# บทที่ 2
# วารสารปริทัศน์

**ต้นอัญชัน** (Blue pea, Butterfly pea) (ปิฏฐะ บุนนาค, 2519)

ต้นอัญชัน (ภาษากลาง) แดงชัน หรือ เอื้องชัน (ภาษาเหนือ) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Clitoria ternatea L.* อยู่ในวงศ์ LEGUMINOSAE เป็นไม้เถาเลื้อยพันยึดเกี่ยว (grasper) โดยใช้ยอดพันแบบ twiner มีถิ่นเดิมในปานามา อินเดีย และหมู่เกาะโมลุกกะ เป็นพืชที่ขึ้นง่าย ขึ้นได้ดีในดินร่วน โตเร็ว ใบเป็นใบย่อยรูปไข่ ออกดอกตลอดปี ดอกเป็นดอกเดี่ยว มีสีครามแก่ ถึงน้ำเงินสด และสีขาว ดอกมีรูปร่างคล้ายฝาหอยเชลล์ กลีบดอกแบ่งเป็น 5 กลีบ กลีบบน ซึ่งดูคล้ายกลีบล่างจะใหญ่ สองกลีบข้างและสองกลีบล่างมักรวมตัวกันเป็นรูปท้องเรือ พอดอกโรย จะติดฝักมีลักษณะคล้ายฝักถั่ว ขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ด สำหรับการดูแลรักษาแทบไม่มีเพราะเป็นพันธุ์ไม้ที่นำมาปลูกในประเทศไทยนานแล้ว จนมีความต้านทานและเข้ากับสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติได้ดี

สีน้ำเงินที่สกัดจากดอกเกิดจากรงควัตถุแอนโธไซยานินส์ซึ่งใช้ผสมกับอาหารได้ เช่น ใส่ในขนมชั้น ขนมช่อม่วง ขนมเรไร ขนมขี้หนู ขนมลูกชุบ เป็นต้น

**การศึกษารงควัตถุแอนโธไซยานินส์ในดอกอัญชัน**

Lowry และ Chew (1974) ใช้สีน้ำเงินที่สกัดจากดอกอัญชันในรูปของสารละลายโดยบดดอกอัญชันตากแห้งในน้ำและกรอง เพื่อใช้เป็นสีผสมอาหารในขนมชนิดหนึ่งคือ "rice cake" แทนการใช้สีสังเคราะห์ พบว่าขนมที่ได้มีสีน้ำเงินสดเหมือนกับการใช้สีสังเคราะห์ และพบว่าสีที่สกัดได้คือรงควัตถุแอนโธไซยานินส์ และแอนโธไซยานินส์ที่พบเป็น glucosides ของ delphinidin

Saito และคณะ (1985) สกัดรงควัตถุแอนโธไซยานินส์จากดอกอัญชันโดยใช้สารละลาย ethanol ความเข้มข้นร้อยละ 80 เป็นตัวทำละลายในการสกัดและทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เรซิน Sephadex CH-20CC ก่อนและแยกอีกครั้งด้วย thin-layer chromatography (TLC) โดยใช้ cellulose เป็น stationary phase และใช้ระบบสารละลาย n-butanol-hydrochloric acid-water ในอัตราส่วน 7:2:5 โดยปริมาตรเป็น developing solvent พบว่าแอนโธไซยานินส์ในดอกอัญชันเป็น acylated anthocyanins ซึ่งได้แก่ ternatin A, B, C, D, E และ F โดย acylated anthocyanins แต่ละชนิดมี delphinidin 3,3′,5′-triglucoside

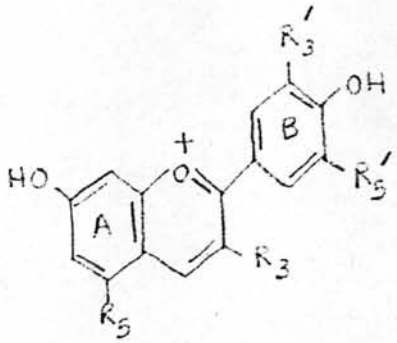
เป็นองค์ประกอบพื้นฐาน และถูก acylated ด้วยกรดต่างชนิดกัน จากการทำ acid hydrolysis พบกรด p-coumaric เป็นส่วนใหญ่ รองลงมาคือกรด caffeic และมีกรด ferulic เล็กน้อย

**แอนโธไซยานินส์ (Anthocyanins)**

แอนโธไซยานินส์มีรากศัพท์มาจากภาษากรีก คือ anthos หมายถึงดอกไม้ และ kyanos หมายถึงสีน้ำเงิน

แอนโธไซยานินส์เป็นสารประกอบในกลุ่ม flavonoids ซึ่งมีโครงสร้างหลักเป็น $C_6C_3C_6$ เป็นรงควัตถุที่ละลายอยู่ใน vacuole sap ในเซลล์ของพืช และมีบทบาทต่อสีในดอกไม้ ผลไม้ และ ใบไม้ หลายชนิด แอนโธไซยานินส์สามารถละลายได้ในน้ำแต่ไม่ละลายในตัวทำละลายประเภท non-hydroxyl เช่น acetone, benzene, chloroform, ether เป็นต้น

แอนโธไซยานินส์เป็นอนุพันธ์ polyhydroxy และ polymethoxy ของสาร flavylium หรือ 2-phenylbenzopyrylium โมเลกุลประกอบด้วยแอนโธไซยานิดินส์ที่เรียกว่า aglycone จับตัวกับน้ำตาลด้วยพันธะ β-glycosidic (รูปที่ 1.1) และมักจับที่คาร์บอนตำแหน่งที่สาม น้ำตาลที่จับกับแอนโธไซยานิดินส์อาจเป็น monosaccharide ได้แก่ glucose, rhamnose, galactose, xylose หรือ arabinose หรือพวก disaccharide หรือ trisaccharide โมเลกุลน้ำตาลมักถูก esterified ที่คาร์บอนตำแหน่งที่สามด้วยกรดอินทรีย์บางชนิด เช่น p-coumaric, caffeic และ ferulic ซึ่งจะช่วยให้แอนโธไซยานินส์ในพืชมีเสถียรภาพดีขึ้น




**Anthocyanidins :** $R_3$ = OH , $R_5$ = OH

| | $R_3'$ | $R_5'$ | Visible colour |
|---|---|---|---|
| Pelargonidin (Pg) | H | H | Red |
| Cyanidin (Cy) | OH | H | Magenta |
| Peonidin (Pn) | $OCH_3$ | H | Magenta |
| Delphinidin (Dp) | OH | OH | Purple |
| Petunidin (Pt) | $OCH_3$ | OH | Purple |
| Malvidin (Mv) | $OCH_3$ | $OCH_3$ | Purple |

**Anthocyanins :** Pg, Cy, Pn, Dp, Pt, Mv with $R_3$ , $R_5$

$R_3$ = O - sugar or O - acylated sugar

$R_5$ = OH or O - glucose

รูปที่ 1.1 โครงสร้างแอนโธไซยานิดินส์และแอนโธไซยานินส์ (Timberlake และ Bridle, 1980)

<u>การสกัดแอนโธไซยานินส์</u>

แอนโธไซยานินส์เป็นรงควัตถุจากธรรมชาติที่สามารถนำมาใช้เป็นสีผสมอาหารได้ การเลือกวัตถุดิบที่ใช้ในการสกัดมักพิจารณาเหตุผลทางด้านเศรษฐศาสตร์ เทคนิคการผลิต ดังนั้นวัตถุดิบที่เลือกใช้ควรสามารถหาได้ง่ายในปริมาณมาก และราคาไม่แพงนัก และสีที่สกัดได้ควรมีลักษณะและองค์ประกอบตรงตามกฎข้อบังคับ ดังนั้นพวก by product จากอุตสาหกรรมโดยเฉพาะอย่างยิ่งกากองุ่นจากอุตสาหกรรมไวน์จึงถูกพิจารณา แอนโธไซยานินส์ที่ผลิตจากกากองุ่นเรียกว่า enocyanin หรือ enocianina ซึ่งได้ผลิตในเชิงการค้าในประเทศอิตาลี ในราวปี ค.ศ. 1879 เพื่อจุดประสงค์ในการแต่งสีไวน์แดง (Markakis,1982) นอกจากนี้ยังมีวัตถุดิบอื่น ๆ ที่มีศักยภาพสามารถนำมาสกัดแอนโธไซยานินส์ได้ เช่น ผล cranberry ผล elderberry ผล miracle กลีบดอกกระเจี๊ยบแดง ดอกอัญชัน เป็นต้น

การผลิตสี ประกอบด้วยขั้นตอนสำคัญ คือ การสกัดแอนโธไซยานินส์ และการทำให้แอนโธไซยานินส์ที่สกัดได้เข้มข้นขึ้น บางครั้งอาจมีการทำแห้งด้วยวิธี spray dry (Main, Clydesdale และ Francis, 1978) หรือ freeze dry (Bronnum-Hansen และ Flink, 1986) เพื่อยืดอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์ให้นานขึ้น

ปัจจุบันสีแอนโธไซยานินส์ที่ผลิตในเชิงการค้ามี 2 ลักษณะ (Anonymous, n.d.) คือ

ก. ลักษณะผง ประชาคมเศรษฐกิจแห่งยุโรป (EEC) กำหนดให้มีรหัสสี E 163 ซึ่งมีลักษณะและสมบัติดังนี้

สกัดจากเปลือกองุ่นพันธุ์ *Vitis vinifevea* และผ่านกระบวนการทำแห้งด้วยวิธี spray dry ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลักษณะเป็นผงสีแดงเข้ม (dark maroon) สามารถละลายได้ดีในน้ำ และให้ค่า $E^{1\%}_{1cm,520nm}$ = 12.50 ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 3.2 แอนโธไซยานินส์ที่พบเป็นชนิดที่มีแอนโธไซยานิดินส์เป็น pelargonidin, cyanidin, peonidin, delphinidin, petunidin และ malvidin ในการผลิตอนุญาตให้ใช้ sulfur dioxide เป็นวัตถุกันเสียและกำหนดให้มีปริมาณตกค้างได้ไม่เกิน 50 ส่วนในหนึ่งล้านส่วน (ppm) และกำหนดปริมาณสารปนเปื้อนจากกระบวนการผลิตดังนี้

- ปริมาณตะกั่ว (คิดเป็น Pb) ไม่มากกว่า 20 ส่วนในหนึ่งล้านส่วน
- ปริมาณอาร์เซนิค (คิดเป็น As) ไม่มากกว่า 5 ส่วนในหนึ่งล้านส่วน
- ปริมาณทองแดง โครเมี่ยม สังกะสี ดีบุก และ แบเรียมซัลเฟต แต่ละชนิดไม่มากกว่า 100 ส่วนในหนึ่งล้านส่วน และปริมาณรวมไม่มากกว่า 200 ส่วนในหนึ่งล้านส่วน

ข. ลักษณะสารละลายเข้มข้น มีลักษณะและสมบัติดังนี้

สกัดจากเปลือกองุ่นพันธุ์ *Vitis vinifevea* และอนุญาตให้ใช้ propylene glycol เป็นวัตถุกันเสีย ผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นสารละลายสีม่วงแดง (dark purple red) มีกลิ่นรสเฉพาะตัว และให้ค่า $E^{1\%}_{1cm,520nm}$ = 3.0-3.5 ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 3.0 ผลิตภัณฑ์ที่ได้ใช้ในอุตสาหกรรมลูกกวาด แยม เยลลี่ ไอศกรีม เครื่องดื่มทั้งประเภทที่มีและไม่มี alcohol เป็นส่วนผสม ปริมาณการใช้ร้อยละ 0.1-0.4 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก มีอายุการใช้งานประมาณ 2 เดือน ควรเก็บในที่เย็นและแห้ง

แอนโธไซยานินส์เป็นรงควัตถุที่ละลายอยู่ในเซลล์พืช ดังนั้นในการสกัดจึงต้องทำลายเซลล์เมมเบรนเพื่อให้รงควัตถุภายในออกมา ปัจจัยที่สำคัญต่อการสกัดคือ ตัวทำละลายซึ่งมีผลต่อประสิทธิภาพการสกัด Fuleki และ Francis (1968a) ใช้ ethanol เป็นตัวทำละลายในการสกัดแอนโธไซยานินส์จากผล cranberry แทนการใช้ methanol เพราะ ethanol

เป็นสารที่ไม่เป็นพิษ และพบว่าสารละลาย ethanol-1.5 M HCl ในอัตราส่วน 85:15 โดยปริมาตร เป็นตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพการสกัดสูง และการใช้กรด hydrochloric จะช่วยให้แอนโธไซยานินส์ที่สกัดได้มีเสถียรภาพที่ดีขึ้น เนื่องจากแอนโธไซยานินส์มีความคงตัวที่ดีในสารละลายที่เป็นกรด

Chiriboga และ Francis (1970) ได้สกัดแอนโธไซยานินส์จากกากของผล cranberry ด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ และรายงานว่า methanol และ ethanol มีประสิทธิภาพการสกัดสูงกว่าตัวทำละลายอื่น ๆ ได้แก่ น้ำ acetone, ethylene glycol, propylene glycol และ isopropanol การใช้สารละลายกรด hydrochloric ใน methanol ความเข้มข้นร้อยละ 0.03 จะให้ประสิทธิภาพการสกัดสูงสุด หลังจากสกัดแล้วทำสารละลายที่ได้ให้เข้มข้นพร้อมกำจัด methanol โดยระเหยภายใต้ระบบสุญญากาศ จากนั้นทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยใช้เรซิน Amberlite CG-50 (cation-exchange resin) และชะแอนโธไซยานินส์ออกจากเรซินโดยใช้สารละลายกรด hydrochloric ใน ethanol ความเข้มข้นร้อยละ 0.0001 จากนั้นกลั่นแยก ethanol ออกจากสารละลายที่ได้ และนำไปผ่านกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dry) สีที่ได้มีลักษณะเป็นผง และบรรจุในภาชนะปิดด้วยระบบสุญญากาศหรือแทนที่อากาศด้วย nitrogen เพื่อลดอัตราการเกิดปฏิกิริยา oxidation ของแอนโธไซยานินส์

Metivier, Frencis และ Clydesdale (1980) ศึกษาชนิดของตัวทำละลาย และชนิดของกรดที่มีผลต่อการสกัดแอนโธไซยานินส์จากกากองุ่นที่เหลือจากการผลิตไวน์แดง โดยตัวทำละลายที่ใช้ ได้แก่ methanol ethanol และ น้ำ ชนิดของกรดที่ใช้ ได้แก่ hydrochloric, citric, tartaric, formic, acetic และ propionic โดยพบว่า methanol เป็นตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพการสกัดสูงสุดซึ่งสูงกว่าการใช้ ethanol ร้อยละ 20 และสูงกว่าการใช้น้ำร้อยละ 73 และการสกัดด้วยกรด hydrochloric ความเข้มข้นร้อยละ 10 ใน methanol ให้ปริมาณแอนโธไซยานินส์สูงสุด ส่วนการใช้กรดอินทรีย์ใน methanol พบว่าสารละลายกรด citric ใน methanol มีประสิทธิภาพการสกัดสูงสุด และผลการใช้กรดอินทรีย์ในน้ำเป็นตัวทำละลายพบว่าสารละลายกรด acetic มีประสิทธิภาพการสกัดสูงสุด ถึงแม้การสกัดด้วยสารละลายกรดในน้ำมีประสิทธิภาพต่ำกว่าการสกัดด้วยสารละลายกรดใน methanol และใน ethanol แต่การเลือกตัวทำละลายในการสกัดควรพิจารณาปัจจัยหลาย ๆ ประการ เช่น ประสิทธิภาพการสกัดของตัวทำละลาย ความปลอดภัยในการนำไปใช้ ค่าใช้จ่าย การกัดกร่อน และ solvent recovery

