



การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดและหาปริมาณทั้งหมดของแอนโทไซยานินจากบีทรูท
The Optimum Conditions for Extraction and Determination of Total
Anthocyanins from Beetroot

สุชาดา แก้วชานา¹ และชญาดา กลิ่นจันทร์²
Suchada Kaewchawna¹ and Chayada Klinchan²

¹นักศึกษาโปรแกรมวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร
²อาจารย์ประจำโปรแกรมวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร

บทคัดย่อ

จากวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดและหาปริมาณทั้งหมดของแอนโทไซยานินจากบีทรูทโดยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายต่างกัน 3 ชนิด ได้แก่ Methanol, 0.7% HCl ใน methanol และ 0.2% HCl ใน methanol ตามลำดับ อัตราส่วนบีทรูทต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1 : 4 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า 0.2% HCl in methanol ให้ผลการสกัดที่ดีที่สุด แล้วนำสารสกัดที่ได้จาก ตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิดไปวัดค่า pH มีค่า 6.90, 1.22 และ 1.90 ตามลำดับ ทดสอบองค์ประกอบเบื้องต้นของ สารสกัดด้วยวิธี Cyanidin test พบว่ามีเป็นสารในกลุ่ม Flavonoids นำไปหาค่าความยาวคลื่นสูงสุดด้วยเทคนิค สเปกโทรโฟโตเมตรี พบว่ามีค่าความยาวคลื่นสูงสุด 535, 520 และ 514 นาโนเมตร ตามลำดับ หาปริมาณสาร แอนโทไซยานินทั้งหมดที่สกัดได้จากบีทรูทด้วยวิธี pH differential method พบว่ามีค่าเท่ากับ 4.1268, 7.7683 และ 12.5889 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ การใช้ sep-pak C18 ในการแยกสารสกัดแอนโทไซยานินให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นเนื่องจากสามารถกำจัดน้ำตาล ไขมัน และสารโพลีฟีนอลชนิดอื่นๆ ได้

คำสำคัญ : การสกัด / บีทรูท/ แอนโทไซยานิน/ความบริสุทธิ์

Abstracts

The objective of this research was to determine the optimum conditions for extraction and determination of total anthocyanins from Beetroot by extraction in 3 different solvents methanol, 0.7% HCl in methanol and 0.2% HCl in methanol, respectively. The beetroot extract ratio was 1 : 4 at room temperature for 24 hours. It was founded that 0.2% HCl in methanol gave a good result. The extract of the three solvents was pH value at 6.90, 1.22 and 1.90, respectively. Cyanidin test was determinate for flavonoids compound. The determination of wavelengths was by using UV-Visible Spectrophotometry. It was founded that wavelengths were 535, 520 and 514 nm, respectively. The total anthocyanins from Beetroot with pH differential method were 4.1268 mg/L, 7.7683 mg/L and 12.5889 mg/L, respectively. Identify of anthocyanin by Thin-layer chromatography was determined with n-Butanol: acetic acid: water. The optimum separation ratios are 7: 1.5: 1.5 and using sep-pak C18 gave beetroot extract. These fats, sugar and other polyphenols were remove by purification technique.

Keywords: Extraction / Beetroot / Anthocyanin / Purification

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

แอนโทไซยานิน (anthocyanins) มีชื่อย่อมาจากรากศัพท์เดิมของกรีก เป็นรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ จัดอยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ โดยสีของแอนโทไซยานินจะเปลี่ยนแปลงไปตามสภาวะความเป็นกรด-ด่าง มีสีน้ำเงินเข้มในสภาวะที่เป็นด่าง (pH มากกว่า 7) มีสีม่วงเมื่อเป็นกลาง (pH 7) และจะเปลี่ยนเป็นสีแดงส้มในสภาวะที่เป็นกรด (pH น้อยกว่า 7) แอนโทไซยานินประกอบไปด้วยส่วนของอะไกลโค น้ำตาล และหมู่เอทิล (Anderson, OM., and



มีสารสีม่วง เรียกว่า แอนโทไซยานิน ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ช่วยลดสารก่อมะเร็ง และช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดโรคหัวใจและอัมพาตได้



รูปที่ 2 บีทรูท

(ที่มา: 10 สรรพคุณ ประโยชน์ของบีทรูท ผักรักษาสุขภาพ สุขสมสารต้านอนุมูลอิสระ, 2017)

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดและหาปริมาณทั้งหมดของแอนโทไซยานินจากบีทรูท

ขอบเขตของโครงการวิจัย

ขอบเขตเชิงเนื้อหา

1) พืชตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย

ได้แก่ บีทรูท ซึ่งได้จากตลาดศูนย์ในจังหวัดกำแพงเพชร มีอายุ 10 วัน หลังการเก็บเกี่ยว

2) ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด คือ methanol, conc.HCl ใน methanol, และ 0.5% HCl ใน methanol ตามลำดับ

3) การหาปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมดที่สกัดได้จากบีทรูทด้วยวิธี pH differential method

4) การทดสอบหาการเคลื่อนที่ของสารเพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารแอนโทไซยานินโดยหาอัตราส่วนของตัวทำละลายที่เหมาะสมด้วยเทคนิค Thin-layer Chromatography

5) การทำให้บริสุทธิ์โดยการแยกคอลัมน์ที่มีเฟสคงที่เป็น sep-pak C18

ขอบเขตเชิงตัวแปร

ตัวแปรต้น ได้แก่ ชนิดของตัวทำละลาย

ตัวแปรตาม ได้แก่ ปริมาณแอนโทไซยานิน

ตัวแปรควบคุม ได้แก่ เวลา อุณหภูมิ และวิธีการสกัด

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมตัวอย่างบีทรูท

1) การเตรียมตัวอย่างนำบีทรูทมาล้างให้สะอาดผึ่งให้แห้ง หั่นเป็นชิ้นบางๆ แล้วนำมาปั่นบดให้พอละเอียด

2) ชั่งน้ำหนักบีทรูทสดประมาณ 50 กรัม ใส่ปิกเกอร์

การเตรียมตัวทำละลาย

1) การเตรียมตัวทำละลาย methanol

2) การเตรียมตัวทำละลาย 0.7%HCl ใน methanol จาก 37%HCl

ปิเปต 37%HCl : น้ำ : methanol อัตราส่วน 5 : 32.5 : 212.5 mL ตามลำดับ ใส่ในขวดปรับปริมาตร ขนาด 250 mL



3) การเตรียมตัวทำละลาย 0.2% HCL ใน methanol
เปิด 37% HCL 1.25 mL ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 250 mL ปรับปริมาตรให้เป็น 250 mL ด้วย methanol

การสกัดสารแอนโทไซยานิน

ใช้วิธีการสกัดแบบแช่ในตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด

- 1) ชั่งน้ำหนักสดบิทรูทประมาณ 50 กรัม จำนวน 3 ชุด ใส่บีกเกอร์จำนวน 3 ใบ
- 2) นำตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิดที่เตรียมไว้เทใส่ลงไปบีกเกอร์ที่มีบิทรูทแต่ละใบ (1 ตัวทำละลายต่อ 1 บีกเกอร์) ในอัตราส่วนตัวอย่างต่อตัวทำละลาย 50 : 200 mL
- 3) นำกระดาษฟอยด์มาปิดปากบีกเกอร์และตั้งไว้ในที่ที่บแสงอุณหภูมิต้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลากรองสารสกัดที่ได้ด้วยวิธีกรองดูดสุญญากาศจากนั้นนำสารสกัดที่ผ่านการกรองแล้วไปวัดค่า pH และนำไปประเหยตัวทำละลายออก

การหาค่าความยาวคลื่นสูงสุด

- 1) นำสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด ที่ผ่านการระเหยเอาตัวทำละลายออกแล้วมาเจือจางในอัตราส่วนตัวอย่างต่อตัวทำละลาย 0.5: 19.5 mL
- 2) นำไปหาค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปคโตรโฟโตมิเตอร์

ทดสอบ Cyanidin test

- 1) หยดสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลายแต่ละชนิด จำนวน 13 หยดใส่ในหลอดทดลองจำนวน 2 หลอด
- 2) นำลวดแมกนีเซียมตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ลงไปหลอดทดลอง 1 หลอดของแต่ละตัวทำละลาย
- 3) หยด conc.HCL จำนวน 6 หยด ใส่ในหลอดทดลองที่มีลวดแมกนีเซียมอยู่สังเกตการเปลี่ยนแปลงเปรียบเทียบกับอีกหนึ่งหลอดทดลองที่ไม่ได้หยด conc.HCL และบันทึกผล

