บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

สารสีธรรมชาติ

สารสีธรรมชาติเป็นสารที่มีอยู่ตามธรรมชาติในพืช และ สัตว์ มีการใช้สีธรรมชาติเพื่อแต่งสีอาหารมาแต่โบราณ สารสีธรรมชาติเหล่านี้อาจแบ่งตามลักษณะโครงสร้างของสารสี (pigment) ได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ๆ (เนื้อทอง วนานุวัช และ สายสนม ประดิษฐ์ดวง, 2520) คือ

1. กลุ่มอนุพันธ์ของเตตราไพโรล (tetrapyrole derivatives) ได้แก่ คลอโรฟิลล์ (chlorophyll) และ ฮีม (heme) คลอโรฟิลล์พบในพืชสีเขียวทั่วๆ ไปแต่เนื่องจากในโครงสร้างมีแมกนีเซียมเกาะอยู่ด้วย ทำให้ไวต่อการเปลี่ยนแปลงมาก โดยแมกนีเซียมอาจถูกแทนที่ด้วยไฮโดรเจนง่ายมากแม้จะใช้ความร้อนค่อนข้างต่ำ ทำให้สีเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำตาล

2. กลุ่มอนุพันธ์ของไอโซพรีนอยด์ (isoprenoid derivatives) ได้แก่ คาโรทีนอยด์ (carotenoids) ชนิดต่างๆ ซึ่งรวมทั้งสารสีที่สังเคราะห์ขึ้น ในลักษณะของสารคาโรทีนอยด์ด้วยได้แก่ เบตาคาโรทีน (β-carotene) เบตาอะโปคาโรทีนอล (β-apo-8-carotenal) และ แคนทาแซนทิน (canthaxanthin) ซึ่งผลิตจากสารเบตาไอโอโนน (β-ionone) สีประเภทนี้พบตามธรรมชาติทั้งในพืชและสัตว์ ซึ่งจะมีสีเหลืองส้มถึงแดง สารคาโรทีนอยด์เท่าที่พบและทราบโครงสร้างแล้วมีมากกว่า 200 ชนิด และถ้ารวมกับสารคาโรทีนอยด์ที่สังเคราะห์ขึ้นและที่นำมาเปลี่ยนแปลงโครงสร้างบางอย่างแล้วมีมากกว่า 400 ชนิด

3. กลุ่มอนุพันธ์ของเบนโซไพแรน (benzopyran derivatives) สารสีในกลุ่มนี้เรียกว่า anthocyanins พบในส่วนต่างๆ ของพืช มีสีแดง น้ำเงิน จนถึงม่วง สีกลุ่ม

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

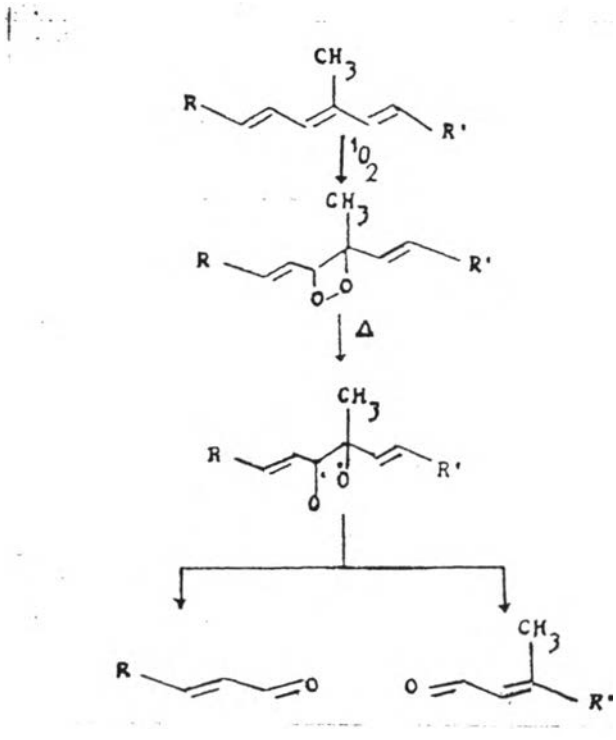
นี้มีการเปลี่ยนแปลงได้ง่ายจึงเป็นปัญหาในการสกัดมาใช้ในอาหาร แม้ว่าพืชบางชนิดจะมีปริมาณสารสีประเภทนี้มากเพียงพอก็ตาม

4. สีชนิดอื่นๆ ได้แก่ สีคาราเมล (caramel) จากน้ำตาลเคี่ยวไหม้ สีโคชินีล (cochineal) จากแมลง ที่มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า Cococcus cacti สีจากครั่ง สีจากขมิ้น (turmuric) สีจากดอกคำฝอย (saffron) เป็นต้น

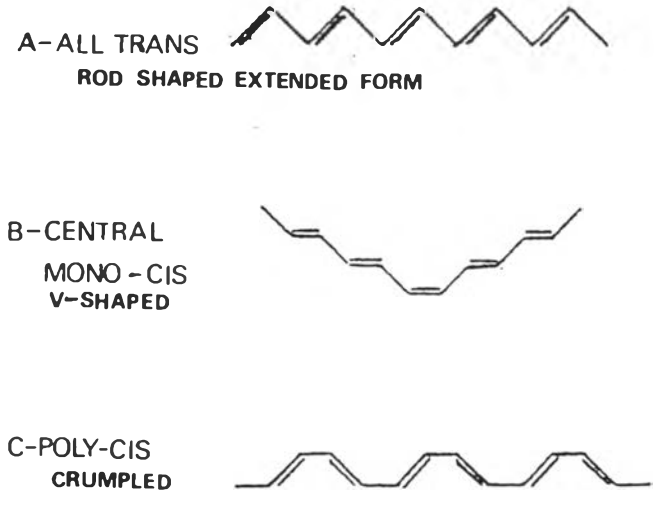
คาโรทีนอยด์ (Carotenoids)

คาโรทีนอยด์เป็นรงควัตถุหรือเม็ดสีที่พบแพร่หลายมากที่สุด เพราะพบทั้งในอาณาจักรสัตว์และอาณาจักรพืช เช่น ไข่แดง เนย มะเขือเทศและแครรอท เป็นต้น คาโรทีนอยด์คือรงควัตถุสีเหลืองถึงแดง สูตรโมเลกุลคือ $C_{40}H_{56}$ (Philip, 1975) มีสูตรโครงสร้างเป็นสารประกอบพวกอะลิฟาติค (aliphatic) หรืออะลิฟาติคอะลิไซคลิค (aliphatic-ali cyclic) ในหนึ่งโมเลกุลจะประกอบด้วยคาร์บอน 40 อะตอม คืออยู่ในรูปของหมู่ไอโซพรีน (isoprene)โดยทั่วไปจะมีอยู่ 8 หมู่ (Goodwin, 1984) หมู่เมทิล 2 หมู่ที่อยู่ใกล้ตรงกลางของโมเลกุลจะจับกันที่ตำแหน่ง 1:6 ส่วนหมู่เมทิลหมู่อื่นๆ จะจับกันที่ตำแหน่ง 1:5 และคาโรทีนอยด์มีสูตรโครงสร้างเป็น conjugated (C=C) double bond ซึ่งเป็นส่วนที่รับผิดชอบต่อการให้สีของคาโรทีนอยด์ (Britton, 1985)

คาโรทีนอยด์จะมีสูตรสัมพันธ์กับ parent compoundโดยวิธีการเปลี่ยนแปลงทางเคมีทำให้ได้คาโรทีนอยด์ชนิดต่างๆ เช่น การเคลื่อนย้ายพันธะคู่ (double bond) หรือ เติมไฮดรอกซิล (hydroxyl) คีโต (keto) หรือ เมทอกซิล (methoxyl) หรืออาจจะมีการจัดเป็นวงแหวน (cyclization) มีการเกิดออกซิเดชัน (oxidation) ดังแสดงในรูปที่ 1 หรือไอโซเมอร์ไรเซชั่น (isomerization) (Klaui and Bauuernfeind, 1981) ดังรูปที่ 2



รูปที่ 1 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเบตาคาโรทีนเนื่องจากเกิด oxidation



รูปที่ 2 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของคาโรทีนอยด์เนื่องจากเกิด isomerization

คาโรทีนอยด์แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ (Klaui and Bauernfeind, 1981)

1. คาโรทีน (carotenes) สูตรโครงสร้างจะประกอบด้วยคาร์บอน และไฮโดรเจน เท่านั้น เช่น เบตาคาโรทีน และ แอลฟาคาโรทีน (α-carotene) เป็นต้น

2. ออกซีคาโรทีนอยด์ (oxycarotenoids) สูตรโครงสร้างจะมีออกซิเจนเป็นส่วนประกอบอยู่ด้วยนอกเหนือจากคาร์บอนและไฮโดรเจน เช่น xanthophyll เป็นต้น

คาโรทีนอยด์ที่พบในเนื้อเยื่อของพืช อาจอยู่ในรูปเป็นผลึกหรือของแข็งหรือละลายในไขมัน คาโรทีนอยด์ที่ใช้เป็นสีผสมอาหารที่สำคัญได้แก่ β-carotene, β-apo-8'-carotenal, canthaxanthin, bixin และ xanthophyll สำหรับคุณสมบัติของ β-carotene, β-apo-8'-carotenal และ canthaxanthin นั้น จะคล้ายคลึงกันและวิธีการใช้ในอาหารคล้ายคลึงกันด้วย คุณสมบัติประการหนึ่งของคาโรทีนอยด์ คือการเป็นโปรวิตามินเอ (provitamin A) ทั้ง β-carotene และ β-apo-8'-carotenal จะมีคุณสมบัติดังกล่าว สำหรับสีของ β-apo-8'-carptenal จะคล้ายกับสีของ β-carotene แต่จะมีสีสันจัดกว่าและมีความสามารถในการละลายได้ดีกว่า ส่วน canthaxanthin ซึ่งไม่มีคุณสมบัติเป็นโปรวิตามินเอจะมีสีส้มแดง (orange-red) มากกว่า แต่มีความสามารถในการละลายต่ำกว่า

ข้อดีของการใช้คาโรทีนอยด์เป็นสีผสมอาหาร (ศิวาพร ศิวเวชช, 2529; Engle, 1979) ดังนี้

1. คาโรทีนอยด์เป็นสีที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ ร่างกายของคนและสัตว์สามารถย่อยและนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างปลอดภัย ไม่มีความเป็นพิษถ้าบริโภคไม่เกินจำนวนที่กำหนด

2. คาโรทีนอยด์ให้สีแตกต่างกันตั้งแต่ สีเหลือง ส้ม และ แดง ขึ้นอยู่กับส่วนผสมของรงควัตถุตัวหลัก (Philip, 1975) สามารถใช้ในอาหารได้หลายชนิดและใช้รวมกันเองหรือรวมกับ FD&C color

3. มีเสถียรภาพได้ดีต่อระดับพีเอช (pH) ในช่วงกว้างในอาหารหลายชนิด โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงสี

4. มีความเข้มของสีดีมาก

5. เป็นสีที่ละลายได้ในไขมันแต่ในขณะเดียวกันมีรูปที่เป็นอิมัลชัน และคอลลอยด์ สำหรับใช้ในผลิตภัณฑ์ประเภทที่ไม่มีไขมันเป็นส่วนประกอบได้

6. คาโรทีนอยด์บางชนิดมีคุณสมบัติเป็นโปรวิตามินเอ ทำให้ผู้บริโภคได้รับประโยชน์เพิ่มขึ้น

7. มีเสถียรภาพที่ดีในสภาวะที่มีรีดิวซิงเอเจนต์ (reducing agent) และวิตามินซีอยู่ด้วย

8. ไม่กัดกร่อนกระป๋องเหมือนพวกสีย้อมผ้าซึ่งทำให้เกิดอันตราย

9. มีคุณสมบัติในการเป็นแอนตี้ออกซิแดนท์ (antioxidant) โดยรักษากลิ่นรสในผลไม้กระป๋องได้ดีกว่าสีสังเคราะห์

10. มีความต้านทานต่อแสงและความร้อนในที่ที่มีออกซิเจนน้อย

11. สามารถหาได้ง่าย

ข้อเสียของการใช้คาโรทีนอยด์เป็นสีผสมอาหาร (ศิวาพร ศิวเวชช, 2529; Engle, 1979) ดังนี้

1. คาโรทีนอยด์มีราคาแพงกว่าสีผสมอาหารที่สังเคราะห์ขึ้น เพราะต้องใช้วัตถุดิบจำนวนมาก

2. คาโรทีนอยด์ไวต่อการเสื่อมสภาพ โดยเกิดการออกซิเดชันคือถ้ามีแสง ความร้อน หรือไอออนของโลหะอยู่ในที่ที่มีออกซิเจนปริมาณมากพอก็จะเกิดออกซิเดชันได้

3. เมื่อเปรียบเทียบกับสีสังเคราะห์จะมีศักยภาพของสีต่ำกว่า

<u>ส้มเขียวหวาน</u> (Tangerine) (กรมวิทยาศาสตร์บริการ, 2528)

ส้มเขียวหวานมีชื่อเรียกทางวิทยาศาสตร์ว่า <u>Citrus reticulata</u> Blanco มีผลขนาดเล็ก กลาง จนถึงขนาดค่อนข้างใหญ่ มีลักษณะทรงผลแบน เปลือกอ่อนบาง ปลอกง่าย ไส้ตรงกลางกลวง กลีบแยกออกจากกันได้ง่าย เป็นที่รู้จักกันทั่วโลกและนิยมบริโภค

แหล่งกำเนิดเดิมของส้มอยู่ในแถบตะวันออกเฉียงใต้ของทวีปเอเชีย จากนั้นได้แพร่กระจายไปยังส่วนต่างๆ ของโลก ส้มเขียวหวานเจริญเติบโตได้ดีในเขตโซนร้อนหรือโซนกึ่งร้อนกึ่งหนาว ซึ่งประเทศไทยเป็นประเทศที่มีดินฟ้าอากาศเหมาะสมกับการปลูกส้มเขียวหวาน ปัจจุบันประเทศไทยมีการปลูกทั่วไปในภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออก และภาคใต้

โครงสร้างลักษณะโดยทั่วไปของส้ม (Goodwin, 1984)

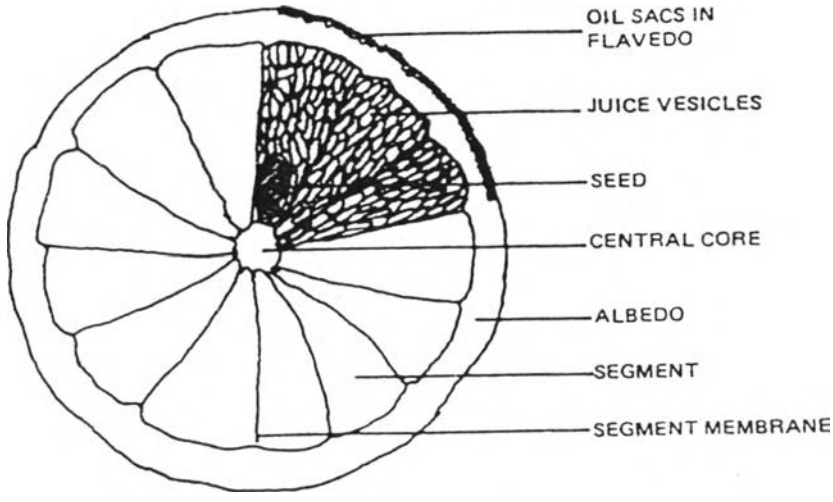
ส้มเป็นผลไม้จำพวก subtropical fruit มีรูปร่างและขนาดแตกต่างกันไปขึ้นกับสายพันธุ์ มีโครงสร้างคล้ายๆ กันซึ่งประกอบด้วย ดังรูปที่ 3

1. เปลือก (peel) เป็นส่วนที่ห่อหุ้มส่วนที่นำมารับประทาน (endocarp) ประกอบด้วย 2 ส่วน (Gross, 1977) คือ

1.1 flavedo อยู่ภายนอกสุดประกอบด้วยโครโมพลาส (chromo plasts) และถุงน้ำมัน (oil vesicles) ในโครโมพลาสประกอบด้วยคาโรทีนอยด์ซึ่งให้ลักษณะสีกับพันธุ์ต่างๆ กัน ต่อมน้ำมันพบในส่วนโครงสร้างบนๆ เปลือก ซึ่งมี essential oil ที่มีลักษณะเฉพาะของส้มแต่ละสายพันธุ์ (Ting and Rouseff, 1986)

1.2 albedo อยู่ถัดเข้ามาจาก flavedo เป็นเนื้อเยื่อนิ่มๆ สีขาว ประกอบด้วย flavonone limonin เพคติน (pectin) และเยื่อใย (fiber) ส้มแมนดาริน (mandarin) บางชนิดมีผิวบางจะพบส่วนนี้บางมาก และยากที่จะแยกออกจาก flavedo

2. ส่วนที่นำมารับประทาน (endocarp) ประกอบด้วย segment หรือ carpel เป็นจำนวนมาก โดยทั่วไปผลหนึ่งอาจมี 9-13 segments (Ting and Rouseff, 1986) ในแต่ละ segment มีถุงน้ำส้ม (juice vesicles) ยึดกันด้วย waxy cuticle ภายใน juice vesicle จะมีน้ำมัน (juice oil) และน้ำส้ม (citrus juice) นอกจากนี้ในส่วน endocarp ยังมีเมมเบรน (membrane) segment wall แกน (core) และเมล็ด (seed) (Tressler and Joslyn, 1961)



รูปที่ 3 โครงสร้างภาพตัดขวางของผลส้ม

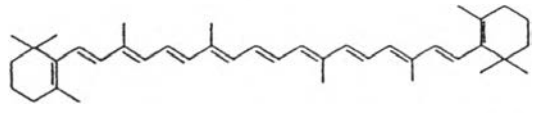
<u>คาโรทีนอยด์ในเปลือกส้ม</u>

ในขณะที่ผลส้มยังอ่อนอยู่ (อายุประมาณ 35 สัปดาห์) สีของเปลือกจะมีสีเขียวของคลอโรฟิลล์ เมื่อผลแก่ปริมาณคลอโรฟิลล์จะลดลงอย่างช้าๆ โดยทั่วไปยังมีรงควัตถุสีเขียวเหลืออยู่โดยเฉพาะในส่วนของเนื้อเยื่อชั้นใน ในสภาพที่เป็นกรดคลอโรฟิลล์จะเปลี่ยนแปลงได้ง่ายทำให้เกิดการสูญเสียแมกนีเซียมอิออน (Mg^{++}) ของหมู่ porphyrin และเปลี่ยนเป็น pheophytin ซึ่งเป็นสารสีเขียวมะกอก เมื่อสัมผัสกับออกซิเจนจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน และเปลี่ยนเป็นสาร chlorin และ purpurin ซึ่งเป็นสารไม่มีสี อย่างไรก็ตาม การสลายตัวของคลอโรฟิลล์อาจเกิดขึ้นโดยมีเอนไซม์ chlorophyllase ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนคลอโรฟิลล์เป็นสาร chlorophyllin ซึ่งมีสีเขียวอ่อนและเมื่อสัมผัสกับออกซิเจนจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันเป็นสาร chlorin และ purpurin เช่นเดียวกันในขณะที่คลอโรฟิลล์สลายตัวปริมาณคาโรทีนอยด์ที่เปลือกซึ่งพบในส่วนของพลาสติด (plastids) และ flavedo จะเพิ่มขึ้นทำให้เปลือกมีสีเหลือง (Gross, 1977) ความเข้มข้นของคาโรทีนอยด์ที่เปลือกจะเพิ่มทีละน้อย จนกระทั่งผลส้มมีการเจริญเติบโตเต็มที่ โดยมีปริมาณสูงกว่า 2-6 เท่า

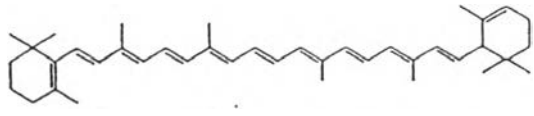
ของปริมาณ ที่พบใน juice vesicles (Stewart, 1980) หรือประมาณร้อยละ 70 ของคาโรทีนอยด์ทั้งหมดในผลหนึ่งๆ (Ting and Rouseff, 1986) สีที่ปรากฏอาจมีสีเหลืองอ่อนถึงส้ม ขึ้นกับปริมาณและชนิดของคาโรทีนอยด์ สภาวะการปลูก ฤดูกาล แหล่งเพาะปลูก และสายพันธุ์ เช่น ส้มที่ปลูกในประเทศสหรัฐอเมริกา จะพบ hydroxy-α-carotene, trollixanthin และอนุพันธุ์ ซึ่งในส้มพันธุ์เดียวกันนี้ที่ปลูกในประเทศอิสราเอล จะไม่พบคาโรทีนอยด์เหล่านี้ นอกจากนี้พบว่าส้มในสายพันธุ์เดียวกันที่ปลูกในรัฐฟลอริดามีปริมาณคาโรทีนอยด์ต่ำกว่าที่ปลูกในรัฐแคลลิฟลอเนีย (Gross, 1977; Klaui and Bauerfeind, 1981)

ส้มเขียวหวานเมื่อมีอายุมากขึ้นความเข้มของสีเหลืองจะมากขึ้นด้วย และเมื่อส้มอายุได้ 47 สัปดาห์เปลือกจะมีสีเหลืองปรากฏอยู่ทั่วไปทั้งผล ส่วนส้มแมนดารินพันธุ์แดนซี(dancy) มีสีแดงส้ม (ศิริวัลย์ พฤติวิลัย, 2530)

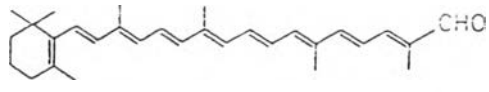
คาโรทีนอยด์ที่พบในเปลือกส้มทั่วๆ ไปจะพบ carotenes กับ xanthophylls ในอัตราส่วน 1:11 หรือคาโรทีน (carotenes) มีประมาณร้อยละ 0.84 ส่วน xanthophylls มีประมาณร้อยละ 91.6 ของปริมาณคาโรทีนอยด์ทั้งหมด(Klaui and Bauernfeind, 1981) คาโรทีนอยด์ที่พบในเปลือกส้มทั่วๆ ไปมีหลายชนิด เช่น β-carotene, α-carotene, apo-8'-carotenal, β-cryptoxanthin, lutein, zeaxanthin, antheraxanthin, luteoxanthin และ violaxanthin (Mackinney, 1961) มีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 4



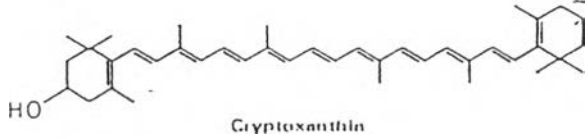
β-Carotene
(β,β-Carotene)



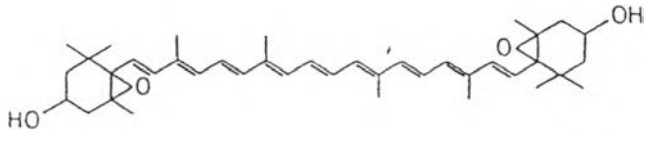
α-Carotene
(β,ε-Carotene)



β-Apo-8'-carotenal
(8'-Apo-β-caroten-8'-al)

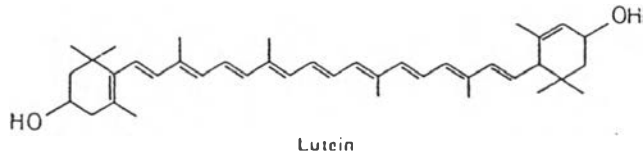


Cryptoxanthin
(β,β-Caroten-3-ol)

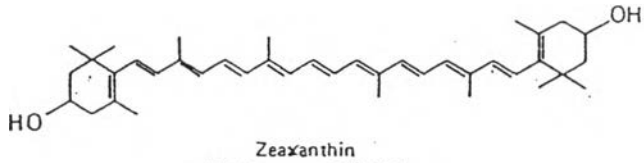


Violaxanthin
(5,6,5',6'-Diepoxy-5,6,5',6'-tetrahydro-β,β-carotene-3,3'-diol)

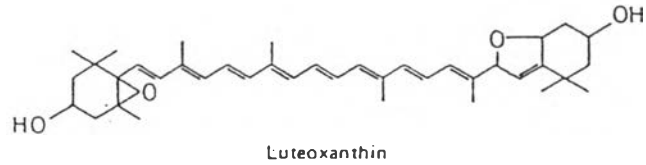
รูปที่ 4 โครงสร้างคาโรทีนอยด์ในเปลือกส้ม



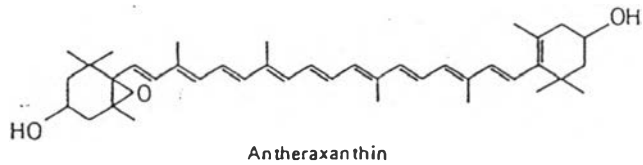
Lutein
(β,ε-Carotene-3,3′-diol)



Zeaxanthin
(β,β-Carotene-3,3′-diol)



Luteoxanthin
(5,6,5′,8′-Diepoxy-5,6,5′,8′-tetrahydro-β,β-carotene-3,3′-diol)



Antheraxanthin
(5,6-Epoxy-5,6-dihydro-β,β-carotene-3,3′-diol)

รูปที่ 4 (ต่อ)

การสกัดและการวิเคราะห์คาโรทีนอยด์

Curl และ Bailey (1956; 1957; 1961) ศึกษาชนิดและเปรียบเทียบปริมาณคาโรทีนอยด์ทั้งหมดของเปลือก (peel) และเนื้อเยื่อ (pulp)ของส้มวาเลนเซีย(valencia) แทนเจอรีน (tangerine) และ เนเวล (navel) โดยปั่นตัวอย่างกับน้ำในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร เติมแคลเซียมหรือแมกเซียมคาร์บอเนตกับเมธานอล แล้วตั้งทิ้งไว้ 1 คืน นำมาเติม filter aid แล้วกรองบน Bushner funnelที่เคลือบด้วย filter aid จากนั้นใช้อะซีโตนผสมกับของแข็งโดยการปั่นทำเช่นนี้ 4 ครั้ง จนได้สารสกัดไม่มีสีออกมา รวบรวมสารละลายที่สกัดได้นำไประเหยภายใต้สุญญากาศ จากนั้นนำส่วนหลังระเหยถ่ายลงในกรวยแยกด้วยน้ำและอีเธอร์ เติมโซเดียมคลอไรด์ประมาณ 1 กรัม ลงในส่วนผสมนี้แยกส่วนสารที่ละลายในอีเธอร์แล้วเติมแอลกอฮอล์ (absolute alcohol) เพื่อกำจัดน้ำ นำส่วนนี้ไประเหยภายใต้สุญญากาศอีกครั้ง แล้วนำสารสกัดเข้มข้นบางส่วนไปผ่านกระบวนการ saponification ด้วยสารละลายโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH)เข้มข้นร้อยละ 20 ในเมธานอล แล้วกำจัดตัวทำละลายโดยการระเหยภายใต้สุญญากาศ นำสีเข้มข้นนี้ไปละลายในเบนซีน (benzene) หาปริมาณคาโรทีนอยด์ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Evelyn colorimeter filter 440 นาโนเมตร คำนวณคาโรทีนอยด์ในค่าของเบตาคาโรทีน (β-carotene) จากการทดลองพบว่าเปลือกและเนื้อเยื่อส้มวาเลนเซียมีคาโรทีนอยด์ 98 และ 24 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมวัตถุดิบ ส่วนแทนเจอรีนในส่วนเปลือกมีคาโรทีนอยด์ 186 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมวัตถุดิบ และในส่วนเนื้อเยื่อมีคาโรทีนอยด์ 26.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมวัตถุดิบ ส้มเนเวลในส่วนเปลือกมีคาโรทีนอยด์ 67 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมวัตถุดิบ และในส่วนเนื้อเยื่อมีคาโรทีนอยด์ 23 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมวัตถุดิบ ตามลำดับ

ส่วนการจำแนกรงควัตถุในกลุ่มคาโรทีนอยด์ใช้ countercurrent distribution และ column chromatography ที่บรรจุด้วย magnesia ผสมกับ filter aid ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร ตัวชะคืออะซิโตน (acetone) หรือ เอทิลแอลกอฮอล (ethyl alcohol) ในปิโตรเลียมอีเธอร์ (petroleum ether) หรือเบนซีน (benzene)

นำแต่ละส่วนที่แยกได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง และหาปริมาณคาโรทีนอยด์ส่วนที่จำแนกได้ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณรงควัตถุในกลุ่มคาโรทีนอยด์จากส่วนเนื้อเยื่อ (pulp) และเปลือก (peel) ของส้มแทนเจอรีน (tangerine)

รงควัตถุ		ปริมาณ(ร้อยละ)ของคาโรทีนอยด์ทั้งหมด	
		เนื้อเยื่อ	เปลือก
Hydrocarbon	phytoene	5.8	4.2
	phytofluene	7.2	3.5
	α-carotene	0.3	0.2
	phytofluenelike	0.1	0.1
	β-carotene	4.1	0.4
	ɣ-carotene	6.9	2.0
	ε-carotene	0.1	---
	lycopene	0.1	0.02
Monol	hydroxy-α-carotenelike	1.0	0.6
	cryptoxanthin epoxide	0.9	1.4
	cryptoxanthin	33.0	24.0
	hydroxy-α-carotene furanoxidelike	---	0.4
	cryptoflavinlike	0.8	3.4
	rubixanthinlike	---	0.1

ตารางที่ 1 (ต่อ)

รงควัตถุ		ปริมาณ(ร้อยละ)ของคาโรทีนอยด์ทั้งหมด	
		เนื้อเยื่อ	เปลือก
Diol	lutein	2.9	3.3
	zexanthin	3.3	3.5
	hydroxy-canthaxanthinlike	0.1	2.7
Monoether	antheraxanthin	9.7	6.2
diol	mutatoxanthin	2.2	2.8
Diether	violaxanthin	14.0	24.0
diol	luteoxanthin	3.5	9.1
	auroxanthin	0.4	1.9
Polyol	valenciaxanthin	0.2	0.4
	sinensiaxanthin	0.2	1.1
	trollixanthinlike	1.0	2.6
	trollein	0.9	---
	trollichromelike	0.3	0.7

Higby (1962) ศึกษาปริมาณคาโรทีนอยด์และคาโรทีนในน้ำส้มพันธุ์ต่างๆ โดยสกัดคาโรทีนอยด์จากน้ำส้มวาเลนเซีย เนเวล แฮมลิน (hamlin) และแมนดาริน (mandarin) ใช้ตัวทำละลายคือไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์กับเฮกเซน (isopropyl alcohol-hexane) ปั่นรวมกับน้ำส้มแล้วจึงแยกออกมา พบว่าไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์ช่วยทำให้เกิดการแยกชั้นมากขึ้น การแยกชนิดคาโรทีนอยด์ใช้ packed column chromatography ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.8 เซนติเมตร ยาว 10 เซนติเมตร บรรจุด้วย Hyflo super-cell

และ activated magnesia ในอัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนัก ตัวชะคืออะซิโตนและเฮกเซน และการหาปริมาณคาโรทีนทั้งหมดโดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร คำนวณได้ดังนี้

$$C = \frac{A \times 100}{250 \times L \times W}$$

เมื่อ C = ความเข้มข้นของคาโรทีน (มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร) ในตัวอย่าง

A = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากตัวอย่าง

L = ความยาวของเซลเป็นเซนติเมตร

W = ปริมาตร (มิลลิลิตร) ของตัวอย่างเริ่มต้นต่อปริมาตรของที่เจือจางความเข้มข้นที่วัดค่าการดูดกลืนแสง

250 = absorptivity (ลิตรต่อกรัม-เซนติเมตร)

พบว่าในการคำนวณหาปริมาณคาโรทีนอยด์จากความยาวคลื่นที่ 454 นาโนเมตร ดีกว่าที่ 425 นาโนเมตร เพราะจากการทดลองเติมเบตาคาโรทีนในน้ำส้มที่ทราบปริมาณคาโรทีนอยด์ทั้งหมด แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 425 นาโนเมตร และที่ 450 นาโนเมตร คำนวณปริมาณคาโรทีนอยด์ทั้งหมดโดยใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 425 นาโนเมตร และปริมาณคาโรทีนโดยใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร เปรียบเทียบปริมาณคาโรทีนอยด์ทั้งหมดกับดาโรทีนที่คำนวณจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร พบว่าน้ำส้มที่เติมเบตาดาโรทีนมีปริมาณคาโรทีนอยด์ทั้งหมดและคาโรทีนเพิ่มขึ้นไปในทางเดียวกันและมีค่า recovery ร้อยละ 98.5

Curl (1967) ศึกษาปริมาณและชนิดคาโรทีนอยด์จากเปลือกส้มวาเลนเซีย โดยนำเปลือกส้ม 900 กรัม ปั่นรวมกับน้ำ 1200 มิลลิลิตร เมธานอล (methanol) 1500 มิลลิลิตร และ magnesium carbonate 10 กรัม เติม filter aid แล้วกรอง จากนั้นล้างส่วนผสมด้วยเมธานอลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 40 2-3 ครั้ง นำส่วนที่เป็นของแข็งปั่นกับอะซิโตนแล้วกรอง ทำเช่นนี้ 2 ครั้ง นำของเหลวไประเหยภายใต้สุญญากาศ ถ่ายส่วน

เข้มข้นนี้ในอีเธอร์ (ether) แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น เติมโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เพื่อไม่ให้เกิดอิมัลชัน นำส่วนสกัดในอีเธอร์ไประเหยกำจัดอีเธอร์ แล้วนำสารสกัดละลายในเบนซีน (benzene) และเจือจางด้วยเบนซีนก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 นาโนเมตร แล้วคำนวณหาปริมาณคาโรทีนอยด์ทั้งหมด พบว่าเปลือกส้มวาเลนเซียมีคาโรทีนอยด์ทั้งหมดอยู่ 84 มิลลิกรัม (เบตาคาโรทีน) ต่อเปลือกส้ม 1 กิโลกรัม ในการจำแนกชนิดคาโรทีนอยด์ที่สกัดได้ก่อนผ่าน saponification ด้วย countercurrent distribution และ column chromatography ที่บรรจุด้วย magnesia กับ celite ในอัตราส่วน 5:1 โดยปริมาตร พบว่าในสารสกัดที่ไม่ผ่านกระบวนการ saponification มี apo-10'-violaxanthanal แต่เมื่อผ่านกระบวนการ saponification ไม่พบสารนี้ในสารสกัด ดังนั้นจึงควรตรวจสารสกัดก่อนและหลังจากผ่านกระบวนการ saponification ว่า กระบวนการนี้มีผลต่อคาโรทีนอยด์ในสารสกัดหรือไม่

Ting และ Hendrickson (1969) ศึกษาคาโรทีนอยด์เฉพาะในส่วน flavedo ของพายแอปเปิล (pineapple) และเปรียบเทียบสีของน้ำส้มที่เติมสารสกัดที่ผ่านและไม่ผ่าน column chromatography โดยแยก flavedo ออกจาก albedo บดตัวอย่างให้ได้ขนาดน้อยกว่า 1/8 นิ้ว จากนั้นเติมอะซีโตนและน้ำ (36:65 โดยปริมาตร) แยกส่วนสกัดออกมาและสกัดซ้ำอีก 3 ครั้ง พบว่าวัตถุดิบ 10 ปอนด์ต้องใช้อะซีโตน 2.0-2.5 แกลลอน จากนั้นถ่ายส่วนสกัดในอะซีโตนลงในเฮกเซนล้างอะซีโตนออกด้วยน้ำ นำส่วนสกัดเฮกเซนไปกลั่นที่ 40 องศาเซลเซียส ความดัน 1 มิลลิเมตรปรอท สีที่สกัดได้นี้อาจเติมในผลิตภัณฑ์หรือทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นโดยผ่าน column chromatography ที่บรรจุด้วย florisil (ขนาด 60-80 mesh) ซึ่ง activated ที่ 1250 องศาเซลเซียส ตัวชะ คือ อะซีโตนและเฮกเซน (10:90 โดยปริมาตร) กำจัดตัวทำละลายที่ผ่านคอลัมน์โดยการระเหยภายใต้สุญญากาศ พบว่าใช้ flavedo 300 ปอนด์ สกัดได้สี 600 กรัม เปรียบเทียบการเติมสีเข้มข้นก่อนและหลังผ่านคอลัมน์ในน้ำส้มเข้มข้น โดยเติมสีเข้มข้นปริมาณ 1.75 ออนซ์ต่อน้ำส้มเข้มข้น 52 องศาบริกซ์ 100 แกลลอน และสีเข้มข้น 3.5 ออนซ์ต่อน้ำส้มเข้มข้น 55 องศาบริกซ์ 100 แกลลอน วัดค่าสีด้วย hunter color difference meter พบว่าน้ำส้มที่เติมสีเข้มข้นก่อนผ่านคอลัมน์มีสีแดงกว่าน้ำส้มที่เติมสีเข้มข้นที่ได้ผ่านคอลัมน์ และได้ทำการทดลองสกัด

คาโรทีนอยด์จากเปลือกส้มแห้งปรากฏว่าสกัดคาโรทีนอยด์ได้ในปริมาณต่ำมาก และสีที่ได้กลิ่นไม่ดี ในการสกัดเปลือกส้มสดด้วยเฮกเซนโดยตรงทำให้เกิดอิมัลชันมาก จึงสกัดรงควัตถุได้ปริมาณน้อยมาก เนื่องจากคาโรทีนอยด์ในพืชมักอยู่ในรูปคอลลอยด์ที่รวมกับโปรตีน ดังนั้นการใช้อะซีโตนสกัดจึงมีประสิทธิภาพในการสกัดดีกว่าการใช้เฮกเซนเป็นตัวสกัด การสกัดอาจใช้แอลกอฮอล์แทนอะซีโตนแต่ต้องใช้ในปริมาณมาก

Kew และ Berry (1970) ศึกษาการสกัดคาโรทีนอยด์จากเปลือกส้มที่ปั่นให้มีขนาดต่างๆ กัน จำนวนครั้งของการสกัด และศึกษาปริมาณสารสกัดที่เติมในน้ำส้ม เพื่อให้ได้สีของน้ำส้มเท่ามาตรฐาน ส้มพันธุ์ต่างๆ ที่ใช้ในการทดลอง คือ แดนซี (dancy หรือ tangerine) พายแอปเปิล (pineapple) วาเลนเซีย (blood valencia) ส้มเทมเปิล (temple orange) และแฮมลิน (hamlin) การสกัดใช้เฮกเซน 2 ลิตรต่อเปลือกส้ม 1000 กรัม ที่ปั่นด้วยความเร็วสูงสุด นำสารละลายสกัดไประเหยภายใต้สุญญากาศให้ปริมาตรลดลง 1/3 ของปริมาตรเดิม พบว่าการสกัดคาโรทีนอยด์จากเปลือกส้มที่มีขนาดเปลือกส้มเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 0.31 มิลลิเมตร จะได้ปริมาณคาโรทีนอยด์มากสุดและเปลือกส้มที่มีคาโรทีนอยด์มากที่สุด คือ ส้มแคนซี (2.1 กรัมต่อกิโลกรัมเปลือกส้ม) ส่วนเปลือกส้มแฮมลินมีคาโรทีนอยด์ต่ำสุด (0.34 กรัมต่อกิโลกรัมเปลือกส้ม) และในการหาปริมาณคาโรทีนอยด์ในแต่ละครั้งของการสกัดเปลือกส้มชุดเดียวกัน โดยใช้อัตราส่วนระหว่างตัวทำละลายกับเปลือกเท่ากับ 1:1 ปริมาตรต่อน้ำหนัก สกัด 6 ครั้ง ได้ปริมาณคาโรทีนอยด์ในแต่ละครั้งเป็นร้อยละได้ผลดังนี้ 60 74 87 93 96 และ 98 ตามลำดับ ดังนั้นในการสกัดทั่วๆ ไปจึงมักสกัดเพียง 2-3 ครั้ง เพื่อไม่เสียเวลาและสิ้นเปลืองตัวทำละลาย ส่วนการใช้สารสกัดเข้มข้นที่สกัดได้ในน้ำส้ม พบว่าการนำสารสกัดเข้มข้นมาทำ saponification ด้วยสารละลาย methanolic KOH และผ่านไอน้ำที่ความดันบรรยากาศนาน 30-60 นาที โดยใช้ในอัตราส่วน 1/3500โดยปริมาตร จะได้น้ำส้มที่มีสีเข้มเท่ามาตรฐานและไม่เกิด off-flaver

Berry, Bissett และ Kew (1971) ศึกษาเสถียรภาพของสารสกัดเข้มข้นจากเปลือกส้มวาเลนเซีย และเสถียรภาพของสารสกัดเข้มข้นที่เติมในผลิตภัณฑ์น้ำส้ม โดยใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลาย วิธีการสกัดเช่นเดียวกับ Kew และ Berry (1970) พบว่า

เสถียรภาพของสีสกัดเข้มข้นที่บรรจุในหลอดแก้วแล้วเก็บในที่มืด และเก็บที่ -20.5 องศาเซลเซียส (-5 องศาฟาเรนไฮซ์) เก็บได้นาน 243 วัน ที่ 4.4 องศาเซลเซียส (40 องศาฟาเรนไฮซ์) นาน 127 วัน และที่ 26.7 องศาเซลเซียส (80 องศาฟาเรนไฮซ์) เก็บได้เพียง 9 วันสีเริ่มมชีดเห็นได้อย่างชัดเจน ส่วนการเติมสารสกัดในน้ำส้ม single-strength ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1000 โดยปริมาตร และเติมในน้ำส้มเข้มข้น 45 องศาบริกซ์ ในอัตราส่วน 4 ต่อ 1000 โดยปริมาตร ผสมโดยการกวนเบาๆ ที่ 48.9 องศาเซลเซียส (120 องศาฟาเรนไฮซ์) นาน 2-3 นาที เก็บน้ำส้มคั้น single-strength ในกระป๋องโลหะและขวดแก้วที่ 1.7 องศาเซลเซียส (35 องศาฟาเรนไฮซ์) 21 องศาเซลเซียส (70 องศาฟาเรนไฮซ์) และ 29.4 องศาเซลเซียส (85 องศาฟาเรนไฮซ์) นาน 10 สัปดาห์ ปรากฏว่าที่ 1.7 องศาเซลเซียส (35 องศาฟาเรนไฮซ์) เก็บได้นาน 10 สัปดาห์ แต่ในขวดแก้วสีเริ่มชีด ส่วนที่ 21 องศาเซลเซียส (70 องศาฟาเรนไฮซ์) และ 29.4 องศาเซลเซียส (85 องศาฟาเรนไฮซ์) เกิดสีคล้ำ เนื่องจากเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาล (browing reaction) และ จากผลการเก็บน้ำส้มเข้มข้น 45 องศาบริกซ์ ที่เติมสีในกระป๋องที่ -20.5 องศาเซลเซียส (-5 องศาฟาเรนไฮซ์) และ 1.7 องศาเซลเซียส (35 องศาฟาเรนไฮซ์) นาน 10 สัปดาห์ ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ -20.5 องศาเซลเซียส ส่วนที่ 1.7 องศาเซลเซียส สีแดงเริ่มลดลงโดยที่สีเหลืองยังเหมือนเดิม

Wilson, Bissett และ Berry (1971) ศึกษาการสกัดคาโรทีนอยด์จากส้มวาเลนเซีย (valencia) 3 ส่วน คือส่วนเปลือกทั้งหมด (albedo และ flavedo) ส่วนที่ 2 คือส่วนที่เรียกว่า "frits" ประกอบด้วยส่วนเปลือก แกนกลาง เมมเบรน ซึ่งได้จากส่วนที่เหลือของผลส้มที่ผ่าครึ่งแล้วคั้นน้ำออกไป และส่วนที่ 3 คือ flavedo ในการสกัดใช้อัตราส่วนระหว่างวัตถุดิบกับเฮกเซน เท่ากับ 1:1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) กวนนาน 5 นาที ระหว่างการสกัดเกิดอิมัลชันจึงใช้อะซีโตนสกัดสารสกัด นำส่วนที่สกัดได้ไประเหยที่ 50 องศาเซลเซียส ด้วยระบบสุญญากาศ ที่ความดัน 28 มิลลิเมตรปรอท นำส่วนเข้มข้นไปทำ saponified ด้วยสารละลาย methanolic KOH (KOH 100 กรัม น้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร และ methanol 750 มิลลิลิตร) กวนนาน 1 ชั่วโมง เกิดการแยกเป็น 2 ชั้น ชั้นล่างเป็น saponified material ชั้นบนเป็นคาโรทีนอยด์ในเฮกเซน ทำให้เป็นกลางที่ pH

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7.5 ด้วยสารละลาย KH_2PO_4 เข้มข้นร้อยละ 10 แล้วระเหยเฮกเซน ที่ 40 องศาเซลเซียส ความดัน 28 มิลลิเมตรปรอท ตรวจคาโรทีนอยด์ในสารสกัดเข้มข้นด้วย TLC ใช้แผ่น silica gel G ขนาด 250 ไมครอน โดยใช้ตัวพา คืออะซีโตนและเฮกเซน (25:75 โดยปริมาตร) พบว่าสารสกัดประกอบด้วยคาโรทีนอยด์เป็นส่วนใหญ่ และจากการสกัดจากเปลือกส่วนต่างๆ ส่วน frits มีปริมาณคาโรทีนอยด์ต่ำสุด (402 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) รองมา คือเปลือก (545 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) และ flavedo มีปริมาณมากสุด (669 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) และจากการเติมสีในน้ำส้มคั้นในอัตราส่วน 1/300-1/6000 โดยปริมาตร พบว่าการเติมสีในอัตราส่วน 1/600 โดยปริมาตร จะได้น้ำส้มที่มีสีและกลิ่นดีที่สุด

Berry, Wilson และ Bissett (1972) ศึกษาสกัดคาโรทีนอยด์จากเปลือกส้ม 3 ส่วน (ส่วน albedo รวมกับ flavedo ,frits, flavedo) ปรับปรุงการทำสารสกัดคาโรทีนอยด์ให้บริสุทธิ์และการใช้สารสกัดในผลิตภัณฑ์น้ำส้ม ในการศึกษาใช้ส้มแฮมลิน (hamlin) เทมเปิล (temple) พายแอปเปิล (pineapple) วาเลนเซีย (valencia) และแดนซี (dancy) ใช้วิธีการสกัดเช่นเดียวกับ Wilson และคณะ (1971) แต่กวนนาน 10 นาที ทำคาโรทีนอยด์ให้บริสุทธิ์โดยวิธีการตกตะกอนด้วย 2-proponal กับน้ำกลั่นแทนวิธี saponification พบว่าวิธีนี้ใช้น้ำและเวลาน้อยลง และตรวจหาสอบสารสกัดที่สกัดจากส้มพันธุ์ต่างๆ ได้ ด้วย TLC (Wilson, Bissett and Berry, 1971) พบว่าสารสกัดจากแทนเจอรีนมีคาโรทีนอยด์บางชนิดที่ไม่พบในส้มแดนซี และจากการศึกษาพบว่าส่วน frits ของแทนเจอรีนมีคาโรทีนอยด์ปริมาณมากสุด แต่เมื่อเทียบคาโรทีนอยด์ทั้งหมดที่สกัดจากทั้ง 3 ส่วนของพันธุ์ต่างๆ พบว่าวาเลนเซียมีปริมาณมากสุดและแฮมลินมีปริมาณต่ำสุด และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณคาโรทีนอยด์ที่สกัดในแต่ละส่วนของผลส้มพันธุ์ต่างๆ พบว่าส่วน frits มีปริมาณต่ำสุดและ flavedo มีปริมาณสูงสุด เนื่องจากขณะสกัดจากส่วน frits เกิดอิมัลชันมากกว่าส่วนอื่นๆ และการใช้สารสกัดในน้ำส้มเข้มข้น 12.5 องศาบริกซ์ ใช้สารสกัด 0.25 กรัม ผสมกับน้ำมันส้ม 0.041 กรัม และเติมในน้ำส้มเข้มข้น 367.5 กรัม กวนให้เข้ากัน (อัตราส่วนสารสกัดต่อน้ำส้ม คือ 1/6000 โดยน้ำหนัก) เปรียบเทียบกับตัวควบคุม คือ เติมน้ำมันส้มที่ไม่มีสารสกัด 0.20 กรัมในน้ำส้ม แล้วให้ผู้ทดสอบชิมปรากฏว่าสารสกัดจากส้มแฮมลินมีกลิ่นที่ผู้ทดสอบไม่ยอมรับ

Rosenberg, Mannheim และ Kopelman (1983) ศึกษาการสกัดคาโรทีนอยด์จากเปลือกส้มวาเลนเซีย โดยใช้ d-limonene เป็นตัวทำละลายในอัตราส่วนระหว่างเปลือกส้มกับตัวทำละลายที่เหมาะสม คือ 1 ต่อ 2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) พบว่าสารที่สกัดได้เกิดกลิ่นไม่ดี จึงทำให้สารบริสุทธิ์ด้วยการผ่าน gel permeation chromatography ที่บรรจุด้วย Sephadex LH-20 และใช้ตัวชะ คือ เอทธานอล เพื่อช่วยกำจัดกลิ่น

Kanner, Shalomn, Benand และ River (1984) ได้นำเอนไซม์เพคติเนส (pectinase) เซลลูเลส (cellulase) และตัวทำละลาย d-limonene มาใช้ในการสกัดคาโรทีนอยด์จากเปลือกส้ม โดยทำให้ส่วนผสมของเปลือกส้ม เอนไซม์และ d-limonene มีค่า pH เป็น 4.5 แช่ย่านาน 8 ชั่วโมง พบว่าการสกัดด้วยเอนไซม์กับตัวทำละลายสามารถสกัดคาโรทีนอยด์ได้ร้อยละ 75 ในขณะที่การสกัดด้วยตัวทำละลาย d-limonene เพียงอย่างเดียวสกัดได้คาโรทีนอยด์ร้อยละ 3

การสกัดคาโรทีนอยด์จากพืชสดโดยวิธีการของ AOAC (1990) ทำโดยตัดตัวอย่างด้วยมีดหรือกรรไกรหรือบดให้มีขนาดเล็กลง นำตัวอย่าง 2-5 กรัม ปั่นกับอะซีโตน 40 มิลลิลิตร เฮกเซน 60 มิลลิลิตร และ $MgCO_3$ 0.1 กรัม นาน 5 นาที กรองด้วยวิธี suction หรือปล่อยให้ตกตะกอน แยกเอาของเหลวออก แล้วล้างส่วนที่เป็นของแข็งอีกครั้งด้วยอะซีโตน 25 มิลลิลิตร ล้างซ้ำด้วยเฮกเซน 25 มิลลิลิตร และล้างสารละลายสกัดในอะซีโตนด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร 5 ครั้ง ถ่ายส่วนสกัดที่อยู่ชั้นบนลงในกรวยแยกขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเฮกเซน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ในการแยกรงควัตถุใช้ column chromatography ที่บรรจุด้วย magnesia ผสมกับ diatomaceous earth ในอัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนัก โดยใช้ตัวชะคือ อะซีโตน ผสมกับเฮกเซน ในอัตราส่วน 1:9 โดยปริมาตร

Aravantinos-Zafiris และคณะ (1992) ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการสกัดคาโรทีนอยด์จากเปลือกส้มจากโรงงานผลิตน้ำส้มในประเทศกรีซ โดยเก็บเปลือกส้มที่ -18 องศาเซลเซียส นำเปลือกมาปั่นกับน้ำกลั่นเพื่อกำจัดส่วนที่เป็นน้ำตาลและสิ่งสกปรก จากนั้น

จึงสกัดด้วยตัวทำละลายในการทดลองใช้ตัวทำละลายชนิดต่างๆ ดังนี้ อะซีโตน เตตระไฮโดรฟิเรน ปิโตรเลียมอีเธอร์ และเฮกเซน กำจัดตัวทำละลายด้วยการระเหยที่ 35 องศาเซลเซียส ภายใต้สุญญากาศ แล้วถ่ายไปยังเฮกเซน และให้การแยกสารละลายดีขึ้นด้วยการเติมสารละลาย NaCl เข้มข้นร้อยละ 10 นำส่วนที่สกัดมากลั่นที่ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้ภาวะสุญญากาศ นำสารที่สกัดได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร แล้วคำนวณปริมาณคาโรทีนอยด์ในค่าของเบตาคาโรทีน จากการศึกษาพบว่าภาวะที่เหมาะสมในการสกัดตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการสกัด คือ อะซีโตน รองมา คือ เตตระไฮโดรฟิเรน ปิโตรเลียมอีเธอร์ และเฮกเซน ตามลำดับ ในการสกัดครั้งแรกใช้อัตราส่วนระหว่างตัวทำละลายกับเปลือกส้ม 1.5:1 ปริมาตรต่อน้ำหนัก กวนนาน 5 นาที ส่วนการสกัดครั้งต่อไปใช้อัตราส่วนตัวทำละลายกับเปลือกส้ม 2.0:1 ปริมาตรต่อน้ำหนัก กวนนาน 10 นาที สามารถสกัดได้คาโรทีนอยด์ปริมาณสูงสุด และการสกัดในช่วงอุณหภูมิ 16-26 องศาเซลเซียส ไม่มีผลต่อปริมาณคาโรทีนอยด์ที่สกัดได้ แต่การสกัดที่อุณหภูมิสูงกว่า 26 องศาเซลเซียส คาโรทีนอยด์ที่สกัดได้มีปริมาณลดลง และมีการศึกษาการสกัดจากเปลือกส้มแห้งที่ผ่านวิธีการต่างๆ คือ การอบแห้งที่ 80 องศาเซลเซียส ด้วยระบบสุญญากาศ และการอบไอน้ำที่ 85 องศาเซลเซียส จากการอบจะได้เปลือกส้มที่มีความชื้น 76±5 กรัมต่อกิโลกรัม จากการศึกษาพบว่าในการสกัดเปลือกส้มแห้งเกิดการสูญเสียของคาโรทีนอยด์ประมาณร้อยละ 3 และร้อยละ 15 ตามลำดับ

<u>การวิเคราะห์คาโรทีนอยด์ด้วยวิธีไฮเพอฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี</u> (High performance liquid chromatography, HPLC)

ในปัจจุบันมีการใช้ วิธี HPLC ในการวิเคราะห์คาโรทีนอยด์ด้านการจำแนกและหาปริมาณคาโรทีนอยด์จากแหล่งต่างๆ เนื่องจาก HPLC เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงให้ความแม่นยำและใช้ระยะเวลาสั้นในการวิเคราะห์องค์ประกอบในสารสกัดจากอาหาร โดยเฉพาะสารจากธรรมชาติที่มีคุณค่าทางอาหาร (Khachik et al., 1992) เช่นในปี ค.ศ. 1986 Bureau และ Bushway ใช้วิธี HPLC หาโปรวิตามินเอในผักและผลไม้ ในประเทศสหรัฐอเมริกา โดยใช้เตตระไฮโดรฟิวเรน (tetrahydrofurane) เป็นตัวทำละลายในการสกัด

โปรวิตามินเอจากตัวอย่าง คอลัมน์ที่ใช้คือ Partisil 5 ODS และตัวพาคือ acetonitrile : tetrahydrofurane : water (85:12.5:2.5 โดยปริมาตร) อัตราการไหล (flow rate) 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที และวัดที่ 470 นาโนเมตร ในปีเดียวกันนี้ Fisher และ Rouseff ใช้ HPLC วิเคราะห์หาเบตาคาโรทีน เบตาคริบโตแซนทิน (β-cryptoxanthin) และแอลฟาคาโรทีนในน้ำส้ม โดยใช้คอลัมน์ C-18 ตัวพาที่ใช้ คือ acetronitrile : methylenechloride : methanol (65:25:10 โดยปริมาตร) อัตราการไหล 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้ตัวอย่าง 50 ไมโครลิตร วัดที่ 450 นาโนเมตร นอกจากมีการใช้ HPLC ในการวิเคราะห์คาโรทีนอยด์ในพืชแล้วยังมีการนำ HPLC วิเคราะห์คาโรทีนอยด์จากแหล่งอื่นๆ Nelis และ De Leenheer (1983)วิเคราะห์หาปริมาณและแยกชนิดคาโรทีนอยด์ในซีรัม ใช้คอลัมน์ที่บรรจุด้วย Zorbax ODS ขนาด 7 ไมครอน ตัวพาที่ใช้ (mobile phase) คือ acetronitrile : dichloromethane: methanol (70:20:10 โดยปริมาตร) อัตราการไหล 1-2 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรตัวอย่างที่ฉีดเท่ากับ 50 ไมโครลิตร ตรวจหาที่ 450 นาโนเมตร นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเปรียบเทียบวิธี HPLC กับ column chromatography ในการวิเคราะห์หาและจำแนกชนิดของคาโรทีนอยด์ในมันสำปะหลัง การศึกษาของ Adewusi และ Bradbury (1993) โดยใช้ภาวะใน HPLC คือใช้คอลัมน์ที่บรรจุด้วย reversephase Spherisorb ODS-2 ขนาด 5 ไมครอน ใช้ตัวพาคือacetonitrile : dichloromethane : methanol (70:20:10 โดยปริมาตร) อัตราการไหล 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 และ 450 นาโนเมตร ส่วนภาวะที่ใช้ใน column chromatography ใช้คอลัมน์ที่บรรจุ magnesium oxide ผสมกับ Hyflo supercel (1:1 โดยน้ำหนัก) ที่ activated ด้วยความร้อน 120 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง ใช้ตัวชะ คือ อะซีโตนและปิโตรเลียมอีเธอร์ นำสารละลายที่ผ่านคอลัมน์แต่ละส่วนที่แยกได้ไปตรวจหาค่าการดูดกลืนแสงที่ 300-520 นาโนเมตร และฉีดเข้าเครื่อง HPLC จากผลการทดลองทั้งสองวิธีสามารถวิเคราะห์ได้ดีแต่ HPLC จะให้ค่าที่ละเอียดกว่า (ด้านปริมาณ) ดังนั้นในการวิเคราะห์หาปริมาณและจำแนกคาโรทีนอยด์สามารถใช้ วิธี column chromatography เนื่องจากค่าใช้จ่ายต่ำกว่าวิธี HPLC และเหมาะสมกับประเทศที่กำลังพัฒนา

การผลิตคาโรทีนอยด์ในเชิงการค้า สามารถทำได้ในรูปต่างๆ คือ

1. แขวนลอยในไขมัน (oily suspension) เตรียมโดยบดผลึกคาโรทีนอยด์ ซึ่งส่วนใหญ่ คือ เบตาคาโรทีน และอะโปคาโรทีนอล (apocarotenal) (Gordon, 1972) ให้มีขนาดเล็ก หรือ microcrystal ในภาวะของไนโตรเจนหรือในภาวะที่ไม่มีออกซิเจน จนได้อนุภาคขนาด 5-10 ไมครอน (วรรณา ตั้งเจริญชัย, 2531) แล้วละลายในน้ำมันพืช เช่น น้ำมันถั่วลิสง น้ำมันมะพร้าวที่ผ่านกระบวนการไฮโดรจิเนชัน เป็นต้น กวนที่ 43-49 องศาเซลเซียส เพื่อให้รวมเป็นเนื้อเดียวกัน โดยผลึกของคาโรทีนอยด์แขวนลอยในน้ำมันพืชซึ่งมีความเข้มข้นของคาโรทีนอยด์อยู่ระหว่างร้อยละ 20-30 และมักไม่เติมแอนตีออกซิแดนซ์ (antioxidant) เนื่องจากน้ำมันเป็นตัวป้องกันออกซิเจนอยู่แล้ว จากการศึกษาเสถียรภาพของสารแขวนลอยในน้ำมันโดยเก็บที่ 23 องศาเซลเซียส 37 องศาเซลเซียส และ 45 องศาเซลเซียส นาน 3 เดือน พบว่าเก็บที่ 23 องศาเซลเซียส มีค่า retention (%) สูงกว่าที่อุณหภูมิอื่นๆ จึงมักเก็บที่อุณหภูมิ 20-24 องศาเซลเซียส หรือที่อุณหภูมิแช่เยือกแข็ง (Klaui and Bauernfeind, 1981)

2. สารละลายในน้ำมัน (oily solution) คาโรทีนอยด์ส่วนใหญ่ คือ เบตาคาโรทีนและอะโปคาโรทีนอล ซึ่งละลายในน้ำมันพืชร้อน อาจเติม antioxidant และหลีกเลี่ยงภาวะที่มีแสงสว่าง อากาศ ความเข้มข้นของคาโรทีนอยด์ในน้ำมันเป็นร้อยละ 2-10 (Engle, 1979) และควรเก็บที่อุณหภูมิแช่เย็น (5 องศาเซลเซียส)

สารแขวนลอยในน้ำมันและสารละลายในน้ำมันเหมาะที่จะใช้กับผลิตภัณฑ์ที่มีไขมันหรือน้ำมันเป็นส่วนประกอบ (Emodi, 1978; Philip, 1975)

3. คอลลอยด์ (colloidal dispersion) เตรียมโดยการละลายคาโรทีนอยด์ในตัวทำละลายพวกสารระเหยที่เหมาะสม(chloroform, trichloroethyllene, carbon tetrachlride) และมักเติม surface active agent เช่น sucrose, fatty acid และ ester เป็นต้น อาจมีการเติมอิมัลซิไฟเออร์ (emulsifier) เพื่อให้การกระจายตัว

ได้ดี โดยนำมาผสมกับสารละลายพวกไฮโดรคอลลอยด์ เช่น เจลาติน เป็นต้น นำส่วนผสมที่เป็นของเหลวไประเหยเพื่อกำจัดตัวทำละลาย ผลิตภัณฑ์อาจอยู่ในรูปของเหลว เม็ดแห้ง(dry beadlet) หรือทำให้แห้งแบบพ่นกระจาย (spray drying) (Emodi, 1978) โดยผสมกับ methylcellulose

4. อิมัลชัน (emulsion) โดยการทำให้ของผสมคาโรทีนอยด์และน้ำมันพืชเป็นอิมัลชันด้วยกัมอะราบิค (gum arabic) หรืออิมัลซิไฟเออร์อื่นๆ ที่เหมาะสมหรือใส่ของผสมลงในสารละลายคอลลอยด์กับพลาสติไซเซอร์(plasticizer) เช่นเจลาตินกับน้ำตาล (Emodi, 1978)เพื่อเคลือบเม็ดคาโรทีนอยด์ทำให้มีเสถียรภาพดี ผลิตภัณฑ์อาจอยู่ในรูปของเหลว หรือทำให้แห้งแบบพ่นกระจายที่มีลักษณะเป็นเม็ดกลมสีส้มถึงแดงขนาด 30-80 mesh ผิวธรุขระ ซึ่งมีคาโรทีนอยด์อยู่ร้อยละ 1-5 (วรรณา ตั้งเจริญชัย, 2531; ศิวาพร ศิวเวชช, 2529) อิมัลชันเมื่อกระจายในน้ำจะให้สารละลายสีเหลืองส้มและขุ่นคล้ายน้ำส้ม

5. สารละลายสีสกัดเข้มข้น (concentrated color extract) Kew และ Berry (1970; 1971) สกัดคาโรทีนอยด์จากเปลือกส้มวาเลนเซีย เพื่อเติมลงในน้ำส้มคั้นและน้ำส้มเข้มข้น โดยใช้ในรูปสารละลายสีสกัดเข้มข้นที่ผ่านกระบวนการ saponification และไอน้ำเพื่อกำจัดกลิ่นแปลกปลอม