



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วิทยาศาสตรการอาหาร)

ปริญญา

วิทยาศาสตรการอาหาร

วิทยาศาสตรและเทคโนโลยีการอาหาร

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การศึกษาสารประกอบฟีนอลิก คุณสมบัติการต้านออกซิเดชัน และความคงตัวของ
แอนโทไซยานินส์ในสารสกัดกากลูกหม่อน

Determination of Phenolic Compounds, Antioxidant Capacity and Stability of
Anthocyanins in Mulberry Pomace Extract

นามผู้วิจัย นางสาวศุทธิณี ถิลาเหมรัตน์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์ศศิธร ตรงจิตภักดี, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์อุทัย กลิ่นเกษร, ปร.ค.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วรัณิ จิรภักย์กุล, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญจนา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

สิงสีทิจิ มทวิตยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาสารประกอบฟีนอลิก คุณสมบัติการต้านออกซิเดชัน
และความคงตัวของแอนโทไซยานินในสารสกัดกากลูกหม่อน

Determination of Phenolic Compounds, Antioxidant Capacity
and Stability of Anthocyanins in Mulberry Pomace Extract

โดย

นางสาวศุทธิณี ลีลาเหมรัตน์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตรการอาหาร)

พ.ศ. 2556

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ศุทธิณี ลีลาหะรัตน์ 2556: การศึกษาสารประกอบฟีนอลิก คุณสมบัติการต้านออกซิเดชัน และความคงตัวของแอนโธไซยานินสีในสารสกัดจากลูกหม่อน ปริญญุณวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การอาหาร) สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อาจารย์ศศิธร ตรงจิตภักดี, Ph.D. 120 หน้า

งานวิจัยนี้ศึกษาผลของกรรมวิธีการทำแห้งต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของกากลูกหม่อน อีกทั้งยังระบุชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกหลักในกากลูกหม่อน โดยการใช้ High performance liquid chromatography (HPLC) นอกจากนั้นศึกษาความเข้มข้นของตัวทำละลายเอทานอลที่เหมาะสมสำหรับสกัดสารพฤกษเคมีจากกากลูกหม่อนและศึกษาความคงตัวของแอนโธไซยานินสีในสารสกัดจากลูกหม่อนแห้งจากผลการทดลองพบว่าวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งและการทำแห้งแบบใช้ลมร้อนไม่มีผลต่อปริมาณกลุ่มสาร (ถ้า เชื้อไฮยาบ โปรตีน ไขมัน ความชื้น คาร์โบไฮเดรต) ($p>0.05$) แต่ตัวอย่างที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งมีปริมาณแอนโธไซยานินสีทั้งหมด สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) มากกว่าตัวอย่างที่ผ่านการทำแห้งแบบใช้ลมร้อนอย่างมีนัยสำคัญ ($p\leq 0.05$) โดยตัวอย่างที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งมีปริมาณแอนโธไซยานินสีทั้งหมด 1,927.6 มิลลิกรัม สมมูลไซยานิดิน-3- กลูโคไซด์ในตัวอย่าง 100 กรัม น้ำหนักแห้ง สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด 4,067.4 มิลลิกรัม สมมูลของกรดแกลลิกในตัวอย่าง 100 กรัม น้ำหนักแห้ง ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด 625.0 มิลลิกรัม สมมูลของคาเทชินในตัวอย่าง 100 กรัม น้ำหนักแห้ง สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ DPPH 1,360.8 มิลลิกรัม สมมูลของวิตามินซีในตัวอย่าง 100 กรัม น้ำหนักแห้ง จากการใช้เทคนิค HPLC และเทคนิคการแยกขนาดของมวลด้วยแมสสเปกโตรมิเตอร์ (MS) พบว่าสารประกอบฟีนอลิก ชนิดหลักของกากลูกหม่อนคือ ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ (346.5 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง) ไซยานิดิน-3-รูทีโนไซด์ (273.0 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง) และ เควอซิทิน-3-รูทีโนไซด์โดยมีปริมาณ (40.3 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง) นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้สารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 50 เป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากกากลูกหม่อน จากการศึกษาความคงตัวของสารสกัดแอนโธไซยานินสีต่ออุณหภูมิ (70-90 องศาเซลเซียส) และความเป็นกรดต่าง (pH 2.5-7.5) ของสารสกัดจากลูกหม่อนด้วยสารละลายซิเตรตฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พบว่าการสลายตัวของแอนโธไซยานินสีเป็นปฏิกิริยาอันดับที่หนึ่ง โดยเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นค่าคงที่อัตราการสลายตัวของของแอนโธไซยานินสีมีค่าเพิ่มขึ้น ส่งผลให้มีค่าครึ่งชีวิต ($t_{1/2}$) ลดลง เมื่อให้ความร้อนแอนโธไซยานินสี (pH 2.5) ที่อุณหภูมิ 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส จะทำให้มีค่าครึ่งชีวิต 11.6, 7.3 และ 4.0 ชั่วโมง ตามลำดับ และเมื่อความเป็นกรดต่างเพิ่มขึ้นความคงตัวของแอนโธไซยานินสีในสารสกัดจากลูกหม่อนจะลดลง ส่งผลให้ค่าครึ่งชีวิต ($t_{1/2}$) ลดลง โดยแอนโธไซยานินสีมีความคงตัวมากที่สุดที่ความเป็นกรดต่าง 2.5 รองลงมาคือ 4.0, 6.0 และ 7.5 ตามลำดับ

Suthinee Leelahemaratana 2013: Determination of Phenolic Compounds, Antioxidant Capacity and Stability of Anthocyanins in Mulberry Pomace Extract. Master of Science (Food Science), Major Field: Food Science, Department of Food Science and Technology. Thesis Advisor: Mrs. Sasitorn Tongchitpakdee, Ph.D. 120 pages

The objective of this research was to determine the effect of drying method on phenolic compounds of mulberry pomace. Major phenolic compounds were also identified and quantified using high performance liquid chromatography (HPLC). Furthermore, optimum concentration of ethanolic solvent for mulberry pomace extraction was also determined and stability of anthocyanins in mulberry pomace extract also investigated. The results showed that there was no significant difference in proximate analysis (ash, fiber, protein, fat, moisture and carbohydrate) between mulberry pomace dried using freeze drying and tray drying ($p > 0.05$). However, the freeze-dried sample had higher total monomeric anthocyanin content, total phenolic contents and 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) scavenging capacity than tray dried sample ($p \leq 0.05$). Freeze-dried sample had total monomeric anthocyanin content 1,927.6 mg cyanidin-3-glucoside/100 g dry weight (DW) basis, total phenolic content 4,067.4 mg gallic acid equivalents/100 g DW basis, total flavonoid content 625.0 mg catechin equivalents/100 g DW basis and DPPH radical-scavenging capacity 1,360.8 mg vitamin C equivalents antioxidant capacity (VCEAC)/100 g DW basis. The HPLC and Mass Spectrophotometry (MS) results showed that major phenolic compounds in mulberry pomace were cyanidin-3-glucoside (346.5 mg/100 g DW), cyanidin-3-rutinoside (273.0 mg/100 g DW) and quercetin-3-rutinoside (40.3 mg/100 g DW). The results also showed that 50% ethanol is an optimum solvent for extraction of phenolic compounds from mulberry pomace. The results of stability study of anthocyanins in mulberry pomace extract adjusted pH to 2.5-7.5 and heated to 70-90 degree celcius showed that the degradation of anthocyanins followed a first-order reaction model. Increasing temperature resulted in an increase of the degradation rate constant (k) and a decrease of half-life periods ($t_{1/2}$). At pH 2.5, half-life periods of anthocyanins at 70, 80 and 90 degree celcius were 11.6, 7.3 and 4.0 hours, respectively. Among pH tested in this study, anthocyanins were most stable at pH 2.5 followed by 4.0, 6.0 and 7.5, respectively.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ดร. ศศิธร ตรงจิตภักดี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และผศ. ดร.อุทัย กลิ่นเกษร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้คำปรึกษาในการเรียน การค้นคว้าวิจัย ตลอดจนการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณ ดร. จิตศิริ ราชตะนะพันธุ์ ประธานการสอบสัมภาษณ์ขั้นสุดท้าย และ รศ. ดร. ทนง ภักฤษพันธุ์ ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกที่ตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณทุนสนับสนุนจากโครงการทุนส่งเสริมศักยภาพนิสิตเกษตรศาสตร์สู่สากล กองวิเทศสัมพันธ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ความช่วยเหลือทุนสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์ ที่ประเทศสิงคโปร์

ขอขอบพระคุณคุณจงสฤณี คู้วงศ์ บริษัท จุลไหมไทย จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์ กากลูกหม่อนสำหรับการวิจัย และ Associate Professor Huang Dejian ที่ให้คำปรึกษาในการทำ วิจัย ในระหว่างการทำวิจัยที่ สาขาวิทยาศาสตร์อาหาร ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย National University of Singapore

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ผู้ซึ่งให้การสนับสนุนในการเรียน ให้กำลังใจ เสมอมาตลอดการศึกษาในระดับปริญญาโท รวมทั้งพี่ เพื่อน และน้องในห้องปฏิบัติการ 2411 ทุกคน ที่ให้ความช่วยเหลือ คำปรึกษาและกำลังใจตลอดการทำวิจัย ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่คณะ อุดสาหกรรมเกษตรทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยผ่านไปได้ด้วยดี และเป็นกำลังใจ ที่ดีเสมอมา

ศุทธิณี ลีลาเหมรัตน์

พฤษภาคม 2556

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	37
อุปกรณ์	37
วิธีการ	41
ผลและวิจารณ์	58
สรุปและข้อเสนอแนะ	91
สรุป	91
ข้อเสนอแนะ	92
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	93
ภาคผนวก	109
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	120

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ปริมาณการใช้ผักและผลไม้ในการแปรรูปและของเหลือทิ้งต่อปี	6
2	ปริมาณของสารต้านออกซิเดชันในของเหลือทิ้งต่างๆ	7
3	ชนิดของแอนโทไซยานินที่พบมากที่สุดในพื้นที่และตำแหน่งการเติมหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl) และหมู่เมทิล (methyl)	13
4	ชนิดของฟลาโวนอลและตำแหน่งการเติมหมู่ไฮดรอกซิลและหมู่เมทิล	18
5	แหล่งของพืชที่พบฟลาโวนอยด์ชนิดต่างๆ	20
6	สัดส่วนของภูมิภาคเคลื่อนที่ในการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกโดยเทคนิค HPLC	53
7	ปริมาณกลุ่มสาร (Proximate analysis) ของกากลูกหม่อนแห้ง (%)	59
8	ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและ สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของกากลูกหม่อนแห้ง	60
9	ปริมาณองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากกากลูกหม่อนในแต่ละแฟรกชัน	65
10	สารประกอบฟีนอลิกหลักในแฟรกชันเมทานอล	68
11	ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกหลักในแฟรกชันเมทานอล	70
12	ค่าสหสัมพันธ์ (Correlation coefficient) ขององค์ประกอบทางเคมีและคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันของสารสกัดกากลูกหม่อน	78
13	องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดกากลูกหม่อนแห้ง	81
14	สมการ และค่า R^2 ของการเปลี่ยนแปลงปริมาณแอนโทไซยานินในสารสกัดกากลูกหม่อนแห้งระหว่างการให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ	86
15	จลนพลศาสตร์ (kinetic parameter) ค่าคงที่อัตราการเกิดปฏิกิริยาอันดับที่หนึ่ง และค่าครึ่งชีวิตของสารสกัดกากลูกหม่อนแห้งที่สภาวะต่างๆในซีเตรท-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์	87

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 แผนผังกระบวนการผลิตน้ำเบอร์รี่	6
2 กลไกการสังเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก	11
3 โครงสร้างกรดไฮดรอกซีซินนามิก (Hydroxycinnamic acid)	12
4 โครงสร้างกรดคลอโรจินิก (Chlorogenic acid)	13
5 โครงสร้างกรดไฮดรอกซีเบนโซอิก (Hydroxybenzoic acid)	13
6 โครงสร้างพื้นฐานของสารประกอบฟลาโวนอยด์ (Flavonoid)	14
7 โครงสร้างพื้นฐานของแอนโทไซยานินส์ (Anthocyanins)	15
8 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของแอนโทไซยานินส์ที่ความเป็นกรด-ด่างต่างๆ	17
9 UV-visible spectrum ของแอนโทไซยานินส์จากหัวแรดิช (Radish) ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 1.0 และ 4.5	18
10 โครงสร้างพื้นฐานของฟลาวานอล (Flavanol)	19
11 โครงสร้างพื้นฐานของฟลาโวนอล (Flavonol)	20
12 โครงสร้างพื้นฐานของฟลาโวน (Flavone)	21
13 โครงสร้างพื้นฐานของฟลาวาโนน (Flavanone)	21
14 โครงสร้างพื้นฐานของไอโซฟลาโวน (Isoflavone)	22
15 บทบาทของอนุมูลอิสระต่อการก่อให้เกิดสภาวะการก่อโรค	24
16 การลดลงของความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์สัมพันธ์ของตัวอย่างและสารมาตรฐาน	27
17 โครงสร้างทางเคมีของ ABTS	29
18 โครงสร้างทางเคมีของ DPPH	30
19 การเกิด Delocalization ของอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวของอนุมูลฟีนอล	33
20 แผนภูมิการสกัดแยกส่วน	48
21 กากลูกหม่อนสดที่เหลือทิ้งจากกระบวนการคั้นน้ำลูกหม่อน (ก) กากลูกหม่อนแห้งที่ผ่านการทำให้แห้งด้วยวิธีทำแห้งด้วยลมร้อน (ข) และกากลูกหม่อนแห้งที่ผ่านการทำให้แห้งด้วยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (ค)	58

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
22 ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (ก) ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (ข) ปริมาณแอนโธไซยานินส์ทั้งหมด (ค) และความสามารถต้านออกซิเดชันวิธี ORAC (ง) ในสารสกัดส่วน EA (EA) สารสกัดส่วน AAW (AAW) และผลรวมของสารสกัดส่วน EA และสารสกัดส่วน AAW (Total)	63
23 ลักษณะของตัวอย่างที่ผ่านตัวชะต่างๆ แพรกชั้นน้ำ (ก) แพรกชั้นเมทานอล (ข) แพรกชั้นอะซิโตน (ค)	65
24 ตัวอย่าง HPLC โครมาโตแกรมของแฟรกชันเมทานอล ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร	67
25 การดูดกลืนแสงของสารประกอบฟีนอลิกหลักในแฟรกชันเมทานอลที่ความยาวคลื่นต่างๆในช่วง UV-visible	68
26 ปริมาณแอนโธไซยานินส์ของสารสกัดจากลูกหม่อนที่สกัดโดยเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ	72
27 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากลูกหม่อนที่สกัดโดยเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ	73
28 ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดจากลูกหม่อนที่สกัดโดยเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ	74
29 สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดจากลูกหม่อนที่สกัดโดยเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ	76
30 ความสามารถต้านออกซิเดชันโดยวิธี ORAC ของสารสกัดจากลูกหม่อนที่สกัดโดยเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ	77
31 สารสกัดจากลูกหม่อนแห้ง	80
32 การสลายตัวของแอนโธไซยานินส์ของสารสกัดจากลูกหม่อนแห้งที่อุณหภูมิต่างๆ (ที่ pH 2.5)	83
33 การสลายตัวของแอนโธไซยานินส์ของสารสกัดจากลูกหม่อนแห้งที่ pH ต่างๆ (ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส)	85

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
34	ค่า $\ln(C/C_0)$ ของปริมาณแอนโธไซยานินส์ของสารสกัดจากลูกหม่อนแห้งระหว่างการให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ ปฏิบัติที่ pH 2.5	88
35	ตัวอย่างสารสกัดจากลูกหม่อนแห้งที่ความเป็นกรด-ด่างต่างๆ (pH 2.5, 4.0, 6.0 และ 7.5)	88
36	กราฟอาร์เรเนียสของการสลายตัวของแอนโธไซยานินส์ของสารสกัดจากลูกหม่อนแห้งระหว่างการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส (ที่ pH 2.5)	90
ภาพผนวกที่		
1	กราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกสำหรับการตรวจวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด	110
2	กราฟมาตรฐานของคาเทคินสำหรับการตรวจวัดปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด	110
3	กราฟมาตรฐานของวิตามินซีสำหรับการตรวจสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ DPPH	111
4	กราฟมาตรฐานของวิตามินซี สำหรับการตรวจสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ABTS	111
5	กราฟมาตรฐานของโทรลิกซ์สำหรับการตรวจสอบสมบัติการต้านออกซิเดชันโดยวิธี ORAC	112
6	โครมาโตแกรมของสารสกัดส่วน AAW ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร	112
7	โครมาโตแกรมแมสสเปกตรัม MH+ ของ แพรกชันเมทานอล	113
8	กราฟมาตรฐานของเคอควิทิน-3-รูทีโนไซด์ (Quercetin-3-rutinoside) ที่ความยาวคลื่น 370 นาโนเมตร	114

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
9 HPLC โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานแควอซีทิน-3-รูทีโนไซด์ (Quercetin-3-rutinoside) ที่ความยาวคลื่น 370 นาโนเมตร	114
10 กราฟมาตรฐานของไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ (Cyanidin-3-glucoside) ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร	115
11 HPLC โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ (Cyanidin-3-glucoside) ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร	115
12 กราฟมาตรฐานของไซยานิดิน-3-รูทีโนไซด์ (Cyanidin-3-rutinoside) ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร	116
13 HPLC โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานไซยานิดิน-3-รูทีโนไซด์ (Cyanidin-3-rutinoside) ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร	116
14 การสลายตัวของแอนโธไซยานินส์ของสารสกัดจากลูกหม่อนแห้งที่อุณหภูมิต่างๆ (ที่ pH 4.0)	117
15 การสลายตัวของแอนโธไซยานินส์ของสารสกัดจากลูกหม่อนแห้งที่อุณหภูมิต่างๆ (ที่ pH 6.0)	117
16 การสลายตัวของแอนโธไซยานินส์ของสารสกัดจากลูกหม่อนแห้งที่อุณหภูมิต่างๆ (ที่ pH 7.5)	118
17 ค่า C/C_0 ของปริมาณแอนโธไซยานินส์ของสารสกัดจากลูกหม่อนแห้งระหว่างการให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ ปฏิริยาอันดับ 0 (ที่ pH 2.5)	118
18 ค่า $1/(C/C_0)$ ของปริมาณแอนโธไซยานินส์ของสารสกัดจากลูกหม่อนแห้งระหว่างการให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ ปฏิริยาอันดับ 2 (ที่ pH 2.5)	119
19 กราฟอาร์เรเนียสของการสลายตัวของแอนโธไซยานินส์ของสารสกัดจากลูกหม่อนแห้งระหว่างการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส (ที่ pH 2.5, 4.0, 6.0 และ 7.5)	119

