บทที่ 3
ขั้นตอนการทดลอง

3.1 วัตถุดิบ

ใช้ดอกของต้นอัญชัน (*Clitoria ternatea* L.) เป็นวัตถุดิบในการทดลอง โดยใช้ดอกอัญชันสดและดอกอัญชันแห้ง สำหรับตัวอย่างดอกอัญชันสด คัดเฉพาะส่วนที่เป็นกลีบดอก ส่วนตัวอย่างดอกอัญชันแห้ง คัดเฉพาะส่วนที่เป็นกลีบดอกและตากแห้งโดยผึ่งแดดประมาณ 2 วัน เก็บในขวดแก้ว วิเคราะห์ความชื้นตามวิธีใน AOAC (1984-14.004)

เนื่องจากเอนไซม์ polyphenol oxidase (PPO) มีผลต่อการสลายตัวของแอนโธไซยานินส์ ดังนั้นทดสอบ PPO activity ของกลีบดอกอัญชัน (Kader และ Chordas, 1984) หยดสารละลาย catechol ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ใน citric acid-phosphate buffer pH 4.2 ปริมาณ 1 หยด ลงบนกลีบดอกอัญชันที่ผ่านการทุบให้ช้ำ ทิ้งไว้ 6 นาที สังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบกับกลีบดอกอัญชันสด ถ้ามีเอนไซม์ PPO จะเกิดสีน้ำตาลเข้ม

3.2 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการสกัดแอนโธไซยานินส์จากดอกอัญชัน

3.2.1 การสกัดแอนโธไซยานินส์จากดอกอัญชัน

ก. ขั้นตอนการสกัด ดัดแปลงจากวิธีของ Fuleki และ Francis (1968b)

เติมตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด 100 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างหนักประมาณ 1 กรัม (SW) ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน ปั่นใน Waring blender (Model 32B-L79, บริษัท Dynamics Corporation of America, USA.) ด้วยความเร็วสูงสุดนานประมาณ 1 นาที เทตัวอย่างลงใน Erlenmeyer flask และชะภาชนะที่ใช้ปั่นด้วยตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด 20 มิลลิลิตร ปิด flask ด้วยแผ่น parafilm ใช้เวลาในการสกัดนาน 30 นาที โดยเก็บไว้ในที่มืด หลังจากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 โดยอาศัยการ suction และล้างกากที่ได้ด้วยตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด 20 มิลลิลิตร วัดปริมาตรสารละลายทั้งหมดที่กรองได้ (TEV) ปิเปตสารละลายที่กรองได้ (SV) และเจือจางด้วยตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร (DV) เพื่อให้ค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.3-0.8 เก็บไว้ในที่มืดนาน 2 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดสมดุลของ forms ต่าง ๆ ของแอนโธไซยานินส์ จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (O.D.) ที่ความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดด้วยเครื่อง

spectrophotometer (Model UV-240, บริษัท Shimadzu, Japan)

คำนวณปริมาณแอนโธไซยานินส์ในสารละลายที่สกัดได้ตามสูตรที่ 1

$$TAcy = O.D. \times DV \times \frac{100}{SV} \times \frac{TEV}{SW} \times \frac{1}{E^{1\%}_{1cm}/10} \quad (1)$$

โดยที่

TAcy มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมแอนโธไซยานินส์ต่อ 100 กรัมดอกอัญชัน

$E^{1\%}_{1cm}$ คือค่า extinction coefficient ในที่นี้ใช้ค่า $E^{1\%}_{1cm}$ ของ delphinidin-3-glucoside ซึ่งมีค่าเท่ากับ 559 (ภาคผนวก) เนื่องจากแอนโธไซยานิดินส์ในดอกอัญชันคือ delphinidin

ข. ศึกษา absorption spectrum ของสารละลายสกัดดอกอัญชัน เปรียบเทียบ absorption spectrum ของสารละลายสกัดแอนโธไซยานินส์ที่ได้จากดอกอัญชันสดและแห้งโดยใช้น้ำกลั่นและสารละลายกรดเจือจางเป็นตัวทำละลายในการสกัดดังนี้ สกัดแอนโธไซยานินส์จากดอกอัญชันสดและแห้งด้วยวิธีการในข้อ ก. โดยใช้น้ำกลั่น (pH 6.2) และสารละลายกรด hydrochloric (HCl, A.R. grade) pH 4.2 เป็นตัวทำละลายในการสกัด หลังจากนั้นนำสารละลายที่สกัดได้ไป scan หา absorption spectrum ในช่วงความยาวคลื่น 350-650 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer และคำนวณปริมาณแอนโธไซยานินส์ที่สกัดได้ที่ความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด

3.2.2 ศึกษาผลของ pH ของตัวทำละลายในการสกัด

เลือกตัวทำละลายในการสกัดในช่วง pH 3.0-3.5 เนื่องจากสารละลายสกัดที่ได้มีสีม่วงน้ำเงิน สกัดแอนโธไซยานินส์จากดอกอัญชันแห้งด้วยวิธีการในข้อ 3.2.1 ก. โดยใช้สารละลาย standard buffer (ภาคผนวก) ในช่วง pH 3.0-5.5 6 ระดับ เป็นตัวทำละลายในการสกัด ดังนี้

สารละลาย acid phthalate buffer pH 3.0

สารละลาย acid phthalate buffer pH 3.5

สารละลาย acid phthalate buffer pH 4.0

สารละลาย neutralized phthalate buffer pH 4.5

สารละลาย neutralized phthalate buffer pH 5.0

สารละลาย neutralized phthalate buffer pH 5.5

วิเคราะห์และประเมินผลเพื่อเลือกระดับ pH ของตัวทำละลายในการสกัดที่ให้ปริมาณแอนโธไซยานินส์ในสารละลายสกัดสูงสุด โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) และทดลอง 3 ซ้ำ ร่วมกับเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

3.2.3 ศึกษาผลของชนิดตัวทำละลายในการสกัดและเวลาในการสกัด

สกัดแอนโธไซยานินส์จากดอกอัญชันแห้งด้วยวิธีการในข้อ 3.2.1 ก. โดยแปรชนิดตัวทำละลายในการสกัดที่ระดับ pH ที่คัดเลือกจากข้อ 3.2.2 5 ชนิด ดังนี้

สารละลายกรด hydrochloric (37 % HCl, A.R. grade, Mallinckrodt) pH 4.5
สารละลายกรด acetic (CH_3COOH, A.R. grade, AJAX chemicals) pH 4.5
สารละลายกรด formic (HCOOH, A.R. grade, Merck) pH 4.5
สารละลายกรด malic ($C_4H_6O_5$, purity 99.5 %, Merck) pH 4.5
สารละลายกรด citric ($C_6H_8O_7$, purity 99.5 %, Merck) pH 4.5

ตัวทำละลายในการสกัดที่ pH 4.5 เตรียมโดยปรับ pH ของน้ำกลั่นปริมาตร 2 ลิตร ให้เท่ากับ 4.5 ด้วยสารละลายกรดแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยปริมาตร และแปรเวลาในการสกัดในช่วง 0-150 นาที 6 ระดับ คือ 0 30 60 90 120 และ 150 นาที ตามลำดับ

จากนั้นเปรียบเทียบผลที่ได้กับการใช้น้ำกลั่น pH 6.2 เป็นตัวทำละลายในการสกัด วิเคราะห์และประเมินผลเพื่อเลือกตัวทำละลายในการสกัดและเวลาในการสกัดที่ให้ปริมาณแอนโธไซยานินส์ในสารละลายสกัดสูงสุด โดยวางแผนการทดลองแบบ Symmetric Factorial Design ขนาด 6x6 และทดลอง 2 ซ้ำ ร่วมกับพิจารณาเสถียรภาพของสารละลายสกัดเมื่อเวลาในการสกัดผ่านไป

3.2.4 ศึกษาผลของอัตราส่วนระหว่างตัวทำละลายในการสกัดกับปริมาณดอกอัญชันร่วมกับการเขย่าในระหว่างการสกัด

สกัดแอนโธไซยานินส์จากดอกอัญชันแห้งด้วยวิธีการในข้อ 3.2.1 ก. โดยใช้ตัวทำละลายที่ระดับ pH 4.5 และเวลาในการสกัดที่เลือกจากข้อ 3.2.3 แปรอัตราส่วนระหว่างตัวทำละลายในการสกัดกับปริมาณดอกอัญชันแห้ง 5 ระดับ คือ 120:1 120:2 120:3 120:4 และ 120:5 ตามลำดับ ร่วมกับการเขย่าและไม่เขย่าในระหว่างการสกัด

วิเคราะห์และประเมินผลเพื่อเลือกระดับที่ให้ปริมาณแอนโธไซยานินส์ในสารละลายสกัดในระดับสูงและปริมาณแอนโธไซยานินส์ที่เหลือในกากในระดับต่ำ โดยวางแผนการทดลองแบบ Asymmetric Factorial Design ขนาด 5x2 และทดลอง 2 ซ้ำ ร่วมกับเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

3.3 ศึกษาเสถียรภาพของสารละลายสกัดแอนโธไซยานินส์

3.3.1 การเตรียมสารละลายสกัดแอนโธไซยานินส์

เตรียมสารละลายสกัดแอนโธไซยานินส์จากดอกอัญชันแห้งด้วยวิธีการในข้อ 3.2.1 ก. โดยใช้ภาวะที่คัดเลือกจากข้อ 3.2 ดังนี้ ใช้สารละลายกรด HCl pH 4.5 เป็นตัวทำละลายในการสกัด โดยมีอัตราส่วนระหว่างตัวทำละลายในการสกัดกับปริมาณดอกอัญชันเท่ากับ 120:3 ใช้เวลาในการสกัด 73 นาที และมีการเขย่าในระหว่างการสกัดโดยใช้เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Model 2563, บริษัท Forma Scientific Marietta, Ohio, USA) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส กรองสารละลายที่สกัดได้ด้วยผ้ากรอง และนำไปปั่นแยกกากด้วยเครื่อง Refrigerated Centrifuge (Model Varifuge K, บริษัท Heraeus-Christ, West Germany) ที่ความเร็วรอบ 5,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที จากนั้นนำไป pasteurize ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ตามภาวะการ pasteurization เครื่องดื่มที่มีแอนโธไซยานินส์เป็นองค์ประกอบ (Bassa และ Francis, 1987) ด้วยเครื่อง pasteurizer (Model FT43B, บริษัท Armfield, UK)

วิเคราะห์ปริมาณแอนโธไซยานินส์ในสารละลายสกัดแอนโธไซยานินส์ก่อนและหลังการ pasteurization ด้วยวิธี pH differential (Fuleki และ Francis, 1968b) จากนั้นบรรจุสารละลายที่ผลิตได้ในขวดแก้วชนิดฝาเกลียวขนาด 35 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที โดยให้ระดับ headspace ของแต่ละภาชนะบรรจุเท่ากัน 2.0 มิลลิลิตร จากนั้นบรรจุในกล่องกระดาษเพื่อป้องกันแสงสว่าง และกลับขวดทุกวันตลอดระยะเวลาการเก็บเพื่อให้เกิดปฏิกิริยา oxidation อย่างสม่ำเสมอ

3.3.2 ผลของอุณหภูมิในการเก็บสารละลายสกัดแอนโธไซยานินส์

ศึกษาเสถียรภาพของสารละลายสกัดแอนโธไซยานินส์ที่อุณหภูมิการเก็บ 2 ระดับ คือ อุณหภูมิห้องเย็น ($4\pm1^{\circ}C$) และ อุณหภูมิห้อง ($30\pm1^{\circ}C$) โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD และทดลอง 2 ซ้ำ ร่วมกับการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test สุ่มตัวอย่างเพื่อนำมาวิเคราะห์ทุกสัปดาห์ วิเคราะห์และประเมินผล

เป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ ดังนี้

ก. ความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด

ข. ปริมาณแอนโธไซยานินส์ทั้งหมด (Fuleki และ Francis, 1968b) (ภาคผนวก)

ค. ปริมาณความเข้มของสีทั้งหมด (Total Colour Density, TCD) (Somers, 1971; Spayd และคณะ, 1984) (ภาคผนวก)

ง. ปริมาณสี polymeric (Polymeric Colour, PC) (Somers, 1971; Spayd และคณะ, 1984) (ภาคผนวก)

จ. วิเคราะห์ปริมาณเชื้อราและยีสต์ โดยใช้ Potato Dextrose Agar ทุก 5 สัปดาห์

3.3.3 ผลของวัตถุเจือปนอาหารในการรักษาเสถียรภาพของแอนโธไซยานินส์ในสารละลายสกัดแอนโธไซยานินส์

3.3.3.1 ผลของการใช้สาร glutathione (Fluka) 2 ระดับ ที่ปริมาณ 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อสารละลายสกัดแอนโธไซยานินส์ 100 มิลลิลิตร ร่วมกับการใช้ tartaric acid (Baker) 3 ระดับ ที่ปริมาณ 100 250 และ 400 มิลลิกรัมต่อสารละลายสกัด 100 มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับสารละลายสกัดแอนโธไซยานินส์ (control) โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD และทดลอง 2 ซ้ำ ร่วมกับการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test สุ่มตัวอย่างเพื่อนำมาวิเคราะห์ทุกสัปดาห์ วิเคราะห์และประเมินผลเป็นระยะเวลา 15 สัปดาห์ โดยติดตามผลเช่นเดียวกับข้อ 3.3.2

3.3.3.2 ผลของการใช้สารประกอบ phenolics 3 ชนิด คือ (+)-catechin (Fluka), rutin (Fluka) และ caffeic acid (Nacalai tesque) ชนิดละ 3 ระดับ ที่ปริมาณ 0 40 และ 80 มิลลิกรัมต่อสารละลายสกัด 100 มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับสารละลายสกัดแอนโธไซยานินส์ (control) โดยละลายสารประกอบ phenolics แต่ละชนิดในสารละลาย NaOH เข้มข้น 0.05 โมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร หลังจากนั้นจึงผสมในสารละลายสกัด วางแผนการทดลองแบบ CRD และทดลอง 2 ซ้ำ ร่วมกับการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test สุ่มตัวอย่างเพื่อนำมาวิเคราะห์ทุกสัปดาห์ วิเคราะห์และประเมินผลเป็นระยะเวลา 15 สัปดาห์ โดยติดตามผลเช่นเดียวกับข้อ 3.3.2