รายงานฉบับสมบูรณ์ ปีที่ 2

งบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2550

# โครงการวิจัย
# การคัดสายพันธุ์พริกและงาเพื่อการประยุกต์ด้านอุตสาหกรรมอาหารและอาหารเสริม


คณะผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรินทร ชวศิริ

รองศาสตราจารย์ ดร.สันติ ทิพยางค์

รองศาสตราจารย์ ดร.ธรรมนูญ หนูจักร

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรีชา ภูวไพรศิริศาล

อาจารย์ ดร.พัฒทรา สวัสดี

อาจารย์ ดร.ลักษณา ดูบาส



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# รายงานฉบับสมบูรณ์ ปีที่ 2

**ที่ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย** งบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2550

**โครงการวิจัยเรื่อง**(ภาษาไทย) การคัดสายพันธุ์พริกและงาเพื่อการประยุกต์ด้านอุตสาหกรรมอาหารและอาหารเสริม

(ภาษาอังกฤษ) Chilli and sesamin variety selection for the applications in food industry and food supplements

**ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปี** 2550 **จำนวนเงิน** 1,160,000 บาท

**ระยะเวลาการทำวิจัย** 1 ปี (โครงการ 4 ปี) **เริ่มทำการวิจัย** 1 ตุลาคม 2550 **ถึง** 30 กันยายน 2551

**รายนามคณะผู้วิจัย พร้อมทั้งหน่วยงานที่สังกัดและหมายเลขโทรศัพท์**


(1) ที่ปรึกษา ศาสตราจารย์ ดร.อุดม ภักผล

(2) หัวหน้าโครงการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรินทร ชวศิริ

(3) นักวิจัย รองศาสตราจารย์ ดร.สันติ ทิพยางค์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธรรมนูญ หนูจักร

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรีชา ภูวไพรศิริศาล

อาจารย์ ดร.พัฒทรา สวัสดี

อาจารย์ ดร.ลักษณา ดูบาส

หน่วยงานที่สังกัด หน่วยวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ 02-2187625 โทรสาร 02-2541309, 02-2187598

e-mail : warintho@yahoo.com


(ลงชื่อ).....หัวหน้าโครงการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรินทร ชวศิริ)

๑ / ธ.ค. / ๒๕๕๒


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**รายละเอียดเกี่ยวกั ผลงานความก้าวหน้าของการวิจัย(แนบท้าย) มีดังนี้**

**1. วัตถุประสงค์ของโครงการ**

1. เพื่อสกัด แยกสารสำคัญจากพริกและงา เพื่อใช้เป็นสารมาตรฐาน
2. เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญในสิ่งสกัดของพริกและงาสายพันธุ์ต่างๆ
3. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารสำคัญกับสายพันธุ์พริกและงา
4. เพื่อเปรียบเทียบวิธีการสกัดและตรวจสอบคุณภาพของสิ่งสกัดที่ได้
5. เพื่อศึกษาแนวทางการใช้ประโยชน์ของสารสำคัญหรือสิ่งสกัดในอุตสาหกรรมอาหารและอาหารเสริม

**2. ตารางเปรียบเทียบระหว่างแผนงานวิจัยตามที่เสนอไว้ในโครงการกับงานวิจัยที่ได้ดำเนินการไปแล้ว**

| กิจกรรม/ขั้นตอนการดำเนินงาน | ปีที่ 2 | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| 1. การสกัดและแยกสารสำคัญจากพริกและงา | ◄·····► | | | | | | | | | | | |
| | ◄——► | | | | | | | | | | | |
| 2. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารสำคัญกับสายพันธุ์พริกและงา | | | | ◄·····► | | | | | | | | |
| | | | | ◄——► | | | | | | | | |
| 3. การศึกษาการใช้ประโยชน์อย่างเต็มศักยภาพจากพริกและงา | | | | | | | | | | ◄·····► | | |
| | | | | | | | | | | | ◄——► | |
| 4. ศึกษาแนวทางประยุกต์สารสำคัญและ/หรือสิ่งสกัดที่ได้จากพริกและงาในอุตสาหกรรมอาหาร | | | | | | | | | | | ◄·····► | |
| | | | | | | | | | | | | ◄——► |
| 5. สรุปผลและเขียนรายงาน | | | | | | | | | | | | ◄·····► |
| | | | | | | | | | | | | ◄——► |

◄·····► แผนงานวิจัยตามที่เสนอไว้ในโครงการ

◄——► แผนงานวิจัยที่ได้ดำเนินการแล้ว

**3. รายละเอียดผลงานวิจัยที่ได้ดำเนินการไปแล้ว**

**บทนำ**

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมและมีแนวนโยบายจะพัฒนาประเทศให้เป็นครัวของโลก งาและพริกจัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญมากขึ้นทุกปี เนื่องจากความต้องการเมล็ดงาและพริกทั้งในและต่างประเทศมีสูงขึ้นเรื่อยๆ ในประเทศไทย มีพื้นที่ปลูกพริกเฉลี่ย 383,000 ไร่ มีผลผลิตประมาณ 420,000 ตัน ผลผลิตส่วนใหญ่ใช้ในการบริโภคในประเทศ และยังคงมีความจำเป็นในการนำเข้าพริก (แห้ง) เพื่อใช้ในงานด้านอุตสาหกรรมอาหารและอาหารเสริม ประมาณปีละ 3,000-5,000 ตัน มูลค่าประมาณ 100 ล้านบาท และมีแนวโน้มของความต้องการเพิ่มมากขึ้นตามการเติบโตของอุตสาหกรรมอาหารในประเทศที่ต้องการพริกเป็นส่วนประกอบ เช่น อาหารกระป๋อง น้ำพริก เป็นต้น หรือนำไปใช้ผลิตเป็นอาหารเสริม เช่น ผลิตภัณฑ์ที่มี capsaisin หรือสารสกัดจากพริกเป็นองค์ประกอบมีรายงานว่าช่วยลดการสะสมของไขมัน โดยการเพิ่มระดับเอนไซม์ในตับ ช่วยเร่งกระบวนการเมทาโบลิซึมในร่างกาย และสามารถใช้ในการควบคุมน้ำหนัก เป็นต้น สารสำคัญอีกอย่างที่มีอยู่ในพริกและมีประโยชน์อย่างมากต่อสุขภาพคือ แคโรทีนอยด์ โดยพริกมีเบต้าแคโรทีนมากกว่าแอลฟาแคโรทีน ซึ่งสารเบต้าแคโรทีนมีประโยชน์ต่อร่างกายมากเพราะเมื่อถูกย่อยในลำไส้เล็ก

จะกลายเป็นเรทินอะ ซึ่งเป็นรูปแบบหนึ่งของวิตามินเอ และจะถูกเก็บสะสมไว้ในตับเพื่อนำไปใช้ในคราวจำเป็น สารเบต้าแคโรทีนเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและช่วยเสริมสร้างภูมิคุ้มกันและช่วยให้ระบบสืบพันธุ์ทำงานได้ดี ในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ได้วิจัยเกี่ยวกับการรับประทานแคโรทีนอยด์สังเคราะห์ในรูปแบบยาเม็ดอาหารเสริม ซึ่งได้รับความนิยมในหมู่คนรักสุขภาพเป็นจำนวนมาก

เบต้าแคโรทีน

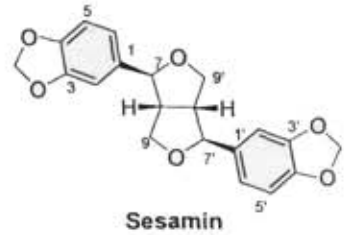
งาเป็นพืชล้มลุกในวงศ์ Pedaliaceae มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Sesamum indicum* มีรายงานว่าในประเทศไทยมีพื้นที่เพาะปลูกงาประมาณ 270,000 - 385,000 ไร่ ส่วนใหญ่อยู่ทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ประเทศไทยสามารถผลิตงาได้ปีละ 35,000 ตัน โดยบริโภคภายในประเทศร้อยละ 45 ส่งออกไปต่างประเทศต่างๆ เช่น ไต้หวัน ญี่ปุ่น สิงคโปร์ มาเลเซียและออสเตรเลีย ร้อยละ 55 สามารถทำรายได้เข้าประเทศปีละประมาณ 400 – 500 ล้านบาท ในขณะที่ตลาดโลกโดยเฉพาะอย่างยิ่งยุโรปและอเมริกายังมีความต้องการงาอีกมาก

การใช้ประโยชน์ของงาในอุตสาหกรรมอาหารในประเทศ เช่น อุตสาหกรรมเครื่องดื่มหรืออาหารที่มีการผสมงาโดยตรงในอาหารเสริม เนื่องจากในน้ำมันงามีกรดไขมันที่สำคัญต่อร่างกาย อีกทั้งมีสารต้านอนุมูลอิสระ ช่วยชะลอความแก่ ป้องกันการเกิดความดันโลหิตสูง อาการสมองเสื่อม แก้ปวดข้อ กระดูก กล้ามเนื้อ แก้การเกิดไมแกรน เป็นต้น เมล็ดงามีไขมันประมาณ 35 – 57% โปรตีน 19 – 25% และกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกาย 2 ชนิด คือ methionine และ tryptophan ซึ่งพบได้น้อยในพืชชนิดอื่น นอกจากนี้เมล็ดงามีลักษณะเด่นกว่าพืชชนิดอื่น คือ มีสารในกลุ่ม lignan ได้แก่ sesamin และ sesamolin ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักและมีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้ยังมีสารในกลุ่มเดียวกันอีกหลายชนิด เช่น sesamol, sesamolinol และ pinoresinol นอกจากนี้ยังพบว่า sesamin และ sesamolin มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่สำคัญหลายอย่าง เช่น ลดความเป็นพิษของสารเคมีที่มีผลต่อตับ สมบัติ antioxidative stress ในเซลล์สมอง ลดความดันโลหิตสูง ลดอาการบวมอักเสบและโรคภูมิแพ้ ปัจจุบันมีการนำงาใช้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารหลายชนิด เช่น ผลิตภัณฑ์ลดไขมันภายใต้ชื่อการค้า "Sesa thin" ซึ่ง sesamin จะช่วยกระตุ้นการเผาผลาญไขมันได้ดีและผลิตภัณฑ์เสริมบำรุงผิว โดยนำมาผสมกับ royal jelly หรือ evening primrose และจำหน่ายเป็นผลิตภัณฑ์ภายใต้เครื่องหมายการค้า "BRAND's"