ทดสอบความสามารถในการเป็นอินดิเคเตอร์

- 1) เตรียมสารละลาย 1 M HCL และ 1 M NaOH เพื่อใช้ปรับค่า pH
- 2) ปรับค่า pH 1 – 12 โดยผสมสารละลาย 1 M HCL และ 1 M NaOH เข้าด้วยกันแล้วนำไปวัดค่า pH
- 3) นำสารสกัดที่ได้ทั้ง 3 ตัวทำละลายหยดลงในสารละลาย pH 1- 12 ที่เตรียมไว้จำนวน 5 หยด สังเกตสีและบันทึกผล

การหาปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในบิทรูทด้วยวิธี pH differential method

- 1) เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ pH 1.0
 - 1.1 เตรียมสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) พีเอช 1.0 ความเข้มข้น 0.025 M (เตรียม 250 mL โดยชั่ง KCl 0.466 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 240 mL. ปรับค่าพีเอชด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น จนได้พีเอชเท่ากับ 1.0 แล้วปรับปริมาตรเป็น 250 mL. ด้วยน้ำกลั่น)
 - 1.2 เตรียมสารละลายโซเดียมอะซิเตท (CH_3COONa) พีเอช 4.5 ความเข้มข้น 0.4 M (เตรียม 250 mL. โดยชั่ง CH_3COONa 13.608 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 240 mL. ปรับค่าพีเอชด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น จนได้พีเอชเท่ากับ 4.5 แล้วปรับปริมาตรเป็น 250 mL. ด้วยน้ำกลั่น)
- 2) เตรียมตัวอย่างต่อตัวทำละลายต่อบัฟเฟอร์ pH 1.0 ในอัตราส่วน 1 : 4 : 16 mL (บัฟเฟอร์ pH 4.5 เตรียมเหมือนกัน)
- 3) นำตัวอย่างที่เตรียมแล้วมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 และ 700 ทั้งสองบัฟเฟอร์และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดได้โดยวิธี pH differential method



การทดสอบการเคลื่อนที่ของสารเพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

1) การแยกสารแอนโทไซยานินด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีโดยนำสารละลายที่สกัดได้มา spot บนแผ่น TLC จากนั้นใส่แผ่น TLC ลงในบีกเกอร์ ที่มีวัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile Phase) ซึ่งประกอบด้วย คือ n – Butanol: Acetic acid : water อัตราส่วน 7 : 1.5 : 1.5 ตั้งทิ้งไว้จนกว่า วัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile Phase) จะเคลื่อนถึงจุดที่กำหนด เป็นระยะทาง 4.5 เซนติเมตร จากนั้นนำแผ่น TLC ตรวจสอบจุดแยกสารภายใต้รังสียูวีความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV Lamps

การทำให้สารแอนโทไซยานินบริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ sephadexgel C18 (sep-pak C18)

1) นำสารสกัดแอนโทไซยานินที่ได้จากตัวทำละลาย 0.5% HCl ใน methanol มาผ่าน sep-pak C18
2) ทำให้คอลัมน์อิ่มตัวด้วยเมทานอลจากนั้นซึ่งสารสกัด 0.5 กรัม เติมลงไปแล้วชะด้วยตัวชะแรกคือ 0.01% HCl ในน้ำ เพื่อชะสารจำพวกน้ำตาล และไขมัน ตามด้วยตัวชะที่สองคือเอทิลอะซิเตทเพื่อชะสารโพลีฟีนอลอื่นๆและสุดท้ายชะด้วย 0.01% HCl ในเมทานอล เพื่อชะสารแอนโทไซยานินออกจากคอลัมน์โดยขณะชะให้เก็บส่วนที่ผ่านจากคอลัมน์แยกตามลำดับการชะ

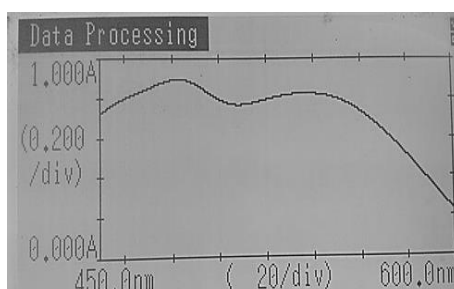
การศึกษาหมู่ฟังก์ชันของแอนโทไซยานินจากสารสกัดด้วยเครื่อง FT-IR spectroscopy

1) เตรียมตัวอย่างที่จะนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FT-IR spectroscopy ที่อยู่ในสถานะของแข็ง
2) ชั่งสารตัวอย่าง 1 มิลลิกรัม (0.001 กรัม) รวมกับผงโพแทสเซียมโบรไมด์ (KBr) 100 มิลลิกรัม (0.100 กรัม) แล้วนำมาบดผสมกันด้วยโกร่งให้มีขนาดอนุภาคเล็กกว่า 5 ไมครอน
3) ชั่ง KBr 100 มิลลิกรัม (0.100 กรัม) ที่ไม่ผสมกับตัวอย่าง แล้วนำมาบดด้วยโกร่งให้มีอนุภาคเล็กกว่า 5 ไมครอน เพื่อเอาไว้สำหรับทำ background
4) นำผง KBr จากข้อ 2) และข้อ 3) ที่บดแล้วมาอัดให้เป็นแผ่น KBr-pellet โดยใช้ชุดอัดแบบใช้มือ (handy quick) โดยให้ใช้ KBr-pellet ที่มีลักษณะใสและบาง มีความโปร่งแสง
5) จากนั้นนำแผ่น KBr-pellet ที่เป็น sample ใส่ในช่องใส่ตัวอย่าง แล้ววัด Collect sample เปรียบเทียบ peaks ที่ได้จากสเปกตรัมทั้งสองพร้อมทั้งชี้ด้วยว่าแต่ละพีคเป็น stretching หรือ bending ของ Functional group ประเภทใด และมีเลขคลื่นเท่าใด

ผลการวิจัย

ผลจากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารแอนโทไซยานินจากบิทรูทด้วยวิธีการแช่ในตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ methanol, 0.7% HCl ใน methanol และ 0.2% HCl ใน methanol ตามลำดับ

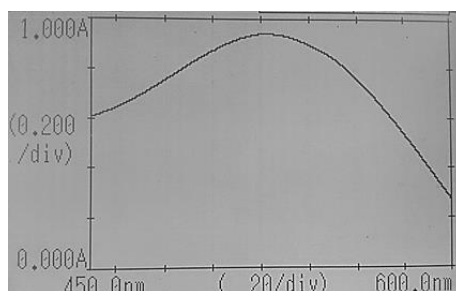
ผลจากการหาค่าความยาวคลื่นสูงสุดของสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด ที่ค่าความยาวคลื่น 450 – 600 นาโนเมตร พบว่าสารสกัดในตัวทำละลาย methanol ค่าความยาวคลื่นสูงสุด 535 นาโนเมตร



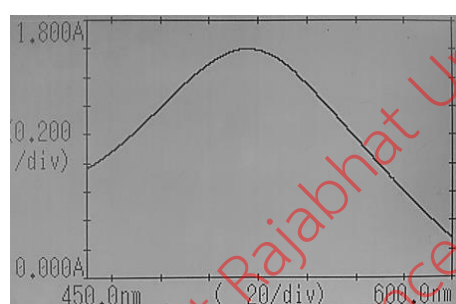
รูปที่ 3 เส้นสเปกตรัมที่ได้จากการหาค่าความยาวคลื่นสูงสุดของสารสกัดในตัวทำละลาย methanol



รายงานสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 5
สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร



รูปที่ 4 เส้นสเปกตรัมที่ได้จากการหาค่าความยาวคลื่นสูงสุดของสารสกัดในตัวทำละลาย 0.7%HCl ใน methanol



รูปที่ 5 เส้นสเปกตรัมที่ได้จากการหาค่าความยาวคลื่นสูงสุดของสารสกัดในตัวทำละลาย 0.2%HCl ใน methanol

จากสเปกตรัมที่แสดงในรูปที่ 3, 4 และ 5 พบว่าสารสกัดในตัวทำละลาย 0.2% HCl ใน methanol ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด ซึ่งมีค่าความยาวคลื่นเท่ากับ 514 นาโนเมตร ดังตารางที่ 1 (ซึ่งตรงตามเอกสารอ้างอิงของ Min-Kyoung Kim และ Han-ah Kim, 2008)

ตารางที่ 1 ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด

Parameter	Solvent		
	methanol (I) 24 hr	0.7%HCl in methanol (II) 24 hr	0.2% HCl in methanol (III) 24 hr
Dilution	20x	20x	20x
Absorbance	0.82	0.94	1.60
λ_{\max}	535	520	514



รายงานสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 5
สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร



(I)

(II)

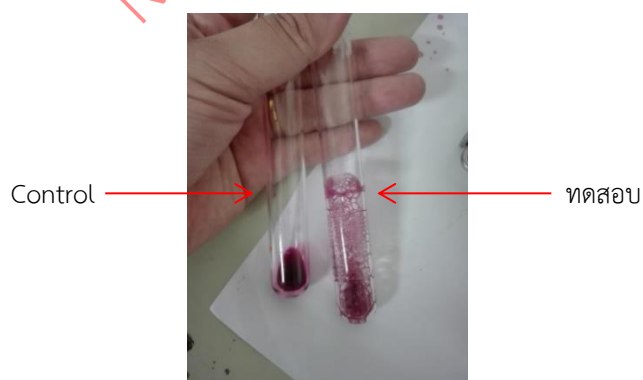
(III)

รูปที่ 6 สีของสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลาย methanol (I), 0.7% HCl ใน methanol (II) และ 0.2% HCl ใน methanol (III) ตามลำดับ

จากรูปที่ 6 เมื่อนำสารสกัดไปวัดค่า pH พบว่ามีค่า pH ที่แตกต่างกันจึงทำให้สารสกัดที่อยู่ในตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด มีสีที่แตกต่างกันตามสภาวะความเป็นกรด ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลค่า pH และสีของสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด

parameter	Solvent		
	methanol (I) 24 hr.	0.7% HCl in methanol (II) 24 hr.	0.2% HCl in methanol (III) 24 hr.
pH	6.90	1.22	1.90
colour	red	Dark red	Darkpink



รูปที่ 7 ผลการทดสอบ Cyanidin test ของสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลาย methanol, 0.7% HCl ใน methanol และ 0.2% HCl ใน methanol ตามลำดับ

จากรูปที่ 7 การทำการทดสอบ Cyanidin test ในสารสกัดที่ได้พบว่ามีสีเปลี่ยนไปจากเดิมดังรูปที่ 7 ซึ่งเป็นผลบวกของการทดสอบด้วยวิธีนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดที่ได้จากปืทรูทเป็นสารในกลุ่มแอนโทไซยานิน (ซึ่งตรงตามเอกสารอ้างอิงของ สุวิชา, 2550) ดังตารางที่ 3



ตารางที่ 3 ผลของการทดสอบ Cyanidin test

Sovlent	Cyanidin test
methanol (I) 24 hr.	+
0.7%HCl in methanol (II) 24 hr.	+
0.2% HCl in methanol (III) 24 hr.	+

หมายเหตุ + หมายถึง positive test



รูปที่ 8 ผลการทดสอบความสามารถในการเป็นอินดิเคเตอร์ของสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลาย methanol (I), 0.7%HCl ใน methanol (II) และ 0.2%HCl ใน methanol (III) ตามลำดับ

จากการทดสอบพบว่าสารสกัดจากตัวทำละลาย methanol (I) มีสีแดงส้มที่ pH 1 - 4 มีสีแดงชมพูที่ pH 5 - 8 มีสีแดงม่วงที่ pH 9 - 11 และมีสีเหลืองที่ pH 12 สารสกัดจากตัวทำละลาย 0.7%HCl ใน methanol (II) พบว่ามีสีแดงชมพูที่ pH 1 - 11 และมีสีเหลืองที่ pH 12 และสารสกัดจากตัวทำละลาย 0.2%HCl ใน methanol (III) พบว่ามีสีแดงชมพูที่ pH 1 - 11 และมีสีเหลืองที่ pH 12

ผลจากการหาปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในปืทุทด้วยวิธี pH differential method (ดัดแปลงจาก AOAC Official Method, 2005) พบว่าการสกัดด้วย 0.2% HCl ใน methanol ให้ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดสูงที่สุด 126.91 (mg/L) ดังตารางที่ 4

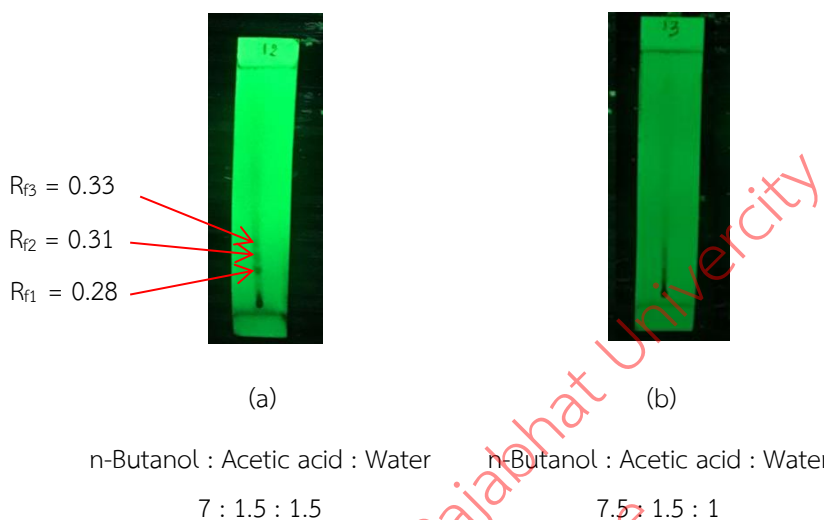
ตารางที่ 4 ผลการหาปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (Total Anthocyanins)

Sovlent	pH	g/20mL	Abs.520 nm.	Abs. 700 nm.	Total Anthocyanins (mg/L)
methanol (I) 24 hr.	pH 1.0	50.3	3.63	0.123	41.41
	pH 4.5		1.643	0.032	
0.7%HCl in methanol (II) 24 hr.	pH 1.0	50.0	3.38	0.217	77.48
	pH 4.5		2.152	0.152	
0.2% HCl in methanol (III) 24 hr.	pH 1.0	50.5	1.664	0.013	126.91
	pH 4.5		1.048	0.021	

ผลจากการวิเคราะห์ทางเคมีเบื้องต้นของสารแอนโทไซยานินในตัวทำละลาย 0.2% HCl ใน methanol โดย



เทคนิค Thin-layer chromatography พบว่าตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารสกัดแอนโทไซยานิน คือ n-Butanol : Acetic acid : water ในอัตราส่วน 7 : 1.5 : 1.5 (ซึ่งตรงตามเอกสารอ้างอิงของ Min-Kyoung Kim และ Han-ah Kim, 2008) ดังรูปที่ 9



รูปที่ 9 ผลวิเคราะห์ทางเคมีเบื้องต้นของสารแอนโทไซยานินในตัวทำละลาย 0.2% HCl ใน methanol

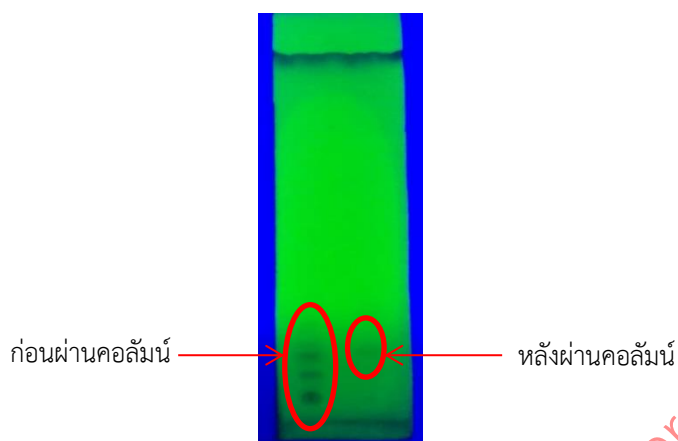
ตารางที่ 5 ค่า R_f ของสารแอนโทไซยานินในตัวทำละลาย 0.2% HCl ใน methanol

No.	Mobile phase (for 10 ml)	Amount (ml)	R_{f1}	R_{f2}	R_{f3}
a	n-Butanol : Acetic acid : Water	7 : 1.5 : 1.5	0.28	0.31	0.33
b		7.5 : 1.5 : 1	-	-	-

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่เกิดการแยก

จากการวิเคราะห์สารสกัดแอนโทไซยานินในตัวทำละลาย 0.2% HCl ใน methanol เมื่อเปรียบเทียบการแยกแถบของสารสกัดแอนโทไซยานิน ระยะที่พบสารแอนโทไซยานินแยกได้ ดังรูปที่ 9 และตารางที่ 5 เมื่อคำนวณหา ค่า R_f ของสารสกัดแอนโทไซยานินในตัวทำละลาย 0.2% HCl ใน methanol พบว่าในอัตราส่วน 7 : 1.5 : 1.5 มีระยะทางการเคลื่อนที่ของสาร (R_f) คือ 0.28, 0.31 และ 0.33

ผลจากการทำให้สารแอนโทไซยานินในตัวทำละลาย 0.2% HCl ใน methanol บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ sephadexgel C18 (sep-pak C18) ที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ตามลำดับ การชะด้วยตัวทำละลายและทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค Thin-layer chromatography พบว่าสารที่ของตัวชะที่ดีที่สุด คือ 0.01% HCl ใน methanol มีสารแอนโทไซยานินละลายอยู่และมีความบริสุทธิ์มากขึ้นเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับสารสกัดก่อนผ่านคอลัมน์ ดังแสดงในรูปที่ 10

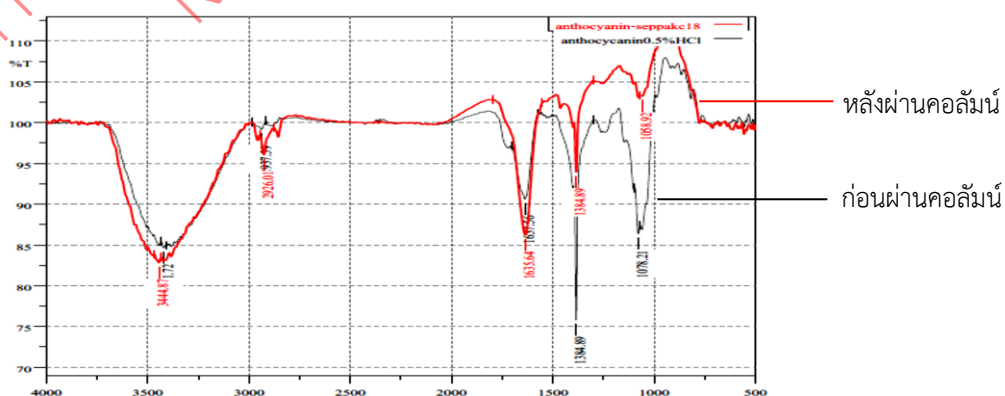


รูปที่ 10 ผล TLC สารสกัดก่อนผ่านคอลัมน์เปรียบเทียบกับหลังผ่านคอลัมน์

ผลจากการศึกษาหมู่ฟังก์ชันนัลกรุปของแอนโทไซยานินจากสารสกัดในตัวทำละลาย 0.2% HCl ใน methanol ด้วยเครื่อง FT-IR spectroscopy

ตารางที่ 6 Wave number (cm^{-1}) and functional groups

Wave number (cm^{-1})	functional groups
1053.64	Phenol
1331.53	phenol + methyl
1632.57	cyclic or conjugate (aromatic)
2937.06	aldehyde
3401.43	hydroxyl group



รูปที่ 11 FTIR สเปกตรัมของแอนโทไซยานินจากสารสกัดในตัวทำละลาย 0.2% HCl ใน methanol ก่อนผ่านคอลัมน์เปรียบเทียบกับหลังผ่านคอลัมน์



FTIR สเปกตรัมของแอนโทไซยานินจากสารสกัดก่อนผ่านคอลัมน์ พบว่ามีหมู่ของฟีนอลที่เลขคลื่น 1078.21 cm^{-1} พบหมู่เมทอกซิลเกาะกับฟีนอลที่เลขคลื่น 1384.89 cm^{-1} พบวงอะโรมาติกที่เลขคลื่น 1637.56 cm^{-1} พบหมู่แอลดีไฮด์ที่เลขคลื่น 2937.59 cm^{-1} และพบหมู่ไฮดรอกซิลที่ เลขคลื่น 3421.72 cm^{-1} และ (ซึ่งตรงตามเอกสารอ้างอิง สุวิชา, 2550)จาก FTIR สเปกตรัมของแอนโทไซยานินจากสารสกัดในตัวทำละลายหลังผ่านคอลัมน์ พบว่ามีหมู่ของฟีนอลที่เลขคลื่น 1058.92 cm^{-1} พบหมู่เมทอกซิลเกาะกับฟีนอลที่เลขคลื่น 1384.89 cm^{-1} พบวงอะโรมาติกที่เลขคลื่น 1635.64 cm^{-1} พบหมู่แอลดีไฮด์ที่เลขคลื่น 2936.01 cm^{-1} และพบหมู่ไฮดรอกซิลที่เลขคลื่น 3444.87 cm^{-1}

อภิปรายผล

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดและหาปริมาณทั้งหมดของแอนโทไซยานินจากบ๊วย พบว่าการสกัดสารแอนโทไซยานินจากบ๊วยโดยใช้สารละลาย 0.2% HCl ใน methanol เป็นสารละลายสกัด อัตราส่วนตัวอย่างบ๊วย : สารละลายสกัด 1 : 4 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ค่า pH 1.90 มีค่าความยาวคลื่นเท่ากับ 514 นาโนเมตร (Qin และ Li, 2008) เป็นสภาวะการสกัดที่ดีที่สุดในการทดลองนี้เพราะให้ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด 126.91 mg/L ซึ่งสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดที่ได้จากการสกัดด้วยสารละลาย methanol และ 0.7% HCl ใน methanol เนื่องจากปัจจัยในการสกัดสารแอนโทไซยานิน ที่ตัวทำละลายต่างกันมีค่า pH ที่ต่างกันมีผลทำให้เกิดการแทนที่ในโครงสร้างและชนิดของสารแอนโทไซยานินต่างกัน (สุวิชา, 2550) ในการสกัดสารแอนโทไซยานินควรอยู่ในสภาวะที่เป็นกรดแอนโทไซยานินจะอยู่ในรูป flavylum salt ในการสกัดด้วย 0.2% HCl ใน methanol (Santos-Buelga และ Williamson, 2003) มีความเป็นไปได้ว่าหมู่เมทอกซิล (-OMe) จะไปแทนที่ในโครงสร้างแอนโทไซยานินที่ตำแหน่ง 3' และ 5' ในวง B-ring ทำให้แอนโทไซยานินมีความเสถียรสูงขึ้นและเมื่อนำสารสกัดแอนโทไซยานินที่ได้จาก 0.5% HCl ใน methanol มาผ่านคอลัมน์ sep-pak C18 ที่มีความสามารถในการแยกสารแอนโทไซยานินจึงทำให้สารแอนโทไซยานินมีความบริสุทธิ์มากขึ้นเนื่องจากสารที่ปนมากับสารสกัดแอนโทไซยานินจะถูกออกไปด้วยตัวชะ 0.01% HCl ในน้ำ เพื่อชะสารจำพวกน้ำตาล และไขมัน ตามด้วยเอทิลอะซิเตตเพื่อชะสารโพลีฟีนอลอื่นๆและสุดท้ายชะด้วย 0.01% HCl ในเมทานอล เพื่อชะสารแอนโทไซยานินออกจากคอลัมน์

เอกสารอ้างอิง

- สุวิชา ดิหะสิงห์. (2550). การสกัดและการทำให้สารแอนโทไซยานินในลูกหว่าบรีสุทธ์, วิชาวิทยาศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- 10 สรรพคุณ...ประโยชน์ของบ๊วย ผักรั้วสุขภาพ สดสมสารด้านอนุมูลอิสระ. (2017). Online]. Available: <https://sukkapap-d.com/10-สรรพคุณ-ประโยชน์ของบ๊วย/>. [2561, ธันวาคม 3]
- AOAC Official Method. (2005.02). Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines pH Differential Method
- Mazza, G.J. (2007). Anthocyanins and heart health. *Ann. Ist. Super. Sanita* 43: 369-374.
- Min-Kyoung Kim, & Han-ah Kim. (2008). Identification and quantification of anthocyanin pigments in colored rice, 2(1), 46-49.
- Qin, & Yang Li. (2008). Composition analysis and structural identification of anthocyanins in fruit of waxberry. *Czech J. Food Sci.*, 29: 171-180.



รายงานสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 5
สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร

Santos-Buelga, & Williamson. (2003). **Methods in polyphenol analysis**. Royal Society of Chemistry, Cambridge

The 5th Kamphaeng Phet Rajabhat University
National Conference