



การสกัดแยกหาปริมาณแอนโทไซยานินจากลูกมะม่วงหาว มะนาวโห่ Extraction and Separation of Anthocyanins from *Carissa carandas* L.

สุภาพร ฟักเงิน¹ และศิริประภา มีรอด²
Suphaphon Fakngoen¹ and Sirapapa Meerod²

¹นักศึกษาโปรแกรมวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร
²อาจารย์ประจำโปรแกรมวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร

บทคัดย่อ

การสกัดปริมาณแอนโทไซยานินในมะม่วงหาว มะนาวโห่ระยะผลสุกงอม (มีสีม่วงเข้ม) ด้วย 0.1 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ไฮโดรคลอริกในเมทานอล ที่อัตราส่วน 1:5 ของมะม่วงหาว มะนาวโห่ต่อสารละลายสกัดระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดเท่ากับ 24 36 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ วิเคราะห์หาปริมาณแอนโทไซยานินด้วยวิธีพีเอชดีฟเฟอเรนเชียล และวิเคราะห์โครงสร้างสารสกัดแอนโทไซยานินที่สกัดได้กับสารแอนโทไซยานินมาตรฐานด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้แก่ อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี และยูวีวิสเปกโตรโฟโตเมทรี จากผลการศึกษาพบว่าที่ความเข้มข้นของสารละลาย 1.0 เปอร์เซ็นต์ไฮโดรคลอริกในเมทานอล ระยะเวลาการสกัด 48 ชั่วโมง ให้ผลการสกัดที่ดีที่สุด ได้สารประกอบแอนโทไซยานินชนิด ไซยานิดิน 181.66 มิลลิกรัมต่อ 50 กรัม และเพลาโกรีนิดิน 157.13 มิลลิกรัมต่อ 50 กรัม น้ำหนักแห้งของมะม่วงหาวมะนาวโห่ ตามลำดับ การตรวจสอบสารสกัดแอนโทไซยานินทั้งสองชนิดด้วยเทคนิคทางสเปกโตรโฟโตเมทรี พบว่าสารสกัดมีความยาวคลื่นสูงสุด (λ_{max}) ที่ 530 nm และมีหมู่ฟังก์ชันที่สอดคล้องกับสารแอนโทไซยานินมาตรฐาน

คำสำคัญ: แอนโทไซยานิน/ การสกัด/ มะม่วงหาวมะนาวโห่/ วิธีพีเอชดีฟเฟอเรนเชียล/ สเปกโตรสโกปี

Abstract

Anthocyanin extracts from mature of *Carissa carandas* was extracted with 0.1, 0.5 and 1 % HCl in MeOH at 1:5 ratio of *C. carandas* and solvent in 24, 36 and 48 hours, respectively. The pH differential technique was used for determined the amount of anthocyanin from extracts and characterizations the extracts by spectroscopy technique such as IR and UV-VIS. The optimum condition for anthocyanin extraction was 1 % HCl in MeOH, at 48 hours. The anthocyanin extract was containing 181.66 mg of cyanidin-3-glucosides and 157.13 mg of pelargonidin-3-glucosides, respectively. The wavelength (λ_{max}) of anthocyanin extract was showed at 530 nm and the functional groups of the extract corresponded to anthocyanin standard.

Key words: Anthocyanin/ Extracts/ *Carissa carandas* L./ pH-Differential/ Spectroscopy

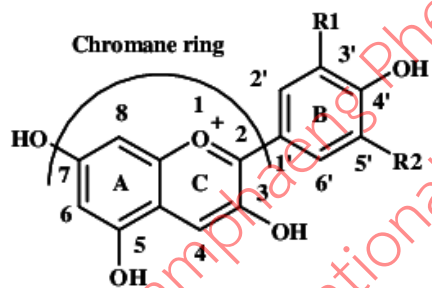
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

มะม่วงหาว มะนาวโห่ หรือ หนามแดง (*Carissa carandas* Linn.) จัดอยู่ในวงศ์ตีนเป็ด (Apocynaceae) พันธุ์ไม้เนื้อแข็ง มีถิ่นกำเนิดในทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เรียกชื่อผลไม้ชนิดนี้ว่า ผลไม้ชนิดนี้ให้รสคล้ายกับผลไม้ในวรรณคดีไทย เรื่องนางสิบสอง ตอน พระรถเมรี ในเรื่องได้กล่าวถึงผลไม้ชนิดหนึ่ง มีรสชาติเปรี้ยวจัด จนทำให้ผู้ที่กำลังง่วงนอน เมื่อรับประทานผลไม้ชนิดนี้เข้าไปแล้วทำให้รู้สึกกระชุ่มกระชวยและตื่นตัวขึ้นมาทันที จัดเป็นผลไม้ท้องถิ่นที่หารสเปรี้ยวมาก และจะออกรสหวานเล็กน้อยหากผลสุกจัดเป็นสีม่วงดำ ผลของมะม่วงหาว มะนาวโห่ ถือได้ว่าให้สรรพคุณทางยาในหลายด้าน โดยเฉพาะเปลือกและเนื้อที่เต็มไปด้วยสารแอนโทไซยานินจำนวนมาก อุดมไปด้วยวิตามิน และแร่ธาตุอื่น ๆ อีกหลายชนิด ซึ่งสารเหล่านี้มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ดีจึงมีประโยชน์ต่อร่างกายหลายด้าน อาทิ ช่วยต้านเซลล์มะเร็ง ช่วยป้องกันการเสื่อมสภาพของเซลล์ ผิวพรรณแลดูเต่งตึง ช่วยเสริมสร้างการทำงานของสมอง ช่วยกระตุ้นการทำงานของระบบประสาท ทำให้ตื่นตัวอยู่เสมอ และช่วยลดไขมันใน

เส้นเลือด เป็นต้น ส่วนอื่นๆของมะม่วงหาว มะนาวโห่ เช่น ใบ เปลือก แก่นไม้ และราก ยังมีสรรพคุณทางยาอีกหลายด้าน

แอนโทไซยานิน (anthocyanins) จัดอยู่ในกลุ่มสารประกอบฟีนอล (phenolic compounds) กลุ่มพอลิฟีนอล (polyphenol) โดยสีของแอนโทไซยานินเป็นสารสีที่พบได้ทั่วไปในดอกไม้ ผลไม้บางชนิด ใบหรือลำต้นของพืชบางชนิดที่มีสีตั้งแต่สีแดงถึงน้ำเงินเข้ม โดยสีของแอนโทไซยานินจะเปลี่ยนแปลงไปตามสภาวะความเป็นกรด-ด่าง ในสภาพที่เป็นกรดมีค่าพีเอช (pH) ต่ำกว่า 3 (เป็นกรดสูง) จะทำให้แอนโทไซยานินมีสีแดง ในสภาพที่ค่อนข้างเป็นกลาง หรือมีค่าพีเอชประมาณ 7-8 แอนโทไซยานินจะมีสีม่วง และเมื่อสภาพเป็นเบสหรือมีค่าพีเอชมากกว่า 11 (เป็นเบสสูง) แอนโทไซยานินจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน ซึ่งเกิดจากการรีโชนแนซของประจุบวกของไอออนฟลาโวนิลเลียมทำให้พีเอชมีผลต่อคุณสมบัติของแอนโทไซยานินด้วย หลักการวัดผลต่างๆของการดูดกลืนแสงที่พีเอชต่างกันจึงนำมาใช้เป็นวิธีการวิเคราะห์ปริมาณรวมของสารแอนโทไซยานินที่เป็นที่ยอมรับตามมาตรฐานสากล และได้รับการพิสูจน์ว่าไม่แตกต่างจากการวิเคราะห์หอยวิธีอื่น เช่น HPLC

ปัจจัยที่มีผลต่อสีและความเสถียรของแอนโทไซยานินคือปัจจัยทางเคมีและฟิสิกส์ เช่น โครงสร้าง อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง กรดแอสคอร์บิก น้ำตาล และปัจจัยอื่นๆ แอนโทไซยานินมีโครงสร้างเป็น แบบ C6-C3-C6 ซึ่งเป็นไกลโคไซด์ของ 2-phenylbenzopyrylium หรือ flavylium cation ที่มีด้วยกันหลายชนิด แต่มีอยู่ 6 ชนิดเท่านั้นที่พบบ่อย ได้แก่ pelargonidin, cyanidin, delphinidin, peonidin, petunidin และ malvidin (Anderson, 2006)



Aglycone	R1	R2
Cyanidin (Cy)	OH	H
Peonidin (Pn)	OCH ₃	H
Pelargonidin (Pg)	H	H
Malvidin (Mv)	OCH ₃	OCH ₃
Delphinidin (Dp)	OH	OH
Petunidin (Pt)	OCH ₃	OH

ภาพที่ 1 แสดงโครงสร้างทางเคมีของแอนโทไซยานินและตารางแสดงการแทนที่ของหมู่ฟังก์ชันในแอนโทไซยานินชนิดต่างๆ

(ที่มา: Jing et al., 2007)

นอกจากนี้คุณสมบัติเด่นของแอนโทไซยานินมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่า วิตามินซีและวิตามินอีถึง 2 เท่าช่วยลดการเกิดมะเร็งและช่วยเสริมให้สุขภาพร่างกายแข็งแรง ต่อต้านเชื้อโรคได้ดี เสริมภูมิคุ้มกันให้ร่างกาย และเสริมการทำงานของเม็ดเลือดแดงได้ดีขึ้น (ศศิธร อุดชาชน และศักดิ์สิทธิ์ จันทร์ไทย, 2558)

ดังนั้น ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาหาปริมาณแอนโทไซยานินในมะม่วงหาว มะนาวโห่ ซึ่งใช้การสกัดด้วยตัวทำละลายที่มีความเข้มข้น และเวลาที่ใช้ในการสกัดต่างกัน และยืนยันผลการทดลองโดยใช้วิธีพีเอชดีฟเฟอเรนเชียล เทคนิคอินฟราเรดสเปกโตรสโคปีและยูวีสเปกโตรโฟโตเมทรี ทำให้ทราบปริมาณสารแอนโทไซยานินที่สกัดได้ที่แน่นอนต่อน้ำหนักมะม่วงหาว มะนาวโห่ เพื่อเป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อยอดงานวิจัยไปสู่ข้อมูลทางเภสัช และรวมทั้งเพิ่มมูลค่าของมะม่วงหาว มะนาวโห่ในอนาคต

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาหาสารสกัดที่มีประสิทธิภาพในการสกัดสารแอนโทไซยานินด้วย 0.1, 0.5, และ 1.0% ไฮโดรคลอริกในเมทานอลในมะม่วงหาว มะนาวโห่ และระยะเวลาที่ 24, 36 และ 48 ชั่วโมง
2. เพื่อศึกษาปริมาณแอนโทไซยานิน และผลของพีเอชต่อความคงตัวของแอนโทไซยานินที่สกัดได้ด้วยวิธีเอชดีฟเฟอเรนเชียล



3. เพื่อศึกษาโครงสร้างของสารสกัดเพื่อเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของแอนโทไซยานินด้วยเทคนิค Fourier-transform infrared spectroscopy

ขอบเขตของโครงการวิจัย

สกัดแอนโทไซยานินจากลูกมะม่วงหาว มะนาวโห่ ด้วยตัวทำละลาย 3 ความเข้มข้น คือ 0.1, 0.5, 1.0 % ไฮโดรคลอริกในเมทานอลโดยใช้เวลาในการสกัด 24, 36 และ 48 ชั่วโมง

วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมตัวอย่างลูกมะม่วงหาว มะนาวโห่

นำลูกมะม่วงหาว มะนาวโห่หั่นเป็นชิ้นเล็กๆแล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 60 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นให้ละเอียด

2. การเตรียมสารละลายสกัด

สารละลายสกัดที่ใช้ มี 3 ชนิด คือ 0.1, 0.5, 1.0 % ไฮโดรคลอริกในเมทานอล มีวิธีการเตรียม ดังนี้

2.1 สารละลาย 0.1 % ไฮโดรคลอริกในเมทานอล

ปิเปต HCl 0.25 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 250 มิลลิลิตร ด้วยเมทานอล (สารละลายสกัดที่ 1)

2.2 สารละลาย 0.5 % ไฮโดรคลอริกในเมทานอล

ปิเปต HCl 1.25 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 250 มิลลิลิตร ด้วยเมทานอล (สารละลายสกัดที่ 2)

2.3 สารละลาย 1.0 % ไฮโดรคลอริกในเมทานอล

ปิเปต HCl 2.50 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 250 มิลลิลิตร ด้วยเมทานอล (สารละลายสกัดที่ 3)

3. การสกัดแอนโทไซยานินในลูกมะม่วงหาว มะนาวโห่

นำตัวอย่างลูกมะม่วงหาว มะนาวโห่ที่อบแห้ง 50 กรัม ผสมกับสารละลายสกัดที่ 1 ปริมาตร 250 mL ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 mL จำนวน 1 ขวด หุ้มฟอยด์แล้วใส่ลงในเครื่องเขย่า (shaker) เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที สกัดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแยกกากมะม่วงหาว มะนาวโห่ ออกจากสารสกัด จากนั้นกรอง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ/สารละลายสกัด ทำการทดลองเช่นเดียวกันแต่เปลี่ยนเป็นสารละลายสกัดที่ 2 และ 3 และเปลี่ยนเวลาสกัดเป็น 36 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ จากนั้นนำสารสกัดไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง evaporator ที่ 39°C จนกว่าตัวทำละลายหมด และนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคพีเอชดีฟเฟอเรนเชียล อินฟราเรดสเปกโตรสโคปี และยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรี

4. ยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-Vis Spectrophotometer)

วิเคราะห์สเปกตรัมของสารสกัดจากตัวทำละลายสกัด 3 ความเข้มข้น จากนั้นนำสารสกัดที่ได้จากข้อ 3 ไปเจือจางในอัตราส่วน 1:100 มิลลิลิตร เพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) และหาความยาวคลื่นสูงสุด (λ_{max}) โดยศึกษาความยาวคลื่นในช่วง 400 - 700 nm

5. Anthocyanins test

ขั้นตอนนี้ทำโดยนำสารสกัดในเมทานอล จำนวน 1 มิลลิลิตร มาเติม ไฮดรอกลอริก 2 นอร์มอล 1 หยด ถ้ามีฟลาโวนอยด์จะให้สีแดง แล้วค่อยๆเติมแอมโมเนีย ทีทีเอส ทีละหยด และสังเกตการเปลี่ยนแปลง

การแปลผล : ถ้าสารตัวอย่างมีแอนโทไซยานินสีจะเปลี่ยนจากสีแดง เป็นสีน้ำเงิน



ภาพที่ 2 Anthocyanins test

6. การวิเคราะห์หาปริมาณแอนโทไซยานิน

การวิเคราะห์หาปริมาณแอนโทไซยานินรวมของสารสกัดมะม่วงหาว มะนาวโห่ ใช้วิธีพีเอช-ดิฟเฟอเรนเชียล (pH-Differential method) ดัดแปลงจากวิธีของ Wrolstad (1976) โดยนำสารละลายของสาร สกัดมะม่วงหาว มะนาวโห่ มาเจือจางด้วย สารละลาย KCl buffer pH 1.0 ในอัตราส่วน 1: 100 และสารละลาย CH_3COONa pH 4.5 ในอัตราส่วน 1: 100 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 520 nm และ 700 nm แสดงผล เป็นค่ามิลลิกรัมของแอนโทไซยานินรวมต่อลิตรของสารละลาย

การหาปริมาณแอนโทไซยานินด้วยวิธีพีเอช-ดิฟเฟอเรนเชียล

ตั้งสมการ

$$\text{Anthocyanin (mg/L)} = \frac{A \times \text{MW} \times \text{DF} \times 1000}{\epsilon \times l}$$

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

= (ค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่นสูงสุดของสารตัวอย่างที่ใส่สารละลายบัฟเฟอร์ pH 1.0 - ค่าการดูดกลืนที่ความยาว 700 นาโนเมตร ของสารตัวอย่างที่ใส่สารละลายบัฟเฟอร์ pH 1.0) - (ค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่นสูงสุดของสารตัวอย่างที่ใส่สารละลายบัฟเฟอร์ pH 4.5 - ค่าการดูดกลืนที่ความยาว 700 นาโนเมตร ของสารตัวอย่างที่ใส่สารละลายบัฟเฟอร์ pH 4.5)

MW = ค่ามวลโมเลกุลของไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ 499.2 กรัมต่อโมล, ค่ามวลโมเลกุลของเพลาริโกนิน ดิน-3-กลูโคไซด์ 306.7 กรัมต่อโมล

(*ให้เลือกใช้ว่าจะหาแอนโทไซยานินชนิดไหน)

DF = dilution factor (การทำให้เจือจางมีค่า 100)

ϵ = โมลาร์แอบซอร์บิตีวี่ ค่านี้จะขึ้นกับชนิดของแอนโทไซยานิน และตัวทำละลาย โดยทั่วไปมักใช้ค่าของไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ และเพลาริโกนิน-3- กลูโคไซด์ ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 1.0 มีค่าเท่ากับค่าของไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ 26,900 ลิตรต่อโมลต่อเซนติเมตร และเพลาริโกนิน-3- กลูโคไซด์ 31,100 ลิตรต่อโมลต่อเซนติเมตร

l = ขนาดความกว้างของคิวเวต (เซนติเมตร) ที่ใช้วัดค่าดูดกลืนแสง

ผลการวิจัย

1. การวิเคราะห์หาปริมาณสารแอนโทไซยานินด้วยวิธีพีเอช-ดิฟเฟอเรนเชียล และยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์

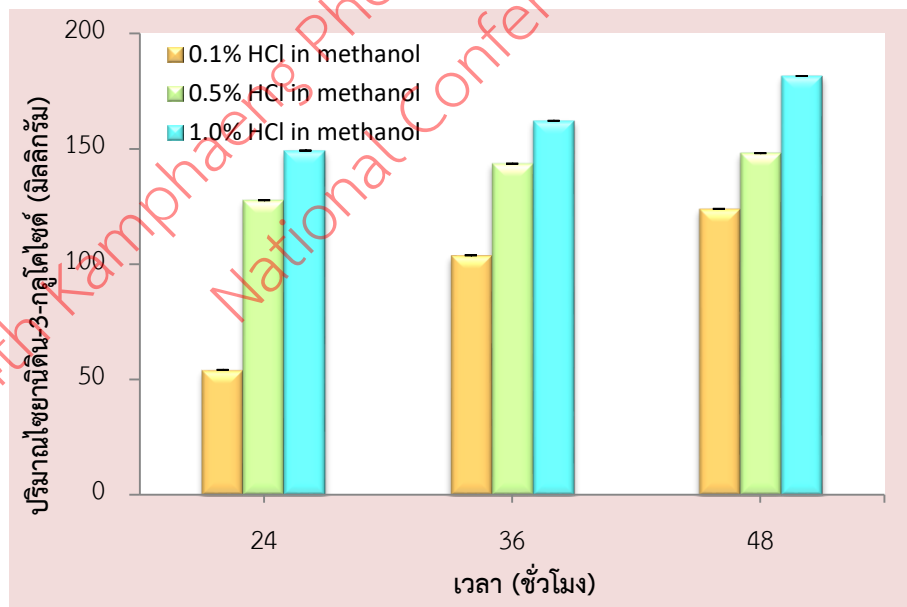
จากการศึกษา พบว่าสารละลายสกัดที่มีประสิทธิภาพในการสกัดสารแอนโทไซยานินรวมทั้งหมดในมะม่วงหาว มะนาวโห่ ด้วยตัวทำละลาย 3 ความเข้มข้น คือ 0.1, 0.5 และ 1.0% ไฮโดรอลอริกในเมทานอล มีสารสกัดแอนโทไซยานินรวมทั้งหมด ดังตารางที่ 1



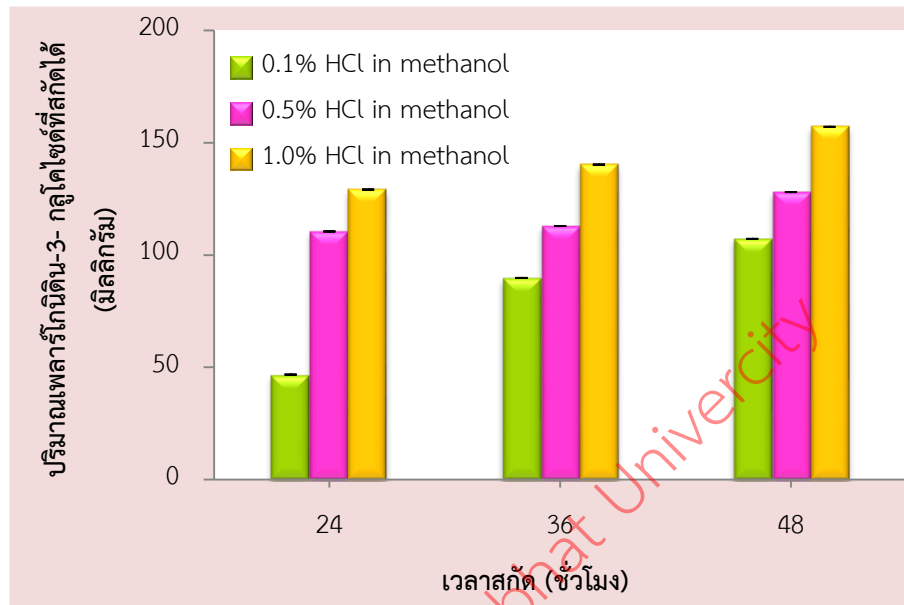
ตารางที่ 1 ค่าดูดกลืนแสง และปริมาณของแอนโทไซยานินที่สกัดได้จากตัวทำละลาย 3 ความเข้มข้น คือ 0.1, 0.5 และ 1.0% ไฮโดรคลอริกในเมทานอล เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ pH 1 และ pH 4.5 ในอัตราส่วน 1:100 มิลลิลิตร

ชนิดของตัวทำละลาย	เวลาสกัด (ชั่วโมง)	แอนโทไซยานินทั้งหมด	
		ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ (มิลลิกรัม/ลิตร)	เพลาโรโกนิน-3-กลูโคไซด์ (มิลลิกรัม/ลิตร)
1.0% ไฮโดรคลอริกในเมทานอล	24	54.15	46.83
	36	103.92	89.89
	48	123.95	107.21
0.5% ไฮโดรคลอริกในเมทานอล	24	127.68	110.43
	36	143.58	112.89
	48	148.07	128.07
1.0% ไฮโดรคลอริกในเมทานอล	24	149.31	129.15
	36	162.17	140.27
	48	181.66	157.13

*การหาปริมาณแอนโทไซยานินคำนวณได้จากสูตรวิธีฟเอช-ดีพีเฟอเรนเชียล



ภาพที่ 3 ปริมาณไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ในมะม่วงหาว มะนาวโห่ ที่สกัดได้จากตัวทำละลาย 3 ความเข้มข้น คือ 0.1, 0.5 และ 1.0% ไฮโดรคลอริกในเมทานอล ที่ใช้เวลาสกัด 24, 36 และ 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง นำไปเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 1 และ pH 4.5 ในที่อัตราส่วน 1:100 มิลลิลิตร



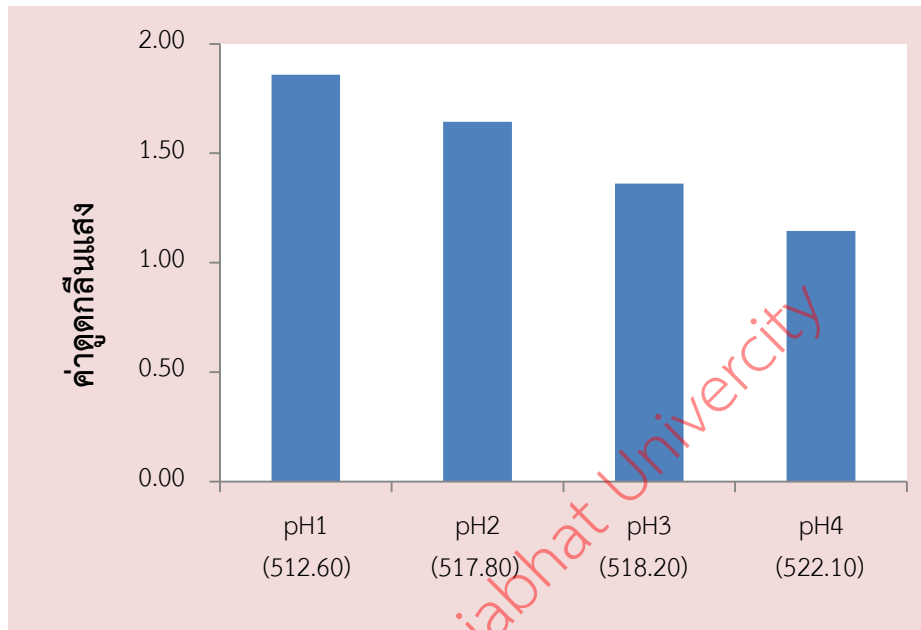
ภาพที่ 4 ปริมาณเพลาาร์โกนิติน-3- กลูโคไซด์ที่สกัดได้ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ในมะม่วงหาว มะนาวโห่ ที่สกัดได้จากตัวทำละลาย 3 ความเข้มข้น คือ 0.1, 0.5 และ 1.0% ไฮโดรคลอริกในเมทานอล ที่ใช้เวลาสกัด 24, 36 และ 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง นำไปเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 1 และ pH 4.5 ในอัตราส่วน 1:100 มิลลิลิตร

2. ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อความคงตัวของแอนโทไซยานินที่สกัดได้จากลูกมะม่วงหาว มะนาวโห่

จากผลการทดลองเลือกสภาวะในการสกัดที่เหมาะสม คือ ใช้ลูกมะม่วงหาว มะนาวโห่ นำไปสกัดโดยใช้อัตราส่วนของมะม่วงหาว มะนาวโห่ 50 กรัม ต่อตัวทำละลาย 1.0% ไฮโดรคลอริกในเมทานอลปริมาตร 250 มิลลิลิตร ทำการสกัดเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อนำไปศึกษาความคงตัวของแอนโทไซยานิน ผลการทดลองเป็นดังนี้

ผลของ pH ต่อความคงตัวของแอนโทไซยานินที่สกัดได้

จากทดลอง พบว่าค่าความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของแต่ละระดับของ pH ไม่เท่ากัน คือ ที่ระยะเวลาการเก็บ ที่ pH 1, 2, 3 และ 4 มีค่าเท่ากับ 512.60, 517.80, 518.20 และ 522.10 nm ตามลำดับ จึงวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ให้ค่าสูงสุดของแต่ละ pH ดังกล่าว พบว่า ที่ pH 1 จะมีค่าสูงที่สุด รองลงมาคือ pH 2 3 และ 4 ตามลำดับ ดังภาพที่ 5



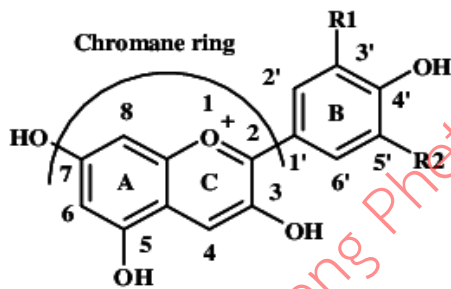
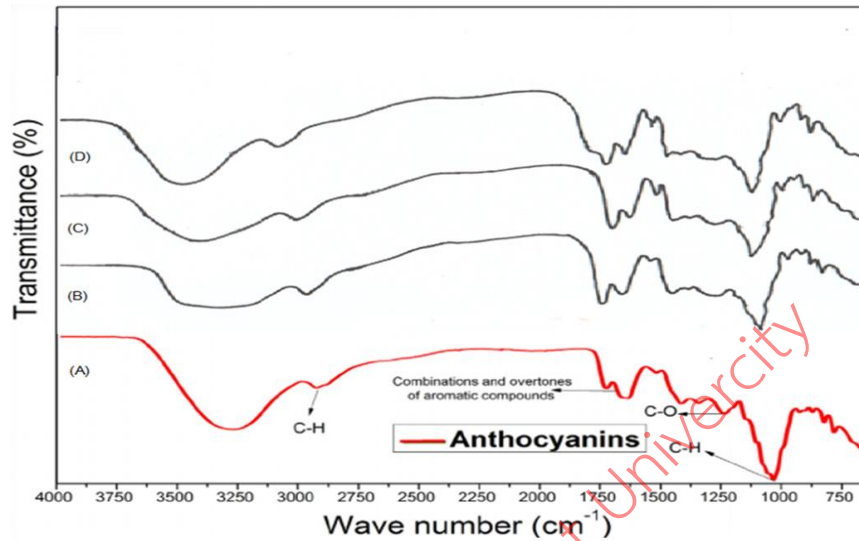
ภาพที่ 5 ค่าการดูดกลืนแสงของแอนโทไซยานินที่ pH ต่างๆ ณ วันที่ 0 (เริ่มต้นการเก็บ)

เมื่อพิจารณาจากรูปที่ 5 จะเห็นได้ว่า เมื่อ pH เพิ่มขึ้นความเป็นกรดจะลดลง และค่าดูดกลืนแสงของแอนโทไซยานินจะมีค่าลดลงแสดงให้เห็นว่าแอนโทไซยานินจะมีความคงตัวของสีแดงได้ดีในสภาวะที่เป็นกรด ทั้งนี้เนื่องจากแอนโทไซยานินอยู่ในสภาพสมดุลในสารละลายที่เป็นกรดมาก ซึ่งจะมี flavylium cation (red) อยู่เพียงชนิดเดียว เมื่อ pH สูงขึ้น ปริมาณ flavylium cation จะค่อยลดลงเนื่องจากการเกิด hydration ไปเป็น carbinol base ซึ่งไม่มีสี สมดุลระหว่างแอนโทไซยานินดังรูปที่ 5 อธิบายได้จากการที่ flavylium cation จะถูกเปลี่ยนรูปไปจนหมดโดยที่ flavylium cation และ quinoidal base จะเกิดสมดุลกันที่ $pK = 4.25$

ดังนั้น เมื่อแอนโทไซยานินอยู่ในสารละลายที่มี pH สูงกว่า 4.5 ขึ้นไป จึงมีเฉพาะโครงสร้างของ carbinol base และ chalcone ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ไม่มีสี ซึ่งเมื่อมีการเปลี่ยนรูปมาเป็น carbinol base และ chalcone จะส่งผลให้คุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระลดลงดังนั้นถ้าต้องการใช้แอนโทไซยานินเพื่อเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ควรคำนึงถึงค่า pH ด้วย (ยุพาพร ผลาขจรศักดิ์, 2547)

3. ผลวิเคราะห์แอนโทไซยานินด้วยเครื่องฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี

2.1 การหาฟังก์ชันต่างๆ จากการสกัดหยาบแอนโทไซยานินในมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่สกัดด้วยวิธีสกัดแบบแช่ เทียบกับสเปกตรัมมาตรฐานของแอนโทไซยานิน พบหมู่ฟังก์ชันของ OH ที่ตำแหน่ง 3400 cm^{-1} , C-H ที่ตำแหน่ง 2916 cm^{-1} , C=O stretching (aromatic) ที่ตำแหน่ง 1724 cm^{-1} , C=C วงเบนซีน ที่ตำแหน่ง 1629 cm^{-1}



Aglycone	R1	R2
Cyanidin (Cy)	OH	H
Peonidin (Pn)	OCH ₃	H
Pelargonidin (Pg)	H	H
Malvidin (Mv)	OCH ₃	OCH ₃
Delphinidin (Dp)	OH	OH
Petunidin (Pt)	OCH ₃	OH

ภาพที่ 6 สเปกตรัมสารสกัดหยาบแอนโทไซยานินในมะม่วงหาว มะนาวโห่ กับสเปกตรัมมาตรฐานของแอนโทไซยานิน (A) สเปกตรัมของสารสกัดแอนโทไซยานินสกัดที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง (B) สเปกตรัมของสารสกัดแอนโทไซยานินสกัดที่ระยะเวลา 36 ชั่วโมง (C) และสเปกตรัมของสารสกัดแอนโทไซยานินสกัดที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง (D)

สรุปผลและอภิปรายผล

จากการวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดจากลูกมะม่วงหาว มะนาวโห่ โดยวิธีพีเอช-ดีฟเฟอเรนเชียล ซึ่งเป็นวิธีที่เป็นที่นิยมสำหรับปัจจุบันในการหาปริมาณแอนโทไซยานิน แล้ววัดค่าดูดกลืนแสงด้วยยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ซึ่งเป็นเครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาการดูดกลืนแสงของสารในช่วงคลื่นอัลตราไวโอเล็ต และช่วงแสงที่มีสี กล่าวคือ สารแอนโทไซยานินตามโครงสร้างพื้นฐานแล้วเป็นสารที่มีสี

จากการวิเคราะห์หาปริมาณแอนโทไซยานิน ที่สภาวะต่างๆ ที่มีผลต่อปริมาณแอนโทไซยานิน คือ ตัวทำละลาย สภาวะเวลา และอัตราส่วนของตัวทำละลายที่ใช้สกัดแอนโทไซยานินจากมะม่วงหาว มะนาวโห่ ผลการวิจัยสรุปได้ดังนี้

จากภาพที่ 3 และ 4 แสดงผลการสกัดแอนโทไซยานิน 2 ชนิดคือ ไซยานิดิน และเพลาร์โกนิน จากมะม่วงหาว มะนาวโห่ที่น้ำหนักแห้ง 50 กรัม โดยการแช่ด้วยตัวทำละลาย 3 ความเข้มข้น คือ 0.1% 0.5% และ 1.0% ไฮโดรคลอริกในเมทานอล และใช้เทคนิคในการหาปริมาณแอนโทไซยานิน ด้วยวิธีพีเอช-ดีฟเฟอเรนเชียล พบว่า ปริมาณแอนโทไซยานินในมะม่วงหาว มะนาวโห่ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 1.0% ไฮโดรคลอริกในเมทานอล มีปริมาณสารแอนโทไซยานินมากที่สุด รองลงมาคือความเข้มข้น 0.5 และ 0.1% ไฮโดรคลอริกในเมทานอล ตามลำดับ สามารถสกัดสารแอนโทไซยานินได้มากที่สุดเนื่องจากความเข้มข้นของกรดส่งผลต่อ pH ของตัวทำละลายในการสกัด โดยที่กรดแก่จะมีคุณสมบัติในการย่อยผนังเซลล์สูง และทำให้ pH ของตัวทำละลายต่ำทำให้มีประสิทธิภาพในการสกัดสูงขึ้น นอกจากนี้เมทานอลมีขั้วต่ำ จึงทำให้สามารถทำลายผนังเซลล์ของพืชซึ่งส่วนใหญ่ซึ่งจะไม่มีขั้ว เมื่อผนังเซลล์แตกออกทำให้สารจำพวกฟีนอลลิกรวมถึงแอนโทไซยานินที่อยู่ภายในผนังเซลล์สามารถออกมาจากเซลล์ของ



เปลือก และเนื้อ ของมะม่วงหาว มะนาวโห่ละลายอยู่ในตัวทำละลายได้มากขึ้น และเมื่อเพิ่มเวลาที่ใช้ในการสกัดจาก 24, 36 และ 48 ชั่วโมง พบว่า เวลาในการสกัดมีผลต่อปริมาณสารแอนโทไซยานินที่สกัดได้ โดยเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นจะสามารถสกัดสารแอนโทไซยานินได้มากขึ้น

จากการศึกษาผลของ pH ที่มีผลต่อการเปลี่ยนสีของแอนโทไซยานินในลูกมะม่วงหาว มะนาวโห่ จากการศึกษาผลของ pH สังเกตได้จากภาพที่ 5 ของสารละลายของมะม่วงหาว มะนาวโห่ แอนโทไซยานินเป็นสารที่มีสี จึงมีการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงโดยเทคนิควิสัยวี-วิสิเบิลสเปกโตรสโคปี เมื่อมีการเปลี่ยนสีของแอนโทไซยานินในลูกมะม่วงหาว มะนาวโห่เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของค่า pH โดยกำหนดค่า pH ตั้งแต่ 1-4 ดังภาพที่ 5 พบว่า เมื่อค่า พีเอช สูงขึ้น การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเลื่อนจาก 512 นาโนเมตร ไปในทิศทางที่สูงขึ้น เนื่องจากที่ pH1 มีความเป็นกรดสูงทำให้โครงสร้างของแอนโทไซยานินอยู่ในรูปออกโซเนียม (Oxonium form) ซึ่งมีสีแดง จะมีความเสถียรมากกว่า เกิดการดูดกลืนแสงได้มากแสดงถึงปริมาณของแอนโทไซยานินที่มาก เมื่อ pH สูงขึ้นความเป็นกรดลดลงจะเกิดการเปลี่ยนอยู่ในรูปเฮมิคีทอล (Hemiketal form) (pH ประมาณ 4.5) ซึ่งจะเป็นโครงสร้างของแอนโทไซยานินที่ไม่มีสี ส่งผลให้ปริมาณแอนโทไซยานิน และความเป็นสีแดงของสารลดลงนอกจากนี้ ยังพบว่า ค่าการดูดกลืนแสงจะลดต่ำลงเมื่อใช้เวลานานในการสกัดมากขึ้นแสดงถึงปริมาณของแอนโทไซยานินที่ลดลงดังภาพที่ 4 (ศศิธร อุดชาชน และศักดิ์สิทธิ์ จันทร์ไทย, 2558.; ยูพาพร ผลาขจรศักดิ์, 2547)

หลังจากทำการสกัดสารแอนโทไซยานินจากมะม่วงหาว มะนาวโห่แห้งได้แล้วจึงนำสารสกัดมายืนยันผลการทดลองโดยใช้เทคนิคอินฟราเรดสเปกโตรสโคปี จากรูปที่ 6 ซึ่งเป็นสเปกตรัมมาตรฐานของแอนโทไซยานิน (A) พบหมู่ฟังก์ชันของ OH ที่ตำแหน่ง 3400 cm^{-1} , C-H ที่ตำแหน่ง 2916 cm^{-1} , C=O stretching (aromatic) ที่ตำแหน่ง 1724 cm^{-1} , C=C วงเบนซิน ที่ตำแหน่ง 1629 cm^{-1} เมื่อเทียบกับสเปกตรัมของแอนโทไซยานินที่สกัดได้ที่ระยะเวลา 24 (B) 36 (C) และ 48 (D) ชั่วโมง เทียบกับสเปกตรัมแอนโทไซยานินมาตรฐาน พบว่า มีลักษณะตำแหน่งตรงกับฟังก์ชันที่ตรงกัน ซึ่งยืนยันได้ว่าสารที่สกัดได้จากมะม่วงหาว มะนาวโห่เป็นแอนโทไซยานิน

ข้อเสนอแนะ

1. สารเคมีที่ใช้ในการทดลองเป็นสารมีพิษต่อสุขภาพ ในการทดลองควรระมัดระวัง และรอบคอบ
2. ช่วยป้องกันการท้าววิจัยซ้ำซ้อนกับคนอื่นที่วิจัยไปแล้ว
3. ช่วยให้ทราบผลงานวิจัยที่ผ่านมาที่เกี่ยวข้องกับเรื่องที่จะวิจัยว่ามีการศึกษากว้างขวางมากน้อยแค่ไหน ในแง่มุมใด ผลการวิจัยเป็นเช่นไร ซึ่งเป็นหลักฐานสำคัญที่จะนำมาประกอบเหตุผลในการตั้งสมมติฐานของผู้วิจัยและนำมาประกอบเหตุผลในการอภิปรายผลการวิจัย
4. เป็นแนวทางในการดำเนินการวิจัย เลือกตัวแปรที่จะศึกษา ออกแบบการวิจัย สร้างเครื่องมือ วิเคราะห์ข้อมูล แปลผล สรุปผลและเขียนรายงานการวิจัย
5. เป็นแนวทางในการพัฒนาคุณภาพของเรื่องที่จะวิจัย เพราะในการศึกษาเอกสารที่เกี่ยวข้องกับการวิจัยอย่างกว้างขวางจริงจึงจะช่วยให้เข้าใจในเรื่องที่จะศึกษาอย่างลุ่มลึก ในการศึกษาผลการวิจัยต่างๆ ทำการพิจารณาถึงจุดอ่อนและจุดดีของแต่ละเรื่อง แล้วหลีกเลี่ยงไม่ให้เกิดจุดอ่อนและเสริมสร้างจุดดีเหล่านั้นให้เกิดขึ้นในงานวิจัยของตน

เอกสารอ้างอิง

- ยูพาพร ผลาขจรศักดิ์. (2547). การสกัดและความคงตัวของแอนโทไซยานินที่สกัดได้จากเปลือกมังคุด. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- ศศิธร อุดชาชน และศักดิ์สิทธิ์ จันทร์ไทย. (2558). การหาปริมาณแอนโทไซยานินในน้ำเม่าโดยสเปกโทรฟลูออโรโฟโตเมทรี. วารสารวิจัย มข. (บศ.), 15(2), 39-47.
- Anderson, OM., & Markham, KR. (2006). *Flavonoids - Chemistry, Biochemistry and Applications*. New York: CRC Taylor & Francis Group. 508-515.
- Jing, P., Noriega, V., Schwartz, S.J. & Giusti, M.M. (2007). Effects of growing conditions on purple corn cob (*Zea mays* L.) anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(21), 8625-8629.



Wrolstad, R.E. (1976). **Color and pigment analyses in fruit products**. Oregon Agr: Expt. Sta. Bul. 624.

The 4th Kamphaeng Phet Rajabhat University
National Conference