



บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาอะพิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส (capillary electrophoresis, CE) แบบไมเซลล์ลารีอิเล็กโทรไคเนติกโครมาโทกราฟี (micellar electrokinetic chromatography, MEKC) และไมโครอิมัลชันอิเล็กโทรไคเนติกโครมาโทกราฟี (microemulsion electrokinetic chromatography, MEEKC) สำหรับแยกและหาปริมาณแคปไซซิน (CAP) และไดไฮโดรแคปไซซิน (DCAP) สำหรับภาวะของ MEKC และ MEEKC ที่เลือกใช้ คือ อะพิลลารีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 μm ความยาว 40.2 cm (30 cm ถึงเครื่องตรวจวัด), อุณหภูมิของคอลัมน์ 25 $^{\circ}\text{C}$, , ทำการบรรจุมวลสารด้วยการอัดความดัน 0.5 psi เป็นเวลา 5 วินาที, ศักย์ไฟฟ้าสำหรับการแยกสาร 25 kV, ตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัด UV ที่ความยาวคลื่น 214 nm สำหรับบัฟเฟอร์ในเทคนิค MEKC ประกอบด้วย 10 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ที่ pH 9.2 โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) เป็นสารลดแรงตึงผิว และตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งใช้เป็นเมทานอล (MeOH) หรืออะซิโตไนไทรล์ (ACN) ในขณะที่บัฟเฟอร์ในเทคนิค MEEKC ประกอบด้วย 0.56 % v/v เอทิลอะซิเตต (EtOAc), 162 mM 1-บิวทานอล, 10 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ที่ pH 9.2 และ SDS เป็นสารลดแรงตึงผิว และ ACN หรือ MeOH ทำหน้าที่เป็นตัวทำละลายอินทรีย์

ได้ทำการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมสำหรับแยก CAP และ DCAP ในส่วนสกัดพริกด้วยเทคนิค MEKC ได้แก่ ชนิดและปริมาณของตัวทำละลายอินทรีย์ (ACN หรือ MeOH ตั้งแต่ 0 ถึง 20 % v/v), ความเข้มข้นของ SDS (50 ถึง 80 mM), ศักย์ไฟฟ้า (15 ถึง 25 kV) และอุณหภูมิ (25 ถึง 35 $^{\circ}\text{C}$) และสำหรับในเทคนิค MEEKC ได้ทำการศึกษาผลของชนิดและปริมาณของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้เป็น ACN หรือ MeOH ตั้งแต่ 0 ถึง 15 % v/v และผลของความเข้มข้นของ SDS ในช่วง 60 ถึง 80 mM

การเพิ่มความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์ทำให้การแยกของสารดีขึ้น แต่ไม่เกรชันใหม่ ของสารมากขึ้นด้วย การใช้ ACN จะให้การแยกสารที่ดีกว่า และใช้เวลาในการวิเคราะห์สารสั้นกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับ MeOH ในงานวิจัยนี้เลือกใช้ 15 % v/v ACN สำหรับบัฟเฟอร์ของ MEKC และ 10 % v/v ACN สำหรับบัฟเฟอร์ของ MEEKC เนื่องจากพิกของ CAP และ DCAP แยกออกจากกัน และแยกจากเมทริกซ์ของส่วนสกัดพริกได้สมบูรณ์

การเพิ่มความเข้มข้นของ SDS จะให้การแยกสารที่ไม่แตกต่างกันมากนัก แต่ไม่เกรชันใหม่ จะมากขึ้น จึงเลือกใช้สารลดแรงตึงผิวที่มีความเข้มข้น 60 mM SDS สำหรับบัฟเฟอร์ของ MEKC และ 80 mM SDS สำหรับบัฟเฟอร์ของ MEEKC ซึ่งจะได้การแยกสารที่สมบูรณ์ภายในระยะเวลาอันรวดเร็ว

