

Thesis Title	Optimization of Modern Liquid Chromatographic Analysis of Capsaicinoid Compounds in Thai Capsicum Fruits	
Author	Mrs. Rachaneewan Kamka	
Ph.D	Chemistry	
Examining Committee	Asst. Prof. Dr. Mongkon Rayanakorn	Chairman
	Assoc. Prof. Dr. Surasak Watanesk	Member
	Asst. Prof. Dr. Yuthsak Vaneesorn	Member
	Asst. Prof. Dr. Sugunya Wongpornchai	Member
	Prof. Dr. Richard L. Deming	Member

#### Abstract

Improvement of a high performance liquid chromatographic (HPLC) method for the analysis of the pungent principles of capsicum fruits known as capsaicinoid compounds was accomplished. A systematic experimental design for optimization in the determination of the major capsaicinoid compounds using the sequential simplex technique was applied to study the chromatographic separation and extraction procedures. Optimization of the chromatographic response function (CRF), used as a quality index of separation, by simultaneous variation of the mobile phase composition, flow rate and column temperature, was carried out to achieve good separation in the shortest possible analysis time. Both the C8 and C18 columns (4.6 mm I.D., 150 mm length, 5  $\mu$ m particle size) gave good separations with UV detection but the C8 column gave the shorter elution times. The optimal conditions were at a column temperature of 43.2°C, a mobile phase composition of 63.6% methanol in water and a flow rate of 1.18

ml/min, resulting in an elution time of 11 minutes. Gas chromatographic-mass spectrometric and liquid chromatographic-mass spectrometric data were obtained to verify the identity of the major capsaicinoid compounds.

Sonication was used in the extraction of the capsaicinoids from capsicum samples. The extraction procedure was optimized with regard to the amount of solvent and the duration of sonication. Sonication with acetonitrile showed satisfactory extraction efficiencies in terms of simplicity, low solvent consumption and fewer interferences. Optimal conditions were at a solvent volume of 10 ml and a sonication time of 60 minutes. Applying the optimized sonication and HPLC conditions to the determination of capsaicinoid compounds in seven samples of *Capsicum annuum* and three samples of *Capsicum frutescens* of Thai capsicum fruits yielded a range of 0.02-0.70 dry-weight percent capsaicin and 0.01-0.46 dry-weight percent dihydrocapsaicin.

The sonication results and the CRF values were fitted to the second-order polynomials. Sample extraction variables in the models included solvent quantity and sonication time. CRF for the HPLC analysis, mobile phase composition, flow rate and column temperature were utilized as experimental variables in the model.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การปรับสภาวะการวิเคราะห์ทางโครมาโทกราฟีของเหลวแบบใหม่ของสารประกอบกลุ่มแคไพซินอยด์ในพริกของไทย	
ชื่อผู้เขียน	นางรัชนีวรรณ การค้า	
วิทยาศาสตร์ดุษฎีบัณฑิต	สาขาวิชาเคมี	
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ผศ.ดร. มงคล รายนาค	ประธานกรรมการ
	รศ.ดร. สุรศักดิ์ วัฒนเสถ์	กรรมการ
	ผศ.ดร. ยุทธศักดิ์ วนีสอน	กรรมการ
	ผศ.ดร. สุกัญญา วงศ์พรชัย	กรรมการ
	ศ.ดร. ริชาร์ด แอล เดมิ่ง	กรรมการ

#### บทคัดย่อ

ได้ทำการปรับปรุงวิธีลิกนิตโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง (เอชพีแอลซี) เพื่อการวิเคราะห์ปริมาณสารเผ็ดในพริกที่รู้จักกันในชื่อ สารประกอบแคไพซินอยด์ โดยประยุกต์การออกแบบการทดลองอย่างมีระบบเพื่อปรับสภาวะให้เหมาะสมด้วยเทคนิคซิมเพลกซ์ ที่มีผลต่อวิธีการแยกในระบบโครมาโทกราฟีและวิธีการสกัดสารประกอบแคไพซินอยด์ ในส่วนของระบบโครมาโทกราฟีได้ปรับสภาวะที่เหมาะสมของตัวแปรหลักพร้อม ๆ กัน ได้แก่ องค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ และอุณหภูมิของคอลัมน์ โดยมุ่งที่จะให้ได้ผลของการวิเคราะห์ที่มีกำลังการแยกของพีคที่เพียงพอสำหรับทุกพีคในเวลาน้อยที่สุด ด้วยการปรับค่าของฟังก์ชันตอบสนองทางโครมาโทกราฟี (ซีอาร์เอฟ) เป็นค่าประเมินที่บ่งชี้คุณภาพของการแยก ซึ่งได้ผลการวิเคราะห์ที่น่าพอใจเมื่อใช้คอลัมน์ทั้งแบบ ซี-8 และ ซี-18 (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร ความยาว 150 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร) โดยตรวจวัดสัญญาณในย่านอัลตราไวโอเล็ต แต่คอลัมน์ ซี-8 ใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อยกว่าเมื่อใช้สภาวะที่เหมาะสมที่สุดที่อุณหภูมิของคอลัมน์ 43.2 องศาเซลเซียส มีระบบเฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยเมทานอลร้อยละ 63.6 ในน้ำ และมีอัตราการไหล 1.18 มิลลิลิตรต่อนาที โดยใช้เวลาของการระเหยเพียง 11 นาที การ

พิสูจน์เอกลักษณ์ด้านคุณภาพวิเคราะห์ของสารประกอบหลักกลุ่มแคพไซซินอยด์ยืนยันโดยข้อมูลจากแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมตรี และลิวคิตโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมตรี

การสกัดสารแคพไซซินอยด์จากตัวอย่างพริกด้วยวิธีโซนิเคชัน ทำได้โดยทำการปรับสภาวะที่เหมาะสมของตัวแปรหลัก 2 ตัว ได้แก่ ปริมาณตัวทำละลายและเวลาที่ใช้ในการสกัด ตัวทำละลายอะซีโตนไตรลให้ประสิทธิภาพการสกัดที่น่าพอใจโดยใช้ปริมาณสารอะซีโตนไตรลในการสกัดน้อย มีสารรบกวนต่ำ และง่ายต่อการสกัด สภาวะที่เหมาะสมที่สุดคือเมื่อใช้ตัวทำละลายอะซีโตนไตรล 10 มิลลิลิตร ทำการสกัดเป็นเวลา 60 นาที การประยุกต์สภาวะที่เหมาะสมในการทำโซนิเคชันและของเซฟพีแอลซี กับการหาปริมาณสารประกอบแคพไซซินอยด์ในตัวอย่างพริกพันธุ์แคพซิคัมแอนนุอัม (*Capsicum annuum*) จำนวน 7 ตัวอย่าง และ แคพซิคัมฟรุเทสเซนส์ (*Capsicum frutescens*) จำนวน 3 ตัวอย่าง พบว่าปริมาณสารแคพไซซินอยู่ในช่วงร้อยละ 0.01-0.70 ต่อน้ำหนักแห้ง และปริมาณสารไดไฮโดรแคพไซซินอยู่ในช่วงร้อยละ 0.01-0.46 ต่อน้ำหนักแห้ง

ผลของการทำโซนิเคชันและค่าซีอาร์เอฟ สอดคล้องกับสมการพอลิโนเมียลลำดับที่สอง โดยปริมาณตัวทำละลายและเวลาที่ใช้ในการสกัดเป็นตัวแปรของสมการในการสกัด ส่วนสมการของซีอาร์เอฟสำหรับการวิเคราะห์แบบเซฟพีแอลซี ตัวแปรที่ใช้ในสมการคือ องค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ และอุณหภูมิของคอลัมน์