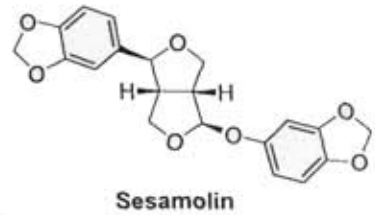
งาที่ปลูกในประเทศไทยมี 3 ชนิด คือ งาขาว งาดำ และงาแดง ในแต่ละชนิดมีอยู่หลายสายพันธุ์ อีกทั้งมีสาร lignan ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ในปริมาณที่ต่างกัน ปัจจุบันมีงาทั้งหมด 4 สายพันธุ์หลักที่สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ส่งเสริมให้เกษตรกรปลูก ได้แก่ งาขาวพันธุ์อุบลราชธานี 2 งาดำพันธุ์อุบลราชธานี 3 งาดำพันธุ์นครสวรรค์ และงาแดงพันธุ์อุบลราชธานี 1 งาทั้ง 4 สายพันธุ์นี้ให้ผลผลิตสูง ปลูกง่าย และทนต่อสภาพแวดล้อม โดยเฉพาะภาวะฝนแล้งได้ดี

*Sesamum indicum*

Sesame oil



Sesamin



Sesamolin

อย่างไรก็ดี อุปสรรคสำคัญของการส่งออกน้ำมันงาหรือการควบคุมคุณภาพพริกเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและอาหารเสริม คือความแปรปรวนของสารสำคัญที่มีอยู่ในพืช ซึ่งผลกระทบส่วนใหญ่นี้มาจากสายพันธุ์ที่ต่างชนิดกัน นอกจากนั้นอาจเกี่ยวข้องกับวิธีขั้นตอนการเก็บเกี่ยว กระบวนการสกัด วิธีและขั้นตอนในการเก็บรักษา การควบคุมคุณภาพน้ำมันงาและพริก เป็นต้น

จากการศึกษาเอกสารอ้างอิง พบว่าในประเทศไทยยังไม่มีการศึกษาวิจัยอย่างเป็นระบบสำหรับการคัดเลือกสายพันธุ์พริกและงาที่ให้ปริมาณสารสำคัญมากที่สุด รวมถึงวิธีการสกัดเพื่อให้ได้ปริมาณสารสำคัญที่มากที่สุดและยังคงรักษาคุณภาพของของสารสกัดที่ได้ การประกันคุณภาพโดยการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในพริกและงา เป็นวิธีการหนึ่งในการส่งเสริมให้ประเทศมีแนวทางการพัฒนาประเทศด้านการเกษตรที่ยั่งยืน โครงงานวิจัยนี้จึงมุ่งเพื่อที่จะสกัดและแยกสารสำคัญจากพริกและงา เพื่อใช้เป็นสารมาตรฐาน โดยศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารสำคัญกับสายพันธุ์พริกและงา ซึ่งวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในสิ่งสกัดของพริกและงาสายพันธุ์ต่างๆ โดยใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟฟี และศึกษาแนวทางการใช้ประโยชน์ของสารสำคัญหรือสิ่งสกัดในอุตสาหกรรมอาหารและอาหารเสริม โดยข้อมูลที่ได้จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้จะสามารถนำไปแนะนำและส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกพริกและงาด้วยสายพันธุ์ที่ให้ปริมาณสารสำคัญเป็นไปตามความต้องการ และสามารถแนะนำอุตสาหกรรมเกี่ยวกับกระบวนการสกัดเพื่อให้รักษาคุณภาพที่ดีที่สุดจากพริกและงาไว้

**งานวิจัยในปีงบประมาณ 2551**

**ส่วนที่ 1 การสกัดสารสำคัญจากพริก**

ในปีนี้ผู้วิจัยได้ศึกษาวิธีการสกัดแยก capsaicinoid เพื่อใช้เป็นสารมาตรฐานเพื่อลดการนำเข้าสารมาตรฐานจากต่างประเทศซึ่งมีราคาค่อนข้างสูง และพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีการสกัดด้วย solvent extraction และวิธีวิเคราะห์ HPLC ตลอดจนศึกษาการสกัดแคโรทีนอยด์ และตรวจสอบปริมาณแคโรทีนอยด์รวม (total carotenoid) ในพริกสายพันธุ์ต่างๆ เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในแง่มุมต่างๆ ซึ่งนับว่าเป็นการศึกษาเพื่อใช้ประโยชน์อย่างเต็มศักยภาพของพริก

สารสำคัญที่ให้ความเผ็ดในพริกคือ capsaicin จากการศึกษาเมื่อปีที่ผ่านมา ผู้วิจัยสามารถหาภาวะ HPLC ที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ capsaicinoid ที่ให้ค่า *resolution* มากกว่า 1 และพบว่าในการวิเคราะห์ *linearity range* ของสารละลายมาตรฐานแคพไซซินที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 29 ถึง 1313 ppm และสารละลายมาตรฐานไดไฮโดรแคพไซซินที่ความเข้มข้น 15 ถึง 707 ppm ให้ค่า linear correlation มากกว่า 0.9900 และคณะผู้วิจัยได้ทดลองวิเคราะห์ปริมาณ capsaicin จากสิ่งสกัดพริกและเปรียบเทียบปริมาณ capsaicin จากสิ่งสกัดพริกขี้หนู พริกชี้ฟ้า จากแหล่งต่างๆ พบว่า

ได้ผลระดับหนึ่ง อย่างไรก็ตามการพิสูจน์วิธีวิเคราะห์ยังประสบปัญหาเนื่องจากไม่สามารถหาสารตัวอย่างที่ปราศจากสารกลุ่ม capsaicinoid ได้ และไม่มีสารมาตรฐานจำหน่าย

**การทดลอง**

**1. การสกัดสารสำคัญจากพริก**

**1.1 การสกัด capsaicinoid บริสุทธิ์จากพริกเพื่อนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์**

1.1.1 การศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด capsaicinoid จากพริก

ในการสกัด capsaicinoid จากพริกด้วยตัวทำละลาย ได้เลือกตัวทำละลายที่ไม่อันตรายและมีราคาถูก เอทานอลและแอซิโทนจึงเป็นตัวทำละลายที่นิยมใช้มาก ในงานวิจัยนี้จึงลองใช้ส่วนผสมของตัวทำละลายทั้งสองชนิดเปรียบเทียบกับใช้ตัวทำละลายเพียงชนิดเดียว

1. ชั่งพริกที่ปั่นละเอียดและอบแห้งแล้ว 45.5030 กรัม แช่ในเอทานอล 250 มิลลิลิตร เป็นเวลา 12 ชั่วโมง
2. กรองและปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร และวิเคราะห์ปริมาณแคพไซซินและดีไฮโดรแคปไซซินด้วย HPLC
3. ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1-2 แต่เปลี่ยนตัวทำละลายเป็นเอทานอลผสมแอซิโทนในอัตราส่วน 1:1 และใช้แอซิโทนเป็นตัวทำละลายแทนเอทานอล ตามลำดับ
4. ตัวทำละลายแต่ละชนิดจะทำการทดลอง 2 ครั้ง เพื่อหาค่าเฉลี่ยของปริมาณแคพไซซินและดีไฮโดรแคพไซซิน

1.1.2 การศึกษาการใช้น้ำมันพืชเป็นตัวทำละลาย [3]

1. ชั่งพริกที่ปั่นละเอียดและอบแห้งแล้ว 20.23 กรัม และเติมน้ำมันรำข้าวคิง 200 มิลลิลิตร
2. สกัดด้วย Sonicator ที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 20 นาที แล้วกรอง
3. นำน้ำมันที่ได้ไปสกัดด้วยเอทานอลหลายๆ ครั้ง จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 250 มิลลิลิตร และวิเคราะห์ปริมาณแคปไซซินด้วย HPLC (**สารตัวอย่าง C001**)
4. นำกากพริกที่ได้จากการกรองในขั้น 2 มาสกัดต่อด้วยเอทานอล โดยรีฟลักซ์เป็นเวลา 5 ชั่วโมง กรอง และปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร และวิเคราะห์ปริมาณแคปไซซินด้วย HPLC ต่อไป (**สารตัวอย่าง C002**)
5. เปรียบเทียบปริมาณแคปไซซินจากข้อ 3 และ 4 กับพริกที่ปั่นละเอียดและอบแห้งแล้ว 20.23 กรัม เช่นเดียวกัน แต่สกัดด้วยเอทานอล โดยการรีฟลักซ์เป็นเวลา 5 ชั่วโมง (**control**)

1.1.3 การศึกษาวิธีการสกัดโดยใช้การปรับ pH ของตัวสกัด [4-5]

1. สกัดพริกแห้งที่บดละเอียด 45.5030 กรัม ด้วยเอทานอล ได้สิ่งสกัด (oleoresin) น้ำหนัก 3.6665 กรัม
2. เติม 4% NaOH ประมาณ 4-5 เท่าของปริมาตร oleoresin
3. กวนสารละลายผสมเป็นเวลา 12 ชั่วโมง
4. ปรับ pH ~ 8 ด้วย กรด HCl เข้มข้น
5. สกัดด้วย diethyl ether ประมาณ 2-3 ครั้ง เก็บชั้นน้ำ
6. เก็บชั้น organic phase ระเหยด้วยเครื่องหมุนสุญญากาศ เติม 5% $Na_2CO_3$ จนหมดฟอง เก็บชั้นน้ำ
7. นำชั้นน้ำมาเติมกรด HCl เข้มข้น จน pH ~ 7 นำชั้นน้ำไปตรวจสอบปริมาณแคปไซซิน ด้วย HPLC
8. เติมสารละลาย $AgNO_3$ ความเข้มข้นประมาณ 5-6 เท่า ของปริมาณแคพไซซิน ที่มีอยู่ pH ~ 7.5, 19°C, กวนสารละลายตลอดเวลา ประมาณ 5 ชั่วโมง
9. แยกเก็บชั้นน้ำ สกัดด้วย hexane ปริมาตรใกล้เคียงกับชั้นน้ำที่ได้
10. แยกเก็บชั้นน้ำ ทำการสกัดด้วย dichloromethane 2 ครั้ง แล้วรวมชั้น dichloromethane

11. นำชั้น di hloromethane มาเติม 1 N HCl สกัด ทำซ้ำ 3 ครั้ง แยกเก็บชั้น dichloromethane
12. นำชั้น dichloromethane มาเติมสารละลายอิ่มตัว NaCl แยกเก็บชั้น dichloromethane
13. ระเหย dichloromethane ออก แล้วตกผลึกซ้ำ
14. ล้างผลึกด้วย ethyl acetate

## 1.2 การพิสูจน์วิธีการสกัดและการวิเคราะห์

1.2.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

1. การเตรียมสารละลาย stock standard solution

ชั่งสารมาตรฐาน (capsaicin และ dihydrocapsaicin) น้ำหนัก 0.0100 กรัม ละลายและปรับปริมาตรให้เป็น 5 mL ด้วยเอทานอล จะได้สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 2000 ppm โดยมีความเข้มข้นของ capsaicin 1300 ppm และ dihydrocapsaicin 700 ppm

2. การเตรียมสารละลายมาตรฐานแคพไซซินและไดไฮโดรแคพไซซินเพื่อเตรียม calibration curve

**ตารางที่ 1** รายละเอียดการเตรียมสารละลายมาตรฐานแคพไซซินและไดไฮโดรแคพไซซิน

| หมายเลข | ปริมาตรสารละลายมาตรฐาน 2000 ppm (mL) | ปริมาตร ethanol (mL) | ปริมาตรรวม (mL) | ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐาน | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | แคพไซซิน(ppm) | ไดไฮโดรแคพไซซิน (ppm) |
| 1 | 0.05 | 9.95 | 10.00 | 13 | 7 |
| 2 | 0.10 | 9.90 | 10.00 | 26 | 14 |
| 3 | 0.25 | 9.75 | 10.00 | 65 | 35 |
| 4 | 0.50 | 9.50 | 10.00 | 130 | 70 |
| 5 | 1.00 | 9.00 | 10.00 | 260 | 140 |
| 6 | 2.00 | 8.00 | 10.00 | 520 | 280 |

1.2.2 ภาวะของการวิเคราะห์ capsaicinoid โดยใช้เทคนิค HPLC

จากปีที่ 1 ภาวะการทดลองที่ใช้ในการวิเคราะห์ LC มีดังต่อไปนี้

- เฟสเคลื่อนที่ ได้แก่ Aectonitrile/1% HOAc ในอัตราส่วน 42/58
- ความยาวคลื่นที่ใช้ในการตรวดวัด 280 nm
- อุณหภูมิของคอลัมน์ 25 °C
- flowrate 1 mL/min

1.2.3 การศึกษา calibration curve

ฉีดสารละลายมาตรฐานแคพไซซินความเข้มข้น 13, 26, 65, 130, 260, 520 ppm และสารละลายมาตรฐานไดไฮโดรแคพไซซินความเข้มข้น 7, 14, 35, 70, 140, 280 ซึ่งเตรียมดังรายละเอียดในหัวข้อ 1.2 โดยฉีดซ้ำเป็นจำนวน 3 ครั้ง

ค่า slope, intercept, correlation coefficients, ของ calibration curve ดังแสดงในตารางที่ 3

1.2.4 การสกัด capsaicinoid ด้วยวิธี solvent extraction

1. ชั่งพริกบดน้ำหนัก 1.25-2.5 กรัม

2. reflux เป็นเวลา 5 ชั่วโมง โดยใช้เอธานอลเป็นตัวทำละลาย
3. กรองและชะสารละลายทั้งหมดออกจากขวดก้นกลมด้วยเอทานอล กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1
4. ระเหยเอทานอลออกให้เหลือปริมาตรสารละลายตัวอย่างประมาณ 5 mL
5. ปรับปริมาตรสารละลายตัวอย่างให้มีปริมาตร 25 mL ด้วยสารละลาย mobile phase (aectonitrile/water: 42/58)
6. กรองสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวิเคาะรห์ ด้วย filter membrane (PTFE) ก่อนทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

1.2.5 การศึกษา Matrix calibration curve

ในการศึกษา matrix calibration curve นั้นทำได้โดยการ spike สารละลายมาตรฐานลงในสารละลาย blank ซึ่งเตรียมได้ตามรายละเอียดการทดลองในหัวข้อที่ 4 โดยชั่งน้ำหนักพริกบด 2.500x g และใช้เอทานอล 20.00 mL ในการ reflux

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานที่มีแคพไซซินเข้มข้น 26, 65, 130, 260 และ 520 ppm และไดไฮโดรแคพไซซินความเข้มข้น 14, 35, 70, 140, 280 ppm
2. เตรียมสารละลายมาตรฐานความเข้มข้นดังตารางที่ 2 โดยใช้สารละลาย blank จากที่สกัดได้ข้างต้น 500 µL ผสมกับเอทานอลจนปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 mL เป็นตัวทำละลาย
3. นำสารละลายทั้งหมดในข้อ 1 และ 2 ไปวิเคราะห์ด้วย HPLC

**ตารางที่ 2** การเตรียม spiked sample (ปริมาตรรวมเท่ากับ 1 mL)

| vial no. | ความเข้มข้นของ spiked sample (ppm) | |
|---|---|---|
| | แคพไซซิน | ไดไฮโดรแคพไซซิน |
| 1 | 52 | 28 |
| 2 | 104 | 56 |
| 3 | 156 | 84 |
| 4 | 208 | 112 |
| 5 | 260 | 140 |

4. สร้าง calibration curve ของ spiked sample เปรียบเทียบกับ calibration curve ที่สร้างจากสารละลายมาตรฐานในข้อ 1 ผลของ matrix ถูกวิเคราะห์โดยใช้ two tailed paired t-test ที่ 95% confidence level calibration curve โดยทำการเปรียบเทียบ calibration curve ที่เตรียมจากสารมาตรฐานและสารละลายที่มี matrix

1.2.6 การศึกษาค่า accuracy และ precision ของวิธีสกัดด้วยเทคนิค solvent extraction และวิเคราะห์สาร capsaicin และ dihydrocapsaicin ด้วย HPLC

accuracy หรือค่าความเที่ยง คือค่าความแตกต่างระหว่างการเฉลี่ยของค่าความเข้มข้นที่วัดได้ และค่าความเข้มข้นที่เติมลงไปใน spiked sample โดยรายงานเป็นค่าเฉลี่ยของ recovery สำหรับค่า precision หรือความแม่น ซึ่งจะรายงานเป็น RSD ในการทดลองนี้การวัด accuracy และ precision นั้นทำโดยการสกัดสารตัวอย่างพริกที่เติม (spike) สารมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นลงไปด้วยเทคนิค solvent extraction แล้วทำการวิเคราะห์สารที่สกัดแล้วด้วยเทคนิค HPLC โดยการเตรียม spiked sample นั้นดังแสดงในรายละเอียดข้างล่างนี้

1. การเตรียม spiked sample

ทำการอบพริกบดที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทิ้งให้เย็น แล้วเก็บไว้ใน desiccator แล้ว ชั่งน้ำหนักพริกดังกล่าว 1.250X g ทำการเตรียมแคพไซซินที่ความเข้มข้น 2 ระดับ คือ 41.6 และ 83.2 ppm และไดไฮโดรแคพไซซินที่ความเข้มข้น 2 ระดับ คือ 22.4 และ 44.8 ppm โดย 1 ชุดการทดลองมีทั้งสิ้น 10 ตัวอย่าง

**1.3 การวัดปริมาณของ total carotenoids ในพริกสายพันธุ์ต่าง ๆ**

1. ชั่งตัวอย่างพริกแห้งที่บดละเอียด 5 กรัม มาสกัดด้วย acetone เย็นปริมาตร 50 มิลลิลิตร จนกระทั่งได้สารสกัดใสไม่มีสี
2. นำสารสกัดที่ได้มาสกัดแยกส่วนด้วย diethyl ether และสารละลาย NaCl 10% จะได้ส่วนที่มีสีอยู่ในชั้นของ diethyl ether
3. ระเหยแห้งส่วนของ diethyl ether ด้วย rotary evaporator จนเหลือปริมาณอยู่ประมาณ 1 มิลลิลิตร
4. แล้วนำไปทำปฏิกิริยา saponification กับสารละลาย KOH ใน methanol (20%) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
5. และนำมาสกัดแยกส่วนด้วย diethyl ether และสารละลาย NaCl 50% จะได้ส่วนของ total carotenoids อยู่ในชั้นของ diethyl ether
6. นำส่วนสกัดนั้นกรองผ่าน sodiumsulphate anhydrous เพื่อดูดน้ำออก แล้วนำไประเหยแห้งด้วย rotary evaporator จากนั้นชั่งน้ำหนักของ total carotenoids ที่ได้
7. วัดปริมาณ total carotenoids ด้วย spectrophotometry ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร โดยมี ß-carotene เป็นสารมาตรฐาน