**การศึกษาสารประกอบฟีนอลิก คุณสมบัติการต้านออกซิเดชัน
และความคงตัวของแอนโทไซยานินส์ในสารสกัดกากลูกหม่อน**

**Determination of Phenolic Compound, Antioxidant Capacity
and Stability of Anthocyanins in Mulberry Pomace Extract**

คำนำ

ลูกหม่อน เป็นผลไม้ที่มีรงควัตถุหลักคือ แอนโทไซยานินส์ ในปัจจุบันมีการแปรรูปลูกหม่อนเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ เพื่อยืดระยะเวลาการเก็บรักษา ผลิตภัณฑ์อย่างหนึ่งที่นิยมคือน้ำลูกหม่อน ซึ่งในกระบวนการผลิตจะได้กากลูกหม่อน เป็นจำนวนมาก โดยทั่วไปกากผลไม้เป็นผลพลอยได้หลักหลังจากการคั้นน้ำในกระบวนการแปรรูปน้ำผลไม้ซึ่ง เป็นแหล่งสำคัญของสารพฤกษเคมี เพคติน เยื่อใยหยาบ ที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย นอกจากนี้แล้วยังมีรงควัตถุอีกหลายชนิดที่มีประโยชน์ เช่น แคโรทีนอยด์ โพลีฟีนอลิก โทโคฟีรอล วิตามินซี เป็นต้น ขึ้นอยู่กับวัตถุดิบที่นำมาผลิตเป็นน้ำผลไม้ โดยกากของผลไม้แต่ละชนิดนั้นสามารถนำไปแปรรูปได้แตกต่างกันไปอุตสาหกรรมส่วนใหญ่จะนำมาใช้เลี้ยงสัตว์ หรือนำมาสกัดสารสำคัญเพื่อให้ได้สารสกัด เช่น สารสกัดแอนโทไซยานินส์ สารสกัดโพลีฟีนอล เป็นต้น

ในแต่ละปีบริษัท จุลไหมไทย จำกัดมีการผลิตน้ำลูกหม่อนเป็นจำนวนมาก กากลูกหม่อนที่เหลือทิ้งมีปริมาณประมาณ 80 ตันต่อปี ปัจจุบันนำมาขายเพื่อเป็นอาหารสัตว์ซึ่งมีมูลค่าต่ำ ดังนั้นทางบริษัท จุลไหมไทย จำกัด จึงมีความสนใจที่จะเพิ่มมูลค่ากากลูกหม่อน ด้วยเหตุนี้จึงมีความจำเป็นต้องศึกษาสารประกอบฟีนอลิกและคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันของกากลูกหม่อน เพื่อช่วยให้ทราบถึงชนิดและปริมาณของสารพฤกษเคมีที่มีประโยชน์ นอกจากนี้เพื่อประสิทธิภาพในการสกัดจึงจำเป็นต้องศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด นอกจากนั้นยังจำเป็นต้องศึกษาสมบัติความคงตัวของแอนโทไซยานินส์ซึ่งเป็นสารประกอบหลักในสารสกัดกากลูกหม่อนแห้งเพื่อให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้เหมาะสม การศึกษาการใช้ประโยชน์จากกากลูกหม่อน เพื่อนำกากลูกหม่อนไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ใหม่เพื่อสุขภาพ จึงเป็นการเพิ่มมูลค่าของเหลือทิ้งให้กับอุตสาหกรรม และยังเป็นการเพิ่มทางเลือกให้แก่ผู้บริโภคอีกทางหนึ่ง เนื่องจากลูกหม่อนนั้นมี

คุณค่าทางโภชนาการค่อนข้างสูง เป็นแหล่งของน้ำตาล กรด และสารสำคัญต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compound) ที่มีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน (Antioxidant) ที่อาจป้องกันการเกิดโรคเรื้อรังต่างๆ ได้ เช่น โรคมะเร็ง โรคหัวใจ โรคเบาหวาน เป็นต้น และยังอาจนำข้อมูลไปเป็นประโยชน์ในงานวิจัยได้ต่อไปด้วย



วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของวิธีการทำแห้งกากลูกหม่อนต่อสารประกอบฟีนอลิกและคุณสมบัติการต้านออกซิเดชัน
2. เพื่อระบุชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกหลักในกากลูกหม่อนโดยใช้เทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC)
3. เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของตัวทำละลายเอทานอลต่อสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดกากลูกหม่อน
4. เพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิ และความเป็นกรด-ด่างต่อความคงตัวของแอนโธไซยานินส์ในสารสกัดกากลูกหม่อนแห้ง

การตรวจเอกสาร

หม่อน

หม่อนเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Moraceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Morus* spp. มีถิ่นกำเนิดกระจายกว้างขวางมากในแถบเขตร้อน (Tropical zone) เขตอบอุ่น (Subtropical zone) เขตหนาว (Temperate zone) และเขตหนาวเย็น (Sub-artic zone) (วสันต์, 2546) โดยทั่วไปหม่อนแบ่งออกเป็น 3 species ได้แก่ Red mulberry (*Morus rubra*) White mulberry (*Morus alba*) และ Black mulberry (*Morus nigra*) (Ercisli and Orhan, 2008) การพัฒนาการของลูกหม่อนเริ่มจากดอกหม่อนแตกออกมาพร้อมกับใบ จะบานหลังจากแตกช่อใบพร้อมช่อดอกประมาณ 8-12 วัน ดอกที่บานเต็มที่ ยอดเกสรตัวเมียจะมีลักษณะสีขาวใส เมื่อได้รับการผสมเกสรจะเปลี่ยนเป็นสีเทาภายใน 3 วัน จากนั้นจะมีการพัฒนาของผลโดยสีของผลเริ่มจากสีเขียว ขาว ชมพู แดง และสีดำ รวมระยะเวลาหลังจากดอกบานประมาณ 40-45 วันผลจะเริ่มสุกและแก่ ลักษณะลูกหม่อนจะอวบน้ำและประกอบด้วยน้ำหวานเมื่อผลแก่เต็มที่ จากนั้นผลจะเริ่มนิ่มลงมีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (Total soluble solid) และน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) เพิ่มขึ้นถึงระยะประมาณ 56 วันหลังจากดอกบาน โดยจะมีน้ำตาลรีดิวซ์สูงถึง 65 กรัมต่อลิตร แต่ปริมาณกรดจะลดลงเรื่อยๆ นอกจากนั้นลูกหม่อนเป็นผลไม้ที่มีสัดส่วนของความหวาน และความเปรี้ยวที่สมดุลกัน ตัวอย่างพันธุ์หม่อนรับประทานผลที่ปลูกในประเทศไทย เช่น พันธุ์เซียงใหม่ พันธุ์บุรีรัมย์ พันธุ์กำแพงแสน เป็นต้น (วสันต์, 2546; ศิริพร, 2546)

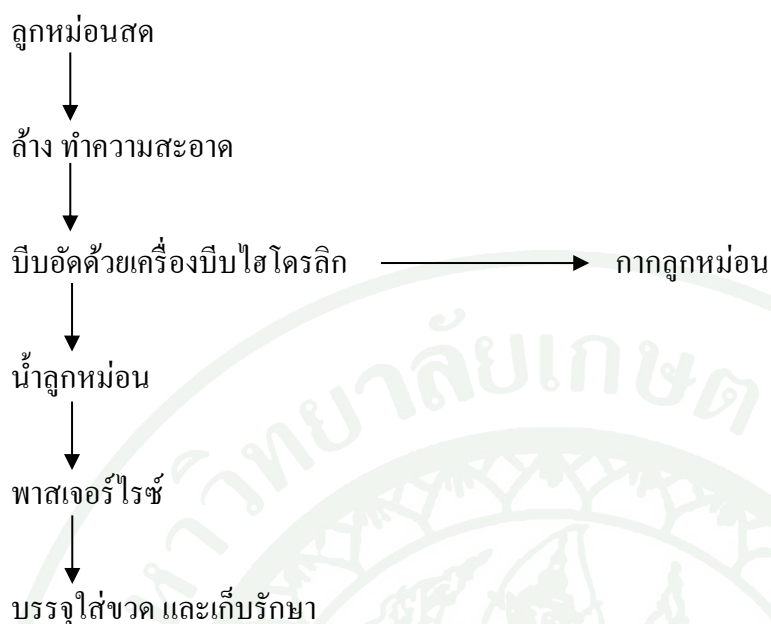
ลูกหม่อนเป็นแหล่งของน้ำตาล กรด และแอนโทไซยานินส์ ในประเทศจีนลูกหม่อนใช้เป็นยาสำหรับรักษาไข้ ป้องกันไม่ให้ตับถูกทำลาย ทำให้ข้อต่อแข็งแรง ช่วยในการขับถ่ายปัสสาวะ และลดความดันเลือด สามารถใช้เป็น Warming agent ใช้เป็นยาบำบัดโรคบิด ใช้เป็นยาบำรุง ยาระงับประสาท และยาระบาย เป็นต้น อีกทั้งยังมีรายงานว่าลูกหม่อนมีสมบัติในการป้องกันการเกิดโรคเบาหวาน (Antidiabetic) ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Antioxidative) ป้องกันการอักเสบ (Antiinflammatory) และมีรายงานว่าในลูกหม่อนมีไขมัน กรดไขมัน วิตามินซี แร่ธาตุ สารประกอบ ฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์อีกด้วย (Bae and Suh, 2007; Pawlowsk *et al.*, 2008) ลูกหม่อนสามารถรับประทานในรูปของผลสด แห้ง หรือในรูปของผลิตภัณฑ์ที่ผ่านกระบวนการ

ผลิต เป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น แยม แยมผิวส้ม (Marmalaid) น้ำผลไม้ ไอศกรีม และไวน์ เป็นต้น (Ercisli and Orhan, 2006; Pawlowsk *et al.*, 2008)

การแปรรูปลูกหม่อน

นอกจากการบริโภคผลไม้สดแล้ว ผลิตภัณฑ์แปรรูปจากผลไม้ก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่งของผู้บริโภค อีกทั้งยังเป็นการยืดอายุการเก็บรักษาผลไม้ให้ยาวนานขึ้น เช่น แยม เยลลี่ น้ำผลไม้ เป็นต้น ในการผลิตน้ำผลไม้ นั้น ส่งผลให้เกิดวัสดุเศษเหลือคือ กากเหลือทิ้ง ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปได้อุตสาหกรรมเครื่องดื่มที่มีน้ำผลไม้เป็นส่วนผสมหลัก (Fruit juice-based) สามารถแบ่งได้เป็นประเภทน้ำผลไม้พร้อมดื่ม น้ำผลไม้เข้มข้น เนกต้าผลไม้ วัตถุดิบสำคัญสำหรับการผลิตน้ำผลไม้ในตลาดโลก เช่น ผลไม้ตระกูลเชอร์รี่ แอปเปิ้ล องุ่น ผลไม้ตระกูลเบอร์รี่ เป็นต้น (Horvath-Kerkai, 2006)

ขั้นตอนการผลิตน้ำเบอร์รี่ ดังแสดงในภาพที่ 1 เริ่มจากการรับวัตถุดิบลูกหม่อนสด เพื่อเตรียมและล้างทำความสะอาดวัตถุดิบให้ลดการปนเปื้อน (Contamination) จากนั้นเข้าขั้นตอนการบีบสกัดของเหลวโดยใช้เครื่องบีบอัดแบบไฮโดรลิก ซึ่งในขั้นตอนนี้จะได้น้ำลูกหม่อน และกากลูกหม่อนซึ่งเป็นของเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตน้ำผลไม้ นำน้ำลูกหม่อนไปให้ความร้อนด้วยเครื่องพาสเจอร์ไรซ์ และบรรจุใส่ขวด เพื่อทำการขนส่งต่อไป



ภาพที่ 1 แผนผังกระบวนการผลิตน้ำเบอร์รี่

ที่มา: คัดแปลงจาก Horvath-Kerkai (2006)

ในปัจจุบันมีงานวิจัยมากมายที่ศึกษาสารพฤกษเคมีเพื่อนำมาใช้ประโยชน์โดยหนึ่งในวัตถุดิบที่นำมาใช้อาจจะเป็นกากที่เหลือทิ้งจากอุตสาหกรรม และนำมาแปรรูปหรือนำกลับมาใช้ใหม่ กากถือเป็นผลพลอยได้หลักหลังจากการคั้นน้ำในกระบวนการแปรรูปน้ำผลไม้ เป็นแหล่งสำคัญของสารพฤกษเคมี เพคติน และเยื่อใยหยาบ ที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย นอกจากนี้แล้วยังมีสารรงควัตถุอีกหลายชนิดที่มีประโยชน์ เช่น แครโทีนอยด์ โพลีฟีนอลิก โทโคฟีรอล วิตามินซี และอื่นๆ (Djilas *et al.*, 2009) โดยปริมาณการใช้และปริมาณกากของผลไม้แต่ละชนิดนั้นก็จะมีปริมาณแตกต่างกัน (ตารางที่ 1) อีกทั้งชนิดของวัตถุดิบแต่ละชนิดนั้น ก็มีปริมาณของสารต้านออกซิเดชันในกากของผักและผลไม้ของเหลือทิ้งแตกต่างกันออกไป ดังแสดงในตารางที่ 2

กากของผลไม้ตระกูลเบอร์รี่ประกอบด้วยของแข็งคือเมล็ด เปลือก และก้านคิดเป็น 10% ของน้ำหนักเบอร์รี่สดทั้งหมด (Skerede *et al.*, 2000) ส่วนใหญ่แล้วจะนำมาใช้ในการเลี้ยงสัตว์ แต่อย่างไรก็ตามการใช้เป็นอาหารสัตว์นั้น จะทำให้ระบบการย่อยทำงานได้น้อยลงเนื่องจากมีสารจำพวกโพลีฟีนอลอยู่เป็นจำนวนมาก สารจำพวกนี้เป็นกลุ่มที่ยับยั้งเอนไซม์เซลลูโลติก และ

เอนไซม์โปรติโอไลติก (Schueg *et al.*, 1980) นอกจากนี้ในอุตสาหกรรมยังมีการสกัดสารสำคัญในกากเพื่อให้อยู่ในรูปสารสกัด เช่น สารสกัดแอนโธไซยานินส์ สารสกัดโพลีฟีนอล เป็นต้น

ตารางที่ 1 ปริมาณการใช้ผักและผลไม้ในการแปรรูปและของเหลือทิ้งต่อปี

ผัก หรือ ผลไม้	ปริมาณการใช้ต่อปี (ล้านตัน)	ปริมาณของเหลือทิ้งต่อปี (ล้านตัน)
สั้ม และผลไม้ตระกูลซิตรัส	31.2	15.6
แอปเปิ้ล	12.0	3.0-4.2
องุ่น	50	5-9
มะเขือเทศ	30.0	0.9-2.1
มันฝรั่ง	150	22-67
แครอท	23.6	<10

ที่มา : ดัดแปลงจาก Oreopoulou and Tzia (2007)

ตารางที่ 2 ปริมาณของสารต้านออกซิเดชันในของเหลือทิ้งชนิดต่างๆ

ของเหลือทิ้ง	ปริมาณฟีนอล (กรัม / กิโลกรัมน้ำหนักแห้ง)	หมายเหตุ
เปลือกสั้ม	1.8	ในเปลือกสด รายงานเป็นกรัม/ กิโลกรัมน้ำหนักสด
เปลือกมะนาว	13.3	ปริมาณของฟลาโวนอยด์ (Eriocitrin และ Hesperidin)
เปลือกสั้มโอ	1.6	ในเปลือกสด รายงานเป็นกรัม/ กิโลกรัมน้ำหนักสด
กากองุ่น	13.8	รายงานเป็นกรดแกลลิกสมมูล
เปลือกมันฝรั่ง	7.8	รายงานเป็นกรดเฟอร์ูลิกสมมูล

ที่มา : ดัดแปลงจาก Oreopoulou and Tzia (2007)

การทำแห้ง

การทำแห้ง เป็นการให้ความร้อนแก่อาหาร เพื่อไล่น้ำออกจากอาหารให้เหลืออยู่ปริมาณน้อยที่สุด การทำแห้งทำได้หลายวิธี เช่น การตากแดด (Sun drying) การทำแห้งโดยใช้พลังงานแสงอาทิตย์ (Solar drying) การทำแห้งด้วยลมร้อน (Hot air drying) การทำแห้งแบบสุญญากาศ (Vacuum shelf drying) การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze drying) เป็นต้น ซึ่งอาหารแห้งแต่ละชนิดจะมีปริมาณน้ำหรือความชื้นเหลืออยู่แตกต่างกัน ซึ่งมีความสัมพันธ์กับค่า a_w ในอาหาร ถ้าค่า a_w มีค่าน้อยลง ทำให้ยืดอายุการเก็บรักษาได้นานขึ้น เพราะปริมาณน้ำอิสระในอาหารลดลงทำให้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์และการทำงานของเอนไซม์ได้ นอกจากนี้การทำแห้งยังช่วยลดน้ำหนักของอาหาร ทำให้ค่าใช้จ่ายระหว่างการเก็บรักษาและขนส่งลดลงอีกด้วย อาหารอบแห้งบางชนิดสามารถเก็บอาหารได้ที่อุณหภูมิห้อง (นิธิยา, 2544; มณฑนา, 2555)

1. การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง เป็นการทำแห้งด้วยการลดอุณหภูมิของอาหารให้ต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง เพื่อให้น้ำเปลี่ยนสถานะเป็นผลึกน้ำแข็ง ซึ่งควรเป็นการแช่เยือกแข็งแบบเร็วเพื่อให้ผลึกที่เกิดขึ้นมีขนาดเล็ก แล้วจึงลดความดันบรรยากาศเพื่อให้ผลึกน้ำแข็งที่อยู่ภายในอาหารระเหิดเป็นไอออกไปจากผิวหน้าของผลิตภัณฑ์ การระเหิดของชั้นน้ำแข็งจะเริ่มจากชั้นน้ำแข็งบริเวณผิวหน้าของผลิตภัณฑ์ ระเหิดไปเป็นไอทำให้บริเวณนี้กลายเป็นชั้นแห้ง จากนั้นเป็นการระเหิดของชั้นน้ำแข็งที่อยู่ภายในผลิตภัณฑ์ ระเหิดผ่านชั้นแห้งออกไปสู่ผิวหน้าของผลิตภัณฑ์ ระยะเวลาการระเหิดขึ้นอยู่กับขนาด รูปร่าง และโครงสร้างของผลิตภัณฑ์ของผลิตภัณฑ์แต่ละชนิด วิธีนี้เป็นการทำแห้งโดยที่อาหารไม่ผ่านความร้อน อาหารทำแห้งที่ได้จะมีคุณค่าทางโภชนาการสูงและคงเหลือคุณภาพทางด้านประสาทสัมผัสไว้เป็นอย่างดี ลดการทำลายเนื้อเยื่อและโครงสร้างของอาหาร รักษาคุณภาพอาหารเช่นสี กลิ่น รสชาติ และเนื้อสัมผัสของอาหารได้ดีเมื่อเทียบกับวิธีการทำแห้งแบบอื่น แต่วิธีนี้ต้องใช้เวลาานมาก เสียพลังงานมาก ค่าใช้จ่ายสูง และการลงทุนที่สูงด้วย ทำให้ผลิตภัณฑ์ทำแห้งที่ใช้วิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งมีราคาสูง จึงนิยมใช้กับวัตถุดิบที่มีราคาสูง มีกลิ่นและลักษณะเนื้อเฉพาะ เช่น กาแฟ เห็ดหอม เครื่องเทศ สมุนไพร น้ำผลไม้ เนื้อสัตว์ เป็นต้น (ปัทมธร, 2547)

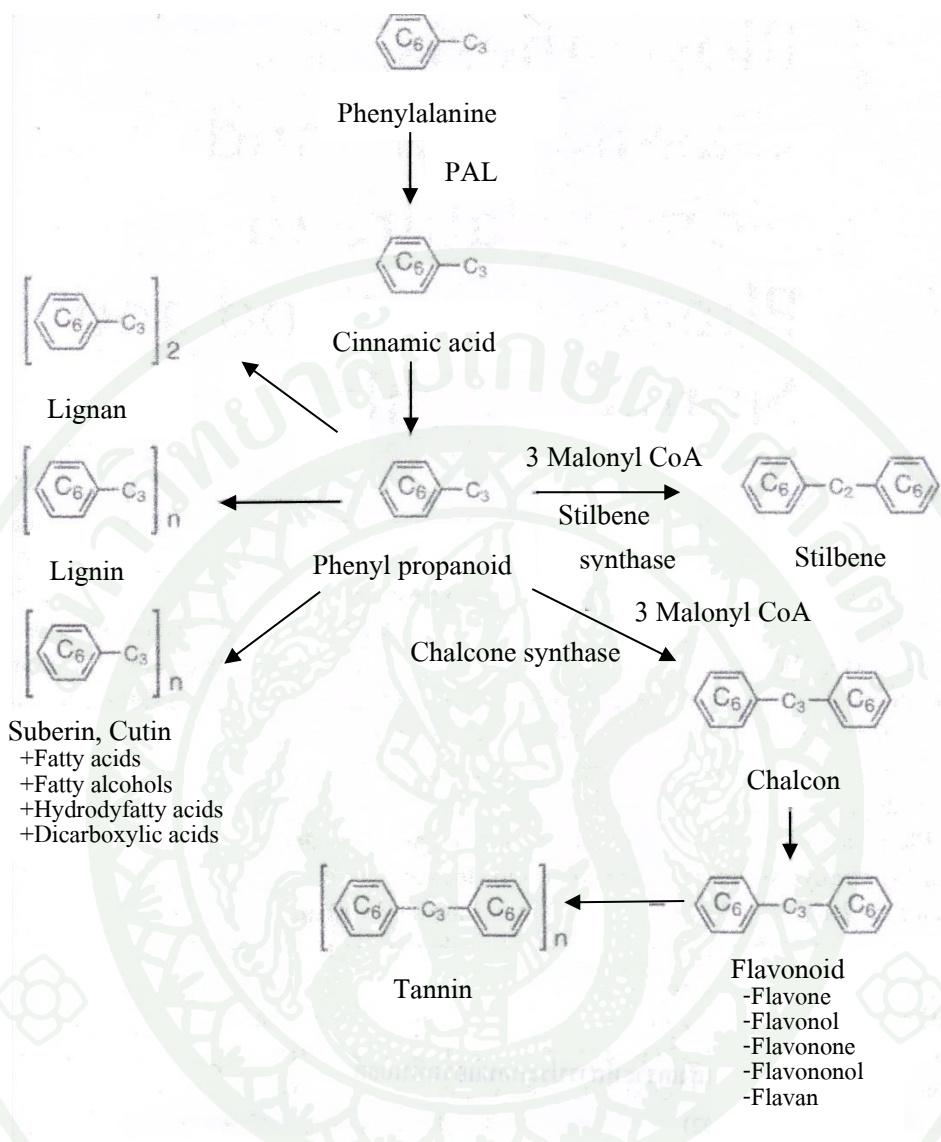
2. การทำแห้งด้วยลมร้อน

การทำแห้งด้วยลมร้อน จะอาศัยลมร้อนจากแหล่งความร้อนเป่าผ่านลงบนผิวอาหารที่เปียกชื้น เมื่ออากาศหรือลมร้อนพัดผ่านหน้าอาหารที่เปียก ความร้อนจะถูกถ่ายเทไปยังผิวของอาหารจะระเหยออกมาด้วยความร้อนแฝงของการเกิดไอ ไอน้ำจะแพร่ผ่านฟิล์มอากาศและถูกพัดพาไปโดยลมร้อนที่เคลื่อนที่ สภาวะดังกล่าวจะทำให้ความดันไอที่ผิวหน้าของอาหารต่ำกว่าความดันไอด้านในอาหาร เป็นผลให้เกิดความแตกต่างของความดันไอน้ำ อาหารชั้นด้านในจะมีความดันไอสองและค่อยๆ ลดต่ำลงเมื่อชั้นอาหารเข้าใกล้อากาศแห้ง ความแตกต่างนี้ทำให้เกิดแรงดันเพื่อไอน้ำออกจากอาหาร แต่อย่างไรก็ตาม การทำแห้งทำให้สูญเสียทั้งคุณภาพการบริโภคและคุณค่าทางโภชนาการของอาหาร (มณฑนา, 2555; Foust *et al.*, 1980)

การใช้ความร้อนในการทำแห้งอาหารจะส่งผลต่อคุณภาพอาหารในหลายด้าน เช่น ลักษณะเนื้อสัมผัส กลิ่นและรสชาติ สี คุณค่าทางโภชนาการ เป็นต้น การเปลี่ยนแปลงเนื้อสัมผัสภายหลังการทำแห้ง จะมีผลของคุณภาพของอาหาร ซึ่งสามารถปรับปรุงให้คุณภาพของอาหารดีขึ้นได้โดยการ Pretreatment เช่น การลวกผักผลไม้ก่อนการนำไปทำแห้ง การปอกเปลือกหรือหั่นก็ส่งผลต่อลักษณะเนื้อสัมผัสเช่นกัน การทำแห้งอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิสูงทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเนื้อสัมผัสมากกว่าการใช้อุณหภูมิต่ำ ในระหว่างการทำแห้งความร้อนจะทำให้สารให้กลิ่นของอาหารระเหยออกไปด้วย ดังนั้นการเลือกอุณหภูมิที่เหมาะสมจะเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อการสูญเสียสารให้กลิ่น นอกจากนี้การทำแห้งยังทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสีผิวอาหารและเปลี่ยนการสะท้อนของสี มีการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของสารแคโรทีนอยด์และคลอโรฟิลล์ ซึ่งเกิดขึ้นเนื่องจากความร้อนและมีการออกซิเดชันระหว่างการทำแห้ง ยิ่งใช้เวลานานและอุณหภูมิในการทำแห้งยิ่งสูงยิ่งเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวได้ง่าย และอาจเกิดปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลระหว่างการเก็บรักษา หากมีการทำงานของเอนไซม์อยู่ สามารถป้องกันโดยการนำไปลวกก่อนนำมาทำแห้ง (นิธิยา, 2544)

สารประกอบฟีนอลิกในหม่อน

สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds) เป็นสารประกอบที่พืชสังเคราะห์ขึ้น โดยมี กรดอะมิโนฟีนิลอะลานีน (Phenylalanine) เป็นสารตั้งต้น (ภาพที่ 2) แต่ในพืชบางชนิดสามารถ สังเคราะห์ได้จากกรดอะมิโนไทโรซีน (Tyrosine) (Shahidi and Nacz, 2004) โครงสร้างของ สารประกอบฟีนอลิกประกอบด้วยวงเบนซีนอยู่ภายในโมเลกุลและมีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) อย่าง น้อยหนึ่งหมู่ โดยพืชสร้างขึ้นเพื่อวัตถุประสงค์ต่างๆ เช่น ก่อให้เกิดสี กลิ่น และรสชาติ ที่จำเพาะ เจาะจง โดยส่วนใหญ่แล้วในพืชจะพบสารประกอบฟีนอลิกเหล่านี้จะอยู่ในรูปที่เกาะอยู่กับน้ำตาล (Glycosylated derivative) มากกว่าอยู่ในรูปเดี่ยวๆ (Aglycone) (Banias *et al.*, 1992) สามารถแบ่งได้ 3 กลุ่มใหญ่ ที่สำคัญคือ กรดฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ (Flavonoid) และแทนนิน (Tannin) โดยใน ลูกหม่อนมีสารประกอบฟีนอลิกที่สำคัญอยู่ 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ กรดฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งแอนโธไซยานินส์



ภาพที่ 2 กลไกการสังเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก

ที่มา: Shahidi and Naczk (2004)

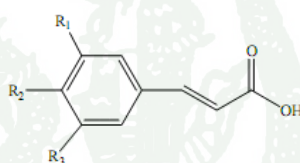
สารประกอบฟีนอลิกที่สำคัญที่พบในลูกหม่อน คือแอนโทไซยานินส์ เป็นสารสีทำให้เกิดสีแดง ชมพู ม่วง หรือน้ำเงินในพืช แอนโทไซยานินส์มีบทบาทในการลดการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ ช่วยในการมองเห็น รวมถึงสมบัติในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน และด้านการเกิดมะเร็ง โดยทั่วไปสามารถพบได้ในผักผลไม้ต่างๆ เช่น สตรอเบอร์รี่ ผักกาดแดง บลูเบอร์รี่ องุ่น ราสเบอร์รี่ แดง พลัม เป็นต้น ปัจจัยที่มีผลต่อความคงตัวของแอนโทไซยานินส์มีหลายปัจจัยเช่น อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง แสง เอนไซม์ ปฏิกิริยาคอนเดนเซชัน (Condensation) และซัลเฟอร์ไดออกไซด์

เป็นต้น หน้าที่สำคัญของแอนโทไซยานินส์ส่วนมาก คือการเป็นสิ่งที่ทำให้เกิดสีในพืชและผลิตภัณฑ์ที่มาจากพืช และบทบาทหน้าที่อื่นๆ คือ สามารถทำหน้าที่ในการเป็นสารต้านออกซิเดชันและสารต้านจุลินทรีย์ได้ ในส่วนของการเป็นสารต้านออกซิเดชันนั้น แอนโทไซยานินส์สามารถทำหน้าที่ในการเป็นตัวให้อิเล็กตรอนอะตอม (Hydrogen donor) แก่อนุมูลอิสระ และทำหน้าที่ในการจับกับไอออนของโลหะเพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ด้วยเหตุนี้จึงสามารถป้องกันการเกิดโรคเรื้อรังต่างๆ ได้

1. กรดฟีนอลิก (Phenolic acid)

กรดฟีนอลิก ประกอบด้วย กรดไฮดรอกซีซินนามิก (Hydroxycinnamic acid) และ กรดไฮดรอกซีเบนโซอิก (Hydroxybenzoic acid)

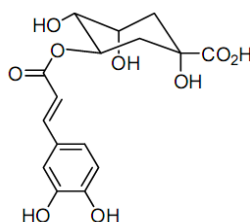
1.1 กรดไฮดรอกซีซินนามิก (Hydroxycinnamic acid)



ภาพที่ 3 โครงสร้างกรดไฮดรอกซีซินนามิก (Hydroxycinnamic acid)

ที่มา : Green (2007)

กรดไฮดรอกซีซินนามิก มีโครงสร้างหลักดังแสดงในภาพที่ 3 มักพบทั่วไปในพืช ได้แก่ กรดคาเฟอิก (Caffeic acid) กรดเฟอร์ริก (Ferulic acid) กรดพาราความาริก (*p*-Coumaric) และ กรดซินแนปิก (Sinapic acid) ในธรรมชาติมักพบในรูปของกรดไฮดรอกซีเอสเทอร์ (Hydroxy acid ester) โดยเกิดพันธะเอสเทอร์กับกรดควินิก (Quinic acid) กรดชิคิมิก (Shikimic acid) กรดทาร์ทาริก (Tartaric acid) ฟลาโวนอยด์ เซลลูโลส ลิกนิน หรือ โปรตีน ตัวอย่างเช่น กรดคลอโรจีนิก (Chlorogenic acid) (ภาพที่ 4) เกิดจากกรดทรานส์ซินนามิกเกิดพันธะเอสเทอร์กับกรดควินิก โดย 5-*O*-caffeoyl quinic acid คือกรดคลอโรจีนิกที่พบมากที่สุด (Waterhouse, 2005; Green, 2007)

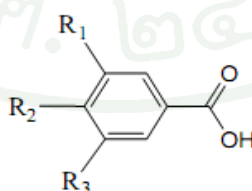


ภาพที่ 4 โครงสร้างกรดคลอโรจินิก (Chlorogenic acid)

ที่มา : Green (2007)

1.2 กรดไฮดรอกซีเบนโซอิก (Hydroxybenzoic acid)

กรดไฮดรอกซีเบนโซอิกส่วนมากมักพบในรูปของอนุพันธ์ และพบปริมาณน้อยในพืช ความหลากหลายของกรดไฮดรอกซีเบนโซอิกขึ้นอยู่กับการแทนที่ของหมู่ไฮดรอกซิลและเมทอกซิลบนวงอะโรมาติก (ภาพที่ 5) โดยมากจะเกิดพันธะไกลโคไซด์หรือพันธะเอสเทอร์กับกรดอินทรีย์ เช่น กรดมาเลอิก (Maleic acid) และกรดทาร์ทาริก (Tartaric acid) หรือเกิดพันธะกับฟลาโวนอยด์ เป็นต้น ตัวอย่างกรดไฮดรอกซีเบนโซอิก เช่น กรดแกลลิก (Gallic acid) กรควานิลลิก (Vanillic acid) และ กรดพาราไฮดรอกซีเบนโซอิก (*p*-Hydroxybenzoic acid) โดยกรดแกลลิก คือ กรดไฮดรอกซีเบนโซอิกที่สามารถพบได้ทั่วไป กรดแกลลิก 2 โมเลกุลสามารถรวมตัวกันกลายเป็น กรดเอลลาจิก (Ellagic acid) ซึ่งกรดเอลลาจิกนี้ได้รับความสนใจอย่างมากเนื่องจากมีคุณสมบัติในการต้านการเกิดมะเร็ง (Anticarcinogenic) และต้านการเกิดออกซิเดชัน (Antioxidant) ได้ (พิชญ์อร, 2549; Green, 2007)

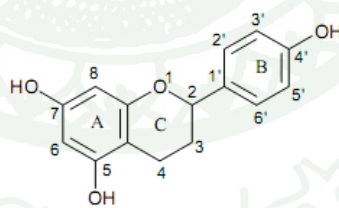


ภาพที่ 5 โครงสร้างกรดไฮดรอกซีเบนโซอิก (Hydroxybenzoic acid)

ที่มา : Green (2007)

2. ฟลาโวนอยด์ (Flavonoid)

ฟลาโวนอยด์จัดเป็นสารประกอบฟีนอลิกที่ถูพบมากที่สุดในการบรรดาสารประกอบฟีนอลิกจากพืชทั้งหมด พบอยู่ทั่วไปในพืชที่มีสีเขียว และพบในทุกส่วนของพืช ไม่ว่าจะเป็นใบ ราก เนื้อไม้ เปลือกต้น ดอก ผล หรือเมล็ด มีสูตรโครงสร้างหลักเป็นฟลาเวน (Flavan) หรือ 2-ฟีนิลเบนโซไพแรน (2-Phenylbenzopyran) ประกอบด้วยคาร์บอน 15 อะตอมเรียงกันเป็นระบบ $C_6C_3C_6$ โดยมีวงเบนซีน 2 วงจับกันด้วยคาร์บอน 3 อะตอม ซึ่งอาจจัดเรียงเกิดเป็นวงที่ 3 ทำให้โครงสร้างหลักที่ได้เหมือนโครงสร้างหลักของวิตามินอีที่เป็นโครงสร้างแบบโครแมน (Chroman) หรือเบนโซไพแรน (Benzopyran) (ภาพที่ 6) จากสูตรโครงสร้างหลักจะมีหมู่แทนที่ที่คาร์บอนตำแหน่งต่างๆ โดยเฉพาะที่วง A และ B ส่วนใหญ่จะเป็นหมู่ไฮดรอกซิล เมทอกซิล และน้ำตาลต่างๆ การแทนที่ของหมู่ต่างๆ เหล่านี้ทำให้เกิดเป็นฟลาโวนอยด์ในธรรมชาติที่แตกต่างกันเป็นจำนวนมาก ฟลาโวนอยด์มักพบในลักษณะของอนุพันธ์ของไกลโคไซด์ (Glycoside) (วิวัฒน์, 2545; โอภา และคณะ, 2549) และแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้ 6 กลุ่ม ได้แก่ แอนโทไซยานินส์ (Anthocyanins) ฟลาวานอล (Flavanol) ฟลาโวนอล (Flavonol) ฟลาโวน (Flavone) ฟลาวาโนน (Flavanone) และ ไอโซฟลาโวน (Isoflavone) โดยฟลาโวนอยด์กลุ่มหลักที่พบในลูกหม่อนคือแอนโทไซยานินส์ (Kim and Lee, 2005)

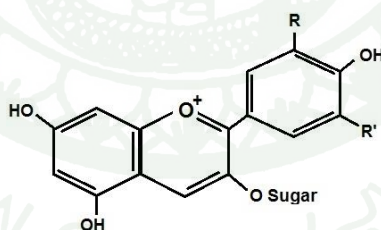


ภาพที่ 6 โครงสร้างพื้นฐานของสารประกอบฟลาโวนอยด์ (Flavonoid)

ที่มา : Green (2007)

2.1 แอนโทไซยานินส์ (Anthocyanins)

แอนโทไซยานินส์คือสารสี (Pigment) ที่สามารถละลายได้ในน้ำ (Water-soluble) เป็นสารที่ทำให้เกิดสีแดง ชมพู ม่วง หรือน้ำเงินในพืช มีโครงสร้างพื้นฐานเป็นแบบ Diphenylpropanes ($C_6-C_3-C_6$) (ภาพที่ 7) แอนโทไซยานินส์อยู่ในรูปเอซิลไกลโคไซด์ (Acylglycoside) ของแอนโทไซยานิดิน (Anthocyanidin (aglycone)) หรือที่เรียกว่าไกลโคไซด์ (Glycoside) โดยมีโมเลกุลของน้ำตาลมาเกาะที่ตำแหน่งที่ 3 ของแอนโทไซยานิดิน ความแตกต่างของแอนโทไซยานินส์แต่ละชนิดจะขึ้นอยู่กับจำนวนของหมู่ไฮดรอกซิล ชนิดและจำนวนของน้ำตาลที่มาเกาะกับโมเลกุล ตำแหน่งที่เกาะ ชนิดและจำนวนของอะลิฟาติก (Aliphatic) หรือ กรดอะโรมาติก (Aromatic acid) ที่มาต่อกับโมเลกุลของน้ำตาล (Kong *et al.*, 2003) แอนโทไซยานินส์มีสีตั้งแต่สีแดง น้ำเงิน จนถึงสีม่วง แอนโทไซยานิดินที่พบมากที่สุดในพืชมี 6 ชนิด คือ เพลลาโกนินิดิน (Pelargonidin) ไซยานิดิน (Cyanidin) เดลฟินิดิน (Delphinidin) พีโอนินิดิน (Peonidin) พีทูนิดิน (Petunidin) และ มัลวิดิน (Malvidin) แอนโทไซยานินส์มีบทบาทสำคัญในการลดการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ ช่วยในการมองเห็น อีกทั้งยังมีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน และต้านการเกิดมะเร็ง สามารถพบได้ทั่วไปในผักและผลไม้ต่างๆ เช่น สตรอเบอร์รี่ ผักกาดแดง บลูเบอร์รี่ องุ่น แบลคเบอร์รี่ ราสเบอร์รี่ แดง พลัม เป็นต้น (Giusti and Wrolstad, 2005; Shahidi and Naczk, 2004; Stintzing and Carle, 2004)



ภาพที่ 7 โครงสร้างพื้นฐานของแอนโทไซยานินส์ (Anthocyanins)

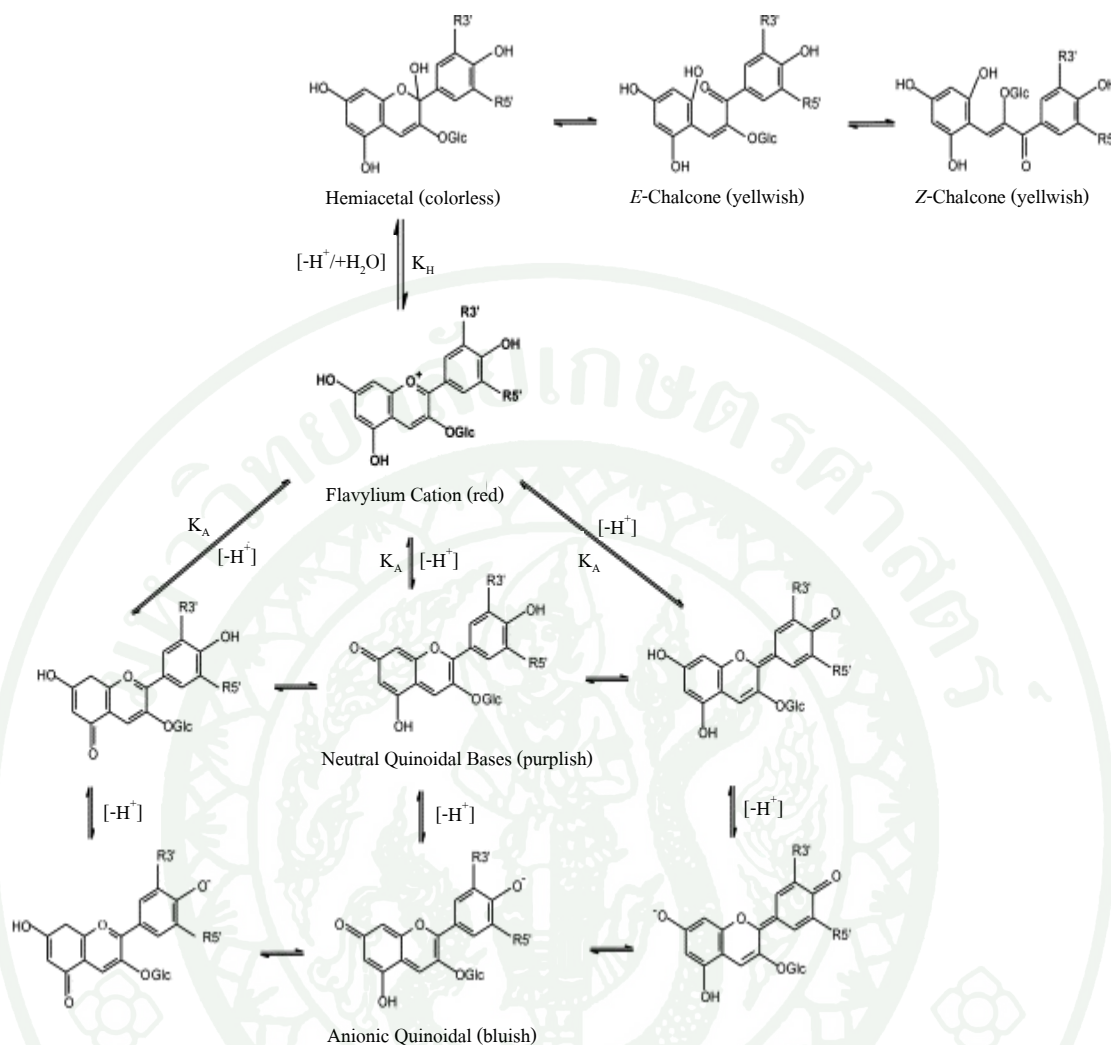
ที่มา : Lee *et al.* (2005)

ตารางที่ 3 ชนิดของแอนโธไซยานิดินที่พบทั่วไปในพืชและตำแหน่งการเติมหมู่ไฮดรอกซิล (Hydroxyl) และหมู่เมทิล (Methyl)

แอนโธไซยานิดิน	ตำแหน่งการเติมหมู่ไฮดรอกซิลและหมู่เมทิล		
	R ₃	R _{3'}	R ₅
เพลลาโกนิน (Pelargonidin)	H	H	H
ไซยานิดิน (Cyanidin)	H	OH	H
เดลฟินิดิน (Delphinidin)	H	OH	OH
พีโอนิดิน (Peonidin)	H	OCH ₃	H
พิทูนิน (Petunidin)	H	OCH ₃	OH
มัลวิดิน (Malvidin)	H	OCH ₃	OCH ₃

ที่มา : ดัดแปลงจาก Kong *et al.* (2003)

แอนโธไซยานินส์เมื่ออยู่ในสารละลายทำตัวเสมือนเป็นอินดิเคเตอร์ จะเกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้าง และสีเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของสารละลายเปลี่ยนแปลงไป โดยในสถานะที่มีความเป็นกรด-ด่างต่ำหรือความเป็นกรด-ด่างกลาง แอนโธไซยานินส์จะมีโครงสร้างได้ทั้ง 4 แบบคือ ฟลาเวียม (Flavylium cation) ควินอยด์ เบส (Quinoidal base) คาร์บินอล ซูโดเบส (Carbinol pseudobase) และ คาลโคน (Chalcone) ที่ความเป็นกรด-ด่างต่ำกว่า 2 แอนโธไซยานินส์จะอยู่ในรูปของ Flavylium cation (สีแดง) แต่เมื่อความเป็นกรด-ด่างเพิ่มขึ้น Flavylium cation จะอยู่ในสถานะที่ไม่เสถียรทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไปเป็น Colourless pseudobase (ไม่มีสี) และ Quinoidal base (สีน้ำเงิน) ดังภาพที่ 8



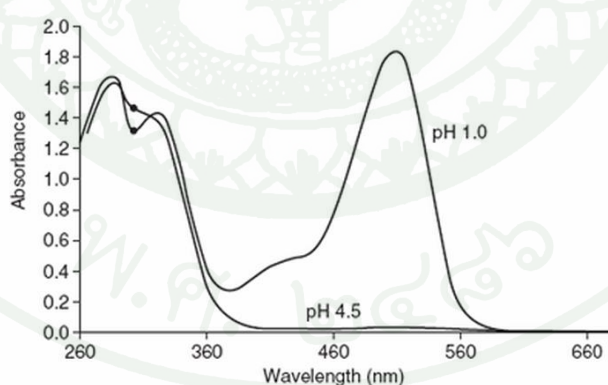
ภาพที่ 8 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของแอนโทไซยานินส์ที่ความเป็นกรด-ด่างต่างๆ

ที่มา : Stintzing and Carle (2004)

แอนโทไซยานินส์มีหน้าที่สำคัญคือการเป็นสิ่งที่ทำให้เกิดสีในพืชและผลิตภัณฑ์ที่มาจากพืช ซึ่งช่วยในการดึงดูดสัตว์เพื่อทำให้เกิดการผสมเกสรดอกไม้และทำให้เกิดการแพร่กระจายของเมล็ดพันธุ์ (วิวัฒน์, 2545) อีกทั้งยังมีความสำคัญต่อคุณภาพทางประสาทสัมผัส (สี กลิ่นรส และรสชาติ) ของผลไม้สด ผักสด และผลิตภัณฑ์ต่างๆ (Kim *et al.*, 2003) และบทบาทหน้าที่อื่นๆ คือ สามารถทำหน้าที่ในการเป็นสารต้านออกซิเดชันและสารต้านจุลินทรีย์ได้ ในส่วนของการเป็นสารต้านออกซิเดชันนั้น แอนโทไซยานินส์ สามารถทำหน้าที่ในการเป็นตัวให้อิเล็กตรอนอะตอม (Hydrogen donor) แก่อนุมูลอิสระ และทำหน้าที่ในการจับกับไอออนของโลหะเพื่อป้องกันการ

เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Kong *et al.*, 2003) ด้วยเหตุนี้จึงสามารถป้องกันการเกิดโรคเรื้อรังต่างๆ ได้ เช่น โรคมะเร็ง โรคเบาหวาน โรคหัวใจ เป็นต้น ในอุตสาหกรรม มีความพยายามนำสารสกัด แอนโทไซยานินสีจากพืช เพื่อนำไปใช้เป็นสารให้สี โดยสารสกัดจากพืชที่เคยมีการรายงานว่ามี ปริมาณแอนโทไซยานินสีมากที่สุด คือ สารสกัดจากกากองุ่น (Chemler *et al.*, 2009)

วิธีการหาปริมาณของแอนโทไซยานินสีทั้งหมดด้วยวิธี pH-differential (Giusti and Wrolstad, 2001) เป็นวิธีที่พัฒนามาจากการที่โครงสร้างของแอนโทไซยานินสีเปลี่ยนแปลงไปได้ ตามการเปลี่ยนแปลงค่า pH ทำให้การดูดกลืนแสงของแอนโทไซยานินสีเปลี่ยนไป ดังภาพที่ 9 เมื่อนำสารสกัดแอนโทไซยานินสีจากหัวแรดิช (Radish) ปรับ pH ให้เป็น 1.0 และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นระหว่าง 260-700 นาโนเมตร พบว่าแอนโทไซยานินสีดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นระหว่าง 460-560 นาโนเมตร และเมื่อปรับ pH ให้เป็น 4.5 การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นดังกล่าวหายไป เนื่องจากที่ pH 1.0 โครงสร้างของแอนโทไซยานินสีจะอยู่ในรูปของออกโซเนียม (Oxonium form) ซึ่งมีสี และที่ pH 4.5 โครงสร้างของแอนโทไซยานินสีจะอยู่ในรูปของเฮมิคีทอล (Hemiketal form) ซึ่งไม่มีสี ในขณะที่ถ้าในตัวอย่างมีสารอื่นๆ ที่ดูดกลืนแสงในช่วงเดียวกับแอนโทไซยานินสี เมื่อเปลี่ยน pH เป็น 4.5 แล้ว ค่าการดูดกลืนแสงของสารอื่นๆ จะเท่าเดิม ในขณะที่ค่าการดูดกลืนแสงของแอนโทไซยานินสีจะหายไป

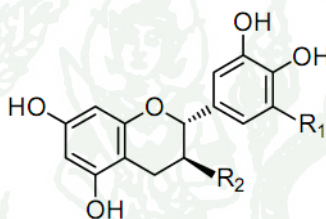


ภาพที่ 9 UV-visible spectrum ของแอนโทไซยานินสีจากหัวแรดิช (Radish) ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 1.0 และ 4.5

ที่มา : Giusti and Wrolstad (2001)

2.2 ฟลาวานอล (Flavanol)

ฟลาวานอลรู้จักกันดีในชื่อของฟลาวานทีโอดส์ (Flavan-3-ols) มีโครงสร้างดังแสดงในภาพที่ 10 ในธรรมชาติพบในรูปของอะไกลโคน (Aglycone) ซึ่งตรงข้ามกับฟลาโวนอยด์ส่วนใหญ่ที่มักพบในรูปที่ต่อกับน้ำตาลหรือไกลโคไซด์ ตัวอย่างฟลาวานอลที่พบมาก เช่น คาเทชิน (Catechin) อีพิกาทะชิน (Epicatechin) และอีพิกัลโลคาเทชิน (Epigallocatechin) มักพบทั่วไปในชาชนิดต่างๆ เช่น ชาเขียว ชาอู่หลง และชาดำ เป็นต้น ฟลาวานอลสามารถเกิดปฏิกิริยาโพลิเมอไรเซชันเกิดเป็นโปรแอนโทไซยานิดิน (Proanthocyanidin) ได้ (พิชญ์อร, 2549; Green, 2007; Kim and Lee, 2005)



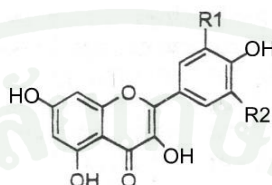
ภาพที่ 10 โครงสร้างพื้นฐานของฟลาวานอล (Flavanol)

ที่มา : Green (2007)

2.3 ฟลาโวนอล (Flavonol)

ฟลาโวนอลคือกลุ่มที่พบมากที่สุดคในพืชเมื่อเทียบกับฟลาโวนอยด์กลุ่มอื่นๆ มีโครงสร้างคล้ายกับฟลาวานอล แตกต่างกันที่พันธะคู่ของอะตอมออกซิเจนที่จับที่ตำแหน่งที่ 4 ของวง C และตำแหน่งพันธะคู่ที่วง C อีกทั้งยังมีหมู่ไฮดรอกซิลเกาะอยู่ที่ตำแหน่งที่ 3 ของวง C (ภาพที่ 11) ปัจจุบันสามารถระบุชนิดของฟลาโวนอลได้แล้วประมาณ 200 ชนิด การสังเคราะห์ ฟลาโวนอล ขึ้นอยู่กับแสง ดังนั้นมักจะพบฟลาโวนอลบริเวณใบหรือผิวของผลไม้ และจะพบในปริมาณน้อยในพืชที่อยู่ใต้พื้นดิน ในธรรมชาติมักพบในรูปของไกลโคไซด์ ที่พบมากในผลไม้และผัก คือ ไกลโคไซด์ของเคอซีทิน (Quercetin) ซึ่งก็คือเคอซีทิน-3-รูทีโนไซด์หรือรูทีน (Rutin) (พิชญ์อร, 2549; Kim and Lee, 2005; Shahidi and Nacz, 2004) Wada and Ou (2002) ศึกษาสารประกอบฟีนอลิกใน Red raspberry (*Rubus idaeus*) Black raspberry (*Rubus occidentalis*) Marionberry (*Rubus*

ursinus) และ Vergreen blackberry (*Rubus laciniatus*) พบว่ามีเคอซีทิน-3- รุทีโนไซด์เป็นองค์ประกอบ ส่วนที่อยู่ในรูปอะไกลโคนที่พบโดยทั่วไป ได้แก่ แคมเฟอร์อล (Kaempferol) เคอซีติน (Quercetin) และไมริซีทิน (Myricetin) (ตารางที่ 4)



ภาพที่ 11 โครงสร้างพื้นฐานของฟลาโวนอล (Flavonol)

ที่มา : United State Department of Agriculture (USDA) (2003)

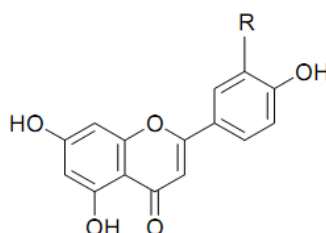
ตารางที่ 4 ชนิดของฟลาโวนอลและตำแหน่งการเติมหมู่ไฮดรอกซิลและหมู่เมทิล

ฟลาโวนอล	ตำแหน่งการเติมหมู่ไฮดรอกซิลและหมู่เมทิล	
	R ₁	R ₂
เคอซีทิน (Quercetin)	OH	H
แคมเฟอร์อล (Kaempferol)	H	H
ไมริซีทิน (Myricetin)	OH	OH
ไอโซแรมเนทิน (Isorhamnetin)	OCH ₃	H

ที่มา : ดัดแปลงจาก United State Department of Agriculture (USDA) (2003)

2.4 ฟลาโวน (Flavone)

ฟลาโวนคือกลุ่มของฟลาโวนอยด์ที่พบได้น้อยมากในพืช แต่มักพบในพืชตระกูลส้ม (Citrus) Green (2007) กล่าวว่าปัจจุบันสามารถระบุชนิดของฟลาโวนได้ประมาณ 700 ชนิดในพืช ตัวอย่างของฟลาโวน ได้แก่ เอพิจินิน (Apigenin) ลูทีโอลิน (Luteolin) และ รือโฟลีน (Rhoifolin) เป็นต้น (Kim and Lee, 2005)

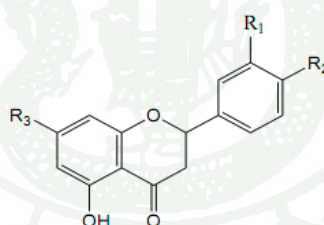


ภาพที่ 12 โครงสร้างพื้นฐานของฟลาโวน (Flavone)

ที่มา : Green (2007)

2.5 ฟลาวาโนน (Flavanone)

ฟลาวาโนนมักพบในพืชตระกูลส้ม ในธรรมชาติมักพบในรูปของไกลโคไซด์ ตัวอย่างเช่น เฮสเพอริดิน (Hesperidin) นารินจิน (Naringin) และนีโอเฮสเพอริดิน (Neohesperidin) เป็นต้น (Kim and Lee, 2005)

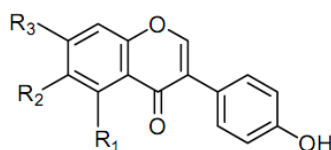


ภาพที่ 13 โครงสร้างพื้นฐานของฟลาวาโนน (Flavanone)

ที่มา : Green (2007)

2.6 ไอโซฟลาโวน (Isoflavone)

ไอโซฟลาโวนมักพบในพืชตระกูลถั่วที่มีลักษณะเป็นฝัก (Legumes) เช่น ไดซีน (Daidzein) จินิสทีน (Genistein) และ ไกลซิทิน (Glycitin) เหล่านี้คือไอโซฟลาโวนที่สำคัญในพืช (วิวัฒน์, 2549; Kim and Lee, 2005)



ภาพที่ 14 โครงสร้างพื้นฐานของไอโซฟลาโวน (Isoflavone)

ที่มา : Green (2007)

ตารางที่ 5 แหล่งของพืชที่พบฟลาโวนอยด์ชนิดต่างๆ

Source	Subclass	Flavonoid
Cherry	Anthocyanin	Cyanidin, Delphinidin, Malvidin, Peonidin, Petunidin
Elderberry		Cyanidin
Red onions		Cyanidin
Blueberries		Cyanidin, Delphinidin, Malvidin, Pelargonidin
Raspberries		Cyanidin, Delphinidin, Malvidin, Pelargonidin
Mushrooms	Flavanol	Epicatechin, Epicatechin 3-gallate, Epigallocatechin
Olives		Catechin, Gallocatechin
Black Tea		Epicatechin, Epicatechin 3-gallate, Epigallocatechin, Catechin, Theaflavin
Peaches		Epicatechin, Epigallocatechin 3-gallate, Gallocatechin
Peppers		Quercetin
Radishes	Flavonol	Kaempferol, Myricetin, Quercetin
Tomato		Kaempferol, Quercetin
Strawberries		Kaempferol, Myricetin, Quercetin

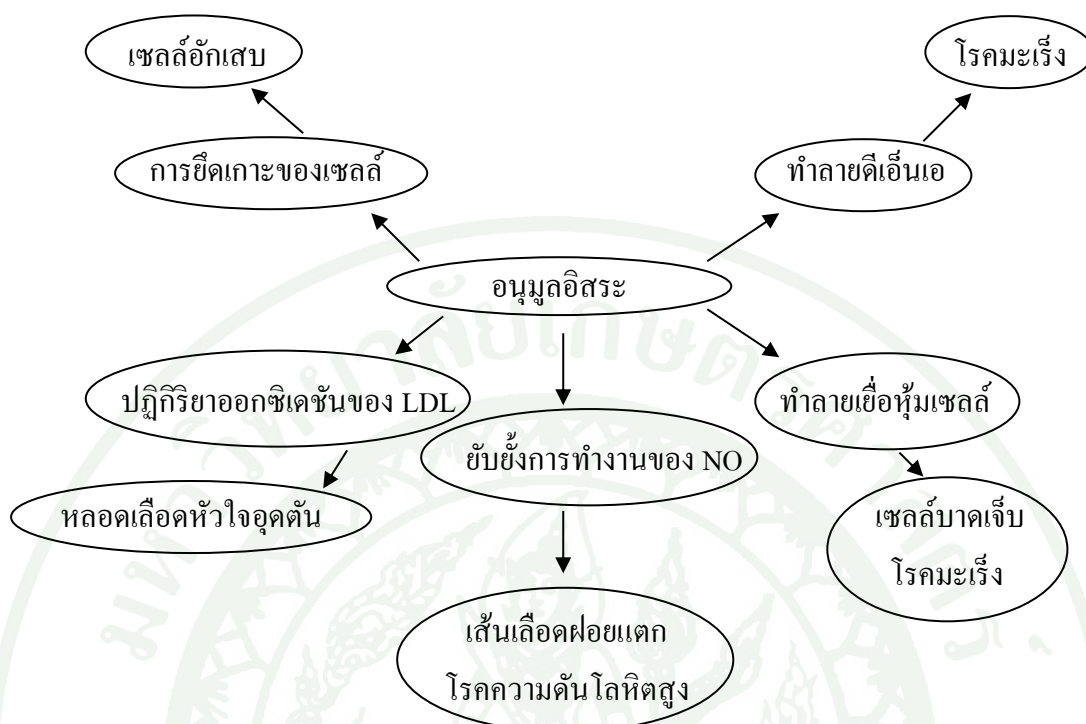
ที่มา : United State Department of Agriculture (USDA) (2003)

สารต้านออกซิเดชัน

สารต้านออกซิเดชัน (Antioxidant) หมายถึงสารที่มีปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับสารตั้งต้น (Substrate) ทำหน้าที่ลดหรือยับยั้งปฏิกิริยาที่จะก่อให้เกิดออกซิเจนหรือสารเปอร์ออกไซด์ (Peroxide) หรือหมายถึง สารในอาหารที่มีผลในการลด Reactive oxygen species (ROS) หรือ reactive nitrogen species (RNS) ในร่างกาย (Huang *et al.*, 2005) ซึ่งได้แก่ อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ (Superoxide radical, $O_2^{\cdot-}$) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide, H_2O_2) อนุมูลไฮดรอกซิล (Hydroxyl radical, $HO^{\cdot}$) กรดไฮโปคลอรัส (Hypochlorous acid, $HOCl$) อนุมูลเปอร์ออกซิล (Peroxyl radical, $ROO^{\cdot}$) ซิงเกิลออกซิเจน (Singlet oxygen, $^1O_2$) และเปอร์ออกไซด์ไนไตรท์ (Peroxyl nitrite, $ONOO^-$) (Sánchez-Moreno, 2002) สารต้านอนุมูลอิสระมีความสำคัญทั้งในระบบอาหาร โดยลดการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันขององค์ประกอบในอาหาร โดยเฉพาะไขมัน เพื่อยืดอายุการเก็บรักษา รวมทั้งมีประโยชน์ต่อระบบร่างกายโดยช่วยลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเรื้อรัง เช่น โรคหัวใจ โรคมะเร็ง เป็นต้น

1. บทบาทของสารต้านออกซิเดชันต่อสุขภาพ

ในระบบร่างกายอนุมูลอิสระสามารถสังเคราะห์ขึ้นได้จากหลายปัจจัย เช่น การสูบบุหรี่ การฉายรังสี และการรั่วของไมโทคอนเดรีย เป็นต้น (Yoshikawa, 1997) ซึ่งอนุมูลอิสระที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจะเข้าทำปฏิกิริยากับโปรตีน ทำลายดีเอ็นเอ (DNA) ก่อให้เกิดโรคมะเร็ง ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลให้เกิดความเสียหายและสูญเสียหน้าที่แก่เซลล์ ทำให้เซลล์บาดเจ็บ และยังยับยั้งการทำงานของไนตริกออกไซด์ (NO) ซึ่งเป็นสารต้านออกซิเดชัน ส่งผลให้เกิดสภาวะก่อโรค อีกทั้งยังเป็นตัวเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน โดยเฉพาะกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ส่งผลให้เกิดโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน ดังแสดงในภาพที่ 15



ภาพที่ 15 บทบาทของอนุมูลอิสระต่อการก่อให้เกิดสภาวะการก่อโรค

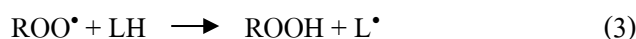
ที่มา: ดัดแปลงจาก Yoshikawa (1997)

2. หลักการวัดสมบัติการต้านออกซิเดชัน

2.1 วิธีการวัดการแลกเปลี่ยนอะตอมไฮโดรเจน (Based on hydrogen atom transfer (HAT) reaction)

Huang *et al.* (2005) รายงานว่าหลักการนี้เป็นการวัดความสามารถในการแข่งขันกัน ในเชิงจลศาสตร์ หลักการนี้ประกอบด้วยสารที่ผลิตอนุมูลอิสระ (Synthetic free radical generator) สารตั้งต้นของปฏิกิริยา (Oxidizable molecular probe) และสารต้านออกซิเดชัน (Antioxidant) ขั้นตอนเริ่มต้นสารประกอบอะโซ (Azo compound) จะถูกกระตุ้น โดยทั่วไปจะใช้ความร้อนในการ กระตุ้นเพื่อทำให้เกิดการสลายตัวกลายเป็นอนุมูลเพอร์ออกซิดเพื่อเป็นตัวแทนของอนุมูลอิสระในธรรมชาติ การเกิดปฏิกิริยาเป็นไปตาม 4 ขั้นตอน ดังนี้

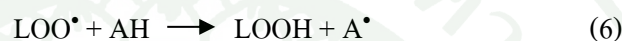
Initiation



Propagation



Inhibition



Termination



เมื่อ

 R_2N_2 = สารประกอบอะโซ (Azo compound)

 $ROO^\bullet$ = อนุมูลเพอร์ออกซิล (Peroxyl radical)

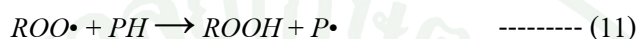
 LH = สารตั้งต้น (Substrate)

 AH = สารต้านออกซิเดชัน (Antioxidant)

วิธีการในกลุ่ม HAT นี้ได้แก่ Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay และ Total radical trapping antioxidant parameter (TRAP) assay ซึ่งวิธีการกลุ่มนี้จะวัดปริมาณอะตอมไฮโดรเจนที่มีการแลกเปลี่ยน โดยจะวัดการเรืองแสงของสารฟลูออเรสเซนต์ ที่ลดลงเมื่อเกิดการออกซิเดชัน เมื่อระบบมีสารต้านออกซิเดชัน สารต้านออกซิเดชันจะไปแย่งจับสารเรืองแสง ส่งผลให้ความเข้มสารฟลูออเรสเซนต์ลดลงด้วยความเร็วที่ช้าลง

วิธีการวิเคราะห์ในกลุ่มนี้ จำเป็นต้องใช้สารตัวแทนเพื่อเป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยา (Probes หรือ Substrates) โดยสารต้านออกซิเดชันจะแย่งกันทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น ในระบบการทดลองจะประกอบด้วย สารกลุ่มอะโซเพื่อผลิตอนุมูลอิสระ เช่น AAPH probes เพื่อติดตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น (สารฟลูออเรสเซนต์) และสารต้านออกซิเดชัน โดย AAPH จะถูกให้ความร้อนเพื่อสร้างอนุมูลเพอร์ออกซิล เมื่อเติมฟลูออเรสเซนต์ และสารต้านออกซิเดชันแล้ว จะเกิดการแย่งกันทำปฏิกิริยากับอนุมูลเพอร์ออกซิล โดยสารต้านออกซิเดชันจะทำปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วเมื่อสารต้าน

ออกซิเดชันทำปฏิกิริยาจนหมดแล้วสารฟลูออเรสซินจึงเข้าทำปฏิกิริยาต่อ การเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์จึงค่อยๆ ลดลง กลไกการแย่งทำปฏิกิริยาของสารต้านออกซิเดชันและฟลูออเรสซินแสดงในสมการที่ 9-12

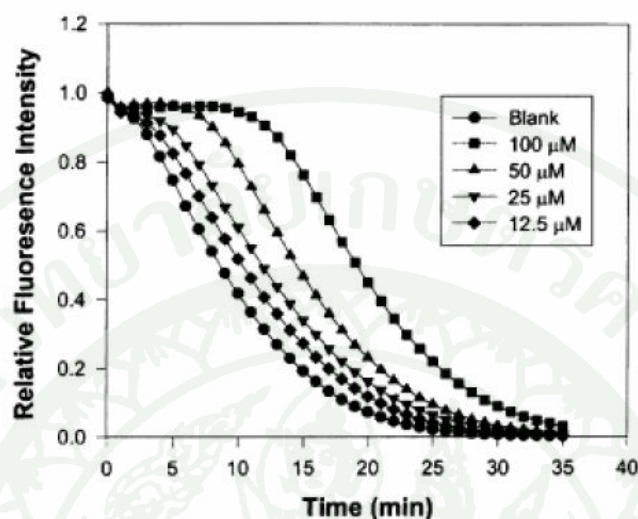


เมื่อ PH = สารตัวแทนสารตั้งต้น (Oxidized probes)

2.1.1 Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay

วิธีนี้เป็นการวัดสมบัติการต้านออกซิเดชัน โดยอาศัยหลักการลดลงของแสงฟลูออเรสเซนซ์เมื่อวัดด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงฟลูออเรสเซนซ์ (Prior *et al.*, 2005) โดยเมื่อฟลูออเรสซินทำปฏิกิริยากับอนุมูลเพอร็อกซิดแล้วความเข้มของแสงจะลดลง หากในระบบมีปริมาณสารต้านออกซิเดชันน้อยจะทำให้ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ลดลงอย่างรวดเร็ว แต่ถ้าปริมาณสารต้านออกซิเดชันมากความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์จะลดลงช้า เนื่องจากอนุมูลอิสระต้องทำปฏิกิริยากับสารต้านออกซิเดชันจนหมดก่อนแล้วจึงทำปฏิกิริยากับฟลูออเรสซิน วิธีนี้นิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง และสามารถใช้ได้ทั้งการวัดสมบัติของสารต้านออกซิเดชันในพืชและระบบร่างกายวิธี ORAC นี้เป็นการรวมกันระหว่างการหาค่าเวลาในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (Inhibition time) และปริมาณการยับยั้งอนุมูลอิสระ ในขณะที่วิธีการอื่นมักหาค่าเวลาในการยับยั้งเมื่อกำหนดปริมาณการยับยั้งอนุมูลอิสระ หรือหาปริมาณในการยับยั้งอนุมูลอิสระเมื่อกำหนดระยะเวลา หลักการโดยย่อของวิธี ORAC คือนำตัวอย่าง หรือตัวแทนควบคุม (Control) หรือสารมาตรฐาน (Standard) ผสมกับสารฟลูออเรสซิน แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วเติม AAPH เพื่อเริ่มปฏิกิริยา วัดความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่น 485 nm Excitation/525 nm Emission เป็นเวลา 35 นาทีโดยประมาณ และตั้งอุณหภูมิภายในเครื่องที่ 37 องศาเซลเซียส โดยในการทดลองใช้ไทรอล็อกซ์ (สารจำลองของวิตามินอี) ความเข้มข้น 4-5 ระดับ เป็นสารมาตรฐาน ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 16 นำผลที่ได้คำนวณหาพื้นที่ใต้กราฟ (Area under curve, AUC) แล้วคำนวณเป็นค่าพื้นที่

ได้กราฟสุทธิ (Net AUC) นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของ
 โทรล็อกซ์ (Y) (μM) กับพื้นที่ใต้กราฟ (X)



ภาพที่ 16 การลดลงของความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์สัมพันธ์ของตัวอย่างและสารมาตรฐาน

ที่มา: Huang *et al.* (2005)

การวัดค่าด้วยวิธี ORAC นี้ เพื่อให้ได้ผลการทดลองที่ดีขึ้นควรใช้ปีเปตชนิด
 หลายทาง (Multichannel) เพื่อใช้เวลาในการเตรียมตัวอย่างลงในไมโครเพลตให้สั้นที่สุด ควมคู่กับ
 เครื่องอ่านค่าพร้อมถาดชนิด 96 หรือ 48 หลุม นอกจากนั้นวิธีนี้ค่อนข้างไวต่ออุณหภูมิ จึงต้อง
 ควบคุมทั้งอุณหภูมิภายในเครื่อง และอุณหภูมิของบัฟเฟอร์ที่นำมาใช้ให้อยู่ที่ 37 องศาเซลเซียส
 ก่อนนำมาละลายสาร AAPH สิ่งสำคัญอีกเรื่องหนึ่งคือในการทดลองแต่ละครั้งไม่ควรใช้เวลาเกิน
 1 ชั่วโมง เนื่องจากสารหมดประสิทธิภาพ

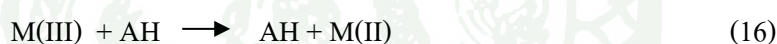
2.1.2 Total radical trapping antioxidant parameter (TRAP) assay

วิธีนี้เป็นวิธีที่ใช้หลักการเดียวกับวิธี ORAC คือใช้สาร AAPH ในการผลิต
 อนุมูลเพอร์ออกซิด ผลที่ได้เปรียบเทียบกับโทรล็อกซ์ และใช้สารฟลูออเรสซินเป็นสารเรืองแสง
 เช่นเดียวกันแต่แตกต่างกันตรงที่ วิธี ORAC ตรวจติดตามความเข้มของแสงที่ลดลงเมื่อวัดด้วย
 เครื่องวัดการดูดกลืนแสงฟลูออเรสเซนซ์โดยเปรียบเทียบพื้นที่ใต้กราฟ ในขณะที่วิธี TRAP ตรวจ

ติดตามปริมาณออกซิเจนที่ถูกใช้ไปในปฏิกิริยาโดยดูที่เวลาการเกิดปฏิกิริยาเป็นหลัก ผลที่ได้คำนวณออกมาเป็นค่าไมโครโมลของอนุมูลเพอร์ออกซิลที่ถูกจับไว้ต่อพลาสมา 1 ลิตร แต่วิธีการนี้มีปัญหาเนื่องจากมีจุดสิ้นสุดของปฏิกิริยา (Endpoint) หลายจุด ซึ่งอาจทำให้เกิดความสับสนในการทดลองได้

2.2 วิธีการวัดการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอนเดี่ยว (Based on single electron transfer (SET) reaction)

วิธีการนี้เป็นการหาความสามารถในการส่งผ่านอิเล็กตรอนไปรีดิวซ์สารอื่น ได้แก่ โลหะ และอนุมูลอิสระ ดังสมการที่ 13-16 (Prior *et al.*, 2005)



Huang *et al.* (2005) รายงานว่าวิธีนี้ประกอบด้วยส่วนผสมของสาร 2 ชนิดคือ สารต้านออกซิเดชัน และสารออกซิไดซ์ (Probe) และเกิดปฏิกิริยาตามสมการที่ 17



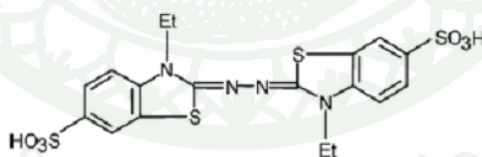
Probe ซึ่งคือสารออกซิไดซ์จะรับอิเล็กตรอนจากสารต้านออกซิเดชัน ทำให้ Probe เปลี่ยนสี การเปลี่ยนสีของ Probe จะเป็นสัดส่วนกับปริมาณสารต้านออกซิเดชัน คือถ้าสารต้านออกซิเดชันมีความเข้มข้นมากสีของ Probe ก็จะลดลงเร็ว วิธีการในกลุ่มนี้ ได้แก่ Total phenols assay by Folin-Ciocalteu reagent (FCR), Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay, Ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) assay และ 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging capacity assay

2.2.1 Total phenols assay by Folin-Ciocalteu reagent (FCR)

วิธีการนี้เป็นการวัดความสามารถในการรีดิวซ์ (Reducing capacity) ของสารหลักการคือสารประกอบฟีนอลิกสามารถเกิดปฏิกิริยากับโฟลีน-ซีโอคาเทอ (Folin-ciocalteu reagent (FCR)) ภายใต้สภาวะที่เป็นด่าง (เมื่อเติมด้วยโซเดียมคาร์บอเนตซึ่งมีความเป็นกรด-ด่างประมาณ 10) สารประกอบฟีนอลิกจะเกิดการแตกตัวได้เป็นฟีนอลเอทแอนไอออน (Phenolate anion) สามารถรีดิวซ์โฟลีน-ซีโอคาเทอ ทำให้เกิดสารประกอบที่ให้สีน้ำเงิน ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร

2.2.2 Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay หรือ ABTS assay

วิธีการนี้เป็นการวัดความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS (ABTS radical cation, $ABTS^{\bullet+}$) เปรียบเทียบกับโทรล็อกซ์ วัดได้จากการลดลงของสีในสารละลาย โดยทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร สาร ABTS (2, 2-azobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate)) มีสูตรโครงสร้างดังแสดงในภาพที่ 17 ซึ่งในสภาวะปกติดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 342 นาโนเมตร เมื่อถูกกระตุ้นให้ผลิตอนุมูลอิสระจะเปลี่ยนมาดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 414 นาโนเมตร



ภาพที่ 17 โครงสร้างทางเคมีของ ABTS

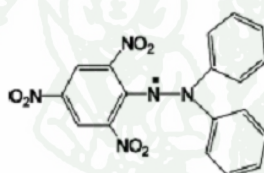
ที่มา: Prior *et al.* (2005)

ข้อดีของวิธี TEAC คือ ทำได้ง่าย โดยอนุมูลอิสระ ABTS จะทำปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วกับสารต้านอนุมูลอิสระภายใน 30 นาที ปกติใช้เวลาประมาณ 5 นาที การวิเคราะห์ทำได้ในช่วงความเป็นกรด-ด่างกว้างทำให้สามารถศึกษาได้โดยละเอียด อนุมูลอิสระ ABTS ละลายได้ทั้งในน้ำและสารทำละลายอินทรีย์ ใช้วิเคราะห์หาความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสาร

ต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นสารที่ละลายน้ำ หรือสารที่ละลายในไขมัน ข้อเสียคือ อนุมูลอิสระ ABTS ไม่เป็นสารตามธรรมชาติที่ก่อให้เกิดอนุมูลอิสระในเซลล์หรือในร่างกาย (โอภา และคณะ, 2549)

2.2.3 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging capacity assay

วิธีการนี้เป็นวิธีที่วัดความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (ภาพที่ 18) โดยวัดได้จากการดูดกลืนของสีที่มีความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร อนุมูลอิสระ DPPH เป็นหนึ่งในสองถึงสามชนิดของอนุมูลอิสระที่มีความคงตัว มีสีม่วงเมื่ออยู่ในรูปอนุมูลอิสระแล้วโดยไม่ต้องทำปฏิกิริยาเหมือนกับอนุมูลอิสระ ABTS สามารถดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร (โอภา และคณะ, 2549; Huang *et al.*, 2005)



ภาพที่ 18 โครงสร้างทางเคมีของ DPPH

ที่มา: Prior *et al.* (2005)

ข้อดีของวิธีนี้คือ ง่าย ใช้เครื่องมือสามัญทั่วๆ ไป นิยมใช้เป็นวิธีเบื้องต้นในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลของสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ ข้อเสียของวิธีนี้คือ อนุมูลอิสระ DPPH มีความคงตัวไม่ไวต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในเซลล์หรือร่างกาย ดังนั้นวิธีนี้จึงไม่สามารถแยกแยะ หรือจัดอันดับอนุมูลอิสระที่ความไวสูงได้ นอกจากนี้โครงสร้างทางเคมีของอนุมูลอิสระ DPPH ที่แสดงในภาพที่ 18 จะเห็นว่าอิเล็กตรอนเดี่ยวของอนุมูลอิสระถูกบดบังด้วยวงเบนซีน 3 วงและหมู่ไนโตร ทำให้สารต้านอนุมูลที่มีฤทธิ์แรงแต่มีขนาดใหญ่ไม่สามารถเข้าไปทำปฏิกิริยาหรือเกิดปฏิกิริยาช้ากว่าความเป็นจริง นอกจากนี้สารรีดิวซ์สามารถทำให้สีของอนุมูลอิสระ DPPH จางลงได้อีกด้วย (โอภา และคณะ, 2549)

3. ประเภทของสารต้านออกซิเดชัน

โอภา และคณะ (2549) และ Prior *et al.* (2005) รายงานว่าสารต้านออกซิเดชันสามารถแบ่งได้อย่างน้อย 4 กลุ่ม ดังนี้คือ

3.1 เอนไซม์

ในระดับเซลล์เอนไซม์เป็นกลไกสำคัญขั้นแรกที่ทำหน้าที่ควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในสมดุล เอนไซม์ที่สำคัญได้แก่ เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (Superoxide dismutase หรือ SOD) เอนไซม์กลูตาไทโอนเพอร์ออกซิเดส (Glutathione peroxidase หรือ GPX) และเอนไซม์คาตาเลส (Catalase หรือ CAT) เป็นต้น

3.2 สารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่

ตัวอย่างเช่น อัลบูมิน (Albumin) เซรูโลพลาสมีน (Ceruloplasmin) เฟอริติน (Ferritin) และโปรตีนชนิดอื่นๆ โดยโปรตีนจับและแยกโลหะที่เกี่ยวข้องในขั้นตอนการเกิดอนุมูลไฮดรอกซิล ($\cdot\text{OH}$) เข้ามารวมไว้ในโครงสร้างให้อยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อน โลหะจึงไม่สามารถทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระได้

3.3 สารที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก

ตัวอย่างเช่น วิตามินซี (Ascorbic acid) กลูตาไทโอน (Glutathione) กรดยูริก (Uric acid) วิตามินอี (Tocopherol) แครอทีนอยด์ (Carotenoid) และสารประกอบฟีนอลิก เป็นต้น สารต้านออกซิเดชันในกลุ่มนี้จะหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูล เช่น วิตามินอี ทำปฏิกิริยาขจัดอนุมูลลิพิดเพอร์ออกไซด์และได้เป็นอนุมูลวิตามินอี ($\text{E-O}^\cdot$) ซึ่งอนุมูลวิตามินอีนี้เป็นอนุมูลที่มีความไวต่ำทำให้ไม่สามารถเกิด Lipid peroxidation ต่อไปได้

3.4 สอร์โมน

สอร์โมนบางชนิด เช่น เอสโตรเจน (Estrogen) แอนจิโอเทนซิน (Angiotensin) และ เมลาโทนิน (Melatonin) เป็นต้น

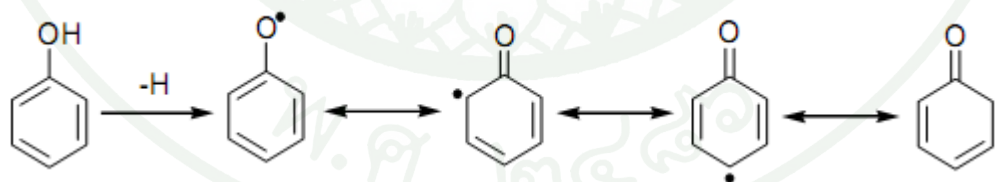
ในปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกและความสามารถต้านออกซิเดชันของลูกหม่อน เนื่องจากมีรายงานว่าลูกหม่อนมีสมบัติในการป้องกันการเกิดโรคเบาหวาน (Antidiabetic) ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Antioxidative) ป้องกันการอักเสบ (Anti-inflammatory) ดังที่กล่าวไปข้างต้น ในปี 2006 Oki *et al.* ศึกษาการเปลี่ยนแปลงสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและองค์ประกอบของลูกหม่อนสายพันธุ์ต่างๆ ในประเทศญี่ปุ่นในระหว่างการเจริญเติบโต พบว่าลูกหม่อนทั้ง 8 สายพันธุ์มีกรดฟีนอลิกและแอนโธไซยานินส์เป็นองค์ประกอบ และสามารถแสดงสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยมีสมบัติการต้านอนุมูลอิสระอยู่ระหว่าง 2.5-20.3 มิลลิโมลสมมูลของ Trolox ต่อกรัมของน้ำหนักรีด อีกทั้ง Bea and Suh (2007) รายงานว่าลูกหม่อน (*Morus alba* L.) ในประเทศเกาหลีสามารถแสดงสมบัติการต้านออกซิเดชันไม่ว่าจะเป็นสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ DPPH สมบัติการต้านอนุมูลไฮดรอกซิล สมบัติการต้านอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน และความสามารถในการรีดิวซ์ เป็นต้น ซึ่งสมบัติการต้านออกซิเดชันเหล่านี้เป็นผลมาจากสารประกอบฟีนอลิกที่มีในลูกหม่อน อีกทั้งในปีเดียวกัน Ercisli and Orhan ศึกษาสารประกอบฟีนอลิกของลูกหม่อน 3 Species ได้แก่ White mulberry (*Morus alba*) Red mulberry (*Morus rubra*) และ Black mulberry (*Morus nigra*) พบว่า Black mulberry มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดมากที่สุด โดยมีปริมาณเท่ากับ 1,422 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อ 100 กรัม น้ำหนักรีด และ 276 มิลลิกรัมสมมูลของเคอซิทินต่อ 100 กรัม น้ำหนักรีด และ Lin and Tang (2007) รายงานว่าลูกหม่อนมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับ สตรอเบอร์รี่ พลัม พริกไทย (เขียว เหลือง และแดง) ผักขม หอมหัวใหญ่ เมล่อน และบัตร์ท โดยปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ $1,515 \pm 5.7$ มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อ 100 กรัม น้ำหนักรีด และมีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเท่ากับ 250.1 ± 6.3 มิลลิกรัมสมมูลของเคอซิทินต่อ 100 กรัม น้ำหนักรีด

ความสามารถต้านออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลิก

สารประกอบฟีนอลิกในผักและผลไม้มีประโยชน์ต่อสุขภาพสามารถป้องกันการเกิดโรคเรื้อรังต่างๆ ได้ เช่น โรคหัวใจ และ โรคมะเร็ง เป็นต้น ด้านการอักเสบ ด้านการแพ้ และมีคุณสมบัติในการละลายลิ่มเลือด รวมไปถึงการเป็นสารต้านการก่อมะเร็ง และสามารถลดความดันโลหิตจากฤทธิ์ขยายหลอดเลือด เป็นต้น (โอภา และคณะ, 2549) เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกมีความสามารถต้านออกซิเดชันได้ Green (2007) กล่าวว่าความสามารถต้านออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลิกมีกลไกการเกิดปฏิกิริยาอยู่ 3 กลไก ดังนี้

1. ความสามารถในการจับกับอนุมูลอิสระ (Scavenging free radical)

สารที่สามารถจับกับอนุมูลอิสระได้คือสารที่สามารถให้อิเล็กตรอนหรือไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูลอิสระ เพื่อยับยั้งไม่ให้อนุมูลอิสระเกิดปฏิกิริยาต่อได้ ความสามารถในการจับกับอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิกเกี่ยวกับการที่สารประกอบฟีนอลิกสามารถให้ไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระ แล้วสารประกอบฟีนอลิกก็จะเปลี่ยนไปเป็นอนุมูลฟีนอล (Phenol radicals) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่มีความคงตัวเนื่องจากอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวจะเกิด Resonance-stabilized delocalization ภายในวงอะโรมาติก (ภาพที่ 19) ดังนั้นอนุมูลฟีนอลจึงเกิดปฏิกิริยาต่อได้ยาก เป็นการชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน



ภาพที่ 19 การเกิด Delocalization ของอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวของอนุมูลฟีนอล

ที่มา : Green (2007)

2. ความสามารถในการจับกับโลหะ (Chelating transition-metals)

สารประกอบฟีนอลิกสามารถจับกับโลหะ ซึ่งโลหะเป็นตัวเร่งให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยกรดฟีนอลิกและ ฟลาโวนอยด์สามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับเหล็ก (Iron) และคอปเปอร์ไอออน (Copper iron) ได้

3. ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เป็นตัวเร่งให้เกิดอนุมูลอิสระ

สารประกอบฟีนอลิกสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดอนุมูลอิสระได้ เช่น ไนตริกออกไซด์ซินเทส (Nitric oxide synthase) ไทโรซีนไคเนส (Tyrosine kinase) และแซนทีนออกซิเดส (Xanthine oxidase)

ปัจจัยที่มีผลต่อความคงตัวของแอนโทไซยานินส์

1. อุณหภูมิ (Temperature)

แอนโทไซยานินส์สามารถถูกทำลายได้ด้วยความร้อนในระหว่างกระบวนการผลิตและในระหว่างการเก็บอาหาร Markakis (1982) รายงานว่าเมื่อให้ความร้อนแก่สตรอเบอร์รี่ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงทำให้แอนโทไซยานินส์ในสตรอเบอร์รี่เกิดการเสื่อมสลายไป 50% และมีค่าครึ่งชีวิตที่ 1 ชั่วโมง และ Kirca and Cemeroglu (2003) ศึกษาความคงตัวของแอนโทไซยานินส์ของ Blood orange ที่อุณหภูมิ 70 80 และ 90 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงขึ้น ความคงตัวของแอนโทไซยานินส์ลดลง และมีค่าครึ่งชีวิตลดลง อีกทั้งในปี 2007 Kirca *et al.* ศึกษาความคงตัวของแอนโทไซยานินส์ของแครอทม่วง (Black carrot) ในสารละลายซิเตรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ความเป็นกรดต่าง 2.5–7.0 โดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 80 และ 90 องศาเซลเซียส พบว่าความคงตัวของแอนโทไซยานินส์ที่ความเป็นกรดต่างกันลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น

2. ความเป็นกรด-ด่าง (pH)

แอนโธไซยานินส์มีความคงตัวในสารละลายที่เป็นกรดมากกว่าในสารละลายที่เป็นกลางหรือด่าง (Markakis, 1982) จากงานวิจัยของ Kirca *et al.* (2007) ที่ศึกษาความคงตัวของแอนโธไซยานินส์ของแครอทม่วงในสารละลายซิเตรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ความเป็นกรด-ด่าง 2.5–7.0 ที่อุณหภูมิต่างๆ กัน พบว่าความคงตัวของแอนโธไซยานินส์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อสารละลายซิเตรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์มีความเป็นกรด-ด่างมากกว่า 5.0 ในระหว่างที่ให้ความร้อน

3. แสง (Light)

แสงมีส่วนช่วยในการสังเคราะห์ (Biosynthesis) แอนโธไซยานินส์ แต่ก็สามารถเร่งให้เกิดการเสื่อมสลายของแอนโธไซยานินส์ได้ด้วย โดยมีรายงานว่าในแอปเปิลที่ยังไม่สุก เมื่ออยู่ในที่ที่มีแสงจะสุกและเปลี่ยนเป็นสีแดง แต่แอปเปิลที่อยู่ในที่ที่ไม่มีแสงยังคงมีสีเขียวอยู่ อีกทั้งยังมีรายงานว่าแสงเร่งให้เกิดการเสื่อมสลายของแอนโธไซยานินส์ที่สกัดจากกากองุ่นในเครื่องดื่มอัดลม (Markakis, 1982)

4. เอนไซม์ (Enzyme)

เอนไซม์สามารถทำให้สีของแอนโธไซยานินส์ซีดจางลงได้ โดยมีรายงานว่าเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส (Polyphenoloxidase หรือ PPO) สามารถเร่งการเสื่อมสลายของแอนโธไซยานินส์ได้ แต่ถึงแม้ว่าโพลีฟีนอลออกซิเดสจะไม่สามารถทำปฏิกิริยากับแอนโธไซยานินส์ได้โดยตรง โดยทั่วไปแล้วโพลีฟีนอลออกซิเดสสามารถทำปฏิกิริยากับสารประกอบฟีนอลิกชนิดอื่นได้ดีกว่า โดย Fang *et al.* (2007) กล่าวว่าเมื่อโพลีฟีนอลออกซิเดสทำปฏิกิริยากับคาเทคิน (Catechin) ทำให้สูญเสียแอนโธไซยานินส์ในสตรอเบอร์รี่ไปถึง 50-60% ที่อุณหภูมิห้อง

5. ปฏิกิริยาคอนเดนเซชัน (Condensation)

แอนโธไซยานินส์สามารถรวมตัวกันเองหรือรวมตัวกับสารประกอบอินทรีย์ตัวอื่นได้ เช่น กรดอะมิโนบางชนิด Phloroglucinol catechin และ Nucleophile นอกจากนี้แอนโธไซยานินส์ยัง

สามารถรวมตัวกับ Flavylum salt ได้เป็นสารประกอบที่ไม่มีสี ซึ่งสารประกอบที่เกิดขึ้นสามารถเกิดปฏิกิริยา และเกิดการเปลี่ยนแปลงต่อไปได้ (Markakis, 1982)

6. ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (Sulfer dioxide)

สีของแอนโทไซยานินส์สามารถเกิดการซีดจางได้โดยซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ซึ่งมักพบในโรงงานอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับผลไม้ โดยซัลเฟอร์ไดออกไซด์ทำปฏิกิริยากับแอนโทไซยานินส์เกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่ไม่มีสี การซีดจางของสีนี้สามารถผันกลับหรือไม่ผันกลับก็ได้ (Markakis, 1982)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. วัตถุดิบ

กากลูกหม่อนเป็นวัสดุเศษเหลือที่ได้จากกระบวนการผลิตน้ำลูกหม่อนพร้อมดื่ม 100% ของบริษัท จุลไหมไทย จำกัด จังหวัดเพชรบูรณ์ โดยหลังจากการผลิตน้ำหม่อนกากลูกหม่อนจะถูกบรรจุในถุงพลาสติกขนาด 10 กิโลกรัม แช่ในถังน้ำแข็ง และขนส่งมายังจังหวัดกรุงเทพโดยรถบรรทุกที่มีตู้ควบคุมอุณหภูมิ ใช้ระยะเวลาการเดินทางประมาณ 6 ชั่วโมง เมื่อได้รับตัวอย่างกากลูกหม่อนจะถูกแบ่งเก็บใส่ถุงพลาสติก ถุงละ 1 กิโลกรัม เก็บในตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส เพื่อการวิเคราะห์ต่อไป

2. สารเคมี

2.1 กรดแกลลิก (Gallic acid; $(\text{HO})_3\text{C}_6\text{H}_2\text{CO}_2\text{H}$: Analytical grade, Sigma-Aldrich, St. Louise, U.S.A.)

2.2 คาเทคินไฮเดรต (Catechin hydrate; $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6 \cdot x\text{H}_2\text{O}$: Analytical grade, Sigma-Aldrich, St. Louise, U.S.A.)

2.3 ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ (Cyanidin-3-glucoside chloride; $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{O}_{11}\text{Cl}$, HPLC: Extrasynthese, Genay Cedex, France)

2.4 ไซยานิดิน-3-รูทีโนไซด์ คลอไรด์ (Cyanidin-3-rutinoside chloride; $\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{O}_{15}\text{Cl}$, HPLC: Extrasynthese, Genay Cedex, France)

2.5 เควอซีทิน-3-รูทีโนไซด์ หรือ รุทีน (Quercetin-3-rutinoside หรือ Rutin; $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$, HPLC: Extrasynthese, Genay Cedex, France)

2.6 กรดคลอโรจีนิก (Chlorogenic acid; $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$, Analytical grade, Sigma-Aldrich, St. Louise, U.S.A.)

2.7 โฟลิน-ซีโอคาเทอ (Folin-ciocalteu reagent; Analytical grade, Sigma-Aldrich, St. Louise, U.S.A.)

2.8 โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate; Na_2CO_3 ; Analytical grade, Ajax Finechem, Auckland, New Zealand)

2.9 โพแทสเซียม ได-ไฮโดรเจน ฟอสเฟต (Potassium di-hydrogen phosphate; KH_2PO_4 ; Analytical grade, Ajax Finechem, Auckland, New Zealand)

2.10 ได-โพแทสเซียม ไฮโดรเจน ฟอสเฟต (Di-potassium hydrogen phosphate; K_2HPO_4 ; Ajax Finechem, Auckland, New Zealand)

2.11 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide; NaOH ; Analytical grade, Merck, Darmstadt, Germany)

2.12 กรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid; $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$; food grade, ห้างหุ้นส่วนจำกัดแซทเทอร์นเคมีคอล, กรุงเทพฯ, ประเทศไทย)

2.13 กรดไฮโดรคลอริก 37% (37% Hydrochloric acid; HCl ; Analytical grade, Merck, Darmstadt, Germany)

2.14 อะซีโตรไนไทรล์ (Acetonitrile; CH_3CN ; HPLC grade, Mallinckrodt Baker Inc., Phillipsburg, NJ, U.S.A.)

2.15 เมทานอล (Methanol; CH_3OH ; Analytical grade, Mallinckrodt Baker Inc., Phillipsburg, NJ, U.S.A.)

2.16 เมทานอล (Methanol; CH_3OH ; HPLC grade, Mallinckrodt Baker Inc., Phillipsburg, NJ, U.S.A.)

2.17 เอทานอล (Ethanol; $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$; Analytical grade, Merck, Darmstadt, Germany)

2.18 2, 2'-อะโซบิส (2-อะมิโนโพรเพน) ไฮโดรคลอริก; (2, 2'-azobis-(2-amidinopropane) HCl ; AAPH, Aldrich, Steinheim, Germany)

2.19 2, 2'-อะซิโน-บิส (3-เอทิลเบนโซไทอะโซลิน-6-ซัลโฟนิค แอซิด); (2, 2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt); ABTS, Aldrich, Steinheim, Germany)

2.20 2, 2'-ไดฟีนิล-1-ไพคริล-ไฮดราซิล; (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (DPPH, Aldrich, Steinheim, Germany)

2.21 โพแทสเซียมคลอไรด์ (Potassium chloride; KCl ; Analytical grade, Merck, Darmstadt, Germany)

2.22 โซเดียมอะซิเตท (Sodium acetate; $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; Analytical grade, Ajax Finechem, Auckland, New Zealand)

- 2.23 กรดอะซิติก (Acetic acid; CH_3COOH : Analytical grade, Merck, Darmstadt, Germany)
- 2.24 กรดซัลฟิวริก (Sulfuric acid; H_2SO_4 : Analytical grade, J.T. Baker, U.S.A.)
- 2.25 กรดบอริก (Boric acid; H_3BO_3 : Analytical grade, Merck, Darmstadt, Germany)
- 2.26 คอปเปอร์ซัลเฟต (Copper(II)sulphate; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: Analytical grade, Ajax Finechem, Auckland, New Zealand)
- 2.27 โพแทสเซียมซัลเฟต (Potassium sulphate; K_2SO_4 : Analytical grade, Ajax Finechem, Auckland, New Zealand)
- 2.28 โบรโมครีซอลกรีน (Bromocresol green; $\text{C}_{21}\text{H}_{14}\text{Br}_4\text{O}_5\text{S}$, Ajax Finechem, Auckland, New Zealand)
- 2.29 ปีโตรเลียมอีเทอร์ (Petroleum ether: Analytical grade, J.T. Baker, Pennsylvania, U.S.A.)
- 2.30 อะซิโตน (Acetone; CH_3COCH_3 : Analytical grade, Fisher Scientific, Leicestershire, UK)
- 2.31 โซเดียมไนไตรต์ (Sodium nitrite; NaNO_2 : Analytical grade: Ajax Finechem, Auckland, New Zealand)
- 2.32 อะลูมิเนียมคลอไรด์ (Aluminium chloride; $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: Analytical grade, Ajax Finechem, Auckland, New Zealand)
- 2.33 ฟลูออเรสซีน (Fluorescein sodium salt; $\text{C}_{20}\text{H}_{10}\text{Na}_2\text{O}_5$: Analytical grade, Sigma Aldrich, Steinheim, Germany)
- 2.34 6-ไฮดรอกซี-2,5,7,8-เตตระเมทิลโครแมน-2-คาร์บอกซิลิก แอซิด 97%; (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid 97%; $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_4$: Trolox, Aldrich, Steinheim, Germany)
- 2.35 เบตาไซโคลเดกสทริน ผ่านการเติมเมทิลอย่างสุ่ม (Randomly Methylated B-Cyclodextrin; RMCD: Trappsol, Technical grade, CTD Inc., Florida, U.S.A.)
- 2.36 เฮกเซน (Hexane; C_6H_{12} : Analytical grade, J.T. Baker, Pennsylvania, U.S.A.)

3. อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 3.1 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer: model spectronic genesys 10 UV scanning thermo electron corporation, Florida, U.S.A.)
- 3.2 เครื่องเหวี่ยงแยก (Centrifuge: Sorvall RC 5C plus superspeed centrifuge, Minnesota, U.S.A.)
- 3.3 เครื่องสั่นสะเทือนด้วยคลื่นเสียง (Sonicator: Bandelin sonorex, model RK 52, Berlin, Germany)
- 3.4 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter: Orion 2 star, Beverly, Massachusetts, USA.)
- 3.5 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath: model WB 7/14/22/29/45, Memmert, Schwach, Germany)
- 3.6 เครื่องปั่นเป็นเนื้อเดียวกัน (Homogenizer: T10 basic, Australia)
- 3.7 เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer: genie II, U.S.A.)
- 3.8 ตู้แช่เยือกแข็ง (Freezer: SF-C995 (GYN), Sanyo, กรุงเทพฯ, ประเทศไทย)
- 3.9 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatograph: Waters, Mailford, Massachusetts, U.S.A.)
- 3.10 เครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ (Mass spectrometer: Amazon X, Bruker, U.S.A.)
- 3.11 เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze dryer: Heto model FD 2.5, Heto lab equipment A/S, Allerod, Denmark)
- 3.12 เครื่องทำแห้งแบบถาด (Tray dryer: Reliance thermo-engineering, กรุงเทพฯ, ประเทศไทย)
- 3.13 เครื่องวัดแสงฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorometer: FLUOstar OPTIMA, BMG, U.S.A.)
- 3.14 ครุชชีเบลหาปริมาณแก้ว (Crucible)
- 3.15 เตาเผาความร้อนสูง (Muffle furnace: Size 3, Gallenkamp, U.K.)
- 3.16 ตู้ดูดความชื้น (Dessicator)
- 3.17 ชุดวิเคราะห์ไขมัน (Soxhlet extractor: Electrothermal ME, England)
- 3.18 ชุดวิเคราะห์โปรตีน (Buchi: k-435, B414 และ B-324, Switzerland)
- 3.19 ครุชชีเบลแก้วหาเชื้อไข (Robu-Glas filter: ROBU, Germany)

3.20 ชุดวิเคราะห์ไฟเบอร์ (Fibertec system M: model 1020 hot extractor, Foss, กรุงเทพฯ, ประเทศไทย)

3.21 เครื่องระเหยแบบหมุน (Rotary evaporator: Buchi rotavapor R-114, Germany)

3.22 เครื่องผลิตน้ำ deionized (DI) (DI water generator: model simpakorl, Millipore, U.S.A.)

3.23 ชุดกรอง mobile phase HPLC

3.24 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (Balance 2 decimal: model TP2KS, OHAUS, U.S.A)

3.25 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Balance 4 decimal model ED2248, Series Extend, Satorius, Germany)

3.26 ชุดเครื่องแก้วมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์

วิธีการ

1. การศึกษาวิธีการทำแห้งตัวอย่างกากลูกหม่อนเหลือทิ้งจากกระบวนการคั้นน้ำ ด้วยวิธีทำแห้งด้วยลมร้อน (Tray dry) และ วิธีทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dry)

กากลูกหม่อนเป็นวัสดุเศษเหลือที่ได้จากกระบวนการผลิตน้ำลูกหม่อนพร้อมดื่ม 100% ของบริษัท จุลไหมไทย จำกัด นำกากลูกหม่อนไปทำแห้งด้วยวิธีทำแห้งด้วยลมร้อน (Tray dryer: Reliance thermo-engineering, กรุงเทพฯ, ประเทศไทย) โดยใช้สภาวะการทำแห้งด้วยลมร้อนที่ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ วิธีทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งด้วยเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze dryer: Heto model FD 2.5, Heto lab equipment A/S, Allerod, Denmark) ที่ อุณหภูมิ -45 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะสุญญากาศที่ความดันน้อยกว่า 86×10^{-3} mbar นาน 72 ชั่วโมง และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส

1.1 การสกัดตัวอย่าง

สกัดกากลูกหม่อนแห้งโดยใช้วิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Kim *et al.* (2002) และ Rodriguez-Saona and Wrolstad (2005) โดยนำตัวอย่างกากลูกหม่อนแห้ง 1 กรัมใส่ในหลอดสำหรับหมุนเหวี่ยง เติมน้ำกลั่นละลายเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 50 ที่มีส่วนผสมของกรดไฮโดรคลอริก

ร้อยละ 0.01 ปริมาตร 12 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นสะท้อนด้วยเครื่องปั่นสะท้อนด้วยคลื่นเสียง (Bandelin sonorex, model RK 52, Berlin, Germany) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงโดยเครื่องเหวี่ยงแยก (Sorvall RC 5C plus superspeed centrifuge, Minnesota, U.S.A.) ด้วยความเร็วรอบ 11,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แยกส่วนใสให้ขาดปรับปริมาตร นำส่วนกากที่เหลือไปสกัดซ้ำอีก 1 ครั้ง แยกส่วนใสและนำไปรวมกับส่วนใสที่ได้จากการสกัดครั้งแรก แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 25 มิลลิลิตร สกัดตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

1.2 การวิเคราะห์ปริมาณกลุ่มสาร (Proximate analysis)

วิเคราะห์ความชื้น เถ้า โปรตีน ไขมัน และเยื่อใยหยาบของตัวอย่างกากลูกหม่อนทำแห้งด้วยวิธีทำแห้งด้วยลมร้อน และวิธีทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (ข้อ 1) ตามวิธีของ AOAC (2002) ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดคำนวณจาก 100% ลบด้วยปริมาณความชื้น เถ้า ไขมัน โปรตีน และเยื่อใยหยาบ

1.2.1 การวิเคราะห์ความชื้น

นำกากลูกหม่อนน้ำหนัก 2 กรัม ในถ้วยอะลูมิเนียมที่มีฝาปิด อบตัวอย่างในถ้วยอะลูมิเนียมให้แห้งในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 102 ± 3 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ปิดฝาแล้วนำภาชนะออกจากตู้อบไฟฟ้า ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์จนถึงอุณหภูมิห้อง ชั่งน้ำหนัก นำไปอบซ้ำอีกครั้งละ 30 นาที จนได้น้ำหนักคงที่

1.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า

นำกากลูกหม่อนน้ำหนัก 5 กรัม ชั่งในถ้วยกระเบื้องเคลือบที่เผาและทราบน้ำหนักที่แน่นอน นำไปเผาด้วยไฟอ่อนๆจนหมดควัน แล้วนำมาเผาในเตาเผาไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 550 ± 20 องศาเซลเซียส นานประมาณ 2-3 ชั่วโมง จนกระทั่งได้เถ้าสีขาวหรือสีเทา นำออกมาใส่ในเดซิเคเตอร์ ทิ้งไว้ให้เย็นในอุณหภูมิห้อง แล้วนำไปชั่ง เเผตัวอย่างซ้ำนานครั้งละ 30 นาที จนได้น้ำหนักต่างกันไม่เกิน 1 มิลลิกรัม และคำนวณได้จากสมการที่ 18

$$\text{ปริมาณเถ้าร้อยละของตัวอย่าง} = 100(W_2 - W) / (W_1 - W) \quad (18)$$

เมื่อ W คือ น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเคลือบเป็นกรัม

W_1 คือ น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเคลือบและตัวอย่างก่อนเผาเป็นกรัม

W_2 คือ น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเคลือบและตัวอย่างหลังจากเผาจนได้น้ำหนักคงที่เป็นกรัม

1.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีเคลดาล

นำกากลูกหม่อนน้ำหนัก 1 กรัม เดิมคอปเปอร์ซัลเฟต 0.5 กรัม โพแทสเซียมซัลเฟต 7 กรัม และ Glass bead 2 เม็ดลงในหลอดย่อย เดิมกรดซัลฟิวริก 12 มิลลิลิตร และต่อชุดย่อยเข้ากับชุดจับไอกรด ตั้งอุณหภูมิที่ 420 องศาเซลเซียส ย่อยจนได้สารละลายใส จากนั้นเติมน้ำกลั่น 75 มิลลิลิตร แล้วนำไปเข้าเครื่องกลั่นด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 40 รองรับสิ่งกลั่นด้วย สารละลายกรดบอริกเข้มข้นร้อยละ 4 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร และเติมอินดิเคเตอร์ (เมทิล เรด ผสมกับโบรโมคริสซัล กรีน) 2-3 หยด จากนั้นไทเทรตสารละลายที่กลั่นได้กับสารละลายมาตรฐาน กรดไฮโดรคลอริก 0.1 นอร์แมล จนได้สีเทา นำปริมาตรกรดที่ใช้ไปคำนวณปริมาณโปรตีนดังสมการที่ 19

$$\% \text{ไนโตรเจน} = \frac{(T-B) * 14.007 * 100 * N}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}} \quad (19)$$

เมื่อ % โปรตีน = %ไนโตรเจน * 6.25 * 5.7

T คือ ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไทเทรตกับตัวอย่าง เป็น มิลลิลิตร

B คือ ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไทเทรตกับ Blank เป็นมิลลิลิตร

N คือ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานไฮโดรคลอริก เป็นนอร์แมล

1.2.4 การวิเคราะห์ปริมาณไขมันโดยใช้เครื่อง Soxhlet

สกัดกากลูกหม่อนแห้งที่บดละเอียดแล้วน้ำหนัก 3 กรัม โดยใช้ปิโตรเลียมอีเทอร์ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องวิเคราะห์ไขมัน (Soxhlet extractor: Electrothermal ME, England) โดยให้ความร้อนเป็นเวลา 20 นาที และระเหยปิโตรเลียมอีเทอร์ออก อบตัวอย่างน้ำมันให้แห้งในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ ระหว่าง 100-102 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำมาทำให้เย็นในเดซิเคเตอร์ แล้วชั่งน้ำหนัก ทำซ้ำโดยอบนานครั้งละ 30 นาที จนกระทั่งผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งได้สองครั้งติดต่อกันต่างกันไม่เกิน 1 มิลลิกรัม คำนวณโดยใช้สมการที่ 20 เก็บตัวอย่างที่ได้ไว้สำหรับวิเคราะห์เชื้อใยหยาบ

$$\text{ปริมาณน้ำมันร้อยละของตัวอย่าง} = 100(W_1 - W_2) / W \quad (20)$$

เมื่อ W คือ น้ำหนักของตัวอย่างที่ทำแห้งแล้วเป็นกรัม

W_1 คือ น้ำหนักของขวดแก้วและน้ำมันที่สกัดได้ ซึ่งทำแห้งแล้วเป็นกรัม

W_2 คือ น้ำหนักขวดแก้วเป็นกรัม

1.2.5 การวิเคราะห์ปริมาณเชื้อใยหยาบ

ใช้หลักการย่อยตัวอย่างที่กำลังไขมันออกแล้วด้วยสารละลายกรดและเบส ภายใต้สภาวะที่กำหนด สารอินทรีย์ที่เหลือคือ เชื้อใยหยาบซึ่งร่างกายย่อยไม่ได้ นำกากลูกหม่อนน้ำหนัก 2.5 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ เติมกรดซัลฟิวริก 0.255 นอร์แมล ซึ่งต้มเดือดลงไป 200 มิลลิลิตร นำไปเข้าเครื่องย่อยโดยใช้กระจกนาฬิกาปิดบนบีกเกอร์ และต้มให้เดือดต่อไปอีกนาน 30 นาที กรองทันทีด้วยผ้ากรอง ล้างด้วยน้ำร้อนจนหมดกรด โดยทดสอบด้วยกระดาษลิตมัส ถ่ายกากบนผ้ากรองลงในบีกเกอร์เดิมจนหมดด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.313 นอร์แมล ซึ่งต้มเดือดจำนวน 200 มิลลิลิตร และต้มให้เดือดต่อไป อีกนาน 30 นาที กรองผ่านครุชชีเบลด้วยน้ำร้อนจนหมดเบส แล้วล้างด้วยแอลกอฮอล์ 10 มิลลิลิตร ถ่ายกากลงในครุชชีเบล นำไปอบให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 105-110 องศาเซลเซียส นานประมาณ 2 ชั่วโมง แล้วนำออกมาใส่ในเดซิเคเตอร์ ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำไปชั่ง อบตัวอย่างนี้ซ้ำนานครั้งละ 30 นาที จนได้น้ำหนักคงที่ จากนั้นเผาครุชชีเบลพร้อมด้วยกากที่อบแห้งแล้วในเตาเผาที่อุณหภูมิ 600 ± 20 องศาเซลเซียส นานประมาณ 30

นาที่ แล้วนำออกมาใส่ในเคซิเตอร์ ทิ้งไว้ให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้อง นำไปชั่งแล้วเผาซ้ำนานครั้งละ 30 นาที จนได้น้ำหนักคงที่ และคำนวณหริมาณเยื่อใยหยาบ ดังสมการที่ 21

$$\text{ปริมาณเยื่อใยหยาบร้อยละของตัวอย่าง} = 100(W_1 - W_2) / W \quad (21)$$

เมื่อ W คือ น้ำหนักของตัวอย่างเป็นกรัม

W_1 คือ น้ำหนักของครุชิลและกากหลังจากอบแห้งแล้วเป็นกรัม

W_2 คือ น้ำหนักของครุชิลและเถ้าหลังจากเผาแล้วเป็นกรัม

1.3 การตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี

1.3.1 วัดปริมาณแอนโทไซยานินส์ทั้งหมด (Total monomeric anthocyanins content)

ตรวจสอบปริมาณแอนโทไซยานินส์ทั้งหมดโดยวิธี pH-differential (Giusti and Wrolstad, 2005) หาค่า Dilution factor (DF) โดยการเจือจางสารสกัดที่ได้จากการสกัดข้อ 1.1 ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์โพแทสเซียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.025 โมลาร์และความเป็นกรด-ด่าง 1.0 (pH 1.0) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Model spectronic genesys 10 UV scanning thermo electron corporation, U.S.A.) โดยให้ค่าที่ได้อยู่ในช่วง 0.2-0.8

จากนั้นจึงนำสารสกัดมาเจือจางด้วย DF ที่ได้ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์โพแทสเซียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.025 โมลาร์และความเป็นกรด-ด่าง 1.0 (pH 1.0) และสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตตที่มีความเข้มข้น 0.4 โมลาร์และความเป็นกรด-ด่าง 4.5 (pH 4.5) และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 ($A_{510\text{ nm}}$) และ 700 นาโนเมตร ($A_{700\text{ nm}}$) โดยใช้น้ำกลั่นเป็นสารละลายไร้สิ่งตัวอย่าง (blank) วัดค่าสารสกัดละ 3 ครั้ง จากนั้นจึงคำนวณค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง (A) (สมการที่ 22) แล้วนำค่าดังกล่าวไปคำนวณเป็นปริมาณแอนโทไซยานินส์ทั้งหมดในตัวอย่างเริ่มต้น (สมการที่ 23)

$$A = (A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}1.0} - (A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}4.5} \quad (22)$$

$$\text{ปริมาณแอนโธไซยานินทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อลิตร)} = (A \times \text{MW} \times \text{DF} \times 1000) / (\epsilon \times 1) \quad (23)$$

เมื่อ MW = มวลโมเลกุลของไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ = 449.2

DF (Dilution factor) = อัตราส่วนของปริมาตรสุดท้ายของสารละลาย

ตัวอย่างเจือจางกับปริมาตรเริ่มต้นของตัวอย่าง

ϵ (Molar absorptivity) ของไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ = 26900

1.3.2 การตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content)

ตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดโดยวิธี Folin-ciocalteu

ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Kim and Lee (2002) โดยดูดสารสกัดข้อ 1.1 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมฟอลิน-ซีโอเคาตู 0.1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้นาน 6 นาที เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตร้อยละ 7 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 90 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Model spectronic genesys 10 UV scanning thermo electron corporation, U.S.A.) วัดค่าสารสกัดละ 3 ครั้ง นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกความเข้มข้น 20-100 ppm (ภาพผนวกที่ 1) รายงานผลเป็นปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง)

1.3.3 การตรวจสอบปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total flavonoid content)

ตรวจสอบปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดโดยวิธีซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ

Kim *et al.* (2003) โดยดูดสารสกัดข้อ 1.1 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมไนไตรท์ ร้อยละ 5 ปริมาตร 0.15 มิลลิลิตร ทิ้งไว้นาน 5 นาที เติมสารละลายอลูมิเนียมคลอไรด์ร้อยละ 10 ปริมาตร 0.15 มิลลิลิตร ทิ้งไว้นาน 6 นาที เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 1.2 มิลลิลิตร นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Model spectronic genesys 10 UV scanning thermo electron corporation, U.S.A.) วัดค่าสารสกัดละ 3 ครั้ง

นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของคาเท킨 ความเข้มข้น 50-250 ppm (ภาพผนวกที่ 2) รายงานผลเป็นปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (มิลลิกรัมสมมูลของคาเท킨ต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง)

1.3.4 การตรวจสอบความสามารถต้านอนุมูลอิสระ 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (DPPH radical scavenging capacity)

ตรวจสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Singh *et al.* (2002) โดยนำสารสกัด ข้อ 1.1 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่า และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานของวิตามินซีความเข้มข้น 20-100 ppm (ภาพผนวกที่ 3) รายงานผลเป็นสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (มิลลิกรัมสมมูลของวิตามินซีต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง)

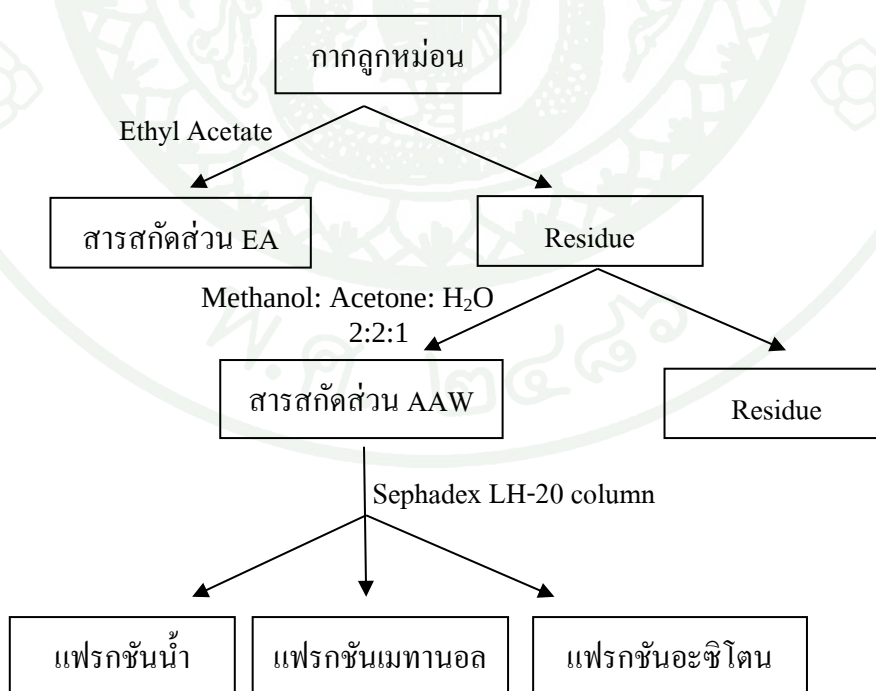
1.3.5 การตรวจสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ 2, 2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6- sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) (ABTS radical scavenging capacity)

ตรวจสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ดัดแปลงจากวิธีของ Kim *et al.* (2002) โดยนำขวดของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer solution: PBS) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ไปวางในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จากนั้นเติม 1.0 มิลลิโมลาร์ AAPH และ 2.5 มิลลิโมลาร์ ABTS (27.117 มิลลิกรัม AAPH + 137.175 มิลลิกรัม ABTS)/100 มิลลิลิตร PBS = Radical solution) ลงไป ให้ความร้อนอย่างน้อย 20 นาที โดยเขย่าทุก 5 นาที และตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที กรองสารละลาย (radical) โดย GHP Acrodisc® 25 mm syringe filter with 0.45 μ m GHP membrane เจือจางสารละลายที่ได้ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จนกระทั่งได้ค่าการดูดกลืนแสง 0.650 ± 0.020 นาโนเมตร บ่มสารละลายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งวัด ผสมตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร และ Radical solution 4.90 มิลลิลิตร และนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานของวิตามินซี ความเข้มข้น 20-100 ppm (ภาพผนวกที่ 4) รายงานผลเป็นสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ABTS (มิลลิกรัมสมมูลของวิตามินซี/100 กรัมน้ำหนักแห้ง)

2. การระบุชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกหลักในกากลูกหม่อน

2.1 การสกัดแยกส่วน (Fractionate) ของกากลูกหม่อนแห้ง

นำกากลูกหม่อนแห้งที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งมาทำการสกัดส่วนที่เป็นไขมันออก คัดแปลงจาก Isabelle *et al.* (2008) โดยนำตัวอย่างกากลูกหม่อนแห้ง 10 กรัม ละลายในเอทิลอะซิเตต (EA) 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แยกส่วนใสออก และนำส่วนกากที่เหลือไปสกัดซ้ำอีก 1 ครั้ง แยกส่วนใสและนำไปรวมกับส่วนใสที่ได้จากการสกัดครั้งแรก นำกากที่เหลือสกัดด้วยสารละลายเมทานอล : อะซิโตน : น้ำ เท่ากับ 2 : 2 : 1 (AAW) 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แยกส่วนใสออก และนำส่วนกากที่เหลือไปสกัดซ้ำอีก 1 ครั้ง แยกส่วนใสและนำไปรวมกับส่วนใสที่ได้จากการสกัดครั้งแรก นำตัวอย่างสารสกัด AAW ที่ได้ นำมาแยกด้วยคอลัมน์ Sephadex LH-20 โดยใช้ตัวชะเป็นน้ำ เมทานอล และ อะซิโตน อย่างละ 200 มิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 20 โดยเก็บส่วนแยกย่อยแต่ละส่วนเพื่อนำไปศึกษาปริมาณแอนโทไซยานินส์ทั้งหมด ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และ ความสามารถต้านออกซิเดชันโดยวิธี ORAC



ภาพที่ 20 แผนภูมิการสกัดแยกส่วน

2.2 การตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี

2.2.1 วัดปริมาณแอนโทไซยานินส์ทั้งหมด (Total monomeric anthocyanins content)

ตรวจสอบปริมาณแอนโทไซยานินส์ทั้งหมดโดยวิธี pH-differential (Giusti and Wrolstad, 2005) หาค่า Dilution factor (DF) โดยการเจือจางตัวอย่างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ โพแทสเซียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.025 โมลาร์และความเป็นกรด-ด่าง 1.0 (pH 1.0) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ให้ค่าที่ได้อยู่ในช่วง 0.2-0.8

จากนั้นจึงนำตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร และสารละลายบัฟเฟอร์โพแทสเซียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.025 โมลาร์และความเป็นกรด-ด่าง 1.0 (pH 1.0) และสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตตที่มีความเข้มข้น 0.4 โมลาร์และความเป็นกรด-ด่าง 4.5 (pH 4.5) ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ใส่ลงในไมโครเพลตชนิด 96 หลุม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 ($A_{510\text{nm}}$) และ 700 นาโนเมตร ($A_{700\text{nm}}$) โดยใช้ น้ำกลั่นเป็นแบล็ก (blank) เมตร จากนั้นจึงคำนวณค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง (A) (สมการที่ 24) แล้วนำค่าดังกล่าวไปคำนวณเป็นปริมาณแอนโทไซยานินส์ทั้งหมดในตัวอย่างเริ่มต้น (สมการที่ 25)

$$A = (A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}1.0} - (A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}4.5} \quad (24)$$

$$\text{ปริมาณแอนโทไซยานินส์ทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อลิตร)} = (A \times \text{MW} \times \text{DF} \times 1000) / (\epsilon \times 1) \quad (25)$$

เมื่อ MW = มวลโมเลกุลของไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ = 449.2

DF (Dilution factor) = อัตราส่วนของปริมาตรสุดท้ายของสารละลายตัวอย่าง
เจือจางกับปริมาตรเริ่มต้นของตัวอย่าง

ϵ (Molar absorptivity) ของไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ = 26900

2.2.2 การตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content)

ตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดโดยวิธี Folin-ciocalteau ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Wu *et al.* (2004) และ Singleton *et al.* (1999) โดยนำตัวอย่าง ปริมาตร 20

ไมโครลิตร ลงในไมโครเพตชนิด 96 หลุม เติมโพลีน-ซีโอคาทุ 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 75 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก รายงานผลเป็นปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง)

2.2.3 การตรวจสอบปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total flavonoid content)

ตรวจสอบปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดโดยวิธีซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Wu *et al.* (2011a) และ Heimler *et al.* (2005) โดยนำตัวอย่าง ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในไมโครเพตชนิด 96 หลุม จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมไนไตรท์ร้อยละ 5 ปริมาตร 85 ไมโครลิตร ตั้งไว้นาน 5 นาที เติมสารละลายอลูมิเนียมคลอไรด์ร้อยละ 10 ปริมาตร 35 ไมโครลิตร ตั้งไว้นาน 1 นาที เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 60 ไมโครลิตร นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโต นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของคาเทชิน รายงานผลเป็นปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (มิลลิกรัมสมมูลของคาเทชินต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง)

2.2.4 การตรวจสอบความสามารถต้านออกซิเดชัน โดยวิธี Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay

ตรวจสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยวิธี Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay โดยใช้วิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Prior *et al.* (2005) นำตัวอย่างแห้ง 1 กรัมใส่ในหลอดสำหรับหมุนเหวี่ยง เติมหีสเซน 10 มิลลิเมตร นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 4,500 รอบต่อนาที นาน 15 นาที แล้วจึงแยกเอาส่วนของฮีสเซนออกมา นำส่วนกากไปