บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

การวิเคราะห์ค่าความชื้นและปริมาณเปลือกส้มเขียวหวานสด

จากการวิเคราะห์ค่าความชื้นของเปลือกส้มเขียวหวานสด พบว่าผลการวิเคราะห์ค่าความชื้นมีค่าอยู่ในช่วงเดียวกับเปลือกส้มทั่วไป (ร้อยละ 70-80) ซึ่งค่าความชื้นของเปลือกส้มมีค่าต่างกันไปบ้าง เนื่องจากค่าความชื้นนี้จะขึ้นกับสถานที่ปลูกซึ่งมีปริมาณน้ำต่างกันไป (ณิฏศิริ สุยสุวรรณ, 2526) ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณเปลือกส้มเขียวหวานมีปริมาณสูงกว่าการศึกษาของ Gross (1977) ที่ได้ศึกษาส้มทั่วไปที่มีอายุได้ 47 สัปดาห์ จะมีเปลือกอยู่ประมาณร้อยละ 19 ทั้งนี้เนื่องจากการเพิ่มปริมาณเปลือกเป็นปฏิภาคโดยตรงกับอายุการเก็บเกี่ยว (ศิริวัลย์ พฤติวิลัย, 2530) และส้มแต่ละพันธุ์มีปริมาณเปลือกส้มแตกต่างกันไป เช่น ส้มวาเลนเซียมีปริมาณเปลือกส้มร้อยละ 29 (Curl and Bailey, 1956) เป็นต้น

การวิเคราะห์คาโรทีนอยด์ในสารละลายสกัด

เบตาคาโรทีนคือคาโรทีนอยด์ชนิดหนึ่งซึ่งเป็นโปรวิตามินเอ สามารถเปลี่ยนเป็นวิตามินเอ และ Hoffman LaRoche (1994) ศึกษาพบว่าเบตาคาโรทีนช่วยลดอัตราการเป็นมะเร็งได้เพราะเบตาคาโรทีนช่วยไม่ให้เนื้อเยื่อแบ่งเซลผิดปรกติ ซึ่งผลการทดลองพบว่าสารละลายสกัดมีเบตาคาโรทีน ดังนั้นการวิเคราะห์ปริมาณคาโรทีนอยด์ทั้งหมดในสารละลายสกัดจึงแสดงในค่าของเบตาคาโรทีน โดยใช้วิธีสเปคโตรโฟโตเมตรีและการคำนวณปริมาณคาโรทีนอยด์ใช้ค่า extinction coefficient ($E^{1\%}_{1cm}$) (Curl and Bailey, 1957; Ramakrishnan and Francis, 1973) ส่วนการวิเคราะห์เบตาคาโรทีนในสารละลายที่

สกัดได้ใช้วิธี HPLC ผลจากการวิเคราะห์เบตาคาโรทีนในสารละลายสกัด พบว่าสารละลายสกัดมีค่าเบตาคาโรทีนเป็นร้อยละ 11.15 ของคาโรทีนอยด์ทั้งหมด หรืออัตราส่วนระหว่างคาโรทีนอยด์ทั้งหมดกับเบตาคาโรทีนมีค่าเท่ากับ 9:1 โดยน้ำหนัก (หน้า 56) ซึ่งมีค่าสูงกว่าผลการวิเคราะห์ของ Gross (1977)ที่วิเคราะห์ปริมาณเบตาคาโรทีนในเปลือกส้มแทนเจอรีน (ร้อยละ 0.4) Klaui และ Bauernfeind (1981) ที่วิเคราะห์ปริมาณเบตาคาโรทีนในเปลือกส้มที่ปลูกในประเทศสหรัฐอเมริกา (อัตราส่วนคาโรทีนอยด์ทั้งหมดกับเบตาคาโรทีนเป็น 11:1-20:1 โดยน้ำหนัก) ทั้งนี้เนื่องจากเปลือกส้มเขียวหวานที่นำมาวิเคราะห์มีความแตกต่างกันของสภาพแวดล้อมของการปลูก สถานที่ปลูก พันธุ์ ฤดูกาลและความแก่อ่อนของส้ม

งานวิจัยนี้ยังได้ศึกษาชนิดคาโรทีนอยด์ของสารละลายสกัดที่สกัดได้ โดยเลือกใช้วิธีโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง (TLC)ในการแยกคาโรทีนอยด์ในสารละลายสกัดและใช้วิธีสเปคโตรโฟโตเมตรีเพื่อศึกษาลักษณะการดูดกลืนแสงของคาโรทีนอยด์ เนื่องจากวิธีทั้งสองนี้ไม่ต้องใช้คาโรทีนอยด์มาตรฐานหลายชนิดซึ่งมีราคาแพง และหาได้ยาก ต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศ ผลจากการวิเคราะห์ชนิดคาโรทีนอยด์ในสารละลายสกัดด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง และวิธีสเปคโตรโฟโตเมตรี พบว่าสามารถจำแนกคาโรทีนอยด์ได้ 3 ชนิด คือ เบตาคาโรทีน ซีตาคาโรทีนและเบตาซีแซนทิน (ตารางที่ 10 หน้า 55) เมื่อเปรียบเทียบกับผลการศึกษาของ Curl และ Bailay (1955, 1956, 1961) ที่จำแนกคาโรทีนอยด์ด้วยวิธีcountercurrent distribution และ column chromatography ซึ่งสามารถจำแนกคาโรทีนอยด์ได้มากชนิดกว่า เนื่องจากคาโรทีนอยด์ทั้งสามชนิดที่พบอาจมีปริมาณสูงกว่าคาโรทีนอยด์ชนิดอื่น และการจำแนกคาโรทีนอยด์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบผิวบางและวิธีสเปคโตรโฟโตเมตรีในการทดลองมีความไวต่ำกว่า นอกจากนี้เปลือกส้มจะมีปริมาณและชนิดคาโรทีนอยด์แตกต่างกันตามสายพันธุ์ สถานที่ปลูก ฯลฯ (Mackinney, 1961)

<u>การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการสกัดคาโรทีนอยด์จากเปลือกส้มเขียวหวาน</u>

1. การศึกษาผลของตัวทำละลายและตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด และจำนวนครั้งของการสกัด

เมื่อใช้ตัวทำละลาย คือ อะซีโตน เอธานอล 95% และปิโตรเลียมอีเธอร์

สกัดซ้ำ 2 ครั้งในแต่ละตัวอย่าง (นำเปลือกส้มที่สกัดไปแล้วหนึ่งครั้งมาสกัดซ้ำ) ด้วยอัตราส่วนระหว่างตัวทำละลายกับเปลือกส้มเป็น 2.5:1 ปริมาตรต่อน้ำหนัก อุณหภูมิในการสกัดคือ 25 องศาเซลเซียส และเวลาในการกวนนาน 30 นาที

ผลการทดลองพบว่าอะซีโตนเป็นตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการสกัดคาโรทีนอยด์จากเปลือกส้มซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Aravantinos-Zafiris และคณะ (1992) ที่ใช้อะซีโตน เตตราไฮโดรฟิวแรน ปิโตรเลียมอีเธอร์และเฮกเซนสกัดคาโรทีนอยด์จากเปลือกส้มที่ปลูกในประเทศกรีซ พบว่าอะซีโตนสกัดคาโรทีนอยด์จากเปลือกส้มได้ปริมาณมากสุดสุดและเฮกเซนสกัดคาโรทีนอยด์ได้ปริมาณต่ำสุด และเมื่อใช้อะซีโตน เอธานอล 95% และปิโตรเลียมอีเธอร์สกัดซ้ำ 6 ครั้ง (ตารางที่ 5 และรูปที่ 8) พบว่าอะซีโตนและเอธานอล 95 % สกัดคาโรทีนอยด์ได้ปริมาณมากที่สุดในการสกัดครั้งที่ 2 ส่วนปิโตรเลียมอีเธอร์สกัดปริมาณคาโรทีนอยด์มากสุดในการสกัดครั้งแรก การที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากอะซีโตนและเอธานอลมีโพลาริตีค่อนข้างสูงสามารถรวมหรือละลายกับน้ำและสารที่มีโพลาริตีใกล้เคียงกัน ดังนั้นอะซีโตนและเอธานอลสามารถแพร่เข้าสู่ชั้นโครโมพลาสในเนื้อเยื่อของเปลือกส้ม จึงสามารถสกัดคาโรทีนอยด์ออกมาได้ (Gross, 1977) จะเห็นได้จากอะซีโตนและเอธานอลสกัดคาโรทีนอยด์ได้ปริมาณต่ำในการสกัดครั้งแรก เพราะอะซีโตนหรือเอธานอลบางส่วนจะไปรวมกับน้ำในเปลือกส้ม อะซีโตนและเอธานอลสกัดคาโรทีนอยด์ได้ปริมาณมากสุดในการสกัดครั้งที่ 2 เนื่องจากน้ำและสารในเปลือกส้มละลายไปกับอะซีโตนและเอธานอลในการสกัดในครั้งแรก ทำให้อะซีโตนและเอธานอลแพร่เข้าเนื้อเยื่อของเปลือกส้มได้เต็มที่ อะซีโตนและเอธานอลจึงสกัดคาโรทีนอยด์ได้ปริมาณน้อยลงในการสกัดครั้งต่อๆ ไป ส่วนปิโตรเลียมอีเธอร์มีโพลาริตีต่ำมากจึงไม่สามารถรวมกับน้ำในเปลือกส้มได้ ทำให้ปิโตรเลียมอีเธอร์ไม่สามารถแพร่เข้าสู่ชั้นโครโมพลาสได้จึงสกัดคาโรทีนอยด์ได้เฉพาะส่วนที่ออกมาจากเนื้อเยื่อที่ฉีกขาด เนื่องจากการตีป่น ดังนั้นปิโตรเลียมอีเธอร์สกัดปริมาณคาโรทีนอยด์มากสุดในการสกัดครั้งแรก (จากการสกัด 6 ครั้ง) ซึ่งได้ผลสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Kew และ Berry (1970) ที่สกัดคาโรทีนอยด์จากเปลือกส้มพันธุ์ต่างๆ เมื่อสกัดคาโรทีนอยด์จำนวนครั้งมากขึ้น จะพบว่าปริมาณคาโรทีนอยด์ที่สกัดได้มีค่าลดลง ดังนั้นในการสกัดเปลือกส้มสดควรใช้ตัวทำละลายที่รวมกับน้ำในเปลือกส้มได้ แต่มีโพลาริตีไม่ต่ำมากหรือสูงเกินไป เพราะคาโรทีนอยด์ส่วนใหญ่มีโพลาริตีค่อนข้างต่ำ ดังนั้นอะซีโตนจึงสกัดคาโรทีนอยด์ได้ปริมาณมากกว่า การใช้เอธานอลสกัด

คาโรทีนอยด์จากเปลือกส้มเขียวหวาน ในทางปฏิบัติ พบว่าการใช้อะซีโตนสกัดคาโรทีนอยด์จะสะดวกกว่า การใช้เอธานอลสกัดถึงแม้ว่าเอธานอลจะปลอดภัยกว่าอะซีโตน เนื่องจากในวิธีการสกัดมีขั้นตอนการระเหยตัวทำละลายก่อนที่จะถ่ายสารละลายคาโรทีนอยด์ไปยังเฮกเซนเพื่อทำให้คาโรทีนอยด์บริสุทธิ์มากขึ้น ในขั้นตอนการระเหยตัวทำละลายจึงทำที่อุณหภูมิไม่เกิน 40 องศาเซลเซียส ในระบบสุญญากาศ (Britton, 1985) ที่อุณหภูมินี้อะซีโตนจะระเหยได้เร็วกว่าเอธานอล เพราะอะซีโตนมีจุดเดือดต่ำกว่าเอธานอล (Morrison and Boyd, 1992) (อะซีโตนมีจุดเดือด 56 องศาเซลเซียส ส่วนเอธานอลมีจุดเดือด 78 องศาเซลเซียส) ประกอบกับในขั้นตอนการระเหยจะเป็นระบบเปิด ดังนั้นถ้าใช้เวลาในการระเหยน้อย โอกาสที่คาโรทีนอยด์สัมผัสกับแสงสว่างจะน้อยลง การสูญเสียของคาโรทีนอยด์จะต่ำลงไปด้วย จากผลการทดลอง จะเห็นว่าคาโรทีนอยด์ที่สกัดได้ในแต่ละครั้งเมื่อคิดเป็นร้อยละของปริมาณคาโรทีนอยด์ทั้งหมดที่สกัดได้จากการสกัดคาโรทีนอยด์ 6 ครั้ง พบว่าอะซีโตนสามารถสกัดคาโรทีนอยด์ได้ประมาณร้อยละ 87 เมื่อสกัด 4 ครั้ง ส่วนการสกัดคาโรทีนอยด์ในครั้งที่ 5 และ 6 ได้ปริมาณคาโรทีนอยด์น้อยมากเมื่อเทียบกับการสกัดในครั้งที่ 2 3 และ 4 จึงไม่ควรสกัดคาโรทีนอยด์ในครั้งที่ 5 และ 6 เพราะเป็นการสิ้นเปลืองตัวทำละลายและเวลา

2. การศึกษาหาอัตราส่วนระหว่างตัวทำละลายกับปริมาณเปลือกส้มร่วมกับเวลาในการกวน

จากการทดลองแปรอัตราส่วนระหว่างตัวทำละลาย กับปริมาณเปลือกส้ม ด้วยอัตราส่วน 1:1 1.5:1 2:1 2.5:1 และ 3:1 ปริมาตรต่อน้ำหนัก แปรเวลาในการกวน 5 10 15 20 25 และ30 นาที โดยอุณหภูมิคงที่ที่ 25 องศาเซลเซียส จากผลการทดลอง (ตารางที่ 7) พบว่าอิทธิพลของอัตราส่วนระหว่างตัวทำละลายกับเปลือกส้ม เวลาในการกวนและอิทธิพลร่วมของปัจจัยทั้งสองมีผลต่อปริมาณคาโรทีนอยด์ที่สกัดได้

จากผลการทดลอง พบว่าภาวะที่สกัดคาโรทีนอยด์ได้ปริมาณมากสุดอย่างนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.5$) (ตารางที่ 6) คืออัตราส่วนระหว่างตัวทำละลายกับเปลือกส้มเป็น 2.5:1 ปริมาตรต่อน้ำหนัก กวนนาน 25 นาที นอกจากนี้พบว่าการใช้ตัวทำละลายในปริมาณต่ำ (อัตราส่วนระหว่างตัวทำละลายกับปริมาณเปลือกส้มเป็น 1:1 และ 1.5:1 (ปริมาตรต่อ

น้ำหนัก) จะสกัดคาโรทีนอยด์ได้ปริมาณต่ำ เนื่องจากปริมาณตัวทำละลายไม่เพียงพอกับปริมาณเปลือกส้มและกวนได้ไม่ทั่วถึง ทำให้ประสิทธิภาพของตัวทำละลายแพร่เข้าสู่เนื้อเยื่อเปลือกส้มได้ต่ำลง (De Ritter and Purcell, 1981)ส่วนอัตราส่วนระหว่างตัวทำละลายกับเปลือกส้มเป็น 2.5:1 และ 3:1 ปริมาตรต่อน้ำหนัก สามารถสกัดคาโรทีนอยด์ได้ในปริมาณมาก เพราะปริมาณตัวทำละลายเพียงพอกับปริมาณเปลือกส้ม แต่อัตราส่วนระหว่างตัวทำละลายกับเปลือกส้มเป็น 2.5:1 ปริมาตรต่อน้ำหนัก เมื่อใช้เวลาในการกวนต่างๆ กันจะสกัดคาโรทีนอยด์ได้ปริมาณสูงกว่าการใช้อัตราส่วนระหว่างตัวทำละลายกับเปลือกส้มเป็น 3:1 ปริมาตรต่อน้ำหนัก เนื่องจากการใช้อัตราส่วนระหว่างตัวทำละลายกับเปลือกส้มเป็น 3:1 ปริมาตรต่อน้ำหนัก สกัดคาโรทีนอยด์จะได้ปริมาณสารละลายสกัดในปริมาณมาก ดังนั้นในช่วงการระเหยตัวทำละลายที่ทำในระบบเปิดจะใช้เวลานานในการระเหย ทำให้สารละลายสกัดสัมผัสกับแสงสว่างได้ จึงเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน

จากการทดลอง พบว่าเมื่อใช้เวลาในการกวนระหว่างการสกัดต่ำๆ จะสกัดคาโรทีนอยด์ได้ปริมาณน้อย (ตารางที่ 6 และรูปที่ 9) เพราะการกวนจะช่วยให้ตัวทำละลายสัมผัสกับเปลือกส้มได้ทั่วถึง ทำให้ตัวทำละลายสามารถแพร่เข้าเนื้อเยื่อของเปลือกส้ม และเมื่อใช้เวลาในการกวนนานขึ้นจะทำให้ตัวทำละลายสามารถแพร่เข้าเนื้อเยื่อของเปลือกส้มได้นานพอที่จะสกัดคาโรทีนอยด์จากเปลือกส้ม และเมื่อพิจารณาการใช้อัตราส่วนระหว่างตัวทำละลายกับเปลือกส้มที่อัตราส่วนต่างๆ กัน และใช้เวลาในการกวนนาน 30 นาที สามารถสกัดคาโรทีนอยด์ได้ปริมาณต่ำ เนื่องจากในระบบการกวนคาโรทีนอยด์สามารถสัมผัสกับออกซิเจนซึ่งทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (Britton, 1985) จะเห็นว่าจากการทดลองในการสกัดเมื่อใช้เวลากวนนาน 25 นาที จะสกัดได้คาโรทีนอยด์มากสุด ดังนั้นเมื่อใช้เวลาในการกวนมากกว่า 25 นาที จะเกิดการสูญเสียคาโรทีนอยด์ จะเห็นว่าเวลาในการกวนระหว่างการสกัดมีผลต่อปริมาณคาโรทีนอยด์ที่สกัดได้

3. การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการสกัดคาโรทีนอยด์

จากการทดลองแปรอุณหภูมิเป็น 5 10 15 20 25 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส ในการสกัดคาโรทีนอยด์ พบว่าอิทธิพลของอุณหภูมิในการสกัดมีผลต่อปริมาณ

คาโรทีนอยด์ที่สกัดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จากผลการทดลองอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัดคาโรทีนอยด์ คืออุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 8 และรูปที่ 10) ส่วนในช่วงอุณหภูมิ 15-25 องศาเซลเซียส ปริมาณของคาโรทีนอยด์ที่สกัดได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p \leq 0.5$) แสดงว่าอุณหภูมิในช่วงนี้ไม่มีผลต่อปริมาณคาโรทีนอยด์ที่สกัดได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Aravantinos-Zefiris และคณะ (1992) และการสกัดคาโรทีนอยด์ที่อุณหภูมิสูงกว่า 25 องศาเซลเซียส สามารถสกัดคาโรทีนอยด์ได้ปริมาณลดลง เนื่องจากความร้อนเป็นตัวเร่งการเกิดออกซิเดชัน (Engle, 1979) และเกิดไอโซเมอไรเซชันเปลี่ยนจาก trans-form เป็น cis-form ซึ่งมีเสถียรภาพน้อยกว่า trans-form ทำให้สูญเสียคาโรทีนอยด์ในระหว่างการสกัด

<u>การทำสารละลายสกัดให้บริสุทธิ์บางส่วน</u>

การที่ต้องตรวจคาโรทีนอยด์ในสารละลายสกัดก่อนผ่าน saponification เนื่องจาก saponification อาจทำให้เกิดการสูญเสียคาโรทีนอยด์บางชนิดไป เพราะจากการรายงานของ Curl (1967) ศึกษาหาชนิดคาโรทีนอยด์ในเปลือกส้มวาเลนเซีย พบว่าเมื่อนำสารละลายสกัดผ่าน saponified จะไม่พบ apo-10'-violaxanthanal ดังนั้นในการทดลองจึงตรวจสอบคาโรทีนอยด์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบผิวบางของสารละลายสกัดก่อนและหลังผ่าน saponification ซึ่งพบว่าแถบสีที่ปรากฏบนแผ่นโครมาโตกราฟของสารละลายสกัดทั้งผ่านและไม่ผ่าน saponification มีลักษณะเหมือนกัน ดังนั้นแสดงว่าไม่มีการสูญเสียคาโรทีนอยด์เมื่อผ่านกระบวนการ saponification จากการทดลอง พบว่าเมื่อเก็บสารละลายสกัดที่อุณหภูมิแช่เยือกแข็งจะเกิดตะกอน แต่เมื่อนำสารละลายสกัดนี้ผ่าน saponification เก็บ ที่อุณหภูมิแช่เยือกแข็ง จะไม่เกิดตะกอน เนื่องจาก saponification จะกำจัดสารปนเปื้อนจากเปลือกส้มระหว่างการสกัดได้ neutral lipid ที่อยู่ในส่วนเปลือกส้ม และยังทำลาย chlorophyll อีกด้วย (Britton, 1985)

การหาสารปนเปื้อนและตัวทำละลายตกค้างในสารละลายสกัดคาโรทีนอยด์เข้มข้น

1. การวิเคราะห์หาสารปนเปื้อน คือ สารหนู สารตะกั่ว และทองแดง

การวิเคราะห์สารปนเปื้อน พบว่า มีสารหนู สารตะกั่ว มีปริมาณต่ำกว่ามาตรฐานของสีผสมอาหารตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 21 พ.ศ. 2522 และFDA กำหนดไว้ คือสารหนูไม่ควรเกิน 3 ppm (3000 ppb) สารตะกั่วไม่เกิน 10 ppm (10000 ppb) นอกจากการวิเคราะห์สารหนูและสารตะกั่วยังมีการวิเคราะห์หาทองแดง เนื่องจากการปลูกส้มเขียวหวานในประเทศไทย มักมีการใช้ยาฆ่าเชื้อราที่มีทองแดงเป็นองค์ประกอบอยู่และจะตกค้างอยู่ตามเปลือกส้ม จากผลการวิเคราะห์ปริมาณทองแดง พบว่าสารละลายสกัดมีปริมาณทองแดงต่ำ จะเห็นว่าสารละลายสกัดมีสารหนู สารตะกั่ว และ ทองแดงในปริมาณต่ำมาก เนื่องจากในการวิจัยนี้มีการล้างวัตถุดิบถึงสองครั้ง จึงทำให้ปริมาณของสารเหล่านี้มีค่าต่ำมาก ดังนั้นในการผลิตสีผสมอาหารควรเน้นในเรื่องการล้างวัตถุดิบที่นำมาผลิต

2. การวิเคราะห์หาตัวทำละลายตกค้างที่ใช้ในการสกัด

การสกัดสารด้วยตัวทำละลายมักเกิดปัญหาตัวทำละลายตกค้างอยู่ในสารที่สกัด โดยเฉพาะสารละลายสกัดที่นำไปใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร ซึ่งตัวทำละลายบางชนิดเป็นอันตรายต่อร่างกาย ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงวิเคราะห์ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด คือ อะซีโตนและเฮกเซนด้วยวิธีกาซโครมาโตกราฟี (GC) ผลจากการวิเคราะห์สารทั้งสองชนิดโดยดูจากค่า retention time ของเฮกเซนและอะซีโตนมาตรฐานกับสารละลายสกัดที่สกัดได้ พบว่าขั้นตอนการสกัดในงานวิจัยนี้สามารถกำจัดตัวทำละลายได้หมด ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากในขั้นตอนการสกัดมีการกำจัดอะซีโตนและเฮกเซนโดยวิธีการระเหยด้วย rotary evaporator ในระบบสูญญากาศ ซึ่งจะทำการระเหยตัวทำละลายในสารสกัดจนไม่มีตัวทำละลายในสารสกัด โดยจะหยุดการระเหยเมื่อปริมาตรของสารสกัดในระบบคงที่หรือตัวทำละลายไม่เกิดการกลั่นตัวออกมา โดยเฉพาะเฮกเซนซึ่งกลั่นตัวได้ดี นอกจากนี้หลังการระเหยยังมีการใช้น้ำกลั่นล้าง

สารสกัด(ดังรูปที่ 5) เพื่อกำจัดอะซีโตนที่อาจหลงเหลืออยู่ในสารสกัดโดยน้ำจะละลายอะซีโตนออกจากสารสกัด (Gross, 1977; Britton, 1985)

การศึกษาเสถียรภาพของสารละลายสกัดคาโรทีนอยด์เข้มข้น

ความร้อนเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้สารละลายสกัดคาโรทีนอยด์เข้มข้นสูญเสียคาโรทีนอยด์ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงศึกษาผลของอุณหภูมิต่อปริมาณคาโรทีนอยด์ในสารละลายสกัดคาโรทีนอยด์เข้มข้นระหว่างการเก็บ 2 เดือน(8 สัปดาห์) เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมกับการเก็บสารละลายสกัดคาโรทีนอยด์เข้มข้น งานวิจัยนี้จะเก็บสารละลายสกัดคาโรทีนอยด์เข้มข้นเพียง 2 เดือน เพราะ Berry, Bissett และ Kew (1971) ศึกษาเสถียรภาพของสารละลายสกัดคาโรทีนอยด์เข้มข้นของส้มวาเลนเซีย พบว่าเมื่อเก็บสารละลายสกัดคาโรทีนอยด์เข้มข้นที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส สารละลายสกัดมีสีซีดอย่างมีนัยสำคัญ หลังจากเก็บไว้นาน 9 วัน

จากผลการทดลอง (ตารางที่ 15) พบว่า อิทธิพลร่วมอุณหภูมิกับระยะเวลาการเก็บมีผลต่อ carotenoids retention (%) ของสารละลายสกัดคาโรทีนอยด์เข้มข้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

จากการทดลองการเก็บสารละลายสกัดคาโรทีนอยด์เข้มข้น ที่อุณหภูมิแช่เยือกแข็งในช่วง 2 สัปดาห์แรก มีค่า carotenoids retention (%) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) แต่เมื่อเก็บสารละลายสกัดคาโรทีนอยด์ที่อุณหภูมิแช่เยือกแข็งไว้ 8 สัปดาห์ ค่า carotenoids retention (%) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ส่วนการเก็บสารละลายสกัดคาโรทีนอยด์เข้มข้นที่อุณหภูมิห้องเย็นและอุณหภูมิห้อง ให้ผลในทำนองเดียวกับการเก็บสารละลายสกัดคาโรทีนอยด์เข้มข้นที่อุณหภูมิแช่เยือกแข็ง ทั้งนี้เนื่องจากการสุ่มเก็บสารละลายสกัดคาโรทีนอยด์มาวิเคราะห์ จะสุ่มมาจากขวดเดียวกันตลอดการทดลองจึงทำให้เกิด head space เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งในส่วน head space นี้จะมีออกซิเจนอยู่ ดังนั้นสารละลายสกัดคาโรทีนอยด์เข้มข้นสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน เมื่อพิจารณาค่าครึ่งชีวิต (คาโรทีนอยด์ลดลงร้อยละ 50 จากเดิม) ของสารละลายสกัดคาโรทีนอยด์เข้มข้นที่ได้จากสมการเส้นตรงซึ่งเกิดจากความสัมพันธ์ระหว่าง carotenoids retention (%) กับระยะเวลาการเก็บ ที่อุณหภูมิการเก็บ

ต่างๆ พบว่า การเก็บสารละลายสกัดคาโรทีนอยด์เข้มข้นที่อุณหภูมิแช่เยือกแข็ง อุณหภูมิห้องเย็น และอุณหภูมิห้อง มีค่าครึ่งชีวิตเป็น 751 วัน (2 ปี) 187 วัน (6 เดือน) และ 94 วัน (3 เดือน) ตามลำดับ จะเห็นว่าการเก็บสารละลายสกัดคาโรทีนอยด์เข้มข้นที่อุณหภูมิต่ำสามารถชลอการลดลงของคาโรทีนอยด์ได้ดีกว่า การเก็บสารละลายสกัดคาโรทีนอยด์เข้มข้นที่อุณหภูมิสูง ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับ Berry, Bissett และ Kew (1971) ที่ศึกษาการเก็บสารละลายสกัดคาโรทีนอยด์เข้มข้นที่สกัดจากเปลือกส้มวาเลนเซีย ทั้งนี้เนื่องจากในระบบที่มีทั้งความร้อนและออกซิเจนอยู่จะทำให้ปฏิกิริยาออกซิเดชันและไอโซเมอไรเซชันเกิดได้เร็วกว่าในระบบที่มีแต่ออกซิเจนหรือความร้อนเพียงอย่างเดียว

<u>การศึกษาเสถียรภาพของสารละลายคาโรทีนอยด์ในน้ำมันพืช</u>

จากผลการทดลอง (ตารางที่ 17) พบว่าอิทธิพลร่วมระหว่างอุณหภูมิกับระยะเวลาการเก็บมีผลต่อ carotenoids retention (%) อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

จากผลการทดลอง การเก็บสารละลายคาโรทีนอยด์ในน้ำมันถั่วเหลืองที่เติมและไม่เติมแอนตีออกซิแดนท์ที่อุณหภูมิต่างๆ ในระยะเวลาการเก็บ 3 เดือน พบว่า สารละลายสกัดคาโรทีนอยด์ในน้ำมันถั่วเหลือง จะมีผลชลอการลดลงของคาโรทีนอยด์ในสารละลายเมื่อระยะเวลาการเก็บมากขึ้น เนื่องจากสารละลายคาโรทีนอยด์ในน้ำมันถั่วเหลืองจะมีน้ำมันถั่วเหลืองทำหน้าที่เป็นตัวป้องกันออกซิเจนจากผิวหน้าของสารละลายคาโรทีนอยด์ในน้ำมันถั่วเหลืองที่จะเข้าทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับคาโรทีนอยด์ที่อยู่ในสารละลายประกอบกับการเก็บในที่มืดจะไม่มีแสงสว่างที่ช่วยทำให้ปฏิกิริยาเกิดเร็วขึ้น จะเห็นว่าการเก็บในช่วงแรกๆ ออกซิเจนที่อยู่ในส่วน head space มีปริมาณน้อย ทำให้แอนตีออกซิแดนท์ไม่มีผลต่อค่า carotenoids retention (%) ดังนั้นการเติมสารแอนตีออกซิแดนท์ จึงไม่มีผลน้อยต่อการชลอการลดลงของคาโรทีนอยด์ในสารละลายน้ำมันพืช แต่การเก็บสารละลายคาโรทีนอยด์ในน้ำมันถั่วเหลืองที่ไม่เติมแอนตีออกซิแดนท์อาจมีผลทางด้านกลิ่นในสารละลายนี้ คือทำให้เกิดกลิ่นที่ไม่ดีหรือกลิ่นเหม็นหืน โดยเฉพาะเมื่อเก็บสารละลายที่อุณหภูมิสูง

จากผลการทดลอง (ตารางที่ 16) การเก็บสารละลายสกัดคาโรทีนอยด์ในน้ำมันถั่วเหลืองที่เติมแอนตีออกซิแดนท์ ที่อุณหภูมิแช่เยือกแข็ง อุณหภูมิห้องเย็นและอุณหภูมิห้อง ระยะ

เวลาการเก็บ 3 เดือน พบว่าสารละลายคาโรทีนอยด์ในน้ำมันถั่วเหลืองมีค่า carotenoids retention (%) เป็นร้อยละ 92.84 83.95 และ 71.82 ตามลำดับ ส่วนการเก็บสารละลายคาโรทีนอยด์ในน้ำมันถั่วเหลืองที่ไม่เติม แอนตีออกซิแดนท์ มีค่า carotenoids retention (%) เป็นร้อยละ 91.62 82.81 และ 70.08 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับ Klaui และ Bauernfeind (1981) ที่ศึกษาการเก็บสารละลาย β-apo-8'-carotenal ในน้ำมันพืชที่เติมและไม่เติมแอนตีออกซิแดนท์ (BHT/BHA) ที่อุณหภูมิ 7 23 และ 45 องศาเซลเซียส นาน 3 เดือน พบว่าการเก็บสารละลาย β-apo-8'-carotenal ในน้ำมันพืชที่เติมแอนตีออกซิแดนท์ ที่อุณหภูมิทั้งสามมีค่า retention เป็นร้อยละ 95 92 และ 76 ตามลำดับ ส่วนการเก็บสารละลาย β-apo-8'-carotenal ในน้ำมันพืชที่ไม่เติมแอนตีออกซิแดนท์ มีค่า retention เป็นร้อยละ 93 93 และ 76 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาค่าครึ่งชีวิตของสารละลายคาโรทีนอยด์ในน้ำมันถั่วเหลือง จากสมการเส้นตรงที่ได้จากความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาการเก็บกับ carotenoids retention (%) พบว่าค่าครึ่งชีวิตของสารละลายคาโรทีนอยด์ในน้ำมันถั่วเหลืองที่อุณหภูมิแช่เยือกแข็ง อุณหภูมิห้องเย็น และอุณหภูมิห้องมีค่าเป็น 696 วัน (1 ปี 9 เดือน) 252 วัน (8 เดือน) และ 156 วัน (5 เดือน) ตามลำดับ จะเห็นว่า การเก็บสารละลายคาโรทีนอยด์ในน้ำมันถั่วเหลืองที่เติมหรือไม่เติมแอนตีออกซิแดนท์ที่อุณหภูมิแช่เยือกแข็งซึ่งมีค่าครึ่งชีวิตมากที่สุด ซึ่งสามารถชลอการลดลงของคาโรทีนอยด์ได้ดีกว่าการเก็บสารละลายด้วยอุณหภูมิห้องเย็นและอุณหภูมิห้อง เนื่องจากการเก็บสารละลายคาโรทีนอยด์ที่อุณหภูมิสูงทำให้คาโรทีนอยด์เกิดการออกซิเดชันและไอโซเมอไรเซชัน

จากการศึกษาเสถียรภาพของสารละลายสกัดคาโรทีนอยด์เข้มข้น และสารละลายคาโรทีนอยด์ในน้ำมันถั่วเหลือง เมื่อเปรียบเทียบการเก็บสารละลายทั้งสองที่อุณหภูมิและระยะเวลาการเก็บเดียวกัน พบว่าค่าครึ่งชีวิตของสารละลายสกัดคาโรทีนอยด์เข้มข้น เมื่อเก็บที่อุณหภูมิแช่เยือกแข็ง อุณหภูมิห้องเย็น และอุณหภูมิห้อง มีค่าเป็น 751 วัน 187 วัน และ 94 วัน ตามลำดับ ส่วนค่าครึ่งชีวิตของสารละลายคาโรทีนอยด์ในน้ำมันถั่วเหลือง มีค่าเป็น 882 วัน 276 วัน และ 176 วัน ตามลำดับ (หน้า 72) เมื่อพิจารณาจากค่าครึ่งชีวิต จะเห็นว่าคาโรทีนอยด์ ในรูปสารละลายในน้ำมันถั่วเหลืองมีเสถียรภาพดีกว่าหรือสามารถเก็บได้นานกว่าคาโรทีนอยด์ในรูปสารละลายสกัดเข้มข้น เพราะสารละลายคาโรทีนอยด์ในน้ำมันถั่วเหลืองมีค่าครึ่งชีวิตสูงกว่า ค่าครึ่งชีวิตของสารละลายสกัดคาโรทีนอยด์เข้มข้น เมื่อเก็บที่อุณหภูมิต่างๆ

การศึกษาการเติมสารละลายสกัดคาโรทีนอยด์เข้มข้นในผลิตภัณฑ์น้ำส้ม

การเติมสารละลายสกัดคาโรทีนอยด์เข้มข้นในน้ำส้มเขียวหวานนั้นต้องมีการกวนน้ำส้มคั้นที่เติมสารละลายสกัดด้วยความร้อน 45 องศาเซลเซียส เพื่อทำให้สารละลายสกัดคาโรทีนอยด์เข้มข้นมีขนาดอนุภาคเล็กลง สามารถรวมกับน้ำส้มได้เป็นเนื้อเดียวกัน และน้ำส้มคั้นที่ได้จากการคั้นส้มผ่าครึ่งทั้งเปลือกจะมีน้ำมันจากเปลือกส้มซึ่งจะช่วยให้สารละลายสกัดที่เติมในน้ำส้มละลายได้ดีขึ้น เนื่องจากสารละลายสกัดคาโรทีนอยด์ที่สกัดได้ละลายได้ค่อนข้างดีในสารที่มีโพลาริตีต่ำ เช่น น้ำมัน เป็นต้น (Berry, Bissett and Kew, 1971; Berry, Wilson and Bissett, 1972)

ในงานวิจัยนี้จะเลือกใช้น้ำส้มเขียวหวานที่มีสีค่อนข้างชีดเพราะในระดับอุตสาหกรรมการผลิตน้ำส้มจะเติมสีในผลิตภัณฑ์ที่มีสีอ่อน หรือสีไม่ได้ตามที่กำหนดไว้ (Kew, Robert and Berry, 1972) และใช้สารละลายสกัดที่เติมในน้ำส้มโดยแปรปริมาณเป็น 0.00-0.1มิลลิลิตรต่อน้ำส้ม 100 มิลลิลิตร หรือคิดเป็นอัตราส่วนสารละลายสกัดกับน้ำส้ม คือ 0-1/1000 โดยปริมาตร โดยใช้อัตราส่วนเดียวกับการศึกษาของ Berry, Bissett และ Kew (1971)

จากผลการทดลอง (ตารางที่19) พบว่าการเพิ่มสารละลายสกัดคาโรทีนอยด์เข้มข้นในน้ำส้มเขียวหวานทำให้ค่า a,b และ L มีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

จากการทดลอง พบว่าน้ำส้มที่ยังไม่มีการเติมสารละลายสกัด มีค่า a ที่แสดงค่าของสีแดงมีค่าติดลบ ส่วนค่า b ที่แสดงค่าสีเหลืองมีค่าเป็นบวก แสดงว่าน้ำส้มคั้นที่ใช้ในการทดลองนี้มีสีเหลืองเขียว ผลจากการเติมสารละลายสกัดคาโรทีนอยด์เข้มข้นปริมาณ 0.02-0.10 มิลลิลิตรต่อน้ำส้ม 100 มิลลิลิตร พบว่าน้ำส้มที่เติมสารละลายสกัดมีค่า a และ b เพิ่มขึ้นตามปริมาณสารละลายสกัด แสดงว่าสารละลายสกัดสามารถทำให้น้ำส้มมีสีเพิ่มขึ้นทั้งสองสี คือสีเหลืองและสีแดง ทั้งนี้เนื่องจากสารละลายสกัดมีคาโรทีนอยด์อยู่หลายชนิดซึ่งคาโรทีนอยด์แต่ละชนิดจะให้สีแตกต่างกันไป เช่น เบตาคาโรทีนให้สีเหลืองถึงส้ม β-apo-8'-carotenal ให้สีส้มถึงแดงเป็นต้น ส่วนค่า L มีค่าลดลงเมื่อเพิ่มปริมาณสารละลายสกัดในน้ำส้มคั้น เนื่องจากการเพิ่มปริมาณสารละลายสกัดจะไปเพิ่มรงควัตถุในน้ำส้มคั้นทำให้ค่าความสว่างของน้ำส้มมีค่าลดลง