## ผลการทดลองและอภิปรายผล

**1. การสกัด capsaicinoid บริสุทธิ์จากพริกเพื่อนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์**

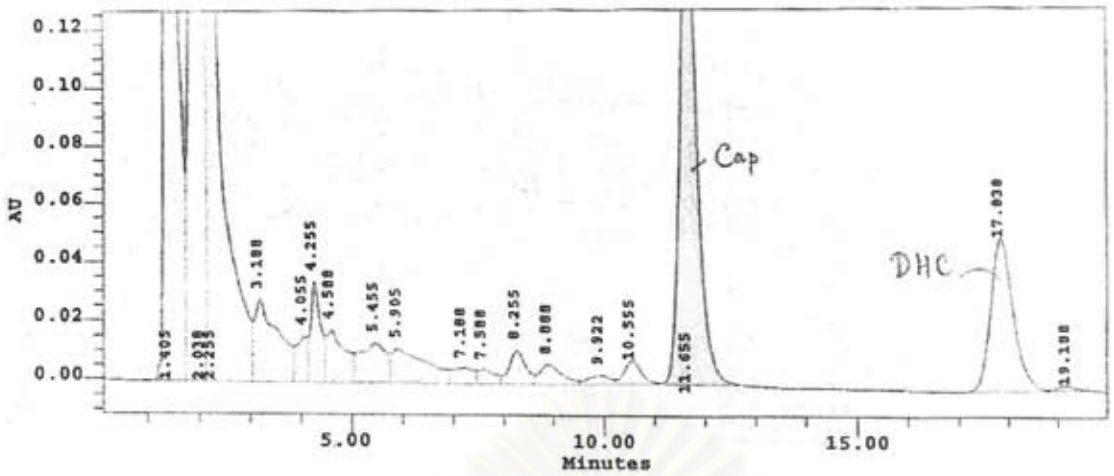
1. <u>การศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด capsaicinoid จากพริก</u>

จากการศึกษาทราบว่า เอทานอลเป็นตัวทำละลายที่สามารถสกัดแคปไซซินและดีไฮโดรแคปไซซินจากพริกได้ดีกว่าแอซิโทนและดีกว่าการใช้ตัวทำละลายผสม ดังนั้นในการสกัดพริกจะใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายสำหรับการสกัด ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3 และรูปที่ 2

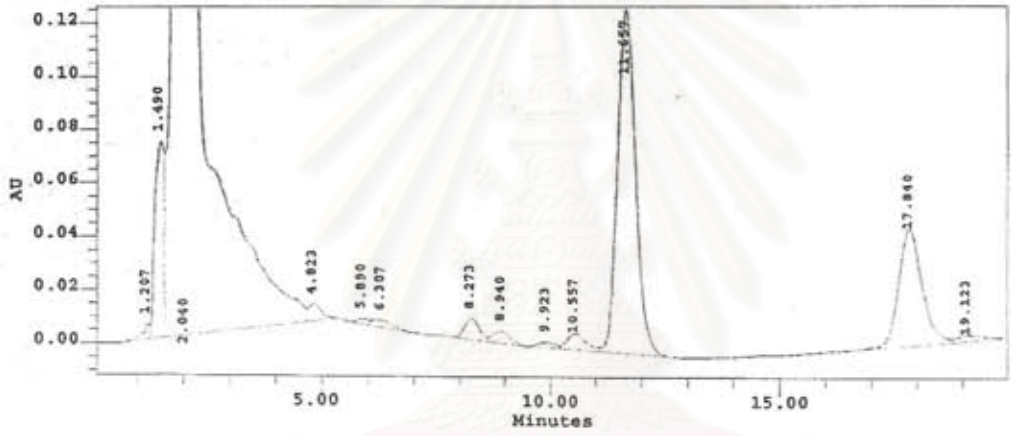
**ตารางที่ 3** ปริมาณแคพไซซินและไดไฮโดรแคพไซซินในการสกัดด้วยตัวทำละลายที่ต่างกัน

| ตัวทำละลายที่ใช้สกัด | ปริมาณแคพไซซิน* | ปริมาณไดไฮโดรแคพไซซิน* | ปริมาณรวม* |
|---|---|---|---|
| เอทานอล | 4,542.8 | 1,690.5 | 6,233.3 |
| เอทานอล:แอซิโทน = 1:1 | 4,037.1 | 1,624.3 | 5,661.4 |
| แอซิโทน | 3,972.1 | 1,581.4 | 5,553.5 |

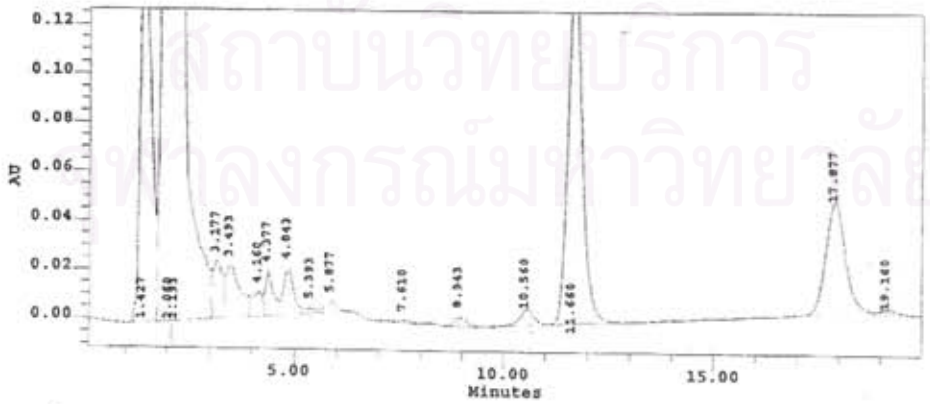
* หน่วยเป็นปริมาณสารต่อน้ำหนักพริกแห้ง




**รูปที่ 2** โครมาโทแกรมของปริมาณแคปไซซินและดีไฮโดรแคปไซซินจากพริกที่แช่ด้วยเอทานอล




**รูปที่ 3** โครมาโทแกรมของปริมาณแคปไซซินและดีไฮโดรแคปไซซินจากพริกที่แช่ด้วยเอทานอล:แอซิโทน 1:1




**รูปที่ 4** โครมาโทแกรมของปริมาณแคปไซซินและดีไฮโดรแคปไซซินจากพริกที่แช่แอซิโทน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. <u>การศึกษาการใช้น้ำมันพืชเป็นตัวทำละลาย</u>

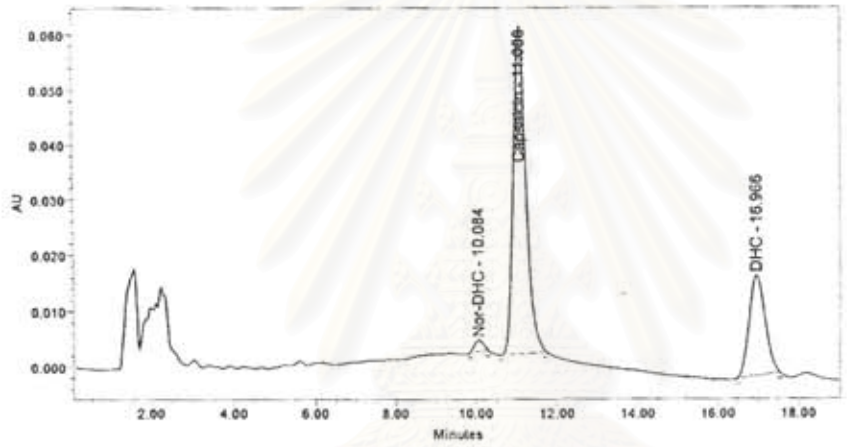
ปริมาณแคพไซซินที่สามารถสกัดได้ดังแสดงในตารางที่ 4 และรูปที่ 5-7

**ตารางที่ 4** ปริมาณแคพไซซินที่สกัด

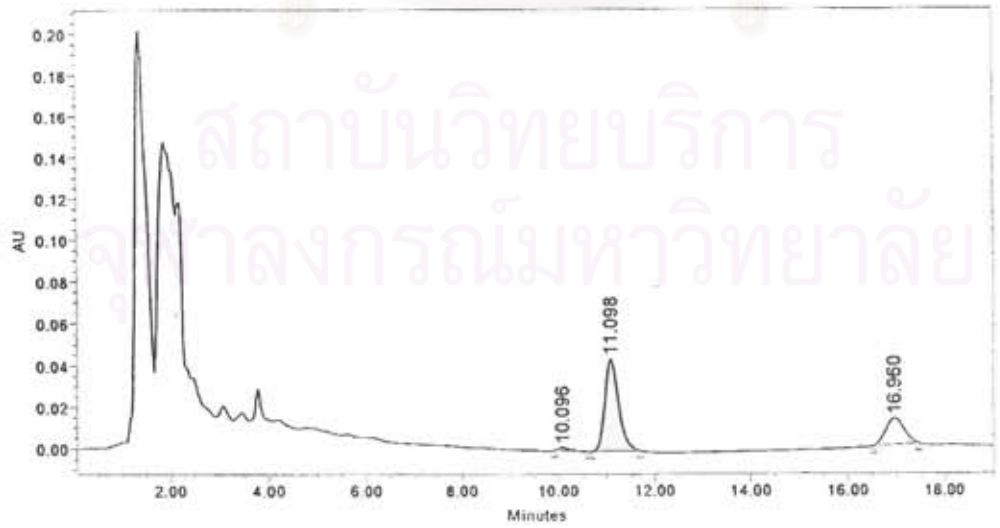
| สารตัวอย่าง | ปริมาณแคพไซซิน* |
|---|---|
| C001 | 1,571.0 |
| C002 | 922.4 |
| control | 3,385.5 |

* หน่วยเป็นปริมาณสารต่อน้ำหนักพริกแห้ง

จากผลการทดลอง C001 คือ น้ำมันที่ได้จากการสกัดพริก พบว่ามีปริมาณแคพไซซินอยู่ แต่ไม่มากเท่ากับการสกัดด้วยเอทานอล (control) นอกจากนี้ส่วนที่ได้จากการสกัดกากพริกที่เหลือจากการสกัดครั้งแรก ซึ่งพบว่ายังมีแคพไซซินอยู่ (C002)

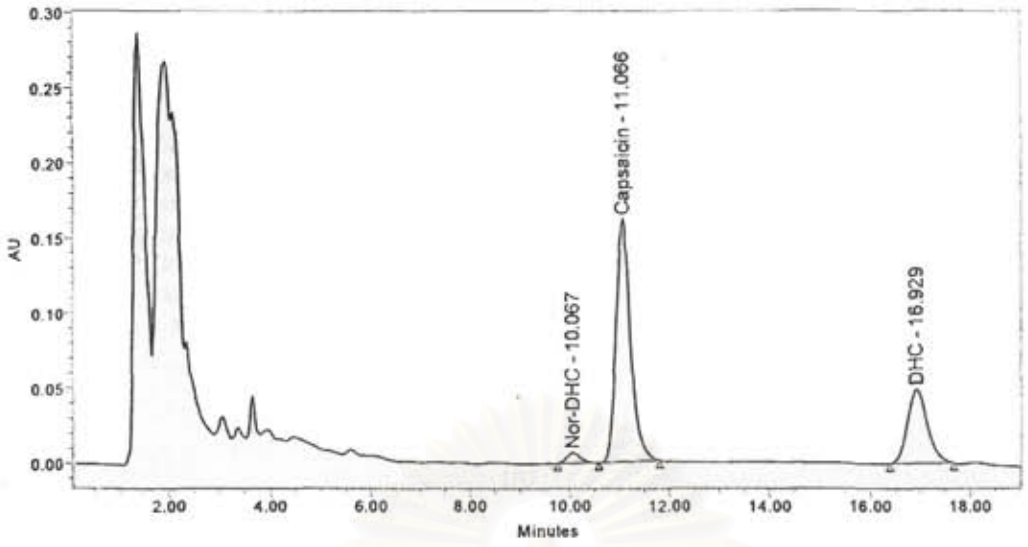



**รูปที่ 5** โครมาโทแกรมของปริมาณแคปไซซินและดีไฮโดรแคปไซซินของสารตัวอย่าง C001




**รูปที่ 6** โครมาโทแกรมของปริมาณแคปไซซินและดีไฮโดรแคปไซซินของสารตัวอย่าง C002

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย




**รูปที่ 7** โครมาโทแกรมของปริมาณแคปไซซินและดีไฮโดรแคปไซซินของ control

3. การศึกษาวิธีการสกัดโดยใช้การปรับ pH ของตัวสกัด

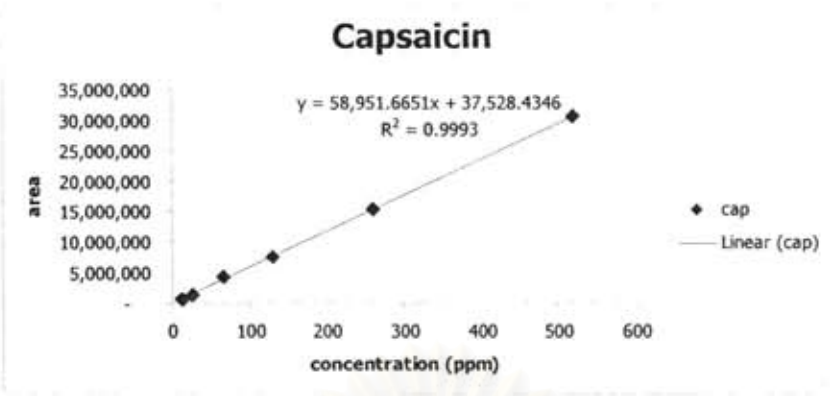
ได้ผลึกสีขาว ซึ่งผลผลิตค่อนข้างต่ำ และเมื่อละลายผลึกสีขาวที่ได้ด้วยคลอโรฟอร์มและเมทานอล พบว่าไม่ละลาย จึงคาดว่าสารที่ได้ไม่ใช่แคพไซซิน วิธีการสกัดข้างต้น ค่อนข้างซับซ้อน และไม่ได้สารแคปไซซินตามที่ต้องการ ดังนั้น ควรหาการสกัดและแยกใหม่ที่ง่ายขึ้น และได้ผลผลิตที่ดีกว่า

2. การวิเคราะห์ปริมาณ capsaicinoid ในพริกสายพันธุ์ต่าง ๆ

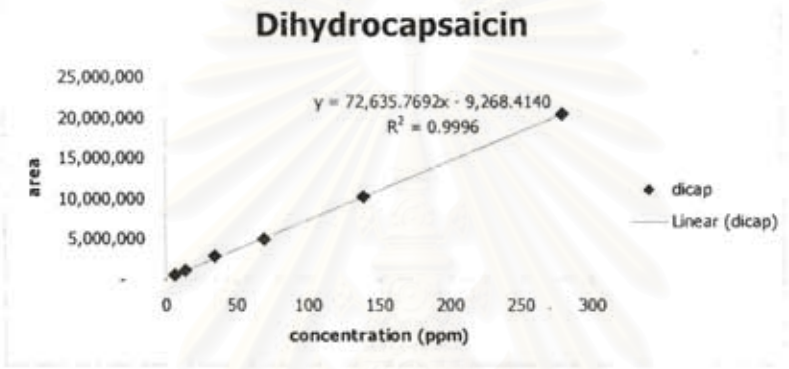
1. การศึกษา calibration curve

calibration curve ที่เตรียมได้ของแคพไซซินที่ความเข้มข้นตั้งแต่ระดับ 13 ถึง 520 ppm และไดไฮโดรแคพไซซินที่ความเข้มข้นตั้งแต่ระดับ 7 ถึง 280 ppm พบว่าให้ค่า correlation coefficients ($R^2$) 0.9993 และ 0.9996 ตามลำดับ (n=6) ดังแสดงในกราฟที่ 1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย




(ก)




(ข)

**กราฟที่ 1** calibration curve ของ (ก) แคพไซซินและไดไฮโดรแคพไซซิน (ข)

2. การศึกษาผลของ matrix ต่อการวิเคราะห์

ในการวิเคราะห์จำเป็นต้องศึกษาถึงผลของ matrix ต่อการวิเคราะห์โดยเฉพาะในการวิเคราะห์ตัวอย่างในอาหาร ทางคณะผู้วิจัย matrix calibration curve ของแคพไซซินและไดไฮโดรแคพไซซินเพื่อตรวจสอบผลดังกล่าว จากการศึกษาโดยใช้ pair t-test ที่ความเชื่อมั่น 95% พบว่า matrix ไม่มีผลต่อการวิเคราะห์แคพไซซิน แต่มีผลต่อการวิเคราะห์ไดไฮโดรแคพไซซิน ซึ่งจะทำการตรวจสอบอีกครั้ง

3. การศึกษาค่า accuracy และ precision ของวิธีสกัดด้วยเทคนิค solvent extraction และวิเคราะห์สาร capsaicin และ dihydrocapsaicin ด้วย HPLC

ค่า accuracy และ precision ของวิธีการสกัดและวิเคราะห์สามารถหาได้จากค่า recovery และ % relative standard deviation (%RSD) ของ spiked sample ของเนื้อพริกที่บดแล้วในความเข้มข้น 2 ระดับ ดังแสดงในตารางที่ 1 และ 2 จากการทดลองพบว่าค่า recovery ของแคพไซซิน และไดไฮโดรแคพไซซิน มีค่าที่ยอมรับได้ตามที่ AOAC กำหนด (ที่ระดับ 10 ppm ค่า %recovery มีค่าอยู่ระหว่าง 80-110 และที่ 100 ppm มีค่าอยู่ระหว่าง 90-107) และค่า precision ของแคพไซซิน และไดไฮโดรแคพไซซิน มีค่าต่ำกว่าที่ AOAC กำหนด เช่นกัน คือที่ระดับ 10 ppm ค่า %RSD ต้องไม่มากกว่า 7.3 และที่ 100 ppm ต้องไม่มากกว่า 5.3 (ตารางที่ 5)

**ตารางที่ 5** % recovery และ precision ของแคพไซซินและไดไฮโดรแคพไซซิน

| สารประกอบ | แคพไซซิน | | ไดไฮโดรแคพไซซิน | |
|---|---|---|---|---|
| | 41.6 (ppm) | 83.2 (ppm) | 22.4 (ppm) | 44.8 (ppm) |
| % recovery | 98.23 | 97.36 | 99.15 | 94.23 |
| precision | 3.23 | 3.84 | 4.79 | 4.18 |

### 3.3 การวัดปริมาณของ total carotenoids ในพริกสายพันธุ์ต่าง ๆ

ตารางที่ 6 แสดงผลการหาปริมาณ total carotenoids ในพริกสายพันธุ์ต่างๆ

**ตารางที่ 6** ผลการวิเคราะห์ total carotenoid ที่สกัดได้จากสายพันธุ์พริกต่างๆ

| ตัวอย่างที่ | สายพันธุ์พริก | แหล่งที่ปลูก | % สิ่งสกัดที่ได้ |
|---|---|---|---|
| CH001 | พริกชี้ฟ้า พันธุ์แม่ปิง 90 (ทำซอสพริก) | แปลงเกษตรกร จ.สุโขทัย | 0.4 |
| CH002 | พริกขี้หนู แชมป์เปี้ยนฮอท | แปลงเกษตรกร อ.ชุมแสง จ.นครสวรรค์ | 0.8 |
| CH003 | พริกขี้หนู จินดา | แปลงเกษตรกร อ.ชุมแสง จ.นครสวรรค์ | 1.2 |
| CH004 | พริกขี้หนู บางลี่ | แปลงเกษตรกร อ.ชุมแสง จ.นครสวรรค์ | 2.4 |
| CH005 | พริกขี้หนู 0042/32 | แปลงเกษตรกร จ.พิจิตร | 1.8 |
| CH006 | พริกขี้หนู พจ.25-1-2-1 | แปลงเกษตรกร จ.พิจิตร | 1.0 |
| CH007 | พริกขี้หนู ซุปเปอร์ฮอท (ไม่คัดพันธุ์) | แปลงเกษตรกร จ.สุโขทัย | 1.6 |
| CH008 | พริกขี้หนู จินดา | แปลงเกษตรกร จ.สุโขทัย | 2.2 |
| CH009 | พริกขี้หนู ซุปเปอร์ฮอท (คัดพันธุ์) | แปลงเกษตรกร จ.สุโขทัย | 1.4 |
| CH010 | พริกขี้หนู 9955-15 | แปลงเกษตรกร จ.สุโขทัย | 0.2 |
| CH011 | พริกขี้หนู พจ.06 | แปลงเกษตรกร จ.พิจิตร | 0.8 |
| CH012 | พริกขี้หนู พจ.05 | แปลงเกษตรกร จ.พิจิตร | 1.2 |
| CH013 | พริกขี้หนู พจ.007 | แปลงเกษตรกร จ.พิจิตร | 1.0 |
| CH014 | พริกขี้หนู 0042-17 | แปลงเกษตรกร จ.สุโขทัย | 0.8 |
| CH015 | พริกขี้หนู พจ.26-1-2-1 | แปลงเกษตรกร จ.พิจิตร | 0.8 |

จากผลการศึกษาจะเห็นว่า สายพันธุ์พริกแต่ละชนิดให้ปริมาณ total carotenoids ที่แตกต่างกัน พริกขี้หนูบางลี่และพริกขี้หนูจินดา (ตัวอย่างที่ CH004 และ CH008) ให้ผลการทดลองที่น่าสนใจ สมควรศึกษาในรายละเอียดต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**ส่วนที่ 2 งา**

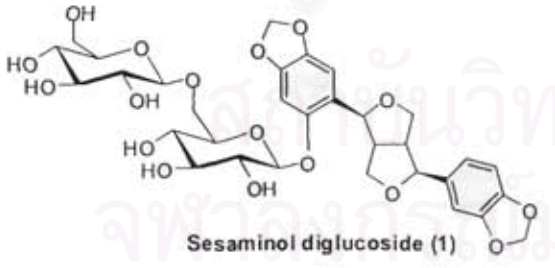
**บทนำ**

เมล็ดงามีไขมันประมาณ 35 – 57% โปรตีน 19 – 25% และกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกาย 2 ชนิด คือ methionine และ tryptophan ซึ่งพบได้น้อยในพืชชนิดอื่น นอกจากนี้เมล็ดงามีลักษณะเด่นกว่าพืชชนิดอื่น คือ มีสารในกลุ่ม lignan ได้แก่ sesamin และ sesamolin ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักและมีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้ยังมีสารในกลุ่มเดียวกันอีกหลายชนิด เช่น sesamol, sesamolinol และ pinoresinol นอกจากนี้ยังพบว่า sesamin และ sesamolin มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่สำคัญหลายอย่าง เช่น ลดความเป็นพิษของสารเคมีที่มีผลต่อตับ สมบัติ antioxidative stress ในเซลล์สมอง ลดความดันโลหิตสูง ลดอาการบวมอักเสบและโรคภูมิแพ้ ปัจจุบันมีการนำงาใช้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารหลายชนิด เช่น ผลิตภัณฑ์ลดไขมันภายใต้ชื่อการค้า "Sesa thin" ซึ่ง sesamin จะช่วยกระตุ้นการเผาผลาญไขมันได้ดีและผลิตภัณฑ์เสริมบำรุงผิว โดยนำมาผสมกับ royal jelly หรือ evening primrose และจำหน่ายเป็นผลิตภัณฑ์ภายใต้เครื่องหมายการค้า "BRAND's"

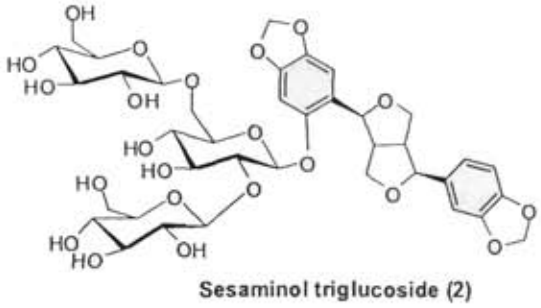
งาที่ปลูกในประเทศไทยมี 3 ชนิด คือ งาขาว งาดำ และงาแดง ในแต่ละชนิดมีอยู่หลายสายพันธุ์ อีกทั้งมีสาร lignan ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ในปริมาณที่ต่างกัน ปัจจุบันมีงาทั้งหมด 4 สายพันธุ์หลักที่สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ส่งเสริมให้เกษตรกรปลูก ได้แก่ งาขาวพันธุ์อุบลราชธานี 2 งาดำพันธุ์อุบลราชธานี 3 งาดำพันธุ์นครสวรรค์ และงาแดงพันธุ์อุบลราชธานี 1 งาทั้ง 4 สายพันธุ์นี้ให้ผลผลิตสูง ปลูกง่าย และทนต่อสภาพแวดล้อม โดยเฉพาะภาวะฝนแล้งได้ดี อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับปริมาณสารออกฤทธิ์ในงาพันธุ์ดังกล่าว ดังนั้นข้อมูลความสัมพันธ์ระหว่างสารออกฤทธิ์สำคัญกับสายพันธุ์งาจึงเป็นข้อมูลที่จำเป็นในการปรับปรุงสายพันธุ์งาให้ดีขึ้น และเป็นมาตรฐานในการตรวจสอบคุณภาพของงา

การดำเนินโครงการในปีแรกที่ผ่านมาเป็นการศึกษาสารออกฤทธิ์สำคัญคือ sesamin และ sesamolin ในส่วนของน้ำมันงาและพบว่าในบรรดาสายพันธุ์ที่หน่วยงานของรัฐส่งเสริมให้ปลูกนั้น งาดำอุบล 3 มีปริมาณรวมของ sesamin และ sesamolin สูงที่สุดคือ 0.39 g/100 g งา

สำหรับกากงาที่เหลือจากการสกัดน้ำมันแล้ว มีการนำไปเป็นส่วนผสมในการผลิตอาหารสัตว์ สามารถทดแทนกากธัญพืชชนิดอื่น เช่น กากถั่วเหลืองได้เนื่องจากมีปริมาณโปรตีนสูง อย่างไรก็ตามมีรายงานวิจัยระบุว่าส่วนของกากงามีสารออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่น่าสนใจหลายชนิด โดยเฉพาะสารในกลุ่ม lignan glycoside องค์ประกอบหลักที่มักพบในสารกลุ่มนี้ คือ sesaminol diglucoside (**1**) และ sesaminol triglucoside (**2**)



**Sesaminol diglucoside (1)**



**Sesaminol triglucoside (2)**

**Sesame powder**

sesamino diglucoside (1) และ sesaminol triglucoside (2) ประกอบด้วยส่วน aglycone คือ sesaminol และมีส่วนของน้ำตาลเป็น glucose จำนวน 2 และ 3 หน่วยตามลำดับ เนื่องจากโครงสร้างมีส่วนของน้ำตาลอยู่ด้วยจึงทำให้สารในกลุ่มนี้มีการละลายในน้ำที่ดีกว่าสารกลุ่ม sesamin และ sesamolin ซึ่งพบในน้ำมันงา สารในกลุ่ม sesaminol glycoside มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายอย่างที่น่าสนใจ เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ การกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกาย ฯลฯ [1-2] ฤทธิ์ทางชีวภาพเหล่านี้ส่วนใหญ่คล้ายคลึงกับที่มีรายงานใน sesamin และ sesamolin ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในน้ำมันงา ดังนั้นคาดว่าสารในกลุ่ม sesaminol glycoside อาจเกิดการย่อยสลายได้ sesaminol ซึ่งเป็นสารที่ออกฤทธิ์ได้ทัดเทียมกับ sesamin และ sesamolin หากมีการนำกากงาที่ได้จากการสกัดน้ำมันแล้วมาสกัดต่ออีกครั้งเพื่อนำสารในกลุ่ม sesaminol glycoside มาใช้ประโยชน์ จะเป็นการเพิ่มมูลค่าแก่กากงาเป็นอย่างมาก ดังนั้นในโครงการนี้จะมุ่งเน้นวิเคราะห์ปริมาณสารในกลุ่ม sesaminol glycoside จากงาสายพันธุ์ต่าง ๆ รวมทั้งพัฒนาวิธีในการวิเคราะห์ โดยคาดว่าผลการวิเคราะห์นี้จะเป็นข้อมูลสำคัญในการส่งเสริมเกษตรกรให้ปลูกงา สายพันธ์ที่มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในปริมาณสูงซึ่งเป็นที่ต้องการของตลาด

## 2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

2.1 สกัดและแยกสารสำคัญจากกากงา เช่น sesaminol diglucoside (1) และ sesaminol triglucoside (2) เพื่อใช้เป็นสารมาตรฐานสำหรับการตรวจวิเคราะห์

2.2 วิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในกากงาสายพันธุ์ต่าง ๆ

2.3 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสารสำคัญกับสายพันธุ์งา

2.4 เปรียบเทียบวิธีการสกัดและตรวจสอบคุณภาพของสารสกัดที่ได้

2.5 ศึกษาแนวทางการใช้ประโยชน์ของสารสำคัญหรือสารสกัดในอุตสาหกรรมอาหารและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร

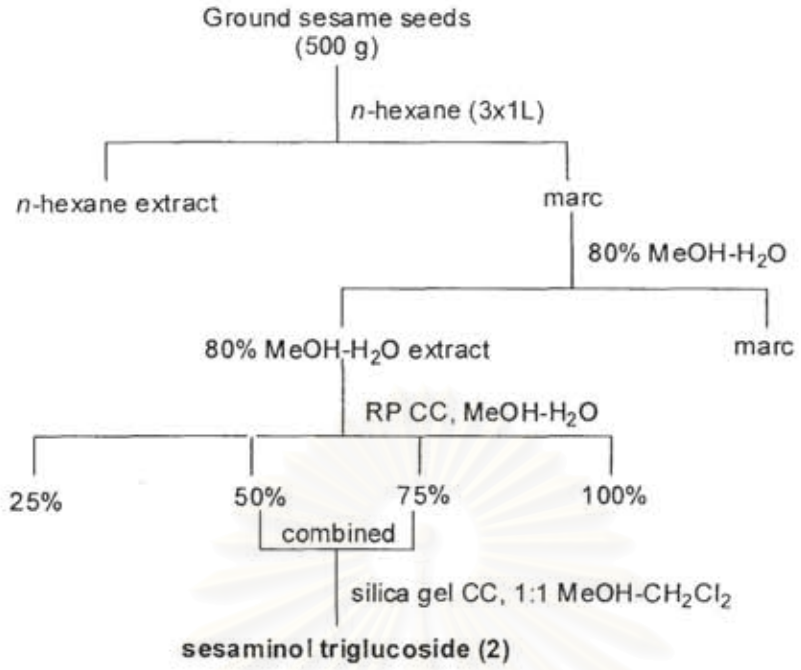
## 3. วิธีวิจัย

### 3.1 งาตัวอย่าง

เมล็ดงาที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญเก็บมาจากแปลงปลูกสาธิตในศูนย์วิจัยพืชไร่ อุบลราชธานี ได้แก่ งาขาวพันธุ์อุบลราชธานี 2 งาดำพันธุ์อุบลราชธานี 3 งาดำพันธุ์นครสวรรค์ และ งาแดงพันธุ์อุบลราชธานี 1

### 3.2 การเตรียมกากงา สกัดและแยก sesaminol glycoside เพื่อใช้เป็นสารมาตรฐาน

สกัดแยก sesaminol glycoside จากเมล็ดงาโดยประยุกต์วิธีของ Moazzami และคณะ [3] ดังนี้ นำงาขาว (500 g) ที่บดละเอียดแล้วมาสกัดด้วย *n*-hexane (1L) ที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง กรองเอาสารละลาย *n*-hexane ออก นำกากมาสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง รวมสารละลาย *n*-hexane ที่สกัดได้ทั้งหมด 3 ครั้ง ระเหยตัวทำละลายด้วย rotary evaporator จะได้สารสกัด *n*-hexane หนัก 13.8 g นำกากที่เหลือมาสกัดด้วย 80% MeOH (1L) ทำซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง นำสารละลายที่สกัดด้วย 80% MeOH มาระเหยให้แห้งจะได้สารสกัด 80% MeOH หนัก 5.7 g ละลายสารสกัด 80% MeOH อีกครั้งด้วย 25% MeOH-$H_2O$ ค่อย ๆ เทสารละลายที่ได้ลงบน flash column chromatography ($\phi$16 × 12 cm) ที่บรรจุด้วย C18 จนมีความสูง 8 cm นำสารละลายของสารสกัดเข้าสู่คอลัมน์ด้วย aspirator จากนั้นชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายผสม MeOH-$H_2O$ 4 ระบบ (ระบบละ 500 mL) โดยมีสัดส่วน MeOH 25, 50, 75 และ 100% ตามลำดับ เก็บสารละลายที่ได้จากการชะคอลัมน์ ระเหยให้ข้น เมื่อตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีพบว่า fraction ที่ชะออกจากคอลัมน์ด้วย 50 และ 75% MeOH-$H_2O$ มีองค์ประกอบหลักในกลุ่ม sesaminol glycoside เหมือนกัน จึงนำมารวมกันและแยกให้บริสุทธิ์ต่อไปด้วย silica gel column chromatography ($\phi$5 × 40 cm) ชะคอลัมน์ด้วย 1:1 $CH_2Cl_2$-MeOH จะได้ sesaminol triglucoside หนัก 30 mg รายละเอียดของการสกัดและแยกสารให้บริสุทธิ์สามารถสรุปได้ดังแผนภาพที่ 1

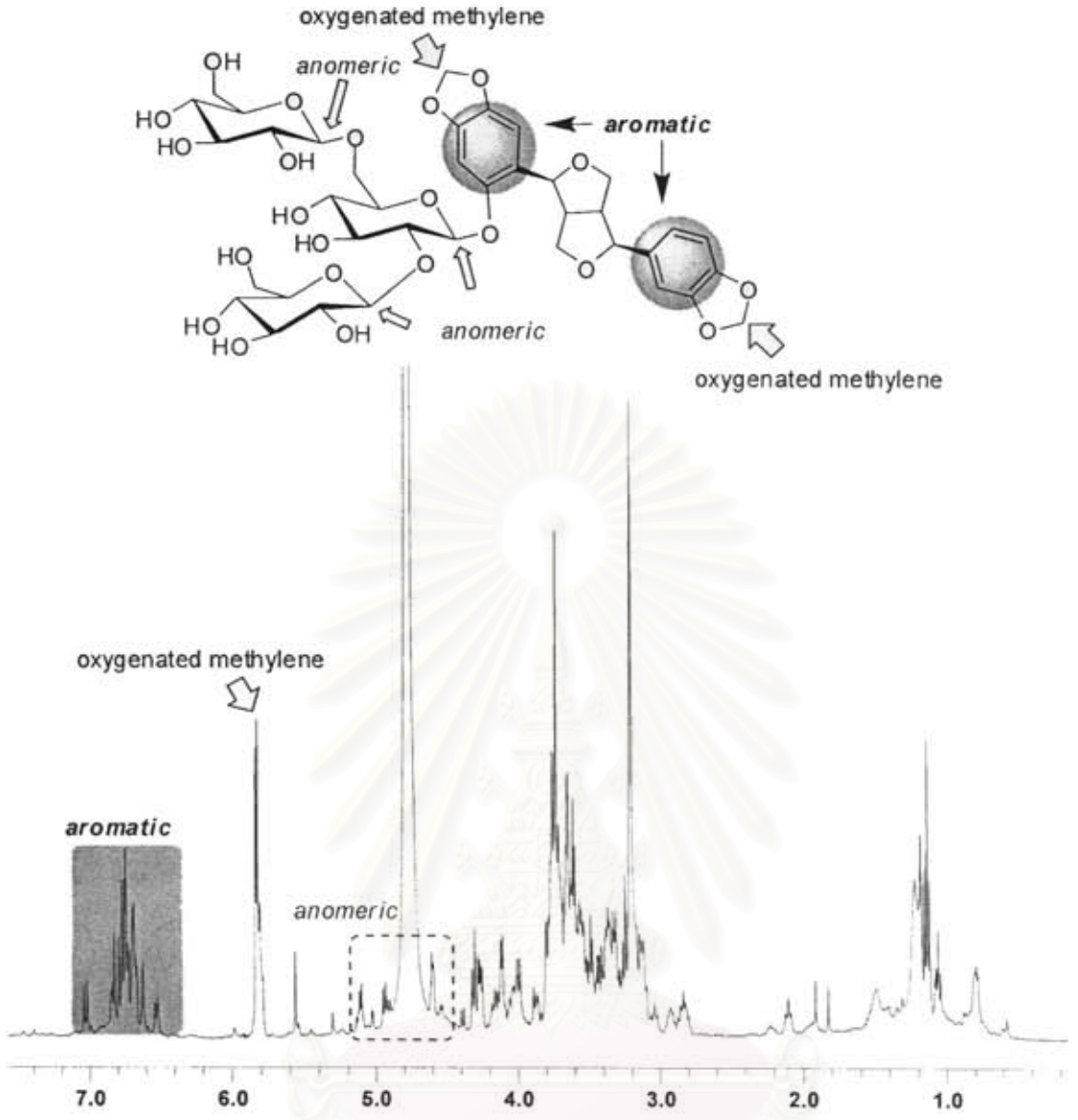



**แผนภาพที่ 1** การสกัดและแยกสารมาตรฐาน sesaminol triglucoside (2) จากกากงา

### 3.3 การพิสูจน์โครงสร้าง sesaminol triglucoside ที่แยกได้

โครงสร้างของ sesaminol triglucoside (2) ที่แยกได้ยืนยันโดยเทคนิค $^1$H NMR (รูปที่ 1) ซึ่งมีสัญญาณที่เป็นลักษณะเฉพาะสำหรับสารชนิดนี้ 3 ช่วงสำคัญคือ ช่วง aromatic ($\delta_H$ 6.6-7.2 ppm) ได้แก่สัญญาณของ 1,4,5-trisubstituted aromatic และ 1,2,4,5-tetrasubstituted aromatic ช่วงของ oxygenated methylene ($\delta_H$ ca 5.9 ppm) ทั้ง 2 ที่และช่วงของ anomeric proton 3 ที่ ($\delta_H$ 4.3, 4.8, 5.0 ppm) เมื่อเทียบกับ chemical shift ที่มีในรายงานแล้วพบว่าใกล้เคียงกัน จึงสรุปได้ว่าสารที่แยกได้เป็น sesaminol triglucoside (2)

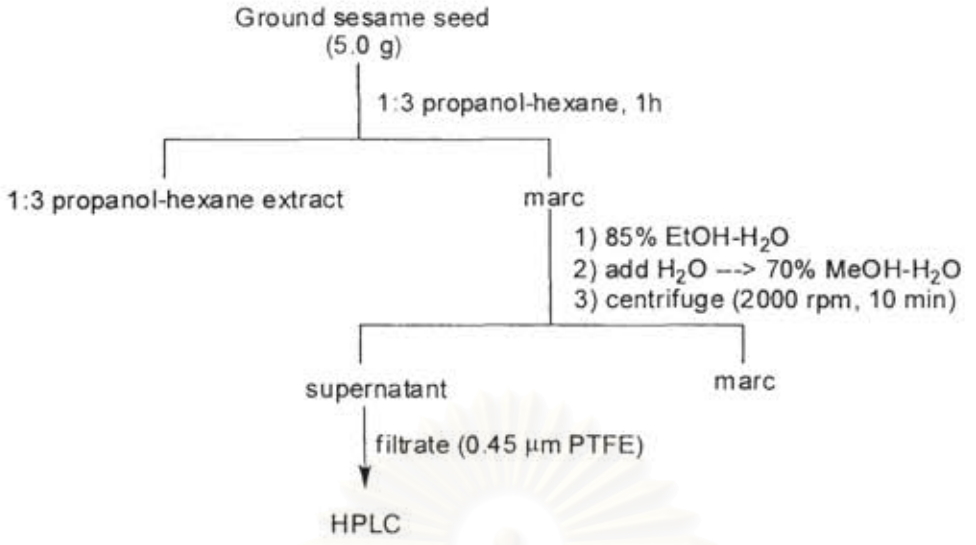
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย




**รูปที่ 1** $^{1}$H NMR spectrum ของ sesaminol triglucoside (**2**)

### 3.3 การวิเคราะห์ sesaminol glycoside ในเมล็ดงา

การวิเคราะห์ปริมาณ sesaminol glycoside ในเมล็ดงาได้ประยุกต์ใช้วิธีของ Moazzami และคณะ [3] ซึ่งมีรายละเอียดการเตรียมตัวอย่างและวิธีวิเคราะห์ดังนี้ นำงาที่บดละเอียดแล้ว 5.0 g มาสกัดด้วย 1:3 propanol-hexane (30 mL) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรองเอาสารละลายออก นำกากงาที่ผ่านการสกัดแล้วมาสกัดต่อด้วย 85% EtOH-$H_2O$ (8.25 mL) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมน้ำอีก 1.75 mL จนสัดส่วนของตัวทำละลายเป็น 70% EtOH-$H_2O$ นำไปเซนตริฟิวก์ด้วยความเร็ว 2000 rmp เป็นเวลา 10 นาที กรองผ่าน syringe filter (0.45 μm PTFE membrane) เอาเฉพาะสารละลายใส (supernatant) นำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC รายละเอียดการเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์สามารถสรุปได้ดังแผนภาพที่ 2




**แผนภาพที่ 2** การเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ sesaminol glycoside ในเมล็ดงา

ตัวอย่างที่เตรียมได้นำมาวิเคราะห์ด้วย HPLC โดยมีสภาวะในการวิเคราะห์ดังนี้

mobile phase: (A) 0.01 M phosphate buffer (pH 2.8) ที่มี 5% MeCN และ (B) MeCN

elution: gradient 0-5 min (15%B), 30 min (30%B) และ 40-50 (70%B)

flow rate: 1.0 mL/min

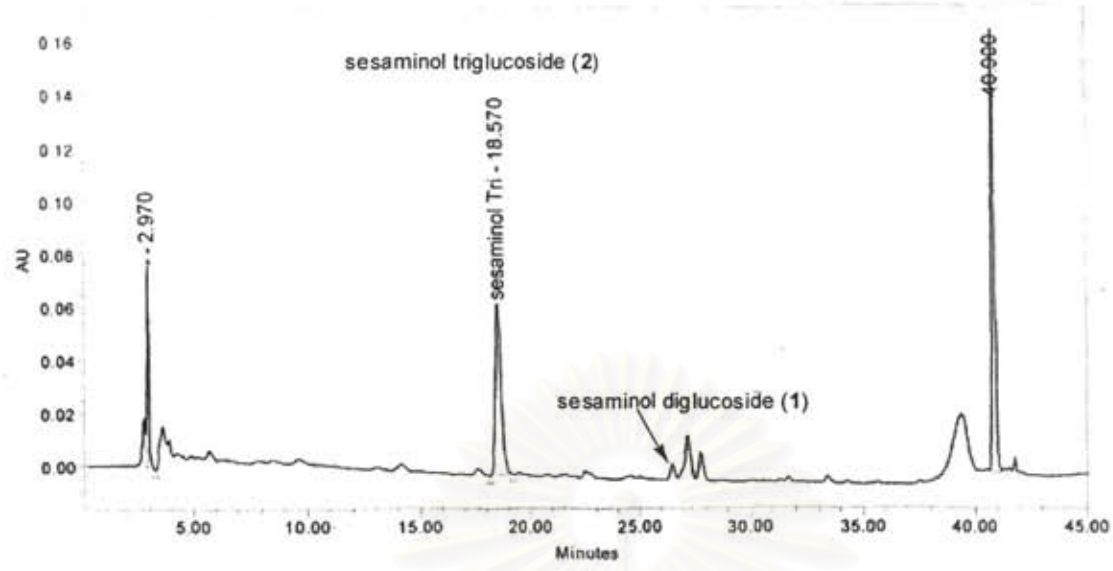
column: Econosil ODS column (5μm, 250 × 4.6 mm, Altech Co.)

detector: UV 290 nm

injection: 10 μL (5 mg/mL)

ในขณะนี้อยู่ในระหว่างการทดสอบสภาวะที่ใช้วิเคราะห์ เมื่อวิเคราะห์งาสายพันธุ์ต่าง ๆ แล้ว จะได้รายงานผลในปีถัดไป สำหรับตัวอย่างที่วิเคราะห์ด้วย HPLC แล้ว พบว่ามี sesaminol triglucoside (**2**) ประมาณ 10 เท่า ของ sesaminol diglucoside (**1**)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย




**รูปที่ 2** HPLC chromatogram ของการวิเคราะห์สารกลุ่ม sesaminol glycoside

4. **งานตามโครงการที่จะทำในงวดระยะเวลาต่อไป**
   1. วิเคราะห์ปริมาณ sesaminol glycoside ในงาพันธุ์ต่าง ๆ ทั้ง 4 พันธุ์ ซึ่งเป็นพันธุ์ที่กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ส่งเสริมให้เกษตรกรปลูก
   2. พัฒนาวิธีเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณ sesaminol glycoside เนื่องจากวิธีเดิมต้องใช้เวลาถึง 1 วันเฉพาะการเตรียมตัวอย่าง

5. **คำชี้แจงเกี่ยวกับอุปสรรคหรือปัญหา**

   อุปสรรคที่สำคัญที่ทำให้งานล่าช้าไม่สำเร็จตามเป้าหมายที่กำหนดเนื่องจาก
   - การสกัดและแยกสาร sesaminol glycoside ซึ่งตรวจหาได้ยาก ซึ่งอาจเกิดจากระบบตัวทำละลาย
   - อุปสรรคจากเครื่อง HPLC ที่เสียซึ่งต้องซ่อมบ่อยครั้งในช่วงที่วิเคราะห์

เอกสารอ้างอิง

1. Shyu, Y. –S.; Hwang, L. S. Antioxidative activity of the crude extract of lignan glycosides from unroasted Burma black sesame meal. *Food Res. Inter.* **2002**, *35*, 357-365.
2. Kang, M.-H.; Kawai, Y.; Naito, M.; Osawa, T. Dietary defatted sesame flour decreases susceptibility to oxidative stress in hypercholesterolemic rabbits. *J. Nutr.* **1999**, *129*, 1885-1890.
3. Moazzami, A.A.; Andersson, R.E.; Kamal-Eldin, A. HPLC analysis of sesaminol glucosides in sesame seeds. *J. Agric. Food. Chem.* **2006**, *54*, 633-638.

**4. งานตามโครงการที่จะทำในงวดระยะเวลาต่อไป**

ดังแสดงในตารางในหัวข้อที่ 2

**5. คำชี้แจงเกี่ยวกับอุปสรรคหรือปัญหา**

งบประมาณที่ได้รับค่อนข้างล่าช้า ทำให้งานวิจัยบางส่วนเริ่มต้นช้า

ลงชื่อ .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรินทร ชวศิริ)

หัวหน้าโครงการวิจัย

วันที่ ....1.. มีนาคม 2552

**ผลการประเมินรายงานความก้าวหน้าของแผนงานวิจัย/ โครงการวิจัย**

สรุปความเห็นของการประเมิน

- ☐ เห็นควรสนับสนุนให้ดำเนินการต่อไป
- ☐ ข้อเสนอแนะเพิ่มเติม

ลงชื่อ .....

(.....)

หัวหน้าส่วนราชการ

วันที่ ..... เดือน ..... พ.ศ.....

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย