้วน้อยกว่า CAP ทำให้ DCAP เกิด partitioning เข้าไปใน micellar phase ได้มากกว่า ดังนั้นในกรณีของ MEKC ที่มี EOF มาก DCAP จึงเคลื่อนที่ออกมาหลัง CAP [Laskaridou-Monnerville, 1999] แต่ถ้าการวิเคราะห์ทำที่ไม่มี EOF ลำดับการออกจะสลับกับภาวะที่มี EOF มาก

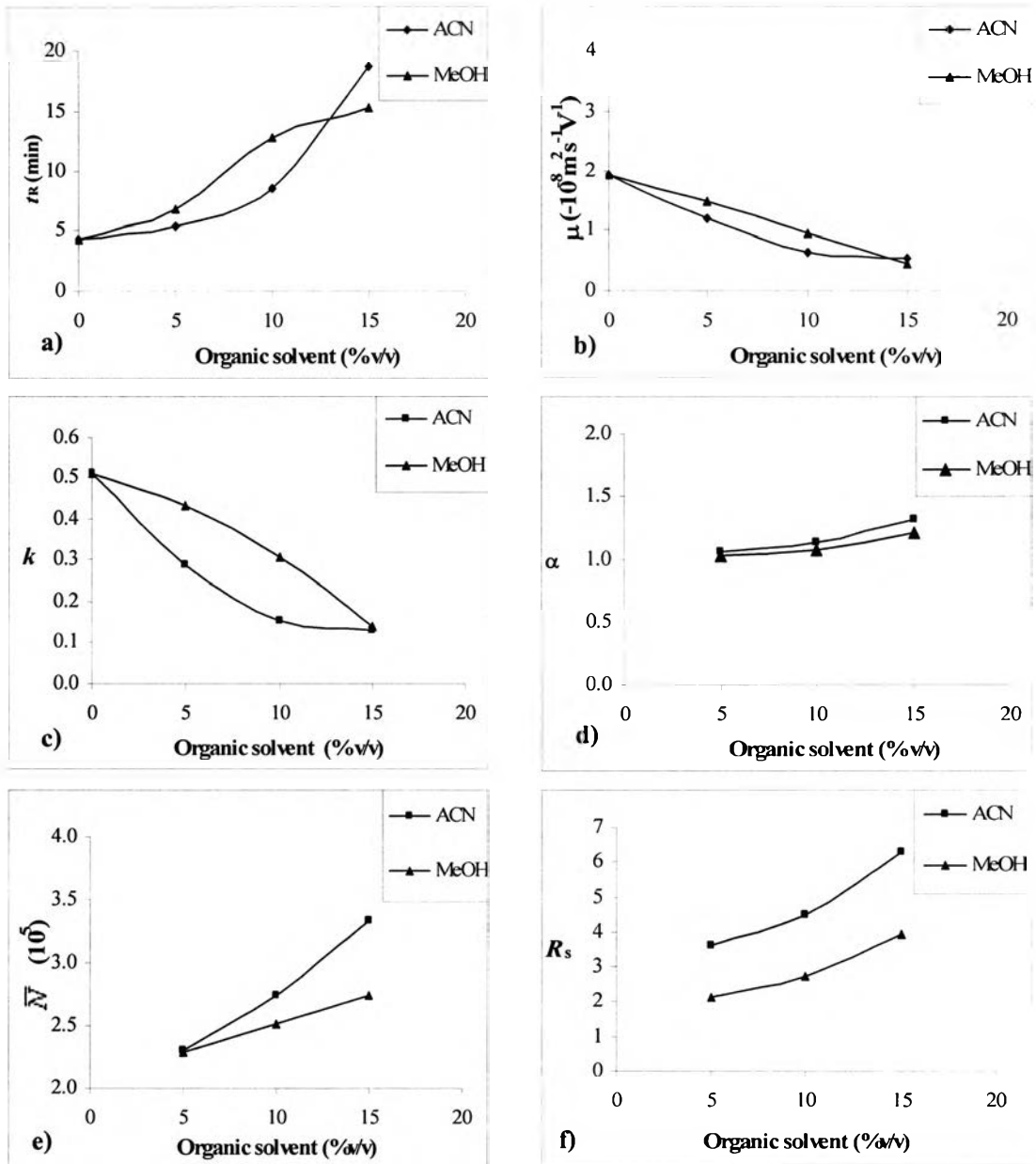
รูปที่ 4.2 แสดงผลของชนิดและปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีต่อพฤติกรรมเคลื่อนที่และการแยกของสาร โดยที่ค่า μ และค่า k ของ CAP ในรูปที่ 4.2b และ 4.2c คำนวณโดยใช้สมการที่ 2.3 และ 2.10 ตามลำดับ ส่วนค่า μ และค่า k ของ DCAP คำนวณได้ในทำนองเดียวกันแต่ไม่ได้แสดงไว้ในที่นี้ ค่า α ในรูปที่ 4.2d คำนวณโดยใช้สมการที่ 2.17 ค่า \bar{N} ในรูปที่ 4.2e เป็นค่าเฉลี่ยของ N สำหรับสารทั้งสองชนิด โดยที่ N คำนวณโดยใช้สมการที่ 2.15 (หรือจากโปรแกรมของเครื่อง CE) ส่วนค่า R_s ของสารสองชนิดในรูปที่ 4.2f คำนวณโดยใช้สมการที่ 2.13 (หรือจากโปรแกรมของเครื่อง CE)

จากรูปที่ 4.2c เมื่อเพิ่มความเข้มข้นตัวทำละลายอินทรีย์ค่า k ของสารลดลง ทั้งนี้เนื่องจาก CAP เกิด partitioning หรือละลายออกมาอยู่ใน aqueous phase ได้มากขึ้น (ดังสมการที่ 2.5, $k \propto 1/n_{aq}$) เมื่อเปรียบเทียบในระบบ MEEKC ที่ประกอบด้วยตัวทำละลายอินทรีย์แตกต่างกัน พบว่าค่า k ของสารจะแตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความสามารถในการละลาย CAP และ DCAP ของตัวทำละลายอินทรีย์แต่ละชนิด

จากรูปที่ 4.1 จะเห็นว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์ สารจะเคลื่อนที่ออกมาได้ช้าลง เนื่องจากการเติมตัวทำละลายอินทรีย์ทำให้ความหนืดของบัฟเฟอร์เพิ่มมากขึ้น ดังนั้น EOF ลดลงดังสมการ 2.2 ความเร็วรวมจึงลดลงด้วยดังสมการ 2.8 และเมื่อเปรียบเทียบการเติมตัวทำละลายอินทรีย์แต่ละชนิดในปริมาณที่เท่ากัน พบว่า ACN จะใช้เวลาในการวิเคราะห์ที่เร็วกว่า เป็นผลเนื่องจากระบบที่มีตัวทำละลายอินทรีย์เป็น MeOH มีความหนืดมากกว่าระบบของ ACN [Altria *et al.*, 2000] โดยเมื่อเติมตัวทำละลายอินทรีย์ทั้งที่เป็น MeOH และ ACN ในปริมาณ 15 % v/v สามารถแยก CAP และ DCAP จากกัน และแยกฟีกทั้งสองออกจากเมทริกซ์ของส่วนสกัดพริกได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้เลือกใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เป็น 15 % v/v ACN ซึ่งใช้เวลาในการวิเคราะห์สารที่สั้นกว่าเมื่อเทียบกับการใช้ MeOH



รูปที่ 4.1 อิเล็กโทรโฟโกราฟีโรแกรมของส่วนสกัดพริก โดยใช้บัฟเฟอร์ของ MEKC ที่ (a) ไม่มีการเติมตัวทำละลายอินทรีย์ (b ถึง d) มี ACN และ (e ถึง g) มี MeOH โดยที่ภาวะอื่นๆ คือ 10 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ที่ pH 9.2 ที่ประกอบด้วย 60 mM SDS, คัพพิลลารีขนาด 50 μm i.d. \times 40.2 cm (30 cm ถึงเครื่องตรวจวัด), อุณหภูมิของคอลัมน์ 25 $^{\circ}\text{C}$, ศักย์ไฟฟ้า 25 kV, บรรจุสารด้วยการอัดความดัน 0.5 psi เป็นเวลา 5 s ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 214 nm; CAP = แคปไซซิน และ DCAP = ไดไฮโดรแคปไซซิน



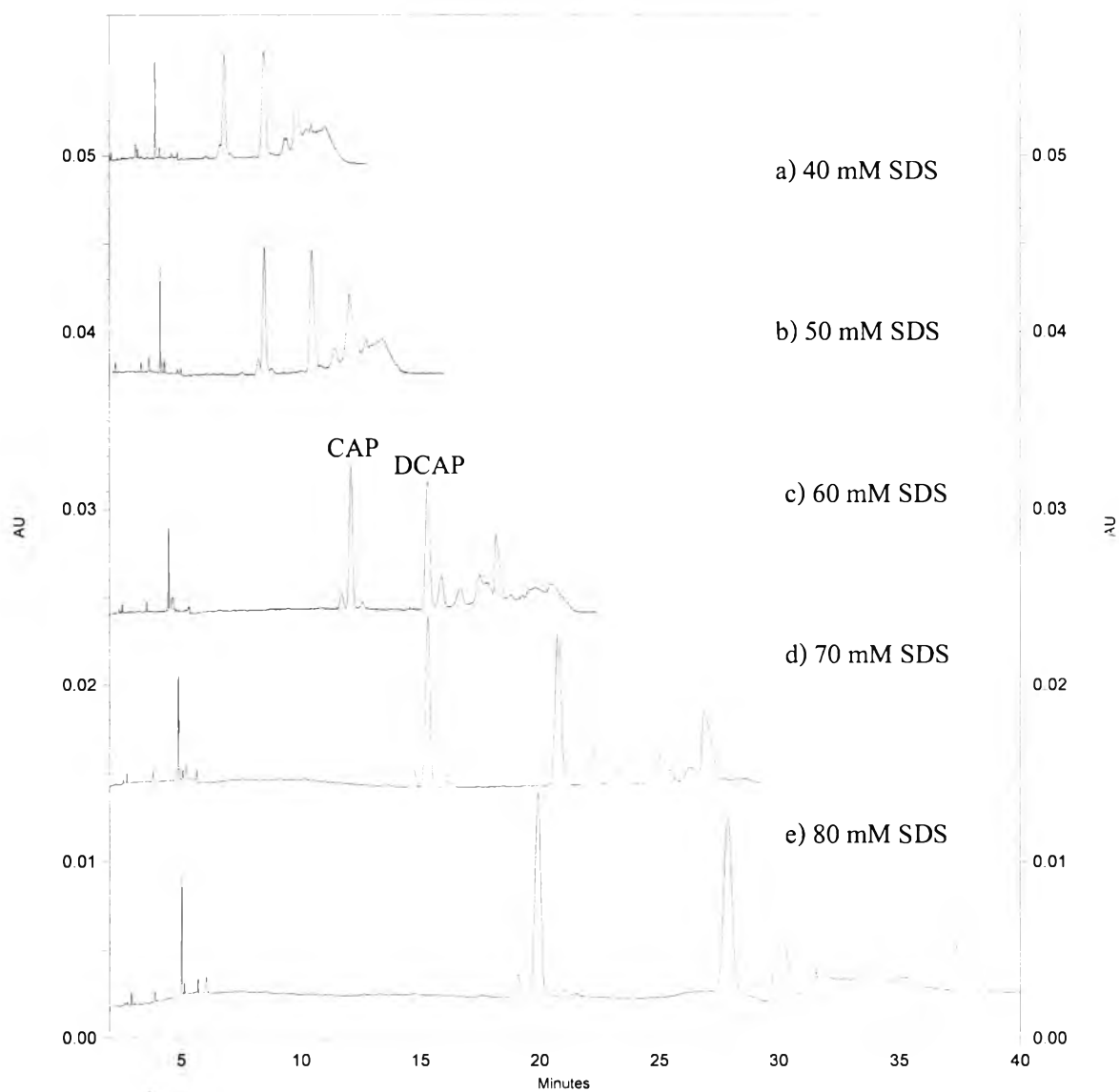
รูปที่ 4.2 ผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อพฤติกรรมเคลื่อนที่และการแยกของสาร a) retention time, b) electrophoretic mobility, c) retention factor, d) selectivity, e) efficiency และ f) resolution ของสาร (a ถึง c เป็นผลการทดลองของ CAP): ภาวะของ CE ดังรูป 4.1

4.3.2 ผลของความเข้มข้น SDS

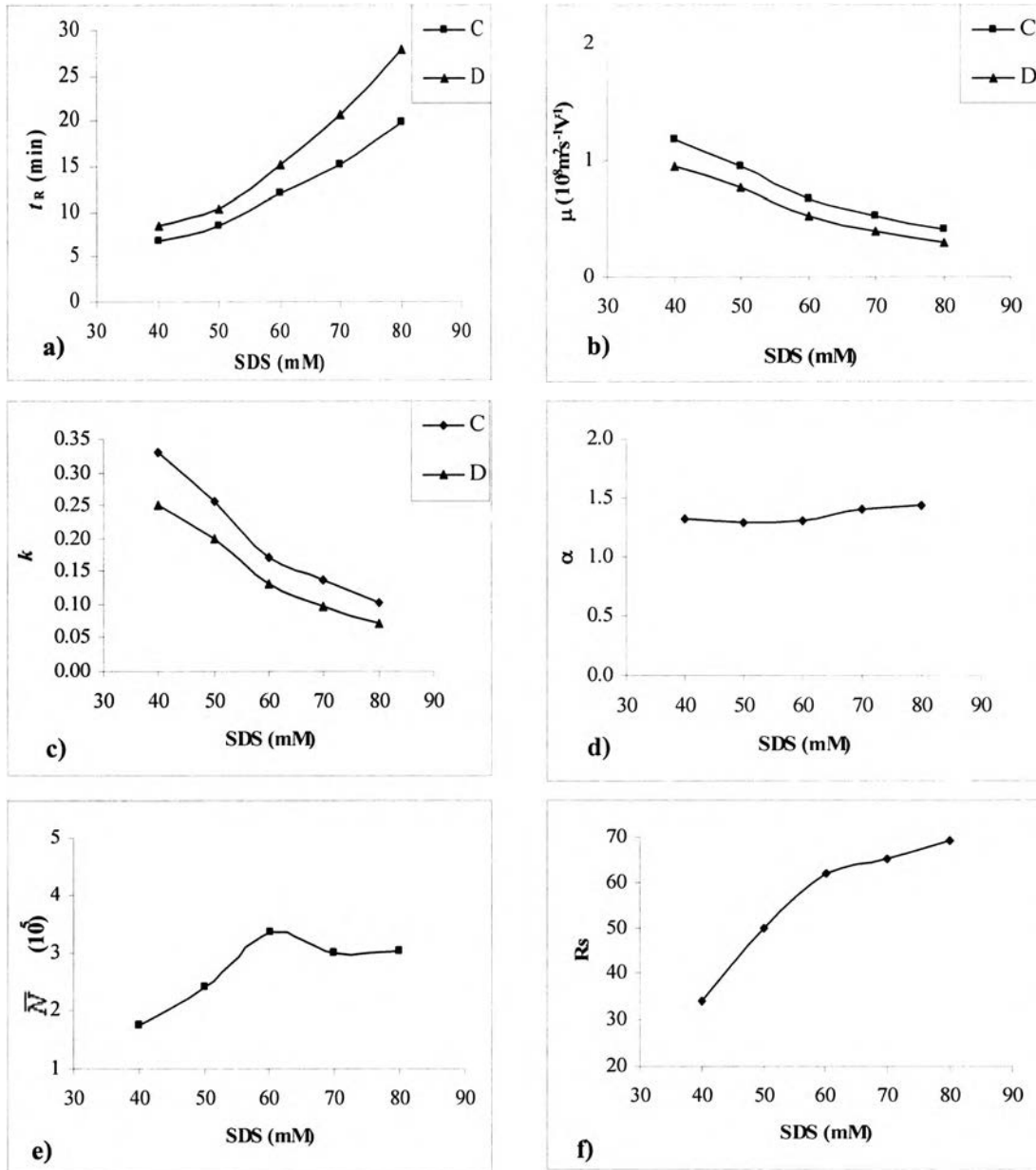
ได้ทดลองหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกของ CAP และ DCAP โดยทำการเปลี่ยนความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวซึ่งใช้เป็น 40 ถึง 80 mM SDS ในบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 15 % v/v ACN และ 10 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, ผลการทดลองดังอิเล็กทรอนิกส์โรแกรมในรูปที่ 4.3 พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ SDS ใช้เวลาในการวิเคราะห์สารนานขึ้นหรือ μ_{net} น้อยลง ($t_m \propto 1/\mu_{\text{net}}$ ดังสมการ 2.12) ทั้งนี้เพราะจำนวนไมเซลล์มากขึ้นหรืออัตราส่วนของเฟสมากขึ้น สารจะเข้าไปในไมเซลล์ (ที่มีประจุลบ) ได้ดีขึ้น (สมการ 2.5 และ 2.6) ทำให้ค่า μ (ดีดล) มากขึ้น และเป็นที่น่าทึ่งว่าผลของการเพิ่มความเข้มข้นของ SDS ทำให้ μ_{co} ลดลง (งานวิจัยนี้ไม่ได้ใส่ EOF marker ในสารตัวอย่างจึงคำนวณค่า μ_{co} ไม่ได้) แต่เนื่องจากทิศของ μ_{co} และ μ ตรงข้ามกันและภาวะที่ใช้เป็น EOF มาก ($\mu_{\text{co}} > \mu$) ดังนั้น μ_{net} (รวมกันตามปริมาณเวกเตอร์) จึงลดลงตามการเพิ่มความเข้มข้นของ SDS มีผลทำให้เวลานานขึ้น

เมื่อใช้ 40 และ 50 mM SDS แม้ว่าพีก CAP และ DCAP แยกออกจากกันชัดเจนและให้เวลาในการวิเคราะห์น้อย แต่พีกทั้งสองนี้ไม่แยกจากพีกอื่นหรือแยกจากพีกอื่นไม่สมบูรณ์ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ SDS จาก 60 mM เป็น 70 และ 80 mM ใช้เวลาในการแยกและการแยกของสารดีขึ้น โดยทั่วไปแล้วการเพิ่มความเข้มข้นของ SDS อาจลดหรือเพิ่มการแยกของสาร ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของกลุ่มสาร ซึ่งไม่สามารถทำนายได้ และจากสมการ 2.14 จะเห็นว่าค่าการแยกของสาร (R_s) ขึ้นอยู่กับ 3 เทอม คือ selectivity (ในกรณีนี้คือ $\Delta\mu$), mobility หรือ retention (กรณีนี้คือ μ_{net} หรือ $\mu + \mu_{\text{co}}$) และ efficiency (N) ซึ่งความเข้มข้นของ SDS มีผลต่อทั้งสามเทอม เช่น จากรูป 4.3 เมื่อคำนวณค่า $\Delta\mu$ และ μ_{net} (โดยใช้สมการ 2.12) และค่า N (จากโปรแกรมของเครื่อง CE) พบว่าที่ความเข้มข้นของ SDS 60, 70 และ 80 mM ได้ค่าต่างๆ ตามลำดับดังนี้ คือ ค่า N (10^4) ของ CAP เป็น 3.33, 2.98 และ 3.01 ค่า μ_{net} ($10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) ของ CAP เป็น 6.65, 5.25 และ 4.04 และ $\Delta\mu$ ($10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) ของ CAP กับพีกสารเล็ก (ที่ออกมาก่อน CAP) เป็น 0.22, 0.22 และ 0.18 ตามลำดับ ส่วนแนวโน้มของ DCAP และพีกสารเล็ก (ที่ออกมาหลัง DCAP) เป็นทำนองเดียวกัน ดังนั้นการทดลองนี้อาจสรุปได้ว่าการแยกของสารดีขึ้น ($R_s = 62, 65$ และ 69 ที่ 60, 70 และ 80 mM ตามลำดับ) เนื่องจากค่า μ_{net} ลดลงอย่างชัดเจน ($R_s \propto 1/\mu_{\text{net}}$) ส่วนค่า N และ $\Delta\mu$ แตกต่างกันเล็กน้อย สำหรับการแยกสารกลุ่มอื่นนั้นผลอาจจะแตกต่างจากนี้

เมื่อเปรียบเทียบที่ 60 ถึง 80 mM SDS พบว่าที่ 60 mM ให้การแยกของสารที่ดีแล้ว และใช้เวลาวิเคราะห์น้อยกว่าที่ 70 และ 80 mM SDS ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกใช้ความเข้มข้น 60 mM SDS เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อพฤติกรรมเคลื่อนที่และการแยกของ CAP และ DCAP ต่อไป



รูปที่ 4.3 อิเล็กโทรโฟโกราฟีของส่วนสกัดพริก โดยใช้บัฟเฟอร์ของ MEKC ประกอบด้วย SDS ความเข้มข้นต่างๆ ในบัฟเฟอร์ที่มี 15 % v/v ACN และภาวะอื่นดังรูปที่ 4.1d

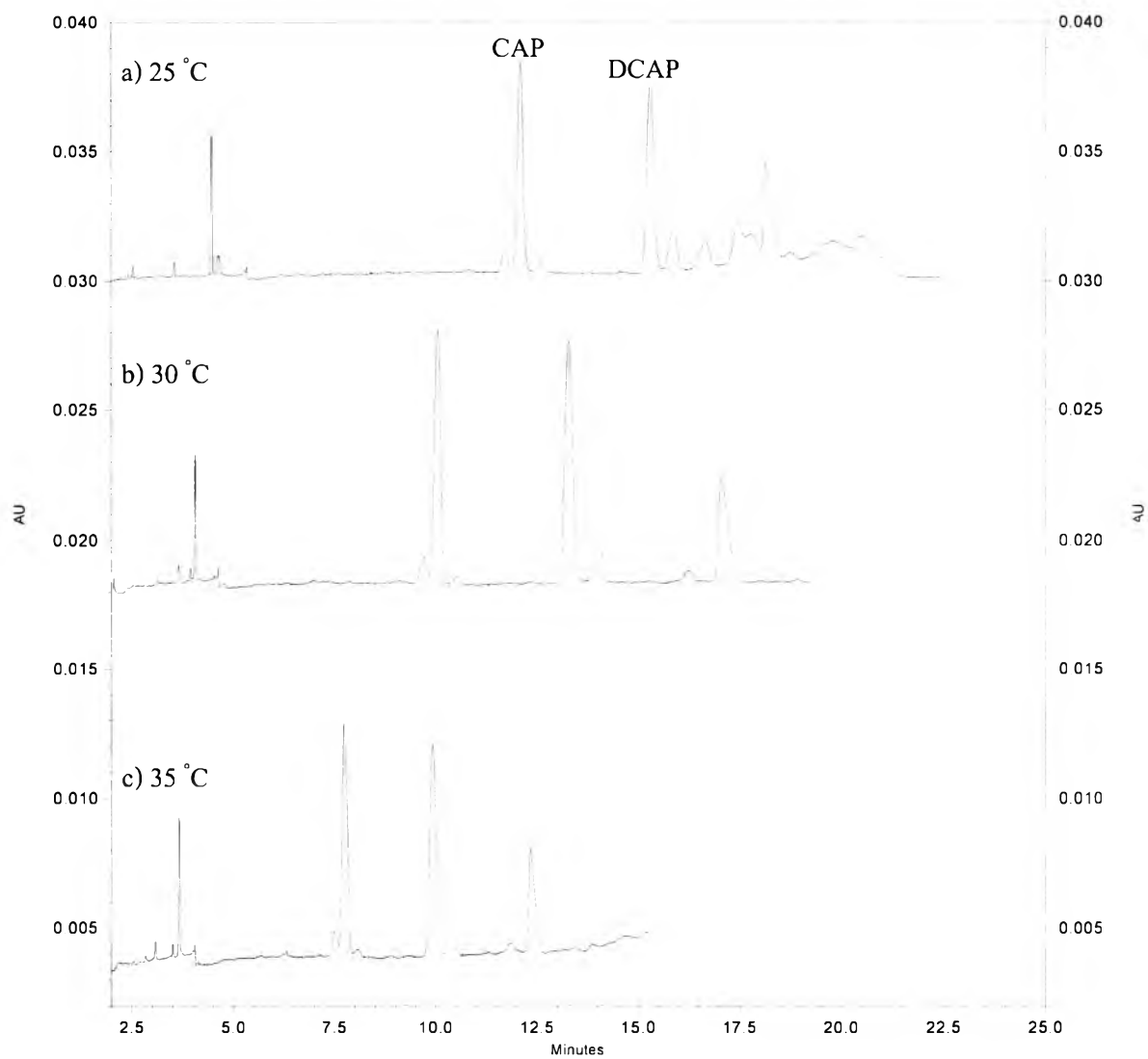


รูปที่ 4.4 ผลของความเข้มข้น SDS ต่อพฤติกรรมเคลื่อนที่และการแยกของสาร a) retention time, b) electrophoretic mobility, c) retention factor, d) selectivity, e) efficiency และ f) resolution ของสาร: ภาวะของ CE ดังรูป 4.3

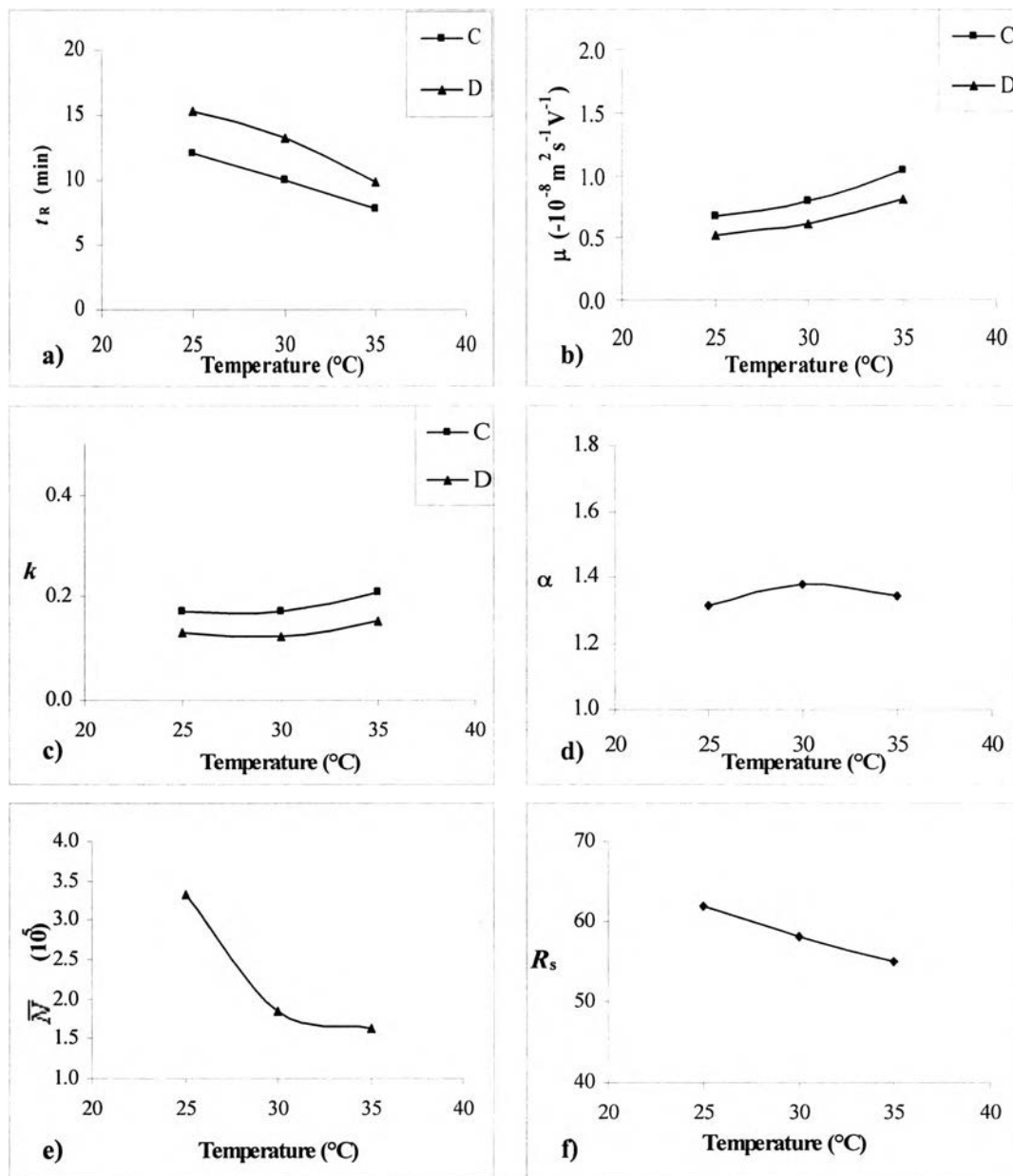
4.3.3 ผลของอุณหภูมิ

ได้ทำการศึกษาผลของอุณหภูมิในช่วง 25 ถึง 35 °C ต่อพฤติกรรมเคลื่อนที่และการแยกของ CAP และ DCAP โดยใช้บัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 10 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, 60 mM SDS และ 15% v/v ACN ดังแสดงในอิเล็กโทรโฟโแกรมที่ 4.5 จากผลการทดลองพบว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิสารจะเคลื่อนที่ออกมาเร็วขึ้นเนื่องจากความหนืดของบัฟเฟอร์ลดลง ทำให้ EOF (μ_{co}) และความเร็วหรือความสามารถในการเคลื่อนที่รวมเพิ่มขึ้น (ดังสมการ 2.2 และ 2.8) เช่น กรณีของ CAP ค่า μ_{net} ($10^{-9} \text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$) เป็น 6.65, 8.00 และ 10.4 ที่ 25, 30 และ 35 °C ตามลำดับ แม้ว่า $\Delta\mu$ ($10^{-9} \text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$) ของ CAP กับพิกสารเล็ก (ที่ออกมาก่อน CAP) จะเพิ่มขึ้น (จาก 0.22 เป็น 0.29 และ 0.36) เมื่อเพิ่มอุณหภูมิจาก 25 เป็น 30 และ 35 °C แต่การแยกของสาร CAP กับพิกเล็กๆ นั้น แย่ลง ($R_s = 62, 58$ และ 55) ทั้งนี้เพราะค่า N ลดลง (เช่น N ของ CAP ลดลงจาก 3.33 เป็น 1.84 และ 1.63 ตามลำดับ) และค่า μ_{net} เพิ่มขึ้น ($R_s \propto \Delta\mu, 1/\mu_{\text{net}}$ และ \sqrt{N} ดังสมการ 2.14) เป็นที่ทราบไว้ว่าการเพิ่มอุณหภูมิทำให้ค่า N ลดลง เนื่องจากผลของ Joule heating ที่เพิ่มขึ้น

ในการทดลองนี้เลือกใช้อุณหภูมิของการแยกสารที่ 25 °C เนื่องจากพิกของสารที่สนใจแยกออกจากพิกอื่นได้สมบูรณ์ และอุณหภูมิใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้องเพื่อลดความแตกต่างของอุณหภูมิของอะนาลิไตต์ในส่วนที่ควบคุมอุณหภูมิ (ประมาณ 32 cm) และในส่วนปลายทั้งสองข้างของอะนาลิไตต์ที่ควบคุมอุณหภูมิไม่ได้ (ประมาณ 8 cm)



รูปที่ 4.5 อิเล็กโทรฟีโรแกรมของส่วนสกัดพริก โดยใช้อุณหภูมิของคอลัมน์ต่างๆ กันของ MEKC และภาวะอื่นดังรูปที่ 4.1d

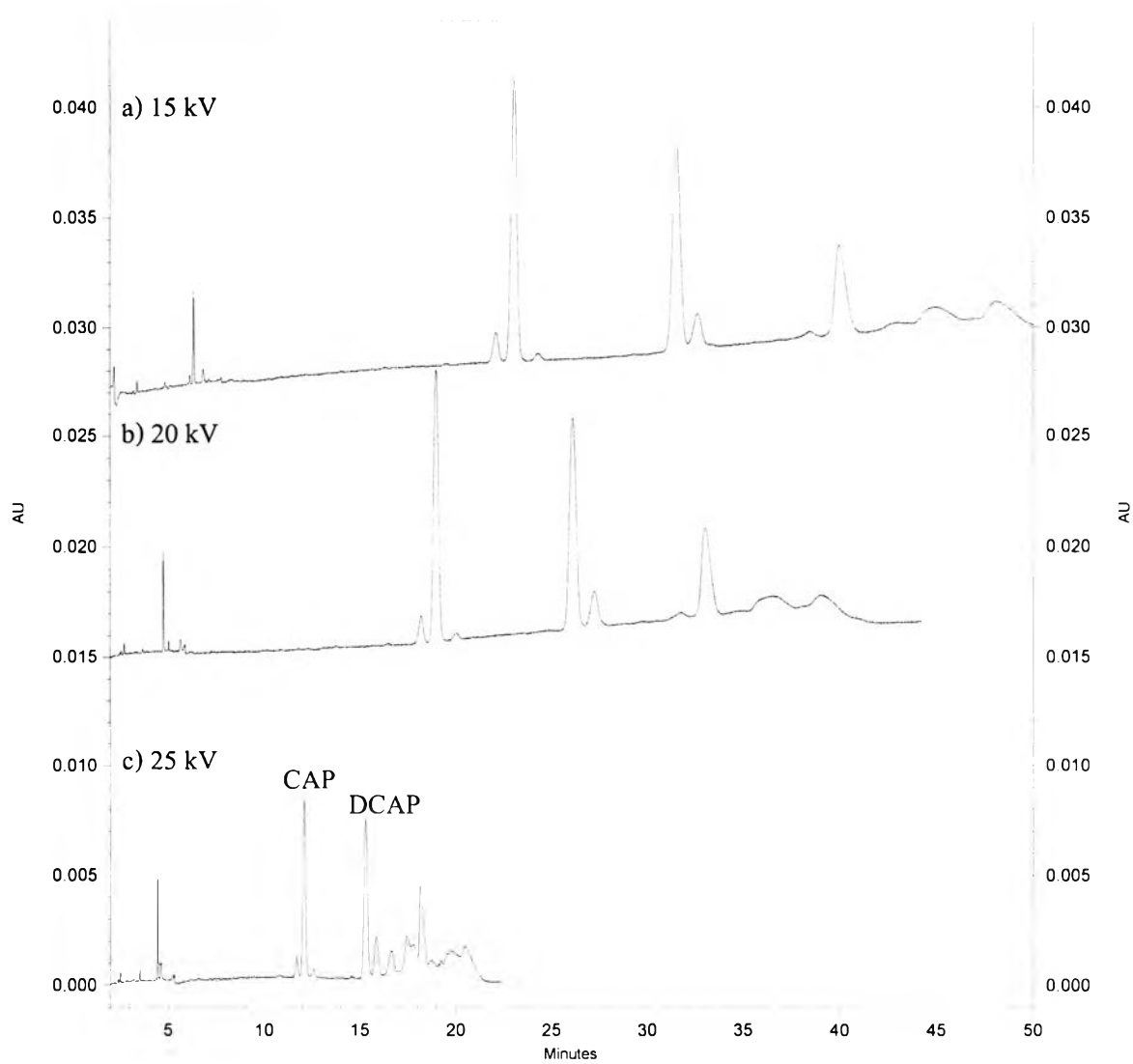


รูปที่ 4.6 ผลของอุณหภูมิต่อพฤติกรรมเคลื่อนที่และการแยกของสาร a) retention time, b) electrophoretic mobility, c) retention factor, d) selectivity, e) efficiency และ f) resolution ของสาร: ภาวะของ CE ดังรูป 4.5

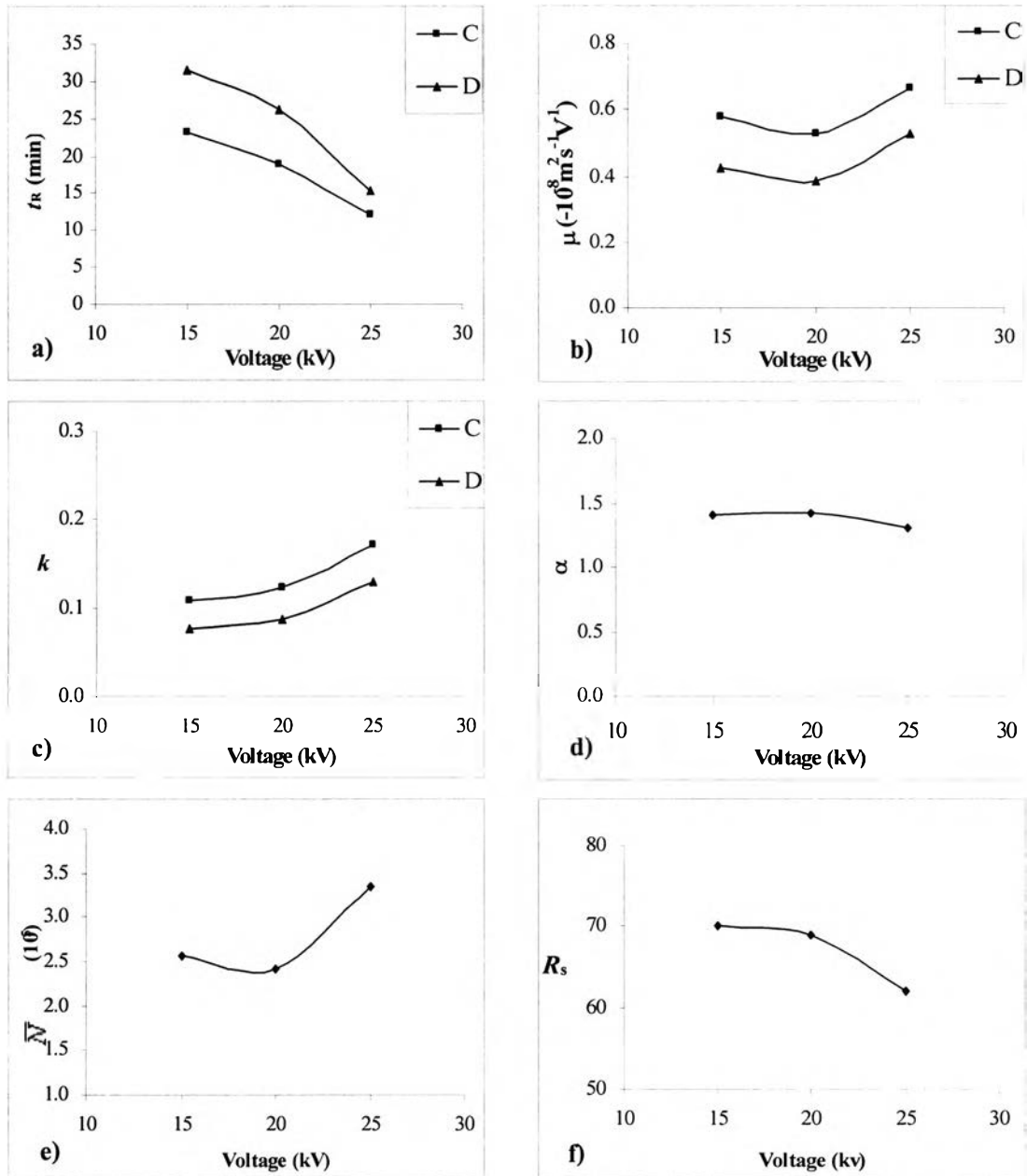
4.3.4 ผลของศักย์ไฟฟ้า

ได้ทำการศึกษาผลของศักย์ไฟฟ้าในช่วง 15 ถึง 25 kV ต่อพฤติกรรมเคลื่อนที่และการแยกของสาร (ความต่างศักย์สูงสุดที่ใช้ได้ คือ 30 kV แต่ที่ 25 kV เป็นค่าที่สูงแล้ว) โดยใช้บัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 10 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, 60 mM SDS และ 15 % v/v ACN ผลการทดลองที่แสดงในอิเล็กทรอนิกส์โทรฟีโรแกรมรูปที่ 4.7 พบว่าเมื่อเพิ่มศักย์ไฟฟ้า โมเกรชันโทม์ของสารลดลง (รูปที่ 4.7 และ 4.8a) ทั้งนี้เนื่องจากความเร็วของการเคลื่อนที่ของสารแปรผันตรงกับความต่างศักย์หรือความเข้มของสนามไฟฟ้า (สมการที่ 2.1) ในทางทฤษฎี ค่า μ ไม่ขึ้นอยู่กับศักย์ไฟฟ้า แต่จากการทดลองพบว่าเมื่อใช้ศักย์ไฟฟ้าสูงขึ้น ค่า μ ของสารจะมีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อย (รูปที่ 4.8b) ทั้งนี้เนื่องจากผลของ Joule heating ที่เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับค่า k , N และ R_s ที่ลดลง (รูปที่ 4.8c, 4.8e และ 4.8f) และเป็นที่น่าสังเกตว่าการเพิ่มศักย์ไฟฟ้า ทำให้ t_r ลดลง และค่า H_1 น้อยลง ดังนั้น \bar{N} น่าจะเพิ่มขึ้น แต่การลดลงของค่า \bar{N} แสดงให้เห็นว่า Joule heating มีผลมากกว่า จากรูปที่ 4.8d ค่า α มีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย เนื่องจาก α ไม่ขึ้นกับศักย์ไฟฟ้า และจากผลการทดลองก่อนหน้านี้ (ในรูปที่ 4.6d) ชี้ว่า Joule heating หรืออุณหภูมิไม่มีผลต่อค่า α

ที่ศักย์ไฟฟ้าต่างๆ จะใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน เนื่องจากความเร็วในการเคลื่อนที่ของสารลดลงตามความต่างศักย์หรือความเข้มของสนามไฟฟ้า และในช่วง 15 ถึง 25 kV การแยกของสารของพีคที่สนใจออกจากพีคสารอื่นนั้นไม่แตกต่างกันมากนัก ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกใช้ศักย์ไฟฟ้า 25 kV เพื่อให้ทำการวิเคราะห์ภายในเวลาอันรวดเร็ว และได้ค่าการแยกสารที่เหมาะสมสำหรับปริมาณวิเคราะห์



รูปที่ 4.7 อิเล็กโทรโฟโแกรมของส่วนสกัดพริก โดยใช้ศักย์ไฟฟ้าต่างๆ กันของ MEKC และภาวะอื่นดังรูปที่ 4.1d



รูปที่ 4.8 ผลของศักย์ไฟฟ้าต่อพฤติกรรมเคลื่อนที่และการแยกของสาร a) retention time, b) electrophoretic mobility, c) retention factor, d) selectivity, e) efficiency และ f) resolution ของสาร: ภาวะของ CE ดังรูป 4.7

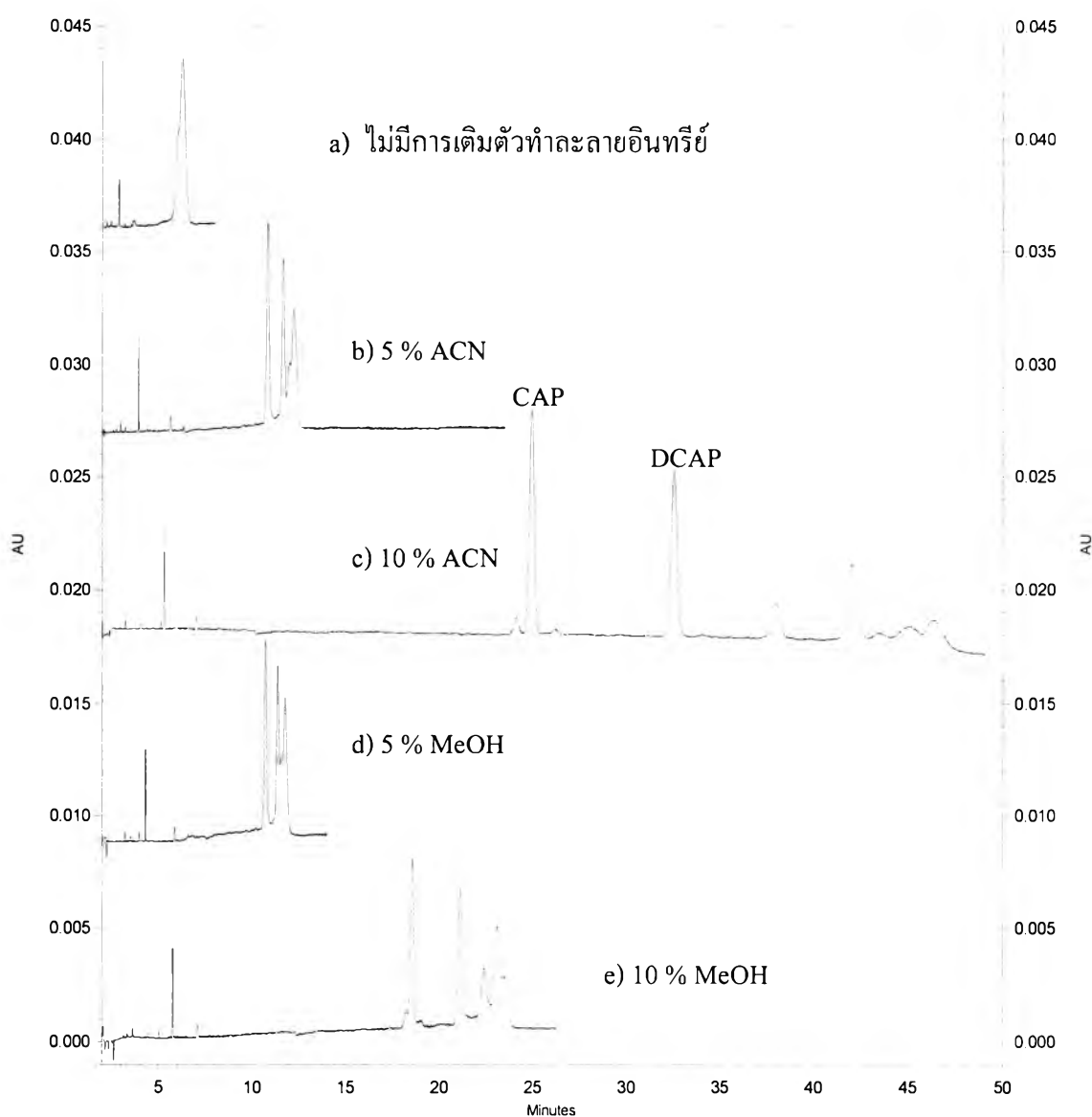
4.4 การหาภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค MEEKC

ได้ศึกษา MEEKC สำหรับแยก CAP และ DCAP ในส่วนสกัดพริก โดยใช้บัฟเฟอร์ ประกอบด้วยบอเรตบัฟเฟอร์ที่ pH 9.2 EtOAc เป็นหยคน้ำมัน โซเดียมโดเดคซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate, SDS) เป็นสารลดแรงตึงผิว 1-บิวทานอลเป็นสารลดแรงตึงผิวร่วม และเติมตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็น ACN หรือ MeOH โดยทำการศึกษาผลของชนิดและปริมาณของตัวทำละลายอินทรีย์ และความเข้มข้นของ SDS เป็นต้น

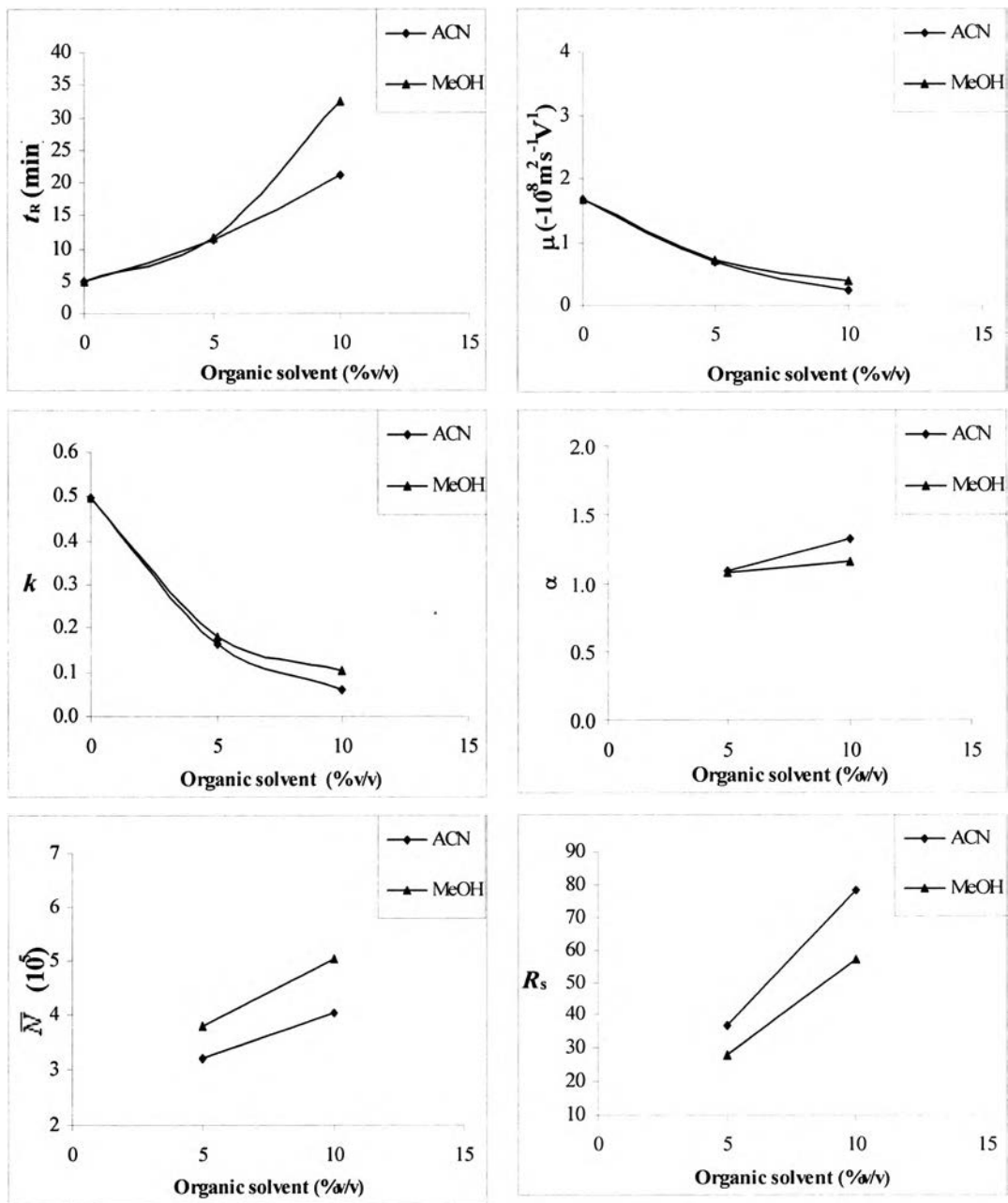
4.4.1 ผลของชนิดและปริมาณของตัวทำละลายอินทรีย์

ในช่วงแรกของการทดลองได้ใช้ไมโครอิมัลชันบัฟเฟอร์ที่เป็นบอเรตบัฟเฟอร์ 10 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ที่ pH 9.2 ที่ประกอบด้วย 0.56 % v/v EtOAc, 162 mM 1-บิวทานอล, 80 mM SDS และตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นเมทานอลหรือ ACN ปริมาณ 5, 10 หรือ 15 % v/v โดยใช้อุณหภูมิ 25 °C และศักย์ไฟฟ้า 25 kV สำหรับแยกและวิเคราะห์ส่วนสกัดพริก รูปที่ 4.9 แสดงอิเล็กโตรโกราแกรมที่ไม่มีการเติมตัวทำละลายอินทรีย์ลงไปในบัฟเฟอร์ พบว่า CAP และ DCAP ไม่แยกออกจากกันเนื่องจากสารทั้งสอง partitioning เข้าไปอยู่ใน oil phase มากกว่าที่จะอยู่ใน aqueous phase ซึ่งเหตุผลคล้ายกับ MEKC ในหัวข้อ 4.3.1 เพียงแต่เปลี่ยนจากไมเซลล์เฟสเป็น oil phase

เมื่อเปรียบเทียบการแยกสารของบัฟเฟอร์ที่มีการเติมตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดเดียวกันในปริมาณที่เท่ากันด้วยเทคนิค MEKC (รูปที่ 4.1 b ถึง g) และ MEEKC (รูปที่ 4.5 b ถึง e) พบว่า MEEKC ให้ผลการแยกสารได้ดีกว่า งานวิจัยก่อนหน้านี้รายงานว่าสารบางชนิดอาจแยกได้ดีกว่าด้วย MEKC บางชนิดอาจแยกได้ดีกว่าด้วย MEEKC ขึ้นอยู่กับชนิดของกลุ่มสาร [Poouthree, 2007] จากรูปที่ 4.9c บัฟเฟอร์ที่มีการเติมตัวทำละลายอินทรีย์เป็น 10 % v/v ACN สามารถแยก CAP และ DCAP ออกจากกัน และแยกจากพริกอื่นในเมทริกซ์ได้ ดังนั้นจึงเลือกใช้ที่ภาวะนี้ในการศึกษาปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของสารในเทคนิค MEEKC ต่อไป



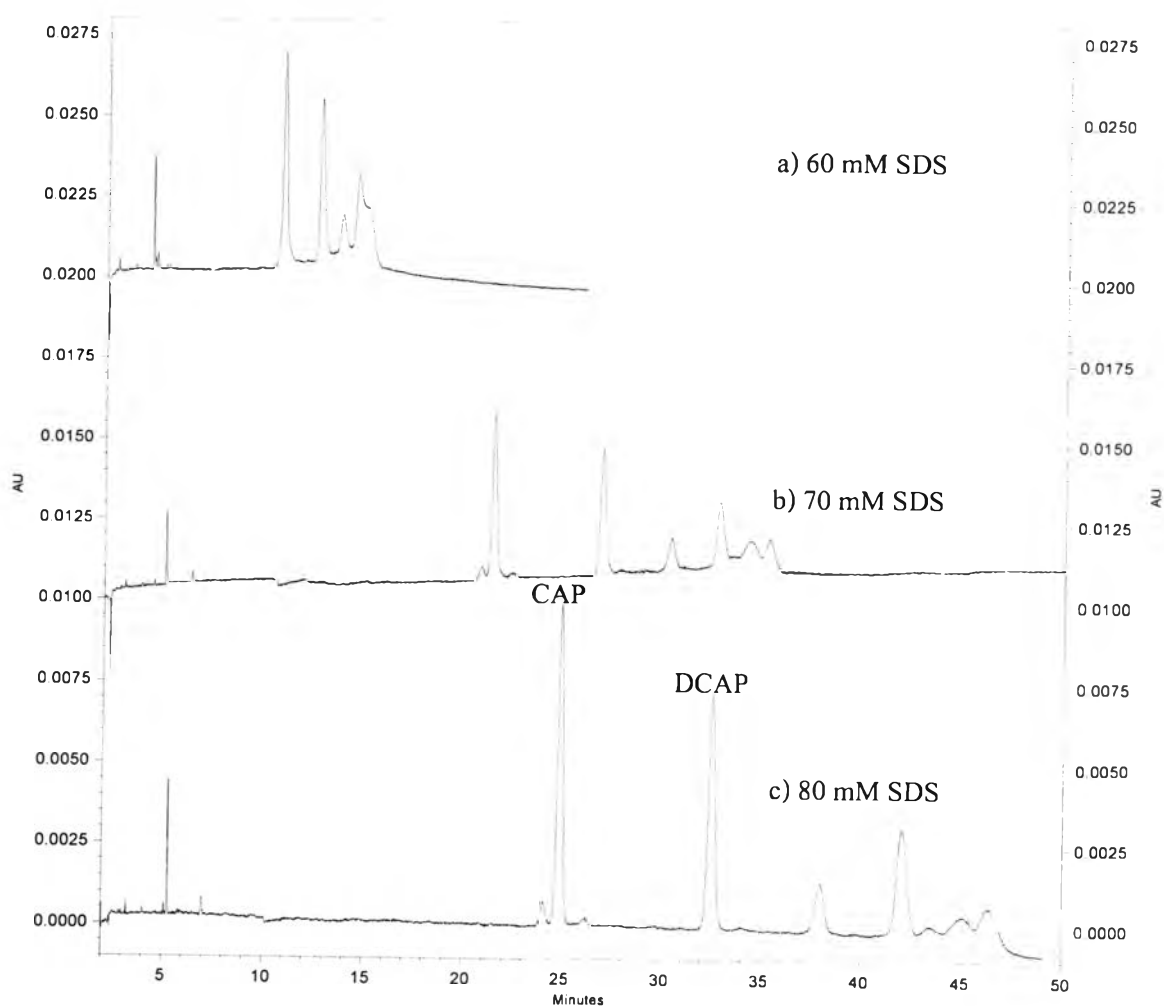
รูปที่ 4.9 อิเล็กโทรโฟโกราฟีโรแกรมของส่วนสกัดพริกโดยใช้บัฟเฟอร์ของ MEEKC ที่ (a) ไม่มีการเติมตัวทำละลายอินทรีย์ (b ถึง c) มี ACN และ (d ถึง e) มี MeOH: 10 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ที่ pH 9.2 ที่ประกอบด้วย 0.56 % v/v EtOAc, 162 mM 1-บิวทานอล, 80 mM SDS และตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นเมทานอลหรือ ACN และภาวะอื่นๆ ของ CE คือ คัพพิลลารีขนาด 50 μm i.d. \times 40.2 cm (30 cm ถึงเครื่องตรวจวัด), อุณหภูมิของคอลัมน์ 25 $^{\circ}\text{C}$, ศักย์ไฟฟ้า 25 kV, บรรจุสารด้วยการอัดความดัน 0.5 psi เป็นเวลา 5 s ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 214 nm; CAP = แคปไซซิน และ DCAP = ไดไฮโดรแคปไซซิน



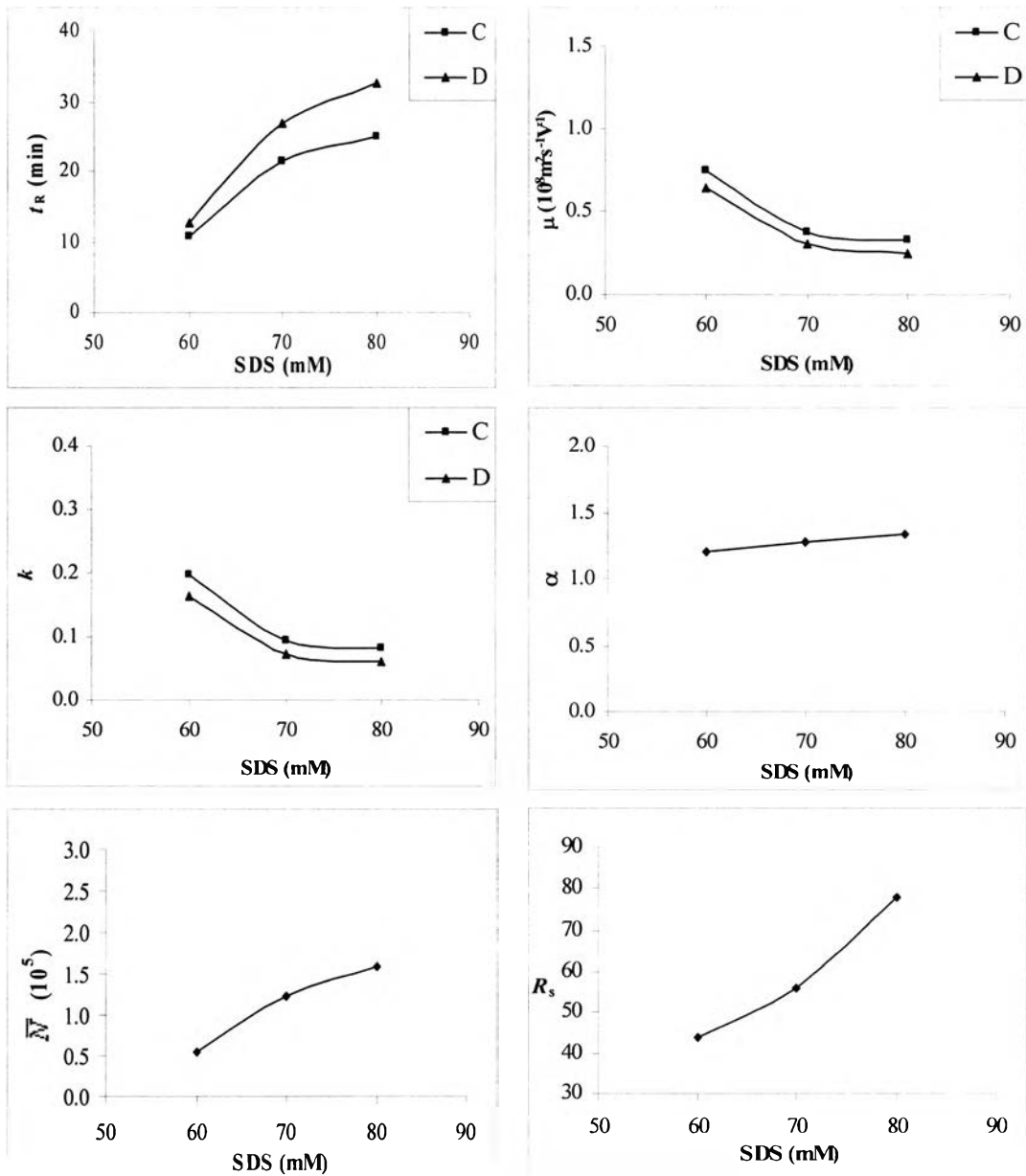
รูปที่ 4.10 ผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อพฤติกรรมเคลื่อนที่และการแยกของสาร a) retention time, b) electrophoretic mobility, c) retention factor, d) selectivity, e) efficiency และ f) resolution ของสาร (a ถึง c เป็นผลการทดลองของ CAP): ภาวะของ CE ดังรูป 4.9

4.4.2 ผลของความเข้มข้น SDS

ได้ทดลองหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกของ CAP และ DCAP โดยทำการเปลี่ยนความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวซึ่งใช้เป็น 50 ถึง 80 mM SDS ในไมโครอิมัลชันบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 10 % v/v ACN และองค์ประกอบอื่นๆ คงเดิม จากอิเล็กโตรโฟรีแกรมในรูปที่ 4.11 เมื่อใช้ความเข้มข้น 50 mM SDS ไม่สามารถทำการวิเคราะห์ได้ กระแสไฟฟ้าตก และที่ความเข้มข้น 60 mM SDS อิเล็กโตรโฟรีแกรมที่ได้มีสัญญาณรบกวนค่อนข้างมากและพิกที่ได้จะกว้าง เนื่องจากที่ความเข้มข้นของ SDS ต่ำกว่า 70 mM ไมโครอิมัลชันที่ได้ไม่ค่อยเสถียร จากการทดลองพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ SDS จะทำให้สารเคลื่อนที่มายังเครื่องตรวจวัดช้าลง ซึ่งเหตุผลคล้ายกับใน MEKC ดังที่กล่าวมาแล้วในหัวข้อ 4.3.2 เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ SDS จาก 70 เป็น 80 mM การแยกของสารเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ซึ่งการเพิ่มความเข้มข้นของ SDS อาจทำให้การแยกของสารเพิ่มขึ้นหรือลดลง ขึ้นอยู่กับชนิดของสารและยากที่จะทำนายคล้ายกับ MEKC ดังที่กล่าวมาแล้ว ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกใช้ 80 mM SDS เพื่อให้ได้ไมโครอิมัลชันที่เสถียร ได้การแยกของพิกสารที่สนใจออกจากพิกสารอื่นได้สมบูรณ์ และใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์สารที่เหมาะสม



รูปที่ 4.11 อิเล็กโทรฟีโกราฟีโรแกรมของส่วนสกัดพริกในบัฟเฟอร์ของ MEEKC ที่ประกอบด้วย SDS ที่ความเข้มข้นต่างๆ: และภาวะอื่นดังรูปที่ 4.9c



รูปที่ 4.12 ผลของความเข้มข้นของ SDS ต่อพฤติกรรมเคลื่อนที่และการแยกของสาร a) retention time, b) electrophoretic mobility, c) retention factor, d) selectivity, e) efficiency และ f) resolution ของสาร: ภาวะของ CE ดังรูป 4.11

4.4.3 ผลของอุณหภูมิและความต่างศักย์

ไม่ได้ทำการศึกษาโดยใช้เทคนิค MEEKC เนื่องจากผลของการศึกษาตัวทำละลายอินทรีย์และความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวจะเห็นว่าใช้เวลานานในการวิเคราะห์ เมื่อเทียบกับผลการทดลองของการศึกษาผลของอุณหภูมิและความต่างศักย์ต่อพฤติกรรมเคลื่อนที่และการแยกของ CAP และ DCAP โดยใช้เทคนิค MEKC ที่ใช้อุณหภูมิของคอลัมน์ 25 °C และศักย์ไฟฟ้า 25 kV และคาดว่าเมื่อทำการศึกษาผลของอุณหภูมิและความต่างศักย์ ต่อพฤติกรรมเคลื่อนที่และการแยกของ CAP และ DCAP โดยใช้เทคนิค MEEKC น่าจะให้ผลเช่นเดียวกันคือ เมื่อเพิ่มอุณหภูมิและความต่างศักย์แนวโน้มของพฤติกรรมเคลื่อนที่ของ CAP และ DCAP เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์สารเร็วขึ้น แต่ให้ค่าการแยกที่ไม่ดีและเกิด Joule heating

ภาวะที่เหมาะสมสำหรับแยก CAP และ DCAP ในส่วนสกัดพริกด้วย MEKC คือ 10 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ที่ pH 9.2, 60 mM SDS เป็นสารลดแรงตึงผิว และ 15 % v/v ACN เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ ดังรูปที่ 4.1d ในขณะที่ภาวะของ MEEKC คือ 0.56 % v/v EtOAc, 162 mM 1-บิวทานอล, 10 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ที่ pH 9.2, 80 mM SDS เป็นสารลดแรงตึงผิว และ ACN เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ ในปริมาณ 10 % v/v ดังรูปที่ 4.9c เมื่อนำภาวะของ CE แบบ MEKC และ MEEKC ที่ได้มาเปรียบเทียบกัน โดยภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค MEKC (รูปที่ 4.1d) ใช้เวลาในการแยกสารภายในเวลาประมาณ 22 นาที ส่วนการแยกสารด้วยเทคนิค MEEKC ใช้เวลาในการแยกสารประมาณ 50 นาที (รูปที่ 4.9c) ซึ่งใช้เวลาในการแยกสารที่นานกว่าเทคนิค MEKC มาก อีกทั้งขั้นตอนในการเตรียมสารของเทคนิค MEEKC ค่อนข้างยุ่งยาก ในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้เทคนิค MEKC มาใช้ในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์และประยุกต์ใช้ในการหาปริมาณสารในตัวอย่างส่วนสกัดพริกต่อไป

4.5 การตรวจสอบวิธีการวิเคราะห์ (Validation of the method)

4.5.1 ขีดจำกัดของการวิเคราะห์

ขีดจำกัดของการตรวจวัด (limit of detection, LOD) หมายถึง ความเข้มข้นของสารต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ด้วยเครื่องมือตามภาวะที่ใช้ ส่วนขีดจำกัดของปริมาณวิเคราะห์ (limit of quantitation, LOQ) หมายถึง ความเข้มข้นของสารต่ำสุดที่สามารถรายงานได้อย่างน่าเชื่อถือจากผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือตามภาวะที่ใช้ [Swartz and Krull, 1997] ในทางปฏิบัตินั้นเป็นที่ยอมรับกันว่า LOD และ LOQ นิยามเป็นความเข้มข้นของสารที่ให้อัตราส่วนของค่าสัญญาณตรวจวัดต่อค่าสัญญาณรบกวน (signal-to-noise ratio) เท่ากับ 3 และ 10 ตามลำดับ สำหรับวิธีการหา LOD และ LOQ ของ CAP และ DCAP อาจทำได้โดยดังที่อธิบายไว้ในหัวข้อ 3.3.7 ส่วนขีดจำกัดของปริมาณวิเคราะห์ในตัวอย่าง (sample quantitation limit, SQL) หมายถึง ความเข้มข้นของสารต่ำสุดในตัวอย่างจริงที่

สามารถรายงานผลการวิเคราะห์ได้อย่างน่าเชื่อถือได้ ซึ่งจะคล้ายกับ LOQ และคำนึงถึงปริมาณของ ตัวอย่าง (sample quantity) การเจือจาง (dilution factor) หรือการเพิ่มความเข้มข้น (concentration factor) และวิธีการเตรียมตัวอย่าง เป็นต้น ในกรณีของงานวิจัยนี้ SQL ของ CAP หรือ DCAP ใน ตัวอย่างส่วนสกัดพริก capsicum oleoresin สามารถคำนวณได้ดังสมการที่ 4.3

$$\text{SQL (g/kg)} = \frac{V \times \text{LOQ} \times f}{1000w} \text{ (g/kg)} \quad (4.3)$$

w คือ น้ำหนักของตัวอย่างส่วนสกัดพริก capsicum oleoresin ที่ชั่งมา (หน่วยเป็นกรัม)

V คือ ปริมาตรเริ่มต้นของสารละลายพริกตัวอย่าง (หน่วยเป็นมิลลิลิตร)

f คือ จำนวนเท่าที่เจือจางสารละลายพริกตัวอย่างจากเริ่มต้น (dilution factor)

LOQ คือ ขีดจำกัดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (ppm)

ตัวอย่างเช่น ถ้าชั่งตัวอย่างพริกมา 0.50 กรัม ละลายใน ACN จนมีปริมาตร 10 mL จากนั้นนำไปเจือจาง 2/0.3 หรือ 20/3 เท่า ด้วยสารละลายที่ประกอบด้วย 60 mM SDS (ดังหัวข้อ 3.3.13) และเมื่อแทนค่า LOQ ลงในสมการที่ 4.3 จะได้ค่า SQL

ผลการทดลองของค่าขีดจำกัดของการวิเคราะห์ของ CAP และ DCAP แสดงไว้ดังในตาราง 4.1 จากการใช้ซอสเตรียมพบว่าได้ SQL ของ CAP และ DCAP เป็น 4.9 และ 3.6 ppm ($\mu\text{g/g}$) (ดังตารางที่ 4.1) ตามลำดับ การปรับปรุง SQL ให้ดีขึ้นหรือการเพิ่มขีดจำกัดของการวิเคราะห์ (ทำให้ค่า SQL ลดลงหรือน้อยลง) อาจทำได้โดยการเพิ่มปริมาณตัวอย่างหรือลดปริมาณสุดท้ายที่ละลาย ตัวอย่าง เป็นต้น อย่างไรก็ตาม SQL ที่ได้นี้เพียงพอสำหรับวิเคราะห์ตัวอย่างซอสพริกจริง เพราะไม่ได้เป็นการวิเคราะห์สารที่ความเข้มข้นต่ำๆ (trace analysis)

ตารางที่ 4.1 ขีดจำกัดของการวิเคราะห์

สาร	LOD (ppm)	LOQ (ppm)	SQL (g/kg) ^a	SQL (ppm, $\mu\text{g/g}$) ^b
CAP	5.2	16.3	2.2	4.9
DCAP	2.8	8.8	1.2	3.6

หมายเหตุ: ^aชั่งตัวอย่างส่วนสกัดพริก capsicum oleoresin 0.50 กรัม ละลายใน ACN จนมีปริมาตร 10 mL แล้วเจือจาง 20/3 เท่า

^b: ปริมาณ CAP และ DCAP ในตัวอย่างซอส

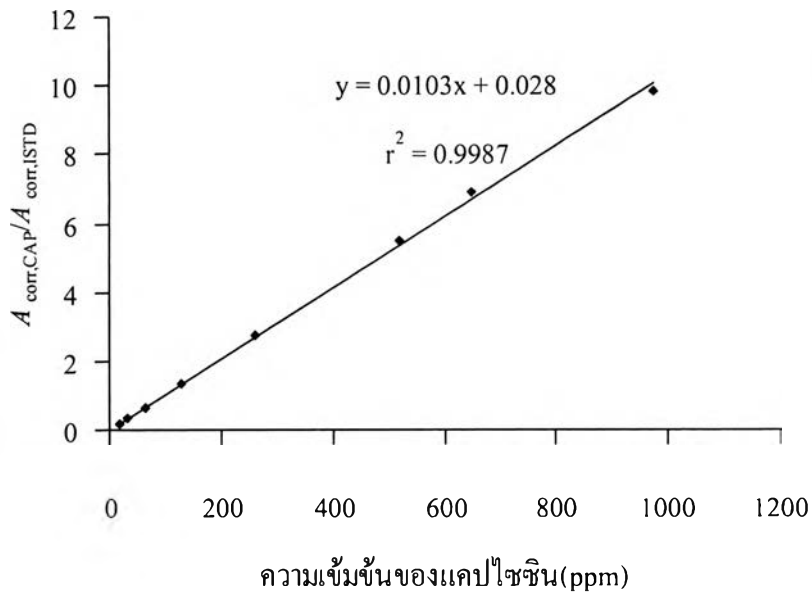
4.5.2 กราฟมาตรฐาน

งานวิจัยนี้ได้ทำกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ CAP และ DCAP โดยความเข้มข้นของแคปไซซินที่ใช้อยู่ในช่วง 16.3 ถึง 975 ppm และไดไฮโดรแคปไซซินในช่วง 8.8 ถึง 525 ppm เนื่องจาก CAP และ DCAP ที่มีอยู่ในตัวอย่างส่วนสกัดพริก capsicum oleoresin ชนิดต่างๆ ส่วนใหญ่จะอยู่ในปริมาณมาก และตัวอย่างส่วนสกัดพริก capsicum oleoresin ที่นำมาทำปริมาณวิเคราะห์มีรายงานไว้ว่า CAP และ DCAP รวมกันอยู่ในช่วง 60 ถึง 100 g/kg จึงเลือกทำกราฟมาตรฐานในช่วงดังกล่าว

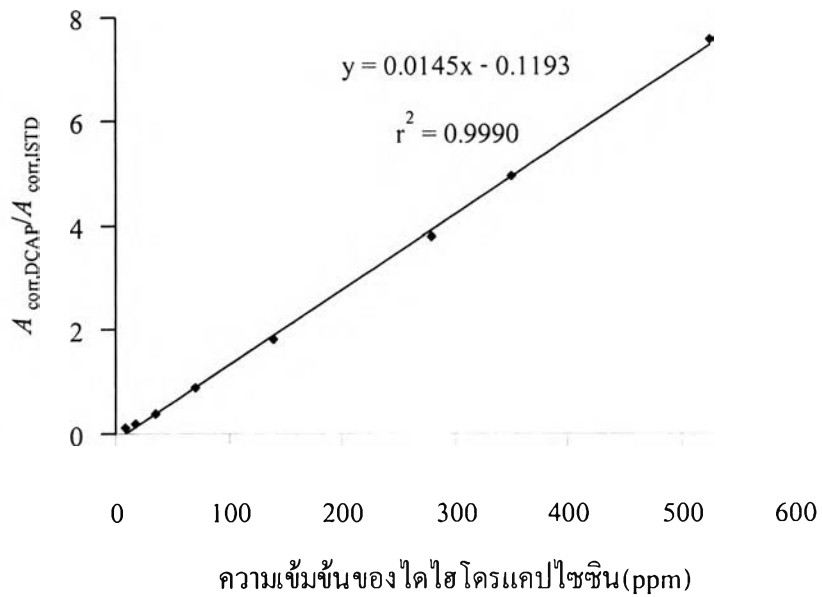
การทำกราฟมาตรฐานใช้วิธี Internal Standard เพื่อลดความผิดพลาดเนื่องจากการฉีดสารที่ไม่เท่ากันในแต่ละครั้ง (ดังที่กล่าวไว้ในหัวข้อ 2.9 หน้า 22) โดยในการทดลองได้เลือก bisphenol A เป็น internal standard (ISTD) เนื่องจากสารตัวนี้ไม่มีอยู่ในตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ ไม่ทำปฏิกิริยากับ CAP และ DCAP และมีการดูดกลืนแสงในช่วงเดียวกับ CAP และ DCAP นอกจากนี้ไม่เกรชันโทรม์ของ bisphenol A ไม่รบกวนพีคของ CAP และ DCAP โดยเติมสารละลาย bisphenol A ลงไปในสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างในปริมาตรที่เท่ากันและให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของ bisphenol A เป็น 50 ppm โดยแต่ละความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานทำการฉีดซ้ำ 2 ครั้ง

รูปที่ 4.13 เป็นกราฟมาตรฐานของความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนของ corrected peak area ของ CAP ต่อ ISTD ($A_{\text{corr,CAP}}/A_{\text{corr,ISTD}}$) และ DCAP ต่อ ISTD ($A_{\text{corr,DCAP}}/A_{\text{corr,ISTD}}$) กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (ใน CE นิยมใช้ corrected peak area ดังที่กล่าวไว้ในหัวข้อ 2.9 หน้า 22) โดยค่า r^2 จะมีค่าใกล้เคียง 1.0 ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าความสัมพันธ์ระหว่าง $A_{\text{corr,CAP}}/A_{\text{corr,ISTD}}$ และ $A_{\text{corr,DCAP}}/A_{\text{corr,ISTD}}$ กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานมีความสัมพันธ์ในลักษณะเชิงเส้นตรง

a)



b)



รูปที่ 4.13 กราฟมาตรฐานสำหรับปริมาณวิเคราะห์ของ a) แคปไซซิน และ b) ไดไฮโดรแคปไซซิน

4.5.3 ความแม่นยำ (accuracy) และความเที่ยง (precision)

ได้ศึกษาผลของเมทริกซ์ต่อความแม่นยำและความเที่ยงของการวิเคราะห์ปริมาณของ CAP และ DCAP ที่เติม (spike) ลงไปในเมทริกซ์ที่เป็นบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 15 % v/v ACN (เพื่อให้มีเมทริกซ์เหมือนกับในตัวอย่าง) และเมทริกซ์ที่เป็นสารละลายตัวอย่างพริก โดยได้เตรียมสารละลายที่ประกอบด้วย CAP และ DCAP ที่ความเข้มข้นต่างๆ และ 50 ppm ISTD จากนั้นทำการวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้ง ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.2

Recovery คิดเป็นความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้จากการทดลองเทียบกับความเข้มข้นที่เติมลงไป สำหรับเมทริกซ์ที่เป็นบัฟเฟอร์ ความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้นั้นได้มาจากการเทียบโดยตรงจากกราฟมาตรฐานในรูปแบบที่ 4.13 ส่วนเมทริกซ์ที่เป็นสารละลายตัวอย่างพริก ความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้จากการทดลองเป็นผลต่างของความเข้มข้นของสารก่อนและหลังทำการเติม

ตารางที่ 4.2 ผลของเมทริกซ์ต่อความเที่ยงและความแม่นยำของปริมาณวิเคราะห์

สาร	ปริมาณที่ spike (ppm)	ค่าเฉลี่ย Recovery (%) \pm RSD (%)	
		เมทริกซ์ในบัฟเฟอร์	เมทริกซ์ในตัวอย่างพริก
แคปไซซิน	81.2	100.0 \pm 1.5	101.7 \pm 3.5
	390	99.9 \pm 0.1	102.7 \pm 0.6
	780	101.7 \pm 3.5	-
ไดไฮโดรแคปไซซิน	43.8	99.0 \pm 2.2	96.3 \pm 2.3
	210	99.0 \pm 1.9	98.2 \pm 1.8
	420	99.4 \pm 1.9	-

หมายเหตุ: วิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้ง, - หมายถึง ไม่ได้ทำการทดลองเพราะปริมาณรวมเกินช่วงกราฟมาตรฐาน

จากตารางที่ 4.2 พบว่าค่าเฉลี่ย Recovery อยู่ในช่วง 99 ถึง 102 % สำหรับเมทริกซ์ที่เป็นบัฟเฟอร์ และช่วง 96 ถึง 103 % สำหรับเมทริกซ์ที่เป็นสารละลายตัวอย่างพริก ด้วย RSD < 3.5 ทั้งสองเมทริกซ์ นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบในเชิงสถิติด้วย *t*-test พบว่าค่าเฉลี่ย Recovery ที่ได้จากทั้งสองเมทริกซ์นั้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % แสดงว่าเมทริกซ์ทั้งสองนี้ไม่มีผลต่อปริมาณ CAP และ DCAP ที่วิเคราะห์ได้

จากนั้นได้ศึกษาความเที่ยงภายในวัน (intraday precision) และความเที่ยงต่างวัน (interday precision) โดยใช้สารละลายมาตรฐาน CAP : DCAP ที่ความเข้มข้น (ppm) เป็น 390 : 210 (ความเข้มข้นรวม 600 ppm) ในเมทริกซ์ที่เป็นบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 15 % v/v ACN ได้ทำการวิเคราะห์ด้วย MEKC 5 วัน แต่ละวันวิเคราะห์ซ้ำ 5 ครั้ง จากนั้นนำอัตราส่วนของ A_{corr} (ของสารที่สนใจกับ

ISTD) ที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณสาร โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน (รูปที่ 4.13a และ 4.13b) ได้ผลการทดลองของค่าเฉลี่ย 5 ครั้ง ดังแสดงในตารางที่ 4.3

จากตารางที่ 4.3 พบว่าไมเกรชันใหม่และอัตราส่วนของ A_{corr} ของสารมาตรฐานมี RSD < 5.0 % ภายในวันเดียวกัน และ < 3.2 % ต่างวันกัน แสดงว่าความเที่ยงสูงทั้งภายในวันเดียวกันและต่างวันกัน

ไมเกรชันใหม่ของสารนั้นอาจมีการเปลี่ยนไปได้ เนื่องจากมีการระเหยของตัวทำละลายอินทรีย์ในบัฟเฟอร์ ทำให้มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของ EOF (มากขึ้น) และความสามารถในการเคลื่อนที่ของสารบัฟเฟอร์ (มากขึ้น) จึงมีผลต่อไมเกรชันใหม่ (แนวโน้มเร็วขึ้น) อย่างไรก็ตามได้ทำการเปลี่ยนบัฟเฟอร์ชุดใหม่หลังจากการวิเคราะห์แล้ว 5 ครั้ง (โดยปกติของการวิเคราะห์ด้วย CE จะเปลี่ยนบัฟเฟอร์ชุดใหม่หลังจากการวิเคราะห์แล้ว 10 ครั้ง) นอกจากนี้ไมเกรชันใหม่ของสารจะแตกต่างกันบ้าง อาจเนื่องจากเมื่อใช้คะพิลลารีเป็นเวลานาน สภาพผิวของคะพิลลารีเปลี่ยนไปได้ ทำให้มีผลต่อ EOF แต่อย่างไรก็ตามจากการทดลองนี้พบว่ามีความเที่ยงสูงทั้งภายในวันเดียวกันและต่างวัน วิธีการนี้จึงยอมรับได้

ตารางที่ 4.3 ความเที่ยงของการวิเคราะห์แคปไซซินและโคไฮโดรแคปไซซิน
(ความเข้มข้นรวมที่ 600 ppm)

ความเที่ยง	RSD และ ค่าเฉลี่ยของ			
	t_m		อัตราส่วนของ A_{corr}	
	CAP	DCAP	CAP	DCAP
ภายในวัน (intraday) ^a				
วันที่ 1	1.2 (11.51)	1.7 (14.45)	2.2 (4.06)	1.7 (2.92)
วันที่ 2	1.7 (11.73)	2.9 (15.17)	3.9 (4.05)	4.8 (2.88)
วันที่ 3	1.3 (12.52)	2.6 (15.03)	2.2 (4.02)	2.1 (2.89)
วันที่ 4	4.8 (11.67)	1.8 (15.15)	4.0 (4.03)	3.8 (2.90)
วันที่ 5	3.8 (11.57)	2.3 (15.25)	4.9 (4.02)	4.2 (2.9)
ต่างวัน (interday) ^b				
รวม	3.2 (11.80)	2.3 (15.01)	1.8 (4.04)	2.4 (2.90)

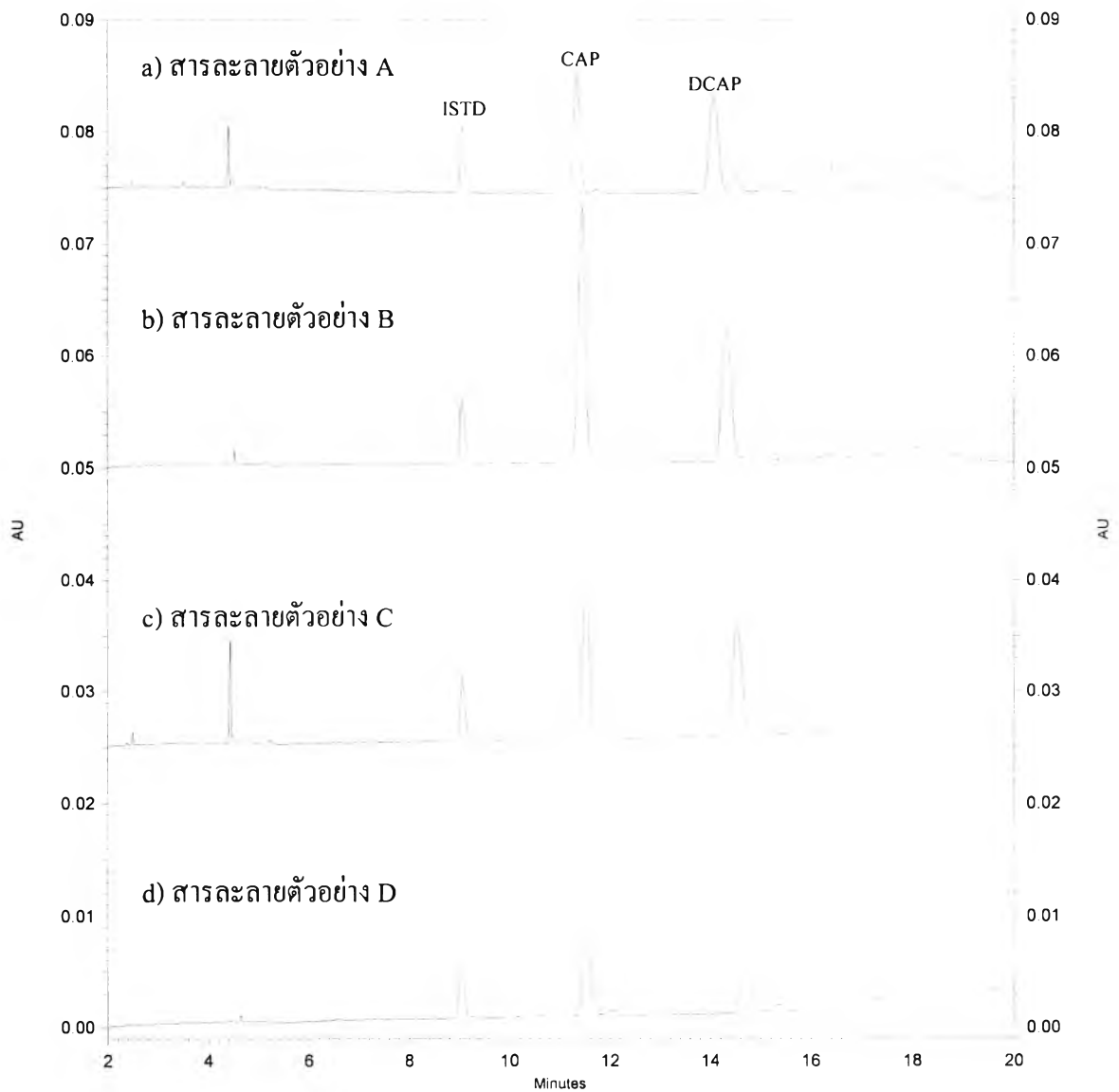
หมายเหตุ : ค่าในวงเล็บเป็นค่าเฉลี่ย และ t_m มีหน่วยเป็นนาที

: ^a ตัวอย่างในแต่ละวัน ทำการฉีดซ้ำ 5 ครั้ง

: ^b คำนวณจากการทำซ้ำ เป็นเวลา 5 วัน วันละ 5 ซ้ำ

4.6 การหาปริมาณแคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซินในตัวอย่างส่วนสกัดพริก

ชั่งตัวอย่างพริก capsicum oleoresin ซึ่งเป็นของเหลว 0.5 กรัม แล้วเจือจางด้วย ACN จนได้ปริมาตร 10 mL (ในขวดวัดปริมาตร 10 mL) จากนั้นนำมาเจือจางตัวอย่างพริกด้วยสารละลายที่ประกอบด้วย 60 mM SDS ที่มี ACN (หัวข้อ 3.3.3.1) พร้อมกับเติม ISTD (ตามวิธีการทดลองที่ได้กล่าวมาแล้วในหัวข้อ 3.3.10) และนำไปกรอง แล้วมาทำการวิเคราะห์ด้วย CE (ฉีดซ้ำ 3 ครั้งต่อตัวอย่าง) เพื่อหาปริมาณ CAP และ DCAP ด้วยเทคนิค MEKC ที่พัฒนาขึ้น การวิเคราะห์ตัวอย่างส่วนสกัดพริกต้องเจือจางด้วยสารละลายที่ประกอบด้วย 60 mM SDS ที่มี 15 % v/v ACN (หัวข้อ 3.3.3.1) ก่อนนำไปวิเคราะห์ เนื่องจากการฉีดสารที่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์โดยไม่มีการเจือจางด้วยสารละลายดังกล่าว จะทำให้บัฟเฟอร์ที่อยู่บริเวณรอยต่อของสารตัวอย่างไม่เป็นไมเซลล์จึงทำให้สารแยกออกจากกันได้ไม่ดี ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างดังรูปที่ 4.14



รูปที่ 4.14 อิเล็กโตรฟีโรแกรมของ a) สารละลายตัวอย่าง A b) สารละลายตัวอย่าง B c) สารละลายตัวอย่าง C d) สารละลายตัวอย่าง D โดยใช้บัฟเฟอร์ของ MEKC ที่ประกอบด้วย 10 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ที่ pH 9.2 ที่ประกอบด้วย 60 mM SDS และ 15 % v/v ACN, คะพิลลารีขนาด 50 μm i.d. \times 40.2 cm (30 cm ถึงเครื่องตรวจวัด), อุณหภูมิของคอลัมน์ 25 $^{\circ}\text{C}$, ศักย์ไฟฟ้า 25 kV, บรรจุสารด้วยการอัดความดัน 0.5 psi เป็นเวลา 5 s ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 214 nm; ISTD = Internal Standard, CAP = แคปไซซิน และ DCAP = ไดไฮโดรแคปไซซิน

สำหรับการหาปริมาณสารที่สนใจนั้น นำอัตราส่วนของ corrected peak area ที่ได้ไปคำนวณหาความเข้มข้นของ CAP และ DCAP ที่มีอยู่ในตัวอย่าง (หน่วยเป็น ppm) โดยใช้กราฟมาตรฐานจากรูปที่ 4.13a และ 4.13b ตามลำดับ จากนั้นคำนวณปริมาณ CAP และ DCAP ที่มีอยู่ในตัวอย่างในหน่วย g/kg (Q) ดังสมการที่ 4.4

$$Q = \frac{fCV}{W} \quad (4.4)$$

W คือ น้ำหนักของตัวอย่างพริกที่ชั่งมา (หน่วยเป็นกรัม)

V คือ ปริมาตรเริ่มต้นของสารละลายพริกตัวอย่าง (หน่วยเป็นลิตร)

f คือ จำนวนเท่าที่เจือจางสารละลายพริกตัวอย่างจากเริ่มต้น (dilution factor)

C คือ ความเข้มข้นของสารที่สนใจที่เทียบหาจากกราฟมาตรฐาน (หน่วยเป็น

ppm)

ตัวอย่างเช่น ถ้าชั่งตัวอย่างพริกมา 0.50 กรัม ละลายใน ACN จนมีปริมาตร 10 mL (0.010 L) จากนั้นนำไปเจือจาง 20/3 เท่าด้วยไมเซิลล์ (หัวข้อ 3.3.1) เมื่อแทนค่าลงในสมการที่ 4.4 จะได้ว่า

$$Q = \frac{3C}{20}$$

ตารางที่ 4.4 ปริมาณของแคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซินในตัวอย่างพริก capsicum oleoresin

ตัวอย่าง	ปริมาณสาร (g/kg)			
	CAP	DCAP	ปริมาณรวม	
capsicum oleoresin			การทดลอง	ที่ระบุไว้ ^a
A	43.0 ± 0.7	26.3 ± 0.6	69.3 ± 0.9	69.1
B	43.9 ± 0.3	16.3 ± 0.6	60.2 ± 0.7	60
C	59.1 ± 0.7	40.6 ± 1.4	99.7 ± 1.6	100
D	41.2 ± 0.9	16.1 ± 0.3	57.3 ± 0.9	ไม่ระบุ

หมายเหตุ: ในแต่ละตัวอย่าง ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากการฉีดตัวอย่าง 3 ครั้ง

^a : เป็นปริมาณที่รายงานโดยแต่ละบริษัทวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

A : บริษัทอุตสาหกรรมเครื่องหอมไทย-จีน จำกัด

B : บริษัทคิงส์ฟู้ด เอ็นเทอไพรซ จำกัด

C : บริษัท เคมสตาร์ จำกัด

D : กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ปริมาณของ CAP และ DCAP ที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างส่วนสกัดพริก แสดงดังตารางที่ 4.4 จะเห็นว่าปริมาณรวมของ CAP และ DCAP ที่ระบุไว้จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC มีค่าใกล้เคียงกับที่วิเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค MEKC ที่พัฒนาขึ้น ดังนั้นเทคนิค MEKC สามารถเป็นทางเลือกหนึ่งของปริมาณวิเคราะห์แคปไซซินอยด์ในตัวอย่างพริก capsicum oleoresin ได้ ซึ่งการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ต้องมีขั้นตอนการกำจัด เมทริกซ์ในตัวอย่างโดยผ่าน solid phase extraction ด้วย C18 cartridge มิฉะนั้นสารที่มีรีเทนชันมาก จะติดในคอลัมน์ของ HPLC ได้ ในขณะที่เทคนิค MEKC ที่พัฒนาขึ้นไม่จำเป็นต้องผ่าน solid phase extraction ดังกล่าว

4.7 การหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดซอสพริก

ในงานวิจัยนี้ทำการหาภาวะที่เหมาะสมของการเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณ CAP และ DCAP ในตัวอย่างซอสพริกด้วยเทคนิค MEKC โดยศึกษาผลของชนิดของตัวทำละลายที่ใช้สกัดและผลของการเติมเกลือ

4.7.1 การหาชนิดของตัวทำละลายที่ใช้สกัดและผลของการเติมเกลือ

จากงานวิจัยที่ผ่านมาดังที่ได้กล่าวไว้ในตารางที่ 1.3 ได้มีรายงานการเตรียมตัวอย่างพริก โดยการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่ละลายน้ำ เช่น ปิโตรเลียมอีเทอร์ เฮกเซน ไดเอทิลอีเทอร์ และเอทิลอะซิเตต เป็นต้น หรือตัวทำละลายอินทรีย์ที่ละลายน้ำได้ เช่น เอทานอล เมทานอล อะซิโตน และอะซิโตนไนโทรส เป็นต้น ในกรณีที่ตัวอย่างเป็นพริกสด มักจะมีการอบตัวอย่างก่อนการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ เพื่อกำจัดน้ำที่อาจลดประสิทธิภาพในการสกัดสารได้

สำหรับซอสพริกประกอบด้วย กระเทียม น้ำตาล เกลือ น้ำส้มสายชู (กรดแอสซิติคและน้ำ) น้ำ และพริก ซึ่งส่วนใหญ่เป็นน้ำประมาณ 20 ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ (คิดจากน้ำและน้ำส้มสายชู) การระเหยน้ำจากตัวอย่างซอสพริกก่อนการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์มีความยุ่งยาก ดังนั้นแนวทางการเตรียมตัวอย่างน่าเป็นไปได้ 2 แบบคือ แบบที่ 1 การสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่ละลายน้ำ หรือแบบที่ 2 การสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่ละลายน้ำ แล้วมีการเติมเกลือลงไปเพื่อทำให้เกิดการแยกของชั้นน้ำออกจากชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ เพราะน้ำอาจทำให้ประสิทธิภาพในการสกัดสารลดลง อีกทั้งทำให้ปริมาตรในส่วนสกัดเพิ่มขึ้น (ปริมาตรของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ละลายน้ำ + ปริมาตรของน้ำ) หากนำส่วนสกัดนี้ไปวิเคราะห์โดยตรงทำให้ความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ค่าน้อยกว่าความเป็นจริง ดังนั้นเมื่อคำนวณเป็นปริมาณของสารในตัวอย่างจะได้น้อยกว่าความเป็นจริง เช่นเดียวกัน แม้ว่าผลงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีรายงานการเตรียมตัวอย่างซอสพริกโดยการสกัดโดยตรงด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่ละลายน้ำได้ เช่น เอทานอล [Batchelor and Jones, 2000; Kachosangi et al., 2008] และ เมทานอล [Kozukuc et al., 2005] แต่วิธีการดังกล่าวนี้ไม่น่าถูกต้อง

ในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการสกัดสำหรับหาปริมาณ CAP และ DCAP ในซอสเตรียมและซอสพริกจริง ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์แบบเดิมเกลือและไม่เติมเกลือ โดยที่ซอสเตรียมที่ได้มาจากซอสเบตงค์ (หัวข้อ 3.3.11.1) มาเติมสารละลายมาตรฐาน CAP และ DCAP ให้มีความเข้มข้นของ CAPs 50 และ 100 ppm ($\mu\text{g/g}$) ในซอสเตรียม จากนั้นนำซอสเตรียมหรือซอสพริกจริงไปสกัดตามวิธีการในหัวข้อ 3.3.11.2 ทำซ้ำตัวอย่างละ 3 Batch แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MEKC ในภาวะที่เหมาะสมที่ได้ทำการพัฒนาขึ้น เพื่อหาปริมาณ CAPs ที่สกัดได้เทียบกับกราฟมาตรฐานดังหัวข้อ 4.5.2 แล้วนำไปคำนวณ % Recovery ของ CAPs ในซอสเตรียม ในกรณีนี้ % Recovery หรือเปอร์เซ็นต์การสกัด เป็นร้อยละของปริมาณที่วิเคราะห์ได้ในตัวอย่างที่ผ่านการสกัดเทียบกับปริมาณเริ่มต้นในตัวอย่างก่อนการสกัด ซึ่งค่า % Recovery ที่ใกล้เคียง 100 % แสดงว่ามีประสิทธิภาพมากในการสกัด CAPs

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

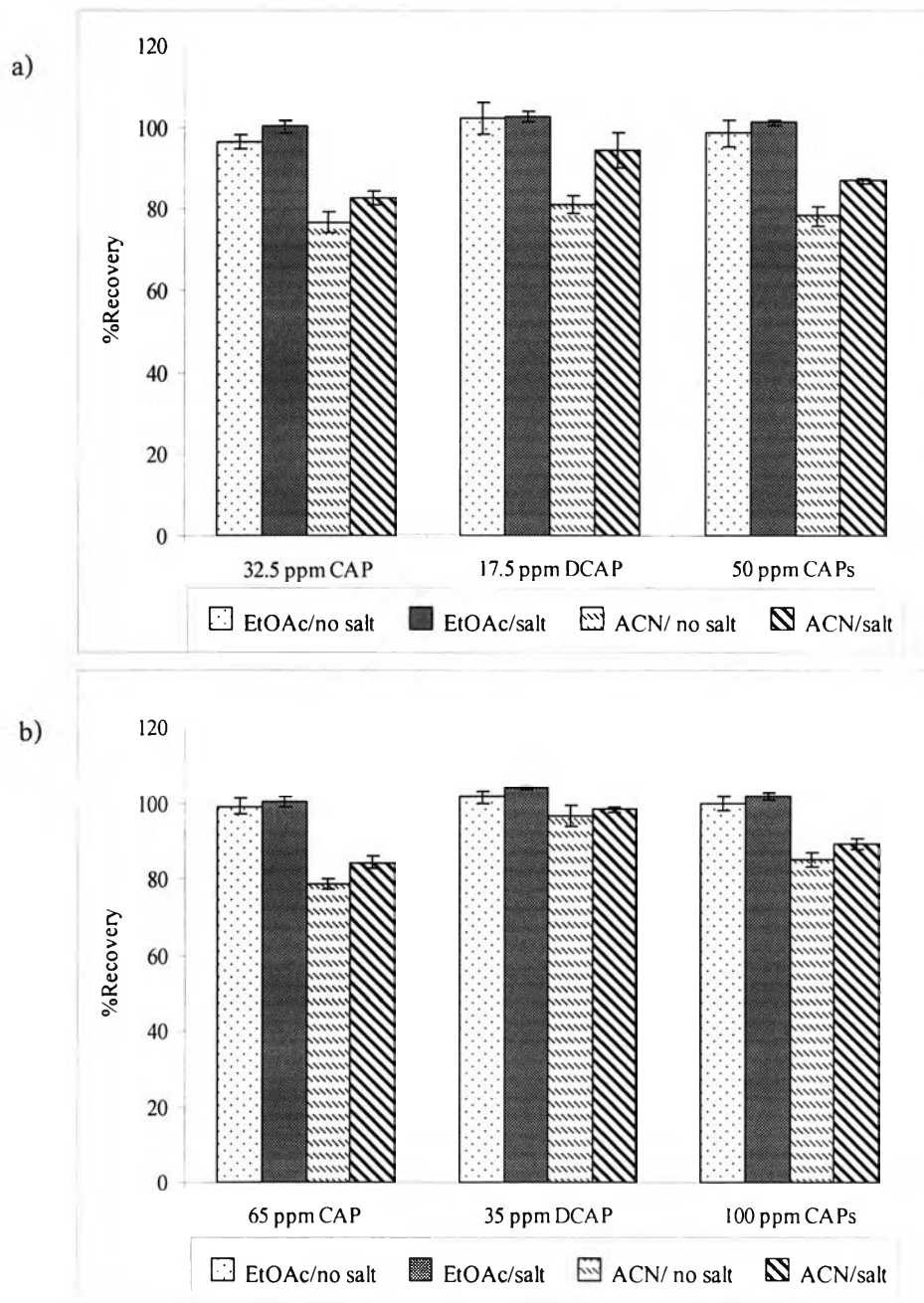
หลังจากที่ผ่านการสกัดซอสด้วย EtOAc และ ACN ทั้งแบบที่เติมเกลือและไม่เติมเกลือ ได้ผลการทดลองของ % Recovery ดังรูปที่ 4.15 ที่ใช้ซอสเตรียมที่มี CAPs 50 และ 100 ppm ($\mu\text{g/g}$) (รูปที่ 4.15a และ 4.15b ตามลำดับ) ซึ่งข้อมูลในกลุ่มแรกเป็น CAP กลุ่มที่สองเป็น DCAP และกลุ่มสุดท้ายคือ CAPs (CAP + DCAP) จะเห็นได้ว่าการสกัดด้วย EtOAc แบบไม่เติมเกลือ มี % Recovery มากกว่า (98.5 และ 99.8 % สำหรับซอสเตรียมที่มี CAPs 50 และ 100 ppm ตามลำดับ) การสกัดด้วย ACN แบบไม่เติมเกลือ (78.2 และ 85.0 % สำหรับซอสเตรียมที่มี CAPs 50 และ 100 ppm ตามลำดับ)

สำหรับการสกัดแบบเติมเกลือ ได้ใช้เกลือ anhydrous MgSO_4 และ NaCl ลงไป เพื่อช่วยในการสกัดนี้ดีขึ้นและทำให้เกิด salting-out effect และแยกชั้นน้ำออกจากตัวทำละลายอินทรีย์ได้ดีขึ้น [Morrison and Freiser, 1962; Anastassiades *et. al.*, 2003; Majors, 2008] พบว่าการสกัดด้วย EtOAc

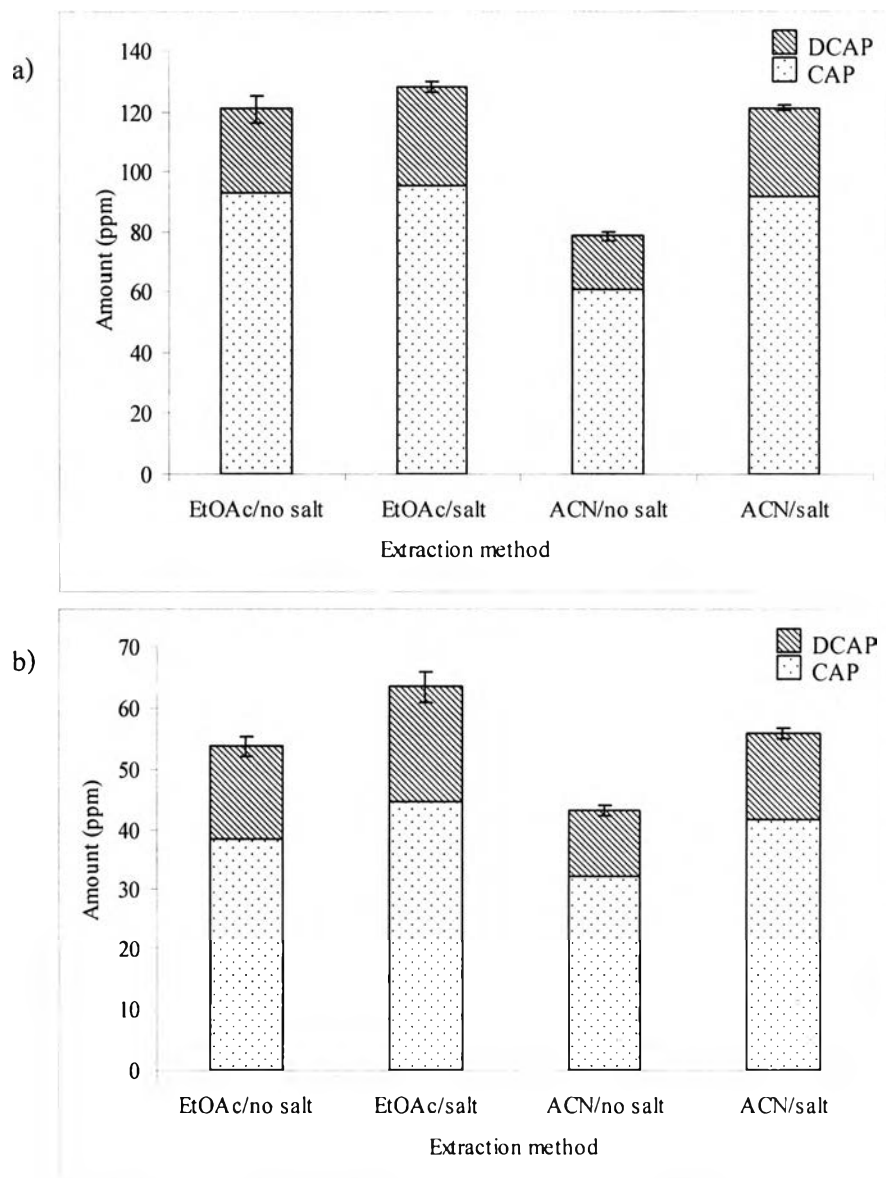
แบบเติมเกลือจะให้ % Recovery เป็น 100.9 และ 101.5 % สำหรับซอสเตรียมที่มี CAPs 50 และ 100 ppm ตามลำดับ ซึ่งให้ % Recovery ไม่แตกต่างจากการสกัดด้วย EtOAc แบบไม่เติมเกลือ ในขณะที่การสกัดด้วย ACN แบบเติมเกลือให้ค่า % Recovery เป็น 86.8 และ 89.1 % สำหรับซอสเตรียมที่มี CAPs 50 และ 100 ppm ตามลำดับ ซึ่ง % Recovery มากกว่าการใช้ ACN แบบไม่เติมเกลือ

จากนั้นจึงได้ทดลองนำตัวอย่างซอสพริกจริง S1-h45 และ S13-x30 มาสกัดด้วย EtOAc และ ACN ทั้งแบบที่เติมเกลือและไม่เติมเกลือ และได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.16a และ 4.16b เมื่อเปรียบเทียบพบว่าปริมาณ CAPs ที่วิเคราะห์ได้จากการสกัดแบบต่างๆ เป็นดังนี้ คือ EtOAc แบบเติมเกลือ > EtOAc แบบไม่เติมเกลือ \approx ACN แบบเติมเกลือ > ACN แบบไม่เติมเกลือ

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



รูปที่ 4.15 Recovery ของ CAPs ในขอสตรีมที่ผ่านการสกัดด้วย EtOAc และ ACN แบบเติมเกลือและไม่เติมเกลือ ที่ใช้ขอสตรีมที่มี CAPs (a) 50 และ (b) 100 ppm ($\mu\text{g/g}$)



รูปที่ 4.16 ปริมาณ CAPs ในตัวอย่างซอสพริกจริง ที่วิเคราะห์ได้จากการสกัดตัวอย่างด้วย EtOAc และ ACN แบบเติมเกลือและไม่เติมเกลือ (a) ตัวอย่างซอสพริก S1-h45 และ (b) S13-x30

4.7.2 ปริมาณเกลือที่เหมาะสมในการสกัด

ได้ทำการศึกษาหาปริมาณเกลือที่เหมาะสมในการสกัด ซึ่งเกลือที่ใช้ได้แก่ anhydrous $MgSO_4$ และ $NaCl$ ที่ต้องมีการเติมเกลือลงไปในช่วงขั้นตอนการสกัดนั้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดและแยกสารออกจากเมทริกซ์ ซึ่งโดยทั่วไปใช้ $MgSO_4$ และ $NaCl$ ในอัตราส่วน 4:1 [Anastassiades *et. al.*, 2003; Majors, 2008] และในช่วง 0.5 ถึง 1.0 เท่าของน้ำหนักตัวอย่าง (ในที่นี้ใช้น้ำหนักตัวอย่างเป็น 2.5 กรัม) โดยนำซอสเตรียมที่มีความเข้มข้นของ CAPs 100 ppm ($\mu g/g$) และซอสพริกจริง S1-h45 เป็นตัวอย่างทดสอบ จากนั้นสกัดตามวิธีในหัวข้อ 3.3.11.2 โดยใช้ EtOAc เป็นตัวทำละลายที่ใช้สกัดแบบเติมเกลือในปริมาณต่างๆ ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 เปรียบเทียบปริมาณเกลือที่เหมาะสมในการสกัดซอสพริก

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

$n = 3$ batch

จากตารางที่ 4.5 จะเห็นว่าปริมาณของเกลือที่เติมแตกต่างกันนั้นให้ % Recovery ของ CAPs ในซอสเตรียม (ที่มีความเข้มข้นของ CAPs 100 ppm) ไม่แตกต่างกันมากนักในขณะที่ปริมาณ CAPs ที่วิเคราะห์ได้ในตัวอย่างซอสพริกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเล็กน้อย เมื่อปริมาณเกลือเพิ่มขึ้น ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่า ลักษณะของซอสเตรียมมีความแตกต่างจากซอสพริกจริง เช่นในซอสพริกจะมีน้ำมันจากพริกในขณะที่ซอสเตรียมไม่มีน้ำมัน ซึ่งเป็นที่ทราบว่าน้ำมันนั้นจะเกิดอิมัลชันกับน้ำได้ และเกลือจะช่วยลดการเกิดอิมัลชันระหว่างรอยต่อของชั้นน้ำและชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์ ดังที่กล่าวมาแล้วว่าเกลือที่เติมลงไปในช่วงนี้นั้น ทำให้เกิด salting-out effect และทำให้เกิดการแยกชั้นน้ำและชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ สารที่เราสนใจที่เป็นสารประกอบอินทรีย์จึงออกมาอยู่ในชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้สกัดได้มากขึ้น

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

4.7.3 การสกัดซ้ำ 2 ครั้ง เทียบกับ 1 ครั้ง

แม้ว่าการสกัดซอสเตรียมด้วย EtOAc แบบเติมเกลือที่ทำการสกัด 1 ครั้ง พบว่า %Recovery ที่ได้เกือบ 100 % แต่ลักษณะของซอสเตรียมและซอสพริกจริงมีความแตกต่างกัน ดังนั้นจึงต้องการตรวจสอบว่าในการสกัดตัวอย่างซอสพริกจริงเพียง 1 ครั้ง ยังมีปริมาณ CAPs เหลือจากการสกัดครั้งแรกมากหรือน้อยเพียงใด โดยนำส่วนที่เหลือจากการสกัดครั้งที่ 1 มาสกัดซ้ำด้วยตัวทำละลายอีก 1 ครั้ง ตามวิธีการในหัวข้อ 3.3.11.2 ซึ่งตัวอย่างซอสพริกจริง ได้แก่ S1-h45 และ S13-x30 และสกัดด้วย EtOAc ทั้งแบบเติมเกลือ (0.5 เท่าของน้ำหนักตัวอย่าง) และแบบไม่เติมเกลือ (แบบไม่เติมเกลือใช้ในการเปรียบเทียบว่ามีสารเหลือจากการสกัดครั้งที่ 1 มากน้อยเพียงใด) จากนั้นคำนวณอัตราส่วน (E_{ratio}) ของปริมาณ CAPs ที่สกัดได้ 2 ครั้ง เทียบกับ 1 ครั้ง ดังสมการที่ 4.5

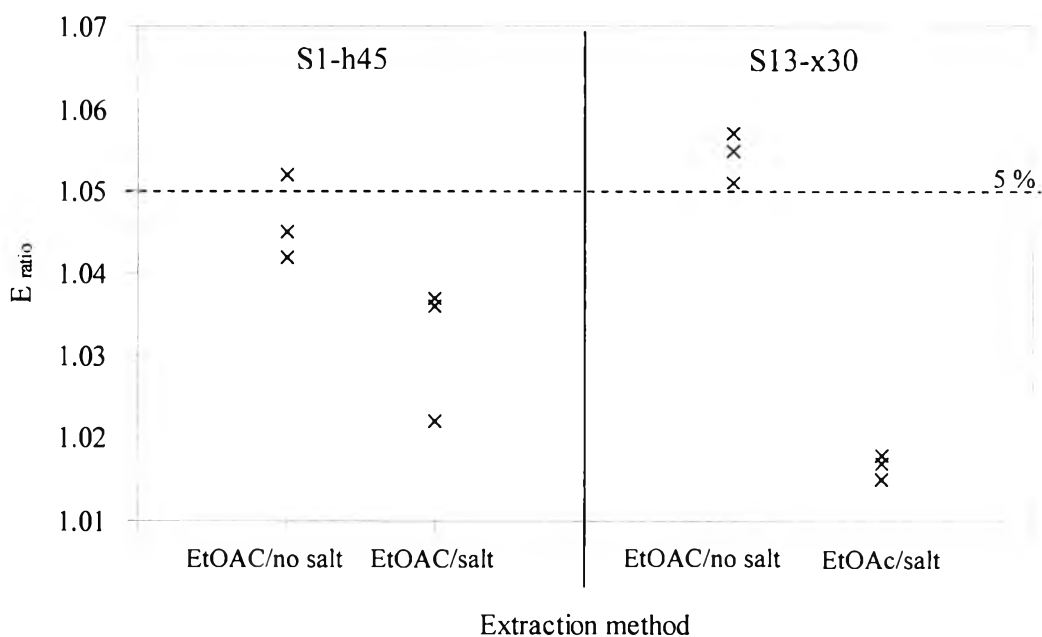
$$E_{ratio} = \frac{x_1 + x_2}{x_1} \quad (4.5)$$

โดยที่ x_1 คือ ปริมาณของ CAPs จากการสกัดครั้งที่ 1

x_2 คือ ปริมาณของ CAPs จากการสกัดครั้งที่ 2

ปริมาณของ CAPs ที่วิเคราะห์ได้จากการสกัดตัวอย่างซอสพริกจริง (S1-h45 และ S13-x30) ที่สกัดซ้ำ 2 ครั้ง เทียบกับ 1 ครั้ง แสดงการเปรียบเทียบให้เห็นดังรูปที่ 4.17 โดยเทียบใน batch เดียวกัน จำนวน 3 batch และที่ค่าอัตราส่วน (E_{ratio}) เป็น 1.05 หมายความว่า การสกัดซ้ำ 2 ครั้งได้ปริมาณสารเพิ่มขึ้น 5 % เทียบกับการสกัด 1 ครั้ง จากผลการทดลองในรูปที่ 4.3 เมื่อสกัดตัวอย่างซอสพริกด้วย EtOAc แบบเติมเกลือ พบว่าการสกัดซ้ำ 2 ครั้ง ได้ปริมาณ CAPs เพิ่มขึ้น (เทียบกับการสกัด 1 ครั้ง) น้อยกว่า 4 และ 2 % สำหรับ S1-h45 และ S13-x30 ตามลำดับ ในขณะที่เพิ่มขึ้นมากกว่า 4 และ 5 % สำหรับการสกัดแบบไม่เติมเกลือ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการสกัดซ้ำ 2 ครั้งด้วย EtOAc แบบเติมเกลือได้ปริมาณ CAPs เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ซึ่งค่าน้อย 4 หรือ 2 % อาจเป็นไปได้สำหรับสารที่ตกค้างในภาชนะ หรือร้อยละค่าเบี่ยงเบนสัมพัทธ์ของการทดลอง ดังนั้นเพื่อ

ประหยัดเวลาในการสกัดและการระเหยตัวทำละลายหลังการสกัด ในงานวิจัยนี้จึงเลือกการสกัดเพียง 1 ครั้งด้วย EtOAc แบบเติมเกลือ (anhydrous $MgSO_4$ 1.0 กรัม + NaCl 0.25 กรัม)



รูปที่ 4.17 อัตราส่วนของปริมาณ CAPs ที่วิเคราะห์ได้จากการสกัดตัวอย่างซอสพริกซ้ำ 2 ครั้งเทียบกับ การสกัด 1 ครั้ง (E_{ratio}) ด้วย EtOAc แบบเติมเกลือและไม่เติมเกลือ

4.7.4 ความเที่ยงของการสกัด

ได้ศึกษาผลของความเที่ยงของวิธีการสกัดซอสพริกเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ CAP และ DCAP โดยใช้ซอสเตรียม คือ ซอสแบบลงค์ที่ได้ทำการเติมสารละลายมาตรฐาน CAPs ลงไปความเข้มข้นที่แน่นอน ประกอบด้วย CAPs ที่ความเข้มข้น 20, 50 และ 100 ppm ($\mu g/g$) ดังหัวข้อ 3.3.13 ทำการสกัดตัวอย่างซอสเตรียมแต่ละความเข้มข้น CAPs ด้วย EtOAc แบบเติมเกลือ โดยทำการสกัดความเข้มข้นของ CAPs ละ 5 batch ในแต่ละวัน เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MEKC ที่ได้พัฒนาขึ้น ดังผลการทดลองในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ความเที่ยงของการสกัดสำหรับวิเคราะห์แคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซิน

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

หมายเหตุ : ^a 5 batch ในแต่ละวัน ($n = 5$)

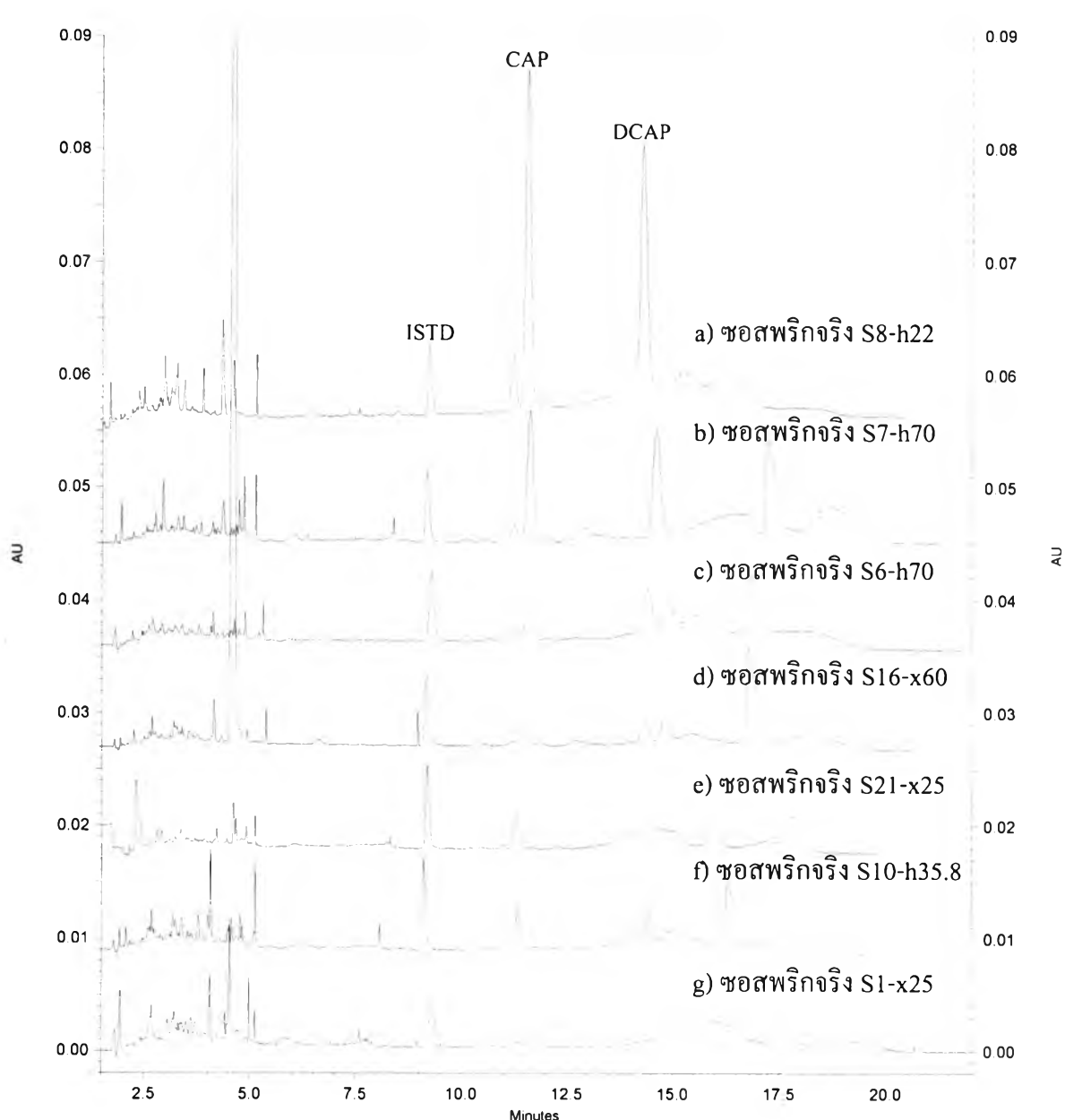
: ^b 5 วัน วันละ 5 batch ($n = 25$)

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

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

4.8 การหาปริมาณแคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซินในตัวอย่างซอสพริก

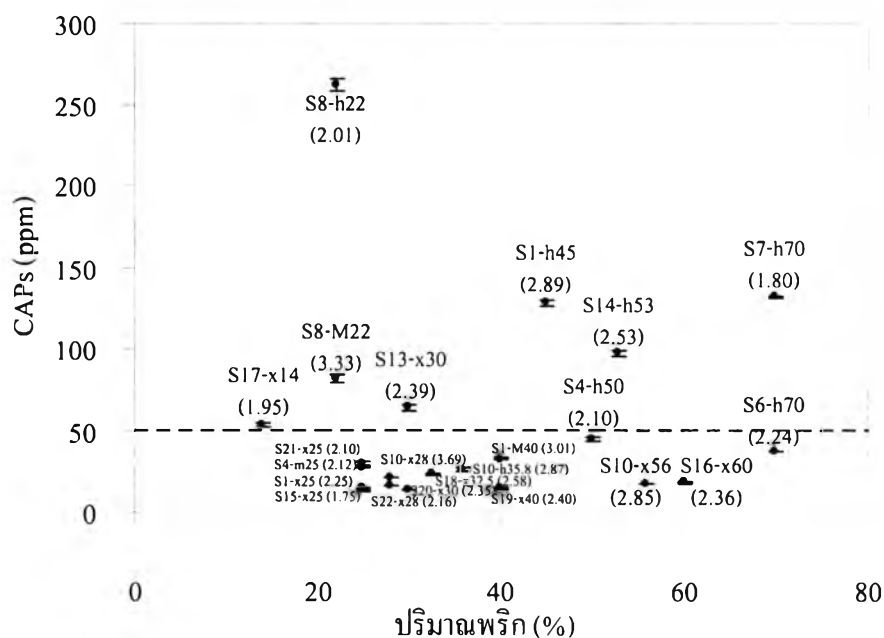
ทำการเตรียมตัวอย่างซอสพริกจริงดังหัวข้อ 3.3.14 ทำการสกัดซ้ำ 3 batch ในแต่ละตัวอย่าง แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MEKC ที่ภาวะเหมาะสมที่หาได้ ตัวอย่างอิเล็กทรอนิกส์โรแกรมของซอสพริก แสดงดังรูปที่ 4.18 สำหรับการหาปริมาณสารที่สนใจ นำอัตราส่วนของ corrected peak area ที่ได้ไปคำนวณหาความเข้มข้นของ CAP และ DCAP ที่มีอยู่ในตัวอย่างโดยใช้กราฟมาตรฐาน (รูปที่ 4.13) และสมการที่ 3.1



รูปที่ 4.18 อิเล็กทรอนิกส์โรแกรมของตัวอย่างซอสพริกจริงบางตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์ปริมาณ โดยทำการสกัดด้วย EtOAc แบบเติมเกลือ (anhydrous $MgSO_4$ 1.0 กรัม และ $NaCl$ 0.25 กรัม); ISTD = Internal Standard, CAP = แคปไซซิน และ DCAP = ไดไฮโดรแคปไซซิน

ตารางที่ 4.7 ปริมาณของแคปไซซินและโคไฮโครแคปไซซินในตัวอย่างซอสพริก

ตัวอย่างซอสพริก	พริกในซอส (% w/w)	ปริมาณสาร (ppm, $\mu\text{g/g}$)		
		CAP	DCAP	CAPs
S1-h45	45	95.1 \pm 1.1	32.9 \pm 0.9	128.0 \pm 2.0
S1-M40	40	26.4 \pm 0.7	4.6 \pm 0.9	31.0 \pm 0.8
S1-x25	25	9.8 \pm 0.9	4.4 \pm 0.2	14.2 \pm 2.2
S4-h50	50	29.8 \pm 1.3	14.2 \pm 0.1	44.0 \pm 1.4
S4-m25	25	18.3 \pm 0.1	8.6 \pm 0.4	26.9 \pm 0.4
S6-h70	70	25.7 \pm 0.5	11.5 \pm 0.3	37.1 \pm 0.2
S7-h70	70	84.6 \pm 2.1	47.2 \pm 2.8	131.7 \pm 1.8
S8-h22	22	175.0 \pm 2.6	86.9 \pm 1.1	261.9 \pm 2.0
S8-M22	22	62.4 \pm 2.7	18.8 \pm 1.0	81.1 \pm 2.5
S10-x28	28	16.6 \pm 0.3	4.5 \pm 0.2	21.1 \pm 0.3
S10-h35.8	35.8	19.6 \pm 1.3	6.8 \pm 0.2	26.4 \pm 1.4
S10-x56	56	13.0 \pm 0.2	4.6 \pm 0.1	17.6 \pm 2.9
S13-x30	30	44.8 \pm 1.8	18.8 \pm 1.1	63.6 \pm 2.3
S14-h53	53	69.5 \pm 1.6	27.5 \pm 1.3	97.1 \pm 2.0
S15-x25	25	8.3 \pm 0.3	4.8 \pm 0.7	13.0 \pm 1.8
S16-x60	60	12.7 \pm 0.5	5.4 \pm 0.4	18.1 \pm 2.4
S17-x14	14	35.0 \pm 0.6	17.93 \pm 0.4	53.0 \pm 0.9
S18-x32.5	32.5	16.6 \pm 0.1	6.5 \pm 0.3	23.1 \pm 0.8
S19-x40	40	10.17 \pm 0.5	4.3 \pm 0.3	14.4 \pm 0.7
S20-x30	30	9.6 \pm 0.1	6.5 \pm 0.3	23.1 \pm 0.8
S21-x25	25	20.0 \pm 1.1	9.5 \pm 0.3	29.5 \pm 1.4
S22-x28	28	10.8 \pm 0.4	5.0 \pm 0.2	15.8 \pm 0.3



รูปที่ 4.19 ความสัมพันธ์ของปริมาณ CAPs และปริมาณของพริกในตัวอย่างซอสพริก (โดยที่ h, M, m และ x หมายถึงสูตรความเผ็ดมาก (hot) เผ็ดปานกลาง (medium) เผ็ดน้อย (mild) และไม่ได้ระบุตามลำดับ ส่วนตัวเลขท้ายสูตรหมายถึงปริมาณพริก (%) ที่ระบุไว้และตัวเลขที่อยู่ในวงเล็บเป็นอัตราส่วนของ CAP : DCAP ที่วิเคราะห์ได้)

จากการประยุกต์เทคนิค MEKC สำหรับปริมาณวิเคราะห์ของ CAP และ DCAP ในซอสพริกจริง โดยใช้ bisphenol A เป็น internal standard ได้ทำการวิเคราะห์และเปรียบเทียบปริมาณของ CAPs ในตัวอย่างซอสพริกต่างๆ จากผลการทดลองในตารางที่ 4.7 และรูปที่ 4.19 จะเห็นได้ว่าปริมาณ CAPs ไม่มีแนวโน้มความสัมพันธ์แปรตามปริมาณพริกที่ระบุไว้ ทั้งนี้เนื่องจากความแตกต่างของสายพันธุ์ และ/หรือ แหล่งพริกที่ใช้ในการผลิตซอสพริก แม้แต่สูตรความเผ็ดเหมือนกัน แต่ปริมาณ CAPs ที่ตรวจพบต่างกัน เช่น ซอสพริกสูตรเผ็ดมาก S1-h45, S4-h50, S6-h70, S7-h70, S8-h22, S10-h35.8 และ S14-h53 พบว่ามี 128, 44, 37, 132, 262, 26 และ 97 ppm CAPs หรือซอสสูตรเผ็ดปานกลาง S1-M40 และ S8-M22 พบว่ามี 31 และ 81 ppm CAPs นอกจากนี้ซอสพริกยี่ห้อเดียวกันแต่สูตรเผ็ดต่างกันและพบว่ามีอัตราส่วนของ CAP : DCAP ที่ตรวจพบเท่ากัน แสดงว่าน่าจะใช้พริกสายพันธุ์เดียวกันหรือปลูกในแหล่งเดียวกัน ในขณะที่ซอสพริกต่างยี่ห้อกันแต่อัตราส่วนของ CAP : DCAP ที่พบมีทั้งเท่ากันและต่างกัน จึงน่าจะใช้พริกต่างสายพันธุ์หรือต่างแหล่งกัน และหากพิจารณาตามข้อกำหนดของปริมาณจำกัดของ CAPs ในซอสพริกแล้ว จะเห็นได้

ว่ามี 7 ตัวอย่างที่มี CAPs เกิน 50 ppm ($\mu\text{g/g}$) ซึ่งน่าจะจัดเป็นซอสพริกสูตรเผ็ดจัดมาก (hottest hot chili sauce)