การใช้สารละลายกรด hydrochloric เป็นตัวทำละลายในการสกัดแอนโธไซยานินส์ จะทำให้สารละลายที่ได้มี pH ต่ำ เป็นการจำกัดช่วงความเป็นกรดด่างในการผสมลงในอาหาร ดังนั้น Philip (1974) จึงใช้สารละลายกรด tartaric ใน ethanol ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เป็นตัวทำละลายในการสกัดแอนโธไซยานินส์จากกากของผลองุ่น (ความชื้นต่ำกว่าร้อยละ 10 ) ที่เหลือจากการผลิตไวน์แดง และกำจัดกรด tartaric ส่วนเกินออกในรูปของ potassium hydrogen tartrate จากนั้นทำให้สารละลายที่ได้เข้มข้นขึ้นโดยระเหยภายใต้ระบบสุญญากาศ สารละลายที่ได้มีความเป็นกรด (คิดเป็นกรด tartaric) ประมาณร้อยละ 10-15 ซึ่งความเป็นกรดจะช่วยป้องกันการสลายตัวของแอนโธไซยานินส์

Bronnum-Hansen, Jacobsen และ Flink (1985) ได้ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดแอนโธไซยานินส์จากผล elderberry พบว่าถึงแม้การใช้ตัวทำละลายประเภท alcohol จะให้ประสิทธิภาพการสกัดสูงกว่าการใช้สารละลายกรด (acidified water, 0.1 M HCl) แต่พบว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายประเภท alcohol จะมี solvent recovery ต่ำกว่า เนื่องจากตัวทำละลายประเภท alcohol จะเหลือใน filter cake สูง และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณแอนโธไซยานินส์ที่สกัดได้พบว่าให้ผลใกล้เคียงกัน นอกจากนี้เวลาในการสกัดก็มีผลต่อปริมาณแอนโธไซยานินส์ที่ได้ เนื่องจากเวลามีผลต่อการแพร่ (diffuse) ของแอนโธไซยานินส์ออกจากเซลล์เมมเบรนเข้าสู่สารละลาย

อัตราส่วนระหว่างตัวทำละลายกับวัตถุดิบที่ใช้เป็นตัวแปรหนึ่งที่สำคัญในการสกัด เนื่องจากมีผลต่ออัตราการแลกเปลี่ยนมวลสารระหว่างวัตถุดิบกับตัวทำละลาย ตลอดจนความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายที่สกัดได้ Bronnum-Hansen และ Flink (1986) ได้สกัดแอนโธไซยานินส์จากผล elderberry โดยแปรอัตราส่วนระหว่างตัวทำละลาย (สารละลายกรด hydrochloric ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์) กับวัตถุดิบในช่วง 2.5 ถึง 40 พบว่าที่อัตราส่วนต่ำ ๆ คือ 2.5 ถึง 5 จะทำให้สารละลายแอนโธไซยานินส์ที่ได้จากการสกัดครั้งแรกมีความเข้มข้นสูง แต่เปอร์เซนต์แอนโธไซยานินส์ในการสกัดครั้งแรกต่ำคือประมาณร้อยละ 50 - 60 และต้องสกัด 3 - 4 ครั้ง เพื่อให้ได้แอนโธไซยานินส์รวมใกล้เคียงร้อยละ 100 แต่เมื่ออัตราส่วนระหว่างตัวทำละลายและวัตถุดิบสูงขึ้น การสกัดครั้งแรกจะได้เปอร์เซนต์แอนโธไซยานินส์สูงถึงร้อยละ 90 แต่ปริมาตรรวมของสารละลายที่ใช้ก็จะเพิ่มขึ้นด้วย ดังนั้นการเลือกอัตราส่วนที่เหมาะสมจึงเป็นสิ่งที่จำเป็นที่ต้องพิจารณารวมถึงจำนวนครั้งในการสกัด และปริมาตรรวมของตัวทำละลายที่ใช้ นอกจากนี้ยังพบว่าความเป็นกรดด่างของสารละลายที่ใช้ในการสกัดมีผลต่อปริมาณแอนโธไซยานินส์ที่ได้

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จะศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดแอนโธไซยานินส์ในด้านต่าง ๆ เช่น ศึกษาผลของ pH ของตัวทำละลายในการสกัดโดยเลือกช่วง pH ที่ให้สารละลายสกัดสีม่วงน้ำเงิน ศึกษาผลของชนิดของตัวทำละลาย ระยะเวลาในการสกัด และอัตราส่วนระหว่างตัวทำละลายในการสกัดกับปริมาณวัตถุดิบ เพื่อให้ได้ปริมาณแอนโธไซยานินส์ในสารละลายสกัดสูงสุด รวมทั้งศึกษาผลของการเขย่าในระหว่างการสกัด และจำนวนครั้งในการสกัด

<u>การวิเคราะห์แอนโธไซยานินส์</u>

การวิเคราะห์ปริมาณแอนโธไซยานินส์ทั้งหมด (Total anthocyanins, TAcy) แบ่งตามลักษณะตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่ม (Francis,1982)

1. ตัวอย่างที่มีสารประกอบซึ่งดูดกลืนแสงในช่วงเดียวกับแอนโธไซยานินส์ปนอยู่เล็กน้อย หรือไม่มีเลย

ตามปกติสารละลายแอนโธไซยานินส์ที่เพิ่งสกัดจากผัก ผลไม้ หรือดอกไม้ จะมีสารประกอบซึ่งดูดกลืนแสงในช่วงเดียวกับแอนโธไซยานินส์ (460-550 nm) อยู่น้อย ประกอบกับสารประกอบ phenolic อื่น ๆ ในสารละลายที่สกัดได้มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดในช่วงความยาวคลื่นที่ห่างออกไป ดังนั้นปริมาณแอนโธไซยานินส์ทั้งหมดสามารถหาจากหลักการวัดการดูดกลืนแสงได้

ในการศึกษาปริมาณแอนโธไซยานินส์ทั้งหมด การทำ dilution เป็นสิ่งที่ควรพิจารณาเนื่องจากค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด และ molar absorptivity ขึ้นกับ pH ชนิดของตัวทำละลาย การมีไอออนของโลหะ อุณหภูมิ และระยะเวลาก่อนการวัดค่าการดูดกลืนแสง ซึ่งความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับค่าการดูดกลืนแสงจะเป็นเส้นตรงได้ในช่วงความเข้มข้นต่ำ ๆ เท่านั้น

Fuleki และ Francis (1968a) ได้ศึกษาปริมาณแอนโธไซยานินส์ทั้งหมดของผล cranberry โดยใช้สารละลาย ethanol-1.5 M HCl ในอัตราส่วน 85:15 โดยปริมาตรเป็นตัวทำละลายในการสกัด และคำนวณปริมาณแอนโธไซยานินส์ทั้งหมดโดยเจือจางสารละลายที่สกัดได้ด้วยตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด เพื่อให้ค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วงที่เหมาะสม จากนั้นเก็บไว้ในที่มืดนาน 2 ชั่วโมงเพื่อให้เกิดสมดุลของ form ต่าง ๆ ของแอนโธไซยานินส์แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร

ปริมาณแอนโธไซยานินส์ทั้งหมด หาได้จากสูตรที่ (1)

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

โดยที่

TAcy คือปริมาณแอนโธไซยานินส์ทั้งหมดที่มีอยู่ในตัวอย่าง (มิลลิกรัมแอนโธไซยานินส์ต่อวัตถุดิบ 100 กรัม)

O.D. คือค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้จากตัวอย่างที่เจือจางแล้ว

DV (Dilution volume) คือปริมาตรของสารละลายที่สกัดได้ที่เจือจางเตรียมไว้สำหรับวัดค่าการดูดกลืนแสง (มิลลิลิตร)

SV (Sample volume) คือปริมาตรของสารละลายที่สกัดได้ที่เตรียมสำหรับเจือจาง (มิลลิลิตร)

SW (Sample weight) คือน้ำหนักของตัวอย่างที่ใช้สกัด (กรัม)

TEV (Total extract volume) คือปริมาตรทั้งหมดของสารละลายที่สกัดได้ (มิลลิลิตร)

$E^{1\%}_{1cm}$ (Extinction coefficient, E) ได้จากค่าเฉลี่ยโดยน้ำหนักของ E ของแอนโธไซยานินส์ทุกตัวที่มีอยู่ในพืชตัวอย่างนั้น ๆ

ในกรณีที่ไม่ทราบค่า E ของแอนโธไซยานินส์ในตัวอย่าง Fuleki และ Francis (1968a) แนะนำให้ใช้ค่า E ของแอนโธไซยานินส์ของผล cranberry แทนในการคำนวณปริมาณแอนโธไซยานินส์ทั้งหมด ซึ่งสามารถตัดความผิดพลาดที่เกิดขึ้นจากการคำนวณทิ้งได้เมื่อใช้คำนวณเปรียบเทียบปริมาณแอนโธไซยานินส์ที่สกัดได้

นอกจากนี้อาจใช้ค่า E ของแอนโธไซยานินส์ตัวใดตัวหนึ่งที่มีในตัวอย่างในการคำนวณปริมาณแอนโธไซยานินส์ทั้งหมดได้ เช่น

- Du และ Francis (1973) คำนวณปริมาณแอนโธไซยานินส์ทั้งหมดของดอกกระเจี๊ยบแดง (*Hibiscus sabdariffa* L.) โดยใช้ค่า E ของ delphinidin-3-glucoside ซึ่งมีค่าเท่ากับ 559 และเป็นแอนโธไซยานินส์ตัวหนึ่งที่มีในดอกกระเจี๊ยบแดง

- Bronnum-Hansen และคณะ (1985) คำนวณปริมาณแอนโธไซยานินส์ทั้งหมดของผล elderberry (*Sambucus nigra* L.) โดยใช้ค่า E ของ cyanidin-3-glucoside ซึ่งมีค่าเท่ากับ 851 และเป็นแอนโธไซยานินส์หลักที่มีในผล elderberry

- Buckmire และ Francis (1978) คำนวณปริมาณแอนโธไซยานินส์ทั้งหมดของผล miracle (*Synsepalum dulcificum*) โดยใช้ค่า E ของ cyanidin-3-glucoside ซึ่งมีค่าเท่ากับ 851 และเป็นแอนโธไซยานินส์หลักที่มีในผล miracle

เนื่องจากแอนโธไซยานินส์ในดอกอัญชันมีแอนโธไซยานิดินส์เป็น delphinidin (Saito และคณะ, 1985) และไม่ทราบค่า E ของแอนโธไซยานินส์ในดอกอัญชัน ดังนั้นในงานวิจัยนี้ใช้ค่า E ของ delphinidin-3-glucoside ซึ่งมีค่าเท่ากับ 559 (Asen, Stuart และ Seigelman, 1959; Du และ Francis, 1973) สำหรับคำนวณปริมาณแอนโธไซยานินส์ในดอกอัญชัน

2. ตัวอย่างที่มีสารประกอบซึ่งดูดกลืนแสงในช่วงเดียวกับแอนโธไซยานินส์ปนอยู่

การวัดปริมาณแอนโธไซยานินส์ทั้งหมดในผลิตภัณฑ์ที่เก็บไว้ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดดังวิธีในข้อ 1 พบว่าบ่อยครั้งที่เกิดความผิดพลาดเนื่องจากการรบกวน (interfere) ของ degradation products ซึ่งสารเหล่านี้อาจเกิดจากปฏิกิริยาระหว่างน้ำตาลกับกรดอะมิโน หรืออาจเกิดจากปฏิกิริยาการสลายตัวของแอนโธไซยานินส์ เมื่อระยะเวลาการเก็บนานขึ้นการสะสมของ degradation products จะมากขึ้นด้วย

ปริมาณแอนโธไซยานินส์ทั้งหมดสำหรับตัวอย่างประเภทนี้สามารถหาได้ 2 วิธี

ก. โดยการแยกสารประกอบซึ่งดูดกลืนแสงในช่วงเดียวกับแอนโธไซยานินส์ออกก่อนด้วยวิธีการแยกวิธีใดวิธีหนึ่ง เช่น ion-exchange, paper, thin-layer และ column chromatography, gas chromatography และ high performance liguid chromatography เป็นต้น

ข. ไม่จำเป็นต้องแยกสารประกอบซึ่งดูดกลืนแสงในช่วงเดียวกับแอนโธไซยานินส์ออกก่อน แต่อาศัยหลักการใดหลักการหนึ่งดังนี้

- วิธี Subtractive อาศัยหลักการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่สกัดได้ในช่วงก่อนและหลังปฏิกิริยาการฟอกสี (bleach) แอนโธไซยานินส์โดยใช้ sodium sulfite หรือ hydrogen peroxide ด้วยวิธีนี้สามารถหาค่าการดูดกลืนแสง เนื่องจากปริมาณแอนโธไซยานินส์ที่มีอยู่ได้ และคำนวณปริมาณแอนโธไซยานินส์ทั้งหมดโดยทำ calibration curve (ใช้ purified pigment extract เป็นสารละลายมาตรฐาน) แต่วิธีการนี้จะทำให้ปริมาณแอนโธไซยานินส์ที่คำนวณได้สูงกว่าค่าจริง ดังนั้นวิธีนี้จึงไม่ค่อยเป็นที่นิยม

- วิธี Differential เนื่องจากโครงสร้างของแอนโธไซยานินส์จะเปลี่ยนแปลงซึ่งส่งผลให้สีของสารละลายเปลี่ยนเมื่อความเป็นกรดด่างของสารละลายเปลี่ยนไป ดังนั้นสามารถคำนวณปริมาณแอนโธไซยานินส์จากค่าความแตกต่างของการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเดียวกันระหว่างสารละลายที่ระดับ pH ต่างกันได้ เช่น pH 1.0 กับ pH 4.5 ทั้งนี้เพราะค่าการดูดกลืนแสงเนื่องจากการมีสารประกอบอื่นนอกเหนือจากแอนโธไซยานินส์ซึ่งดูดกลืนแสงในช่วง

เดียวกับแอนโธไซยานินส์ถูกหักล้างไป วิธีการนี้ได้รับความนิยมมากกว่าวิธีแรก และมีข้อดีคือสามารถคำนวณค่าดรรชนีที่เรียกว่า degree of degradation ซึ่งเป็นค่าที่บอกสัดส่วนของรงควัตถุแอนโธไซยานินส์ที่เสื่อมสลาย (degrade) ได้

ค่าดรรชนีหาได้จากสูตรที่ (2)

$$\text{Degradation Index (DI)} = \frac{\text{T Acy by the single pH method}}{\text{T Acy by the pH differential method}} \quad (2)$$

Fuleki และ Francis (1968b) ใช้หลักการของวิธี differential ในการหาปริมาณแอนโธไซยานินส์ทั้งหมดในน้ำแครนเบอรี่ (cranberry juice) โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างในบัฟเฟอร์ของ KCl-HCl ที่ pH 1.0 และ ของ $CH_3COONa$-HCl ที่ pH 4.5 ที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร โดยที่ pH 1.0 แอนโธไซยานินส์จะอยู่ในรูปของ flavylium cation ซึ่งให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด และที่ pH 4.5 แอนโธไซยานินส์จะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ carbinol base ซึ่งให้ค่าการดูดกลืนแสงต่ำสุด ดังนั้นค่าความแตกต่างของการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างที่ pH 1.0 และ pH 4.5 เป็นผลอันเนื่องมาจากปริมาณแอนโธไซยานินส์

ดังนั้นปริมาณแอนโธไซยานินส์ทั้งหมดสามารถคำนวณได้จากจากสูตรที่ (3)

$$\text{TAcy in mg./100ml.} = \frac{\text{O.D.} \times 0.1}{\text{avg } \Delta E^{1\%}_{1cm,520nm}} = \frac{\text{O.D.}}{77.5} \quad (3)$$

โดยที่

O.D. = T O.D.(pH 1.0) - T O.D.(pH 4.5)

T O.D. = O.D. x DV x VF

O.D. คือค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้จากตัวอย่างที่เจือจางแล้ว

DV (Dilution volume) คือปริมาตรของสารละลายที่สกัดได้ที่เจือจางเตรียมไว้สำหรับวัดค่าการดูดกลืนแสง (มิลลิลิตร)

VF คือ volume factor

การเลือกระดับ pH ต้องพิจารณาถึง

ก. ค่า pH สองค่าที่เลือกนั้นควรให้ค่าการดูดกลืนแสงที่มีผลต่างห่างกันมากที่สุด หลีกเลี่ยงการเลือกช่วง pH บริเวณเส้นโค้งที่มีความชันสูง ซึ่งจะทำให้ค่าการดูดกลืนแสงเปลี่ยนแปลงได้มากเมื่อค่า pH เปลี่ยนแปลงเล็กน้อย

ข. การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดด่างรอบ ๆ ค่า pH ที่เลือกไม่ควรทำให้ค่าการดูดกลืนแสงเปลี่ยนแปลงมากนัก

ค. แอนโธไซยานินส์ควรมีเสถียรภาพที่ pH ที่เลือกใช้

ซึ่งข้อมูลเหล่านี้ได้จากการหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างที่สกัดได้ในบัฟเฟอร์ที่ pH ต่าง ๆ และความมีเสถียรภาพของสีในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้

ในงานวิจัยนี้ใช้วิธี pH differential ตามวิธีของ Fuleki และ Francis (1968b) ในการหาปริมาณแอนโธไซยานินส์ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ระดับ pH 1.0 และ 4.5 ที่ความยาวคลื่น 543 นาโนเมตร

## เสถียรภาพของแอนโธไซยานินส์

เนื่องจากการขาดอิเล็กตรอนของ flavylium cation จึงทำให้แอนโธไซยานินส์มีความไวต่อปฏิกิริยาสูง ภายใต้ภาวะของการแปรรูปและภาวะที่เก็บผลิตภัณฑ์เหล่านั้นเป็นผลให้ได้สารประกอบซึ่งมีโครงสร้างและสีที่ไม่พึงประสงค์ บางครั้งอาจทำให้ผลิตภัณฑ์มีสีน้ำตาล จากการศึกษาความคงตัวของแอนโธไซยานินส์ในผลิตภัณฑ์อาหาร พบว่าอัตราการสลายตัวของแอนโธไซยานินส์เป็นแบบ first order kinetic (Jurd, 1972)

ปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการสลายตัวของแอนโธไซยานินส์ เช่น ความเป็นกรดด่าง (pH) อุณหภูมิ ออกซิเจน น้ำตาล แสง และกรดแอสคอร์บิก เป็นต้น Starr และ Francis (1968) ศึกษาผลกระทบของกรดแอสคอร์บิกและระดับของ headspace oxygen ของภาชนะบรรจุที่มีต่อเสถียรภาพของแอนโธไซยานินส์ในผลิตภัณฑ์ cranberry cocktail พบว่าเมื่อความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิคและ/หรือระดับของ headspace oxygenเพิ่มขึ้น อัตราการสูญเสียของแอนโธไซยานินส์จะเพิ่มขึ้น

Maccarone, Maccarrone และ Rapisarda (1985) ศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการสลายตัวของแอนโธไซยานินส์ โดยพบว่าอุณหภูมิในการเก็บน้ำส้มคั้นที่ผลิตจากส้มพันธุ์ "Moro" มีผลต่อเสถียรภาพของแอนโธไซยานินส์ และอัตราการสลายตัวของแอนโธไซยานินส์จะเพิ่มเป็น 2 เท่า เมื่ออุณหภูมิในการเก็บเพิ่มขึ้น 10 องศาเซลเซียส ดังนั้นจึงใช้สารเคมีประเภท antioxidant เติมลงในน้ำส้มคั้นเพื่อช่วยรักษาเสถียรภาพของแอนโธไซยานินส์ ซึ่งพบว่าการเติมกรด tartaric ร่วมกับสาร glutathione จะช่วยให้เสถียรภาพของแอนโธไซยานินส์ดีขึ้น เนื่องจากกรด tartaric ช่วยเพิ่มความเป็นกรดของสารละลายทำให้แอนโธไซยานินส์อยู่ในรูปของ flavylium cation และสาร glutathione จะช่วยลดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้นเนื่องจากปฏิกิริยาเคมีหรือเอนไซม์ ปริมาณกรด tartaric และสาร glutathione ที่เหมาะสมคือ 250 และ 10 มิลลิกรัมต่อน้ำส้มคั้น 100 มิลลิลิตร ตามลำดับ ที่ปริมาณสารเจือปนระดับนี้จะช่วยให้ค่าครึ่งชีวิตของแอนโธไซยานินส์ในน้ำส้มคั้นเพิ่มขึ้นจาก 44 วัน เป็น 82 วัน

นอกจากการใช้สารเคมีประเภท antioxidant ยังมีการใช้สารประกอบ phenolics เพื่อช่วยรักษาเสถียรภาพของแอนโธไซยานินส์ เนื่องจากการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างแอนโธไซยานินส์กับสารประกอบ phenolics จะช่วยให้แอนโธไซยานินส์มีเสถียรภาพที่ดีขึ้น ทำให้ colour intensity เพิ่มขึ้น และเกิด bathochromic shift effect หรือ bluing effect (Osawa, 1982) Scheffeldt และ Hrazdina (1978) ศึกษาผลของการใช้ rutin ในการรักษาเสถียรภาพของแอนโธไซยานินส์ในน้ำองุ่น และพบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของ rutin ในสารละลายแอนโธไซยานินส์มีผลต่อการเพิ่ม colour intensity และการเกิด bathochromic shift effect ทำให้สีของน้ำองุ่นเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีม่วง นอกจากนี้ยังพบว่าชนิดของแอนโธไซยานินส์ที่ต่างกัน (malvidin-3-glucoside, malvidin-3,5-diglucoside, malvidin-3-p-coumarylglucoside, malvidin-3-p-coumarylglucoside-5-glucoside) มีผลต่อการเพิ่มของ colour intensity และการเพิ่มของความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของแอนโธไซยานินส์ ในงานวิจัยต่อเนื่อง Williams และ Hrazdina (1979) พบว่า pH ของสารละลายมีผลต่อการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง rutin กับแอนโธไซยานินส์ และค่า pH ที่เหมาะสมจะขึ้นกับชนิดของหมู่แทนที่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่สาม และตำแหน่งที่ห้า ในโครงสร้าง A-ring ของแอนโธไซยานินส์ เช่น pH ที่เหมาะสมสำหรับการสร้างสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง rutin กับ anthocyanin-3-glucoside, anthocyanin-3,5-diglucoside, anthocyanin-3-acylglucoside และ anthocyanin-3-acylglucoside-5-glucoside คือ 4.2 3.1 4.0-4.5 และ 3.1 ตามลำดับ และยังพบว่าสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างแอนโธไซยานินส์กับ rutin เกิดจากการสร้างพันธะ hydrogen ระหว่างหมู่ aromatic hydroxyl ของ rutin กับหมู่ carbonyl ของ quinoidal anhydrobase ต่อมา Chen และ Hrazdina (1981) ศึกษาการสร้างสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างแอนโธไซยานินส์กับสารประกอบ phenolics ชนิดต่าง ๆ ในสารละลาย และพบว่าโครงสร้างของสารประกอบ phenolics เช่น จำนวนหมู่ hydroxyl ตำแหน่งของหมู่ hydroxyl มีผลต่อการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน ส่วนชนิดของน้ำตาลที่แทนที่หมู่ hydroxyl ไม่มีผลต่อการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน ทั้งนี้ขึ้นกับโครงสร้างของสารประกอบ phenolics

Maccarone, Maccarrone และ Rapisarda (1985) ศึกษาผลของการใช้สารประกอบ phenolics เพื่อรักษาเสถียรภาพของแอนโธไซยานินส์ในน้ำส้มคั้นพันธุ์ "Moro" โดยสารประกอบ phenolics ที่ใช้คือ rutin และ trans-caffeic acid ในปริมาณ 50 มิลลิกรัมต่อน้ำส้มคั้น 100 มิลลิลิตร ซึ่งพบว่าการใช้ trans-caffeic acid จะให้ผลในการชลอการลดลงของปริมาณแอนโธไซยานินส์ได้ดีกว่าการใช้ rutin โดยที่ค่าครึ่งชีวิตของแอนโธไซยานินส์

ในน้ำส้มคั้นมีค่า 90 และ 75 วัน ตามลำดับ ในขณะที่ค่าครึ่งชีวิตของแอนโธไซยานินส์ในน้ำส้มคั้นที่ไม่มีการใช้สารประกอบ phenolics มีค่าเพียง 44 วัน ทั้งนี้อธิบายได้โดยการเกิด intramolecular complexs ระหว่างแอนโธไซยานินส์กับสารประกอบ phenolics (Sweeny, Wilkinson และ Iacobucci, 1981) ทำให้ความไวของแอนโธไซยานินส์ในการทำปฏิกิริยา nucleophilic กับน้ำหรือสารประกอบอื่น ๆ ลดลง

ฉวีวรรณ และบุศรากรณ์ (2531) ได้ศึกษาผลของวัตถุเจือปนอาหารที่มีต่อเสถียรภาพของแอนโธไซยานินส์ในน้ำกระเจี๊ยบแดงโดยใช้ (+)-catechin, caffeic acid และกรด tartaric ร่วมกับสาร glutathione และพบว่าการใช้ (+)-catechin ในปริมาณ 50 มิลลิกรัมต่อน้ำกระเจี๊ยบแดง 100 มิลลิลิตร และการใช้กรด tartaric ร่วมกับสาร glutathione ในปริมาณ 250 และ 10 มิลลิกรัมต่อน้ำกระเจี๊ยบแดง 100 มิลลิลิตร ตามลำดับ จะให้ผลในการชลอการลดลงของปริมาณแอนโธไซยานินส์ได้ดีกว่าการใช้ caffeic acid ในปริมาณ 50 มิลลิกรัมต่อน้ำกระเจี๊ยบแดง 100 มิลลิลิตร ตลอดระยะเวลาการเก็บ 39 วัน ($P < 0.05$)

สำหรับในงานวิจัยนี้มีการใช้วัตถุเจือปนอาหารเพื่อรักษาเสถียรภาพของสารละลายสกัดแอนโธไซยานินส์ โดยเลือกใช้สารเคมีประเภท antioxidant ร่วมกับการใช้กรด (glutathione ร่วมกับกรด tartaric) และสารประกอบ phenolics (caffeic acid, rutin และ (+)-catechin) เพื่อศึกษาผลในการชลอการลดลงของปริมาณแอนโธไซยานินส์ และผลในการชลอการเพิ่มขึ้นของปริมาณ polymeric colour ในสารละลายสกัดแอนโธไซยานินส์

018063