การเพิ่มอุณหภูมิของคอลัมน์และศักย์ไฟฟ้าที่ใช้สำหรับแยกสาร ทำให้เวลาในการวิเคราะห์สั้นลง แต่การแยกของสารลดลงด้วย เนื่องจากผลของ Joule heating ดังนั้นจึงเลือกใช้ศักย์ไฟฟ้าที่ 25 kV และอุณหภูมิของคอลัมน์ที่ 25 °C ซึ่งใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้อง

ดังนั้นภาวะที่เหมาะสมสำหรับแยก CAP และ DCAP ในส่วนสกัดพริกด้วย MEKC คือ 10 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ที่ pH 9.2, 60 mM SDS และ 15 % v/v ACN 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 และ 10 % v/v ACN เมื่อนำภาวะของ CE แบบ MEKC และ MEEKC ที่ได้มาเปรียบเทียบกัน โดยภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค MEKC ใช้เวลาในการแยกสารภายในเวลาประมาณ 22 นาที ส่วนการแยกสารด้วยเทคนิค MEEKC ใช้เวลาในการแยกสารประมาณ 50 นาที ซึ่งใช้เวลาในการแยกสารที่นานกว่าเทคนิค MEKC มาก อีกทั้งขั้นตอนในการเตรียมสารของเทคนิค MEEKC ก่อนข้างยุ่งยากกว่า จึงนำเทคนิค MEKC มาใช้ในการศึกษาการแยกและวิเคราะห์ CAP และ DCAP

จากการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ CAP และ DCAP ในส่วนสกัดพริกด้วย MEKC พบว่า มีความแม่นยำและความเที่ยงสูง และมีขีดจำกัดของการตรวจวัดเป็น 5.2 และ 2.8 ppm ตามลำดับ และขีดจำกัดของปริมาณวิเคราะห์เป็น 16.3 และ 8.8 ppm และขีดจำกัดของปริมาณวิเคราะห์ในตัวอย่างส่วนสกัดพริกเป็น 2.2 และ 1.2 g/kg สำหรับ CAP และ DCAP ตามลำดับ

จากนั้นประยุกต์เทคนิค MEKC สำหรับปริมาณวิเคราะห์ของ CAP และ DCAP ในส่วนสกัดพริก โดยใช้ bisphenol A เป็น internal standard พบว่าปริมาณรวมของ CAP และ DCAP ในตัวอย่างของ 4 บริษัทที่วิเคราะห์ได้ด้วย MEKC มีค่าใกล้เคียงกับปริมาณที่ระบุไว้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ซึ่งเทคนิค HPLC ต้องมีขั้นตอนการเตรียมสารตัวอย่าง โดยการทำ solid phase extraction (SPE) เพื่อกำจัดสารที่อาจติดในคอลัมน์ได้ ขั้นตอน SPE ต้องเสียเวลาและค่าใช้จ่าย ในขณะที่เทคนิค MEKC ไม่จำเป็นต้องมีขั้นตอนในการเตรียมสารตัวอย่างที่ยุ่งยากนอกจากการละลายและการกรองเท่านั้น ดังนั้นเทคนิค MEKC จึงน่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการหาปริมาณ CAP และ DCAP ในส่วนสกัดพริก

จากเทคนิค MEKC ที่พัฒนาขึ้นมาไปประยุกต์ใช้สำหรับวิเคราะห์ปริมาณ CAP และ DCAP ในตัวอย่างอื่นๆ เช่น ซอสพริก ซึ่งซอสพริกมีลักษณะเป็นของเหลวข้น มีส่วนประกอบเป็นกระเทียม น้ำตาล เกลือ น้ำส้มสายชู (กรดแอสซิดิกและน้ำ) น้ำ และพริก ซึ่งส่วนใหญ่เป็นน้ำประมาณ 20 ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ (คิดจากน้ำ + น้ำส้มสายชู) เพื่อความปลอดภัยทางอาหาร สหภาพยุโรป (European Commission) แนะนำว่าในซอสพริกควรมีแคปไซซินอยด์ (CAPs) ไม่เกิน 50 ppm (g/kg)

ได้ทำการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมสำหรับการสกัดซอสพริกด้วยตัวทำละลายอินทรีย์เพื่อวิเคราะห์ปริมาณ CAPs ด้วยเทคนิค MEKC ได้แก่ ชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้สกัดและผลของการเติมเกลือ จากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการสกัดของ EtOAc และ ACN ทั้งแบบที่

เดิมเกลือและไม่เติมเกลือ โดยใช้ซอสพริกเตรียมที่มี CAPs 50 และ 100 ppm ($\mu\text{g/g}$) และตัวอย่างซอสพริกจริง (S1-h45 และ S13-x30) อย่างละ 3 ชุด พบว่าการสกัดตัวอย่างด้วย EtOAc แบบเติมเกลือ ให้ประสิทธิภาพในการสกัด CAPs ดีกว่าการสกัดด้วย ACN เนื่องจาก ACN เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่ละลายน้ำ ในขณะที่ EtOAc เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่ละลายน้ำและไม่มีขี้มากกว่า ACN ส่วน CAPs เป็นสารที่ละลายน้ำได้น้อยมาก จึงละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขี้ได้ดีกว่า ดังนั้นการสกัด CAPs จากซอสพริกด้วย EtOAc จึงให้ประสิทธิภาพที่ดีกว่า และการเติมเกลือช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดเนื่องจากผลของ salting-out effect และช่วยแยกชั้นน้ำออกจากตัวทำละลายอินทรีย์ได้ดีขึ้น

ในการศึกษาหาปริมาณเกลือที่เหมาะสมสำหรับการสกัดตัวอย่างซอส โดยใช้ซอสเตรียมที่มี CAPs 100 ppm และซอสพริกจริง S1-h45 เป็นตัวอย่างทดสอบ พบว่าปริมาณของเกลือที่เติมลงไป 0.5 เท่าของน้ำหนักสารตัวอย่าง (เติม anhydrous MgSO_4 1.0 กรัม และ NaCl 0.25 กรัม) ก็เพียงพอสำหรับการสกัดตัวอย่างซอส 2.5 กรัม และได้ทำการสกัดซอสพริกจริงซ้ำ 2 ครั้งเทียบกับการสกัด 1 ครั้ง พบว่าการสกัดซ้ำ 2 ครั้ง ด้วย EtOAc แบบเติมเกลือ (0.5 เท่าของน้ำหนักซอสพริกจริง) ได้ปริมาณ CAPs เพิ่มขึ้นเล็กน้อยเท่านั้น (เพิ่มน้อยกว่า 4 % สำหรับตัวอย่างซอสพริก S1-h45 และ เพิ่มน้อยกว่า 2 % สำหรับ ตัวอย่างซอสพริก S13-x30) ดังนั้นจึงไม่จำเป็นต้องสกัดซ้ำ 2 ครั้งเพื่อความสะอาดและประหยัดเวลา

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

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

จากการประยุกต์เทคนิค MEKC สำหรับปริมาณวิเคราะห์ของ CAPs ในซอสพริกจริงตัวอย่าง โดยเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น พบว่ามีปริมาณ CAPs ในช่วง 13 ถึง 262 ppm โดยที่ 7 ตัวอย่างมีปริมาณ CAPs มากกว่า 50 ppm ซึ่งเกินปริมาณจำกัด นอกจากนี้ปริมาณ CAPs ที่วิเคราะห์ได้จากต่างยี่ห้อกันไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณพริกที่ระบุไว้ในซอสพริก และระดับความเผ็ดที่ระบุไว้ ดังนั้น MEKC และวิธีการเตรียมตัวอย่างที่พัฒนาขึ้นนี้ จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของการวิเคราะห์ปริมาณ CAPs ในซอสพริก เพื่อควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์และเป็นข้อมูลความปลอดภัยของผู้บริโภคได้