รายงานสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 5
สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร

การหาปริมาณแอนโทไซยานินและศึกษาสภาวะของ pH ต่อความเสถียรในข้าวไรซ์เบอร์รี่
Determination of Anthocyanin and Study the pH on Stability of Rice berry

ศศิประภา ฤทธิ์เต็ม[1] ศิรประภา มีรอด[2]
Sasiprapha Rittem[1] and Siraprapa Meerod[2]

[1]นักศึกษาโปรแกรมวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร
[2]อาจารย์ประจำโปรแกรมวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร

บทคัดย่อ

การหาปริมาณสารสกัดแอนโทไซยานินในข้าวไรซ์เบอรรี่โดยวิธีพีเอชดิฟเฟอเรนเชียลร่วมกับอัลตร้าไวโอเลตวิซิเบิล สเปกโทรโฟโทเมทรีภายใต้สภาวะที่เหมาะสม พบว่า pH 1-8 ปรากฏสารสกัดที่มีสีแดงหลังจากนั้นเริ่มเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำเงินที่ pH สูงกว่า 8 และทำให้ค่าความยาวคลื่นสูงสุดเปลี่ยนไปทางด้านที่มีค่าความยาวคลื่นมากขึ้น ปริมาณแอนโทไซยานินในสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่เจือจาง 1:10 เท่าโดยปริมาตรในส่วนผสมของ สารละลายกรดกับเอทานอล เมื่อคำนวณอ้างอิงกับเพลาร์โกนิดิน และ ไซยานิดิน จะมีค่า 422.18 (mg/L) และ 224.35 (mg/L) ตามลำดับ

คำสำคัญ: แอนโทไซยานิน / ความเสถียร / ข้าวไรซ์เบอร์รี่ / วิธีพีเอชดิฟเฟอเรนเชียล

Abstract

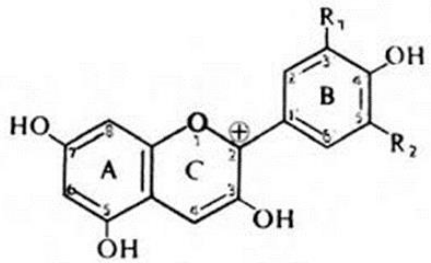
The determination of anthocyanins extraction in rice berry by pH-differential method associated with an ultraviolet-visible spectrophotometry under optimum conditions was carried out. It was found that the effect of pH on anthocyanin was inevitably found at pH range of 1 to 8 with a deep red color, when pH of the solution was increased above 8 the blue one appeared with the red shift of its maximum wavelength. The contents of anthocyanins extraction was diluted in the ratio of 1 : 10 (v/ v) in the presence of acidic methanol could be accomplished with respect to both pelargonidin and cyanidin standards. Based on pelargonidin and cyanidin, the total anthocyanin contents were 422.18 (mg/L) and 224.35 (mg/L) respectively.

Key words: Anthocyanin / stability / Rice berry / pH-Differential method

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันสารแอนโทไซยานินได้รับจากความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากมีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาที่หลากหลาย ได้แก่ เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ช่วยต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ลดอาการอักเสบ ลดคอเลสเตอรอล และต้านไวรัส ทำให้มีการนำสารชนิดนี้มาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมที่เกี่ยวกับสุขภาพและความงามมากขึ้น เพราะดีต่อสุขภาพ ด้วยสีม่วงอมดำจาก “แอนโทไซยานิน (Anthocyanins)” สารสีจากธรรมชาติ (pigment) ซึ่งพืชสังเคราะห์สารชนิดนี้ขึ้นมาเพื่อช่วยป้องกันตัวเองจากรังสียูวี อากาศหนาว และความแห้งแล้ง นอกจากจะช่วยให้พืชมีสุขภาพแข็งแรงแล้ว ยังมีประโยชน์ต่อร่างกายมนุษย์อีกด้วย (Malee, 2561)

The 5th Kamphaeng Phet Rajabhat University National Conference



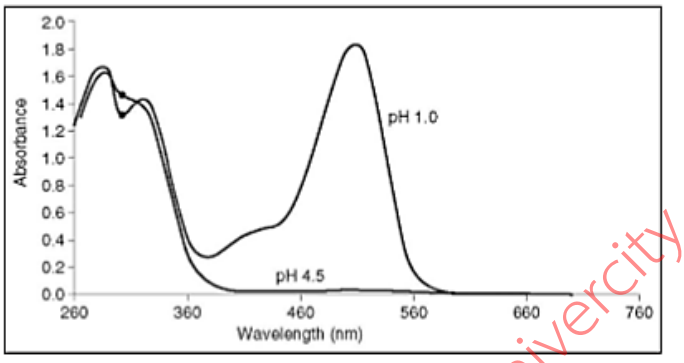
Anthocyanidins	ตำแหน่ง R1	ตำแหน่ง R2
Pelargonidin	H	H
Cyanidin	H	OH
Delphinidin	OH	OH
Peonidin	OCH_3	H
Petunidin	OCH_3	OH
Malvidin	OCH_3	OCH_3

ภาพที่ 1 แสดงโครงสร้างทางเคมีของแอนโทไซยานิดิน (อรุษา เชาวนลิขิต, 2554)

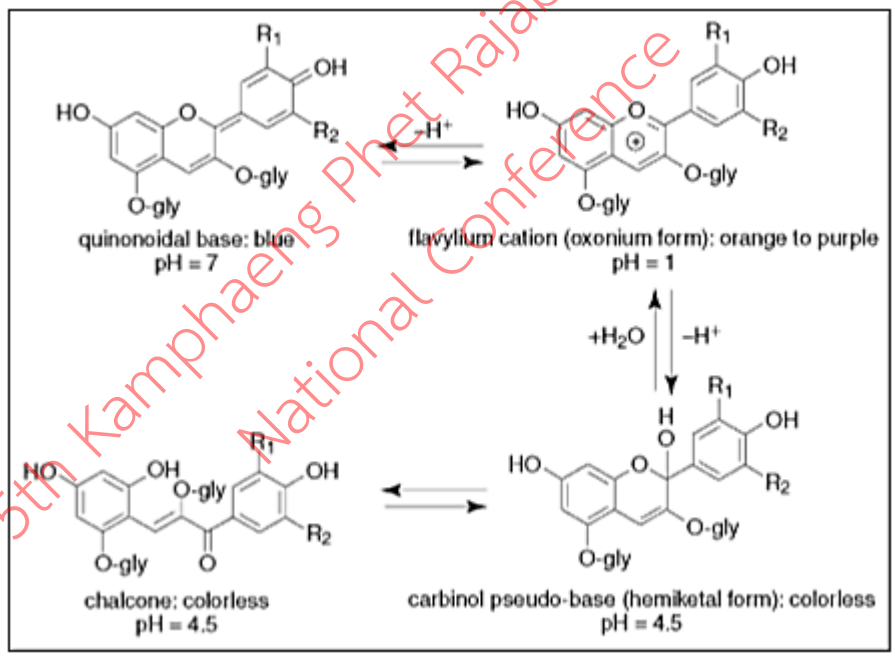
แหล่งของแอนโทไซยานินจากธรรมชาติพบได้มากในผัก และผลไม้ที่มีสีน้ำเงิน สีแดง และ สีม่วง เช่น กะหล่ำปลีม่วง มันเทศสีม่วง ชมพู่มะเหมี่ยว ชมพู่แดง ลูกหว้า ข้าวแดง ข้าวนิล ข้าวเหนียวดำ ถั่วแดง ถั่วดำ หอมแดง ดอกอัญชัน เผือก หอมหัวใหญ่สีม่วง มะเขือม่วง พริกแดง องุ่นแดง-ม่วง แอปเปิ้ลแดง ลูกไหน ลูกพรุน ลูกเกด บลูเบอรี่ เชอรี่ แบล็กเบอรี่ ราสเบอรี่ สตรอเบอรี่ เป็นต้น แอนโทไซยานินเป็นสารประกอบในกลุ่มฟลาโวนอยด์ โครงสร้างของแอนโทไซยานิน ประกอบด้วย แอนโทไซยานิดิน (anthocyanidin) หรืออะไกลโคนกับน้ำตาลและแอซิล (acyl group) ซึ่งส่วนนี้จะมีหรือไม่มีก็ได้ แอนโทไซยานิดินมีโครงสร้างที่ประกอบด้วยวงแหวนอะโรมาติก (A) ต่อกันกับวงแหวนเฮเทอโรไซคลิก (C) และมีวงแหวนอะโรมาติกหรืออาจเป็นหมู่ของ เมทอกซิล (methoxyl ,-OCH_3) และไฮดรอกซิล (hydroxyl, -OH) มาต่ออีก 1 วง (B) แอนโทไซยานิดิน หรืออะไกลโคน(Aglycone) มีโครงสร้างพื้นฐานประกอบด้วยคาร์บอนเชื่อมต่อกันในรูป C-6-C-3-C-6 เชื่อมต่อกัน ซึ่งแอนโทไซยานิดินที่พบมากในปัจจุบันจะมีอยู่ 6 ชนิด คือ เพลาโกนิดินไซยานิดิน เดลฟินิดิน พีโอนิดิน เพทูนิดิน และมอลวิดิน (อรุษา เชาวนลิขิต, 2554)

แอนโทไซยานินละลายได้ดีในน้ำ ไม่เสถียร สลายตัวได้ง่ายด้วยความร้อน ออกซิเจน แสง เมื่อโครงสร้างเปลี่ยนแปลงไป สีจะเปลี่ยนไปด้วย ปัจจัยที่มีผลต่อสีของแอนโทไซยานิน ได้แก่ ความเป็นกรดเป็นด่าง เมื่อ pH เป็นกรดจะมีสีแดง เมื่อ pH สูงขึ้นจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน ปัจจัยที่มีผลต่อความเสถียรของแอนโทไซยานิน พบว่าปัจจัยทางเคมีและฟิสิกส์ที่เกี่ยวข้องกับการสลายตัวของแอนโทไซยานินมีผลต่อความเสถียรของแอนโทไซยานินมากที่สุดได้แก่ อุณหภูมิ แสง ความเป็นกรดด่าง ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ โลหะ น้ำตาลและออกซิเจน รวมทั้งความเข้มข้นโครงสร้างเคมีและองค์ประกอบของแอนโทไซยานิน (สินีนาฏ ภูมีศรี และ.ศักดิ์สิทธิ์ จันทร์ไทย, 2558) ดังเช่นงานวิจัย Giusti และ Wrolstad ศึกษาผลของ pH ต่อสารสกัดแอนโทไซยานินจากหัวแรดิช (Radish) เมื่อปรับ pH ให้เป็น 1 และนำไปศึกษาค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นระหว่าง 260-700 นาโนเมตร พบว่า แอนโทไซยานินดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นระหว่าง 460-560 นาโนเมตร และเมื่อปรับ pH ให้เป็น 4.5 การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นดังกล่าวหายไป ดังภาพที่ 2 เนื่องจากที่ pH 1 โครงสร้างของแอนโทไซยานนิจะอยู่ในรูปออกโซเนียม (Oxonium form) ซึ่งมีสี และที่ pH 4.5 โครงสร้างแอนโทไซยานิน จะอยู่ในรูปเฮมิคีทอล (Hemiketal form) ซึ่งไม่มีสี (รูปที่ 3) ในขณะที่ถ้าในตัวอย่างมีสารอื่นๆ ที่ ดูดกลืนแสงช่วงเดียวกับแอนโทไซยานิน เมื่อเปลี่ยน pH เป็น 4.5 ค่าการดูดกลืนแสงของสารอื่นๆ จะเท่าเดิมในขณะที่ค่าการดูดกลืนแสงของแอนโทไซยานินจะหายไป (Giusti, M.M.; & Wrolstad, R.E., 2001)

The 5th Kamphaeng Phet Rajabhat University National Conference



ภาพที่ 2 อัลตราไวโอเลตวิสิเบิลสเปกตรัมของแอนโทไซยานินจากหัวแรดิช (Radish) ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 1.0 และ 4.5 (Giusti, M.M.; & Wrolstad, R.E., 2001)



ภาพที่ 3 โครงสร้างของแอนโทไซยานินในรูปออกโซเนียม (Oxonium form) และ เฮมิคีทอล (Hemiketal form) (Giusti, M.M.; & Wrolstad, R.E., 2001)

การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินวิธีพีเอช-ดิฟเฟอเรนเชียลเป็นวิธีที่ พัฒนาจากการที่โครงสร้างของแอนโทไซยานิน เปลี่ยนแปลงไปได้ตามการเปลี่ยนแปลงค่า pH การวัดด้วยวิธีนี้จะต้องวัดค่าการดูดกลืนแสงของแอนโทไซยานินความยาวคลื่นสูงสุดที่ pH 1 และ 4.5 นำมาหักลบกันเพื่อกำจัดการดูดกลืนแสงจากสารอื่นๆ ที่ไม่ใช่แอนโทไซยานิน และการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร เพื่อหักลบค่าความขุ่นที่อาจเกิดขึ้น เพื่อให้ผลที่ได้ มีความถูกต้องและแม่นยำมากขึ้น (อรุษา เชาวนลิขิต, 2554)

The 5th Kamphaeng Phet Rajabhat University National Conference

การหาปริมาณแอนโทไซยานินด้วยวิธีพีเอช-ดิฟเฟอเรนเชียล

ดังสมการ (A x MW x DF x 1000) / (ε x L)

โดย A = $(A_{520} - A_{700})_{pH\ 1.0} - (A_{520} - A_{700})_{pH\ 4.5}$

MW = ค่ามวลโมเลกุลของไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ 499.2 กรัมต่อโมล, ค่ามวลโมเลกุลของเพลาร์โกนิดิน-3-กลูโคไซด์ 306.7 กรัมต่อโมล (*ให้เลือกใช้ว่าจะหาแอนโทไซยานินชนิดไหน)

DF = dilution factor (การทำให้เจือจางมีค่า100)

ε = โมลาร์แอบซอบติวิตี้ ค่านี้จะขึ้นกับชนิดของแอนโทไซยานิน และตัวทำละลาย โดยทั่วไปมักใช้ค่าของไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ และ เพลาร์โกนิดิน-3- กลูโคไซด์ ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 1.0 มีค่าเท่ากับค่าของไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ 26,900 ลิตรต่อโมลต่อเซนติเมตร และเพลาร์โกนิดิน -3- กลูโคไซด์ 31,100 ลิตรต่อโมลต่อเซนติเมตร

l = ขนาดความกว้างของคิวเวต (เซนติเมตร) ที่ใช้วัดค่าดูดกลืนแสง

ข้อควรระวังของวิธีพีเอช-ดิฟเฟอเรนเชียล คือ ควรมีการตรวจสอบ pH ของสารละลายบัฟเฟอร์ ก่อนใช้เพราะการที่ pH สูงหรือต่ำกว่ามาตรฐาน จะทำให้การวัดปริมาณแอนโทไซยานินไม่ถูกต้อง การเจือจางตัวอย่างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์โดยใช้ปริมาตรตัวอย่างที่มากเกินไปอาจทำให้สารละลายบัฟเฟอร์ไม่สามารถในการต้านทานการเปลี่ยนแปลง pH ได้ จึงควรใช้ตัวอย่างไม่เกิน 20% ของปริมาตรทั้งหมด การวัดค่าการดูดกลืนแสงควรวัดหลังจากเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ เป็นเวลา 15-60 นาที การทิ้งตัวอย่างไว้นานเกินไป ไปจะทำให้ค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มมากขึ้น

ข้าวไรซ์เบอร์รี่เป็นข้าวเจ้าสายพันธุ์ใหม่ ที่มีสีม่วงเข้มซึ่งเป็นข้าวที่เกิดจากการปรับปรุงพันธุ์โดยการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างข้าวเจ้าหอมนิลกับข้าวขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งข้าวไรซ์เบอร์รี่จะมีสารแอนโทไซยานินและสารโพลีฟีนอลสูง ซึ่งเป็นสารต้าน อนุมูลอิสระและมีฤทธิ์สูงกว่าวิตามินซีและอีถึง 2 เท่า สารต้านอนุมูลอิสระสามารถจับกับอนุมูลอิสระภายในร่างกาย ทำให้การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลอิสระกับโมเลกุลอื่นๆ ทำให้เซลล์ต่างๆภายในร่างกาย ไม่ถูกทำลาย ในทางอุตสาหกรรมเครื่องสำอางมักนิยมใช้สารต้านอนุมูลอิสระ มีทั้งที่มาจากการสังเคราะห์และจากธรรมชาติ (วชิราภรณ์ ภักดี, 2558)

ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการศึกษาหาปริมาณของแอนโทไซยานินชนิดไซยานิดินและเพลาร์โกนิดินในข้าวไรซ์เบอร์รี่ โดยวิธีพีเอช – ดิฟเฟอเรนเชียล และศึกษาสภาวะของ pH ที่มีผลต่อความเสถียรของแอนโทไซยานินที่ค่า pH ต่างๆโดยใช้เทคนิคสเปกโทรโฟโตเมทรี

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินจากข้าวไรซ์เบอร์รี่ โดยวิธีพีเอช – ดิฟเฟอเรนเชียล (pH – differential method) ร่วมกับเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมทรี
2. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของ pH ที่มีต่อความเสถียรของแอนโทไซยานินชนิดไซยานิดินและเพลาร์โกนิดินในข้าวไรซ์เบอร์รี่

ขอบเขตการวิจัย

งานวิจัยนี้ใช้รูปแบบเชิงทดลอง (Experimental research) โดยศึกษาการสกัดสารแอนโทไซยานินในข้าวไรซ์เบอร์รี่โดยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายน้ำต่อเอทานอล หาปริมาณของแอนโทไซยานินชนิดไซยานิดินและเพลาร์โกนิดินโดยวิธีพีเอช – ดิฟเฟอเรนเชียล และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของ pH ที่มีต่อความเสถียรของแอนโทไซยานินในข้าวไรซ์เบอร์รี่

The 5th Kamphaengphet Rajabhat University National Conference

วิธีดำเนินงานวิจัย

การเตรียมตัวอย่างข้าวไรซ์เบอร์รี่

นำข้าวไรซ์เบอร์รี่ มาปั่นด้วยเครื่องปั่นแล้วบดต่อให้ละเอียดด้วยโกร่ง จากนั้นใช้ตะแกรงร่อน ร่อนข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่บดไว้

การสกัดแอนโทไซยานินในข้าวไรซ์เบอร์รี่

นำผงข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่บดละเอียด 50 กรัม มาสกัดด้วยตัวทำละลายในอัตราส่วนผงข้าวไรซ์เบอรรี่ต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1:10 (w/v) โดยตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด คือ 0.1 % ไฮโดรคลอริกในเอทานอล (1:100 (v/v)) จากนั้นทำการเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้มากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วนำไปประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary evaporation ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และ นำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส จะได้สารสกัดที่มีลักษณะข้นเหนียวถึงของแข็งและมีสีม่วงดำ เก็บสารสกัดที่ได้ในตู้เย็นก่อนนำไปทดสอบ

ยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV–Visible)

วิเคราะห์สเปกตรัมของสารสกัดจากข้าวไรซ์เบอร์รี่ นำสารสกัดที่ได้จากข้อ 2 ไปเจือจางด้วยตัวทำละลาย 0.1 % ไฮโดรคลอริกในเอทานอล (1:100 (v/v)) ในอัตราส่วนของสารสกัดต่อตัวทำละลาย 1:100 มิลลิลิตร เพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) และหาความยาวคลื่นสูงสุด (λ_{max}) โดยศึกษาความยาวคลื่นในช่วง 400 - 700 nm

การวิเคราะห์หาปริมาณแอนโทไซยานิน (Total Anthocyanin Content หรือ TAC)

การวิเคราะห์หาปริมาณแอนโทไซยานินรวมของสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่โดยใช้วิธีพีเอช-ดิฟเฟอเรนเชียล (pH-Differential method) ดัดแปลงจากวิธีของ (Wrolstad,1976) โดยนำสารละลายของสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ มาเจือจางด้วย สารละลาย KCl buffer pH 1.0 ในอัตราส่วนสารสกัดต่อตัวทำละลาย 1: 100 และสารละลาย CH_3COONa buffer pH 4.5 ในอัตราส่วนสารสกัดต่อตัวทำละลาย 1: 100 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 520 nm และ 700 nm แสดงผล เป็นค่ามิลลิกรัมของแอนโทไซยานินรวมต่อลิตรของสารละลาย

การหาปริมาณแอนโทไซยานินด้วยวิธีพีเอช-ดิฟเฟอเรนเชียล

ดังสมการ $(A \times MW \times DF \times 1000) / (\varepsilon \times L)$

โดย A $= (A_{520} - A_{700})_{pH\ 1.0} - (A_{520} - A_{700})_{pH\ 4.5}$

MW = ค่ามวลโมเลกุลของไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ 499.2 กรัมต่อโมล, ค่ามวลโมเลกุลของเพลาร์โกนิดิน-3-กลูโคไซด์ 306.7 กรัมต่อโมล (*ให้เลือกใช้ว่าจะหาแอนโทไซยานินชนิดไหน)

DF = dilution factor (การทำให้เจือจางมีค่า100)

ε = โมลาร์แอบซอบติวิตี้ ค่านี้จะขึ้นกับชนิดของแอนโทไซยานิน และตัวทำละลาย โดยทั่วไปมักใช้ค่าของไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ และ เพลาร์โกนิดิน-3- กลูโคไซด์ ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 1.0 มีค่าเท่ากับค่าของไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ 26,900 ลิตรต่อโมลต่อเซนติเมตร และเพลาร์โกนิดิน -3- กลูโคไซด์ 31,100 ลิตรต่อโมลต่อเซนติเมตร

l = ขนาดความกว้างของคิวเวต (เซนติเมตร) ที่ใช้วัดค่าดูดกลืนแสง

The 5th Kamphaeng Phet Rajabhat University National Conference

สภาวะ pH ที่มีผลต่อความเสถียรของแอนโทไซยานินในข้าวไรซ์เบอร์รี่

เตรียมตัวอย่างสารสกัดแอนโทไซยานิน โดยเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ pH 1-14 ในอัตราส่วนสารสกัดจากข้าวไรซ์เบอร์รี่ต่อสารละลายบัฟเฟอร์ 1:50 (v/v) นำไปวัดค่าหาความยาวคลื่นสูงสุด (λ_{max}) และสังเกตสีที่เปลี่ยนไปของตัวอย่าง

สรุปผลการวิจัย

การวิเคราะห์หาปริมาณแอนโทไซยานินรวมของสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่โดยใช้วิธีพีเอช-ดิฟเฟอเรนเชียล (pH-Differential method)

จากการสกัดสารแอนโทไซยานินจากข้าวไรซ์เบอร์รี่ด้วยตัวทำละลายในอัตราส่วนสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1:10 (w/v) โดยตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด คือ 0.1 % ไฮโดรคลอริกในเอทานอล (1:100 (v/v)) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาหาปริมาณไซยานิดินและเพลาร์โกนิดินด้วยวิธีพีเอช-ดิฟเฟอเรนเชียล (pH-Differential method) พบว่ามีปริมาณไซยานิดินและเพลาร์โกนิดินเท่ากับ 422.18 (mg/L) และ 224.35 (mg/L) ตามลำดับดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณแอนโทไซยานินรวมที่สกัดได้จากข้าวไรซ์เบอร์รี่ด้วยตัวทำละลาย 0.1 % ไฮโดรคลอริกในเอทานอล (1:100 (v/v)) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ชนิดของแอนโทไซยานิน	ปริมาณแอนโทไซยานิน (mg/L)
ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์	422.18
เพลาร์โกนิดิน-3-กลูโคไซด์	224.35

การศึกษาสภาวะ pH ที่มีผลต่อความเสถียรของแอนโทไซยานินในข้าวไรซ์เบอร์รี่

จากผลการทดลองโดยนำสารสกัดแอนโทไซยานินมาเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ pH 1-14 ในอัตราส่วนสารสกัดจากข้าวไรซ์เบอร์รี่ต่อสารละลายบัฟเฟอร์ 1:50 (V/V) นำไปวัดค่าการดูดกลืนสูงสุดและค่าความยาวคลื่นสูงสุดดังตารางที่ 2 พบว่า เมื่อค่า pH สูงขึ้น การดูดกลืนแสงสูงสุดเคลื่อนไปในทิศทางที่สูงขึ้น เนื่องจากที่ pH1 มีความเป็นกรดสูงทำให้โครงสร้างของแอนโทไซยานินอยู่ในรูปออกโซเนียม (Oxonium form) ซึ่งมีสีแดง จะมีความเสถียรมากกว่าเกิดการดูดกลืนแสงได้มากแสดงถึงปริมาณของแอนโทไซยานินที่มาก เมื่อ pH สูงขึ้นความเป็นกรดลดลงจะเกิดการเปลี่ยนอยู่ในรูปเฮมิคีทอล (Hemiketal form) ซึ่งจะเป็นโครงสร้างของแอนโทไซยานินที่ไม่มีสี ส่งผลให้ปริมาณแอนโทไซยานิน และความเป็นสีแดงของสารลดลง

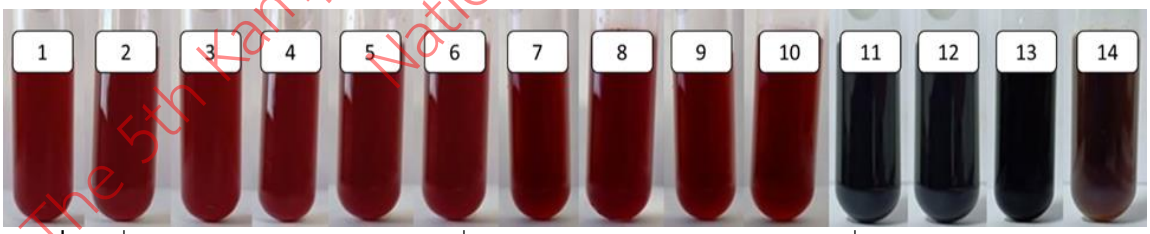
จากการสังเกตสีที่เปลี่ยนไปของสารสกัดแอนโทไซยานินจากข้าวไรซ์เบอรร์รี่ ดังรูปที่ 4 พบว่าในช่วง pH 1-8 แอนโทไซยานินจะปรากฏสีแดงเนื่องจากสีของแอนโทไซยานินจะเปลี่ยนแปลงไปตามสภาวะความเป็นกรด-ด่าง ในสภาพที่เป็นกรดมีค่าพีเอช (pH) ต่ำกว่า 3 (เป็นกรดสูง) จะทำให้แอนโทไซยานินมีสีแดง ในสภาพที่ค่อนข้างเป็นกลาง หรือมีค่า pHประมาณ 7-8 แอนโทไซยานินจะเริ่มมีสีม่วง และเมื่อสภาพเป็นเบสหรือมีค่าพีเอชมากกว่า 11 (เป็นเบสสูง) แอนโทไซยานินจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน ในขณะที่ pH 12 – 14 เกิดการจางของสีแอนโทไซยานินอย่างรวดเร็ว ซึ่งเกิดจากการรีโซแนนซ์ของประจุบวกของไอออนฟลาไวเลียมทำให้ pH มีผลต่อคุณสมบัติของแอนโทไซยานินด้วย

The 5th Kamphaeng Phet Rajabhat University National Conference

ตารางที่ 2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุดและสีที่ปรากฏให้เห็นของแอนโทไซยานินที่ pH 1-14 ของสารสกัดแอนโทไซยานินที่เจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 1:50 (V/V)

pH	λ_{max} (nm)		สี
	Band I	Band II	
1	270	515	แดง
2	269	514	แดง
3	270	514	แดง
4	268	515	แดง
5	268	515	แดง
6	268	515	แดง
7	269	516	แดงอมน้ำเงิน
8	268	515	แดงอมน้ำเงิน
9	269	515	แดงอมน้ำเงิน
10	267	515	น้ำเงินอมแดง
11	-	584	น้ำเงิน
12	212	570	น้ำเงิน
13	215	-	เขียว
14	-	717	น้ำตาล

* สีจางลงอย่างรวดเร็ว



ภาพที่ 4 สีที่ปรากฏให้เห็นของแอนโทไซยานินที่ pH 1-14 ของสารสกัดแอนโทไซยานินที่เจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 1:50 (V/V)

อภิปรายผลการวิจัย

การหาปริมาณแอนโทไซยานินด้วยวิธีพีเอช-ดิฟเฟอเรนเชียล (pH-Differential method) ร่วมกับเทคนิคสเปกโทรโฟโททรีนั้นเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว และมีความน่าเชื่อถือค่อนข้างสูง เมื่อคำนวณเทียบสารระหว่างไซยานิดินกับเพลาร์โกนิดิน จะพบว่าปริมาณของสารไซยานิดินมีปริมาณที่สูง นอกจากนี้การศึกษา pH พบว่าสารสกัดที่สกัดจากข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่ช่วง pH 1-8 จะปรากฏสีแดงและเมื่อ pH สูงขึ้นจะปรากฏเป็นสีน้ำเงิน แสดงว่าค่า pH สูงขึ้นจะส่งผลต่อความเสถียรของแอนโทไซยานิน ซึ่งแอนโทไซยานินจะมีความเสถียรในสภาวะเป็นกรดมากกว่าในสภาวะที่เป็นเบส

The 5th Kamphaeng Phet Rajabhat Univercity National Conference

ข้อเสนอแนะ

1. การหาผลการทดลอง pH ควรเตรียมตัวอย่างแล้ววัดทันทีเนื่องจากแอนโทไซยานินสลายตัวเร็วทำให้ผลที่ได้เกิดการคลาดเคลื่อน
2. สามารถนำผลสภาวะของ pH ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการหาความเสถียรของแอนโทไซยานินได้

เอกสารอ้างอิง

วชิราภรณ์ ภักดี. (2558). **การพัฒนาสารสกัดจากข้าวไรซ์เบอร์รี่เพื่อเป็นสารต้านอนุมูล.** สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสาอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง.

สินีนาฏ ภูมีศรี และดร.ศักดิ์สิทธิ์ จันทร์ไทย. (2558). **การหาปริมาณแอนโทไซยานินและผลของไอออนอะลูมิเนียมต่อเสถียรภาพของน้ำเม่า.** วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น

อรุษา เชาวนลิขิต. (2554). **การสกัดและวิธีการวิเคราะห์แอนโทไซยานิน.** คณะเทคโนโลยีและนวัตกรรมผลิตภัณฑ์การเกษตร มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

Giusti, M.M.; & Wrolstad, R.E. (2001). Characterization and measurement of anthocyanins by UV-Visible spectroscopy. **Current protocols in food analytical chemistry.**

Malee. (ม.ป.ป). **แอนโทไซยานิน สารอาหารตัวจี๊ด พิชิตมะเร็งร้าย.** [ออนไลน์]. Available: http://www2.malee.co.th/fruit_expert.[ตุลาคม 1,2561].

The 5th Kamphaeng Phet Rajabhat University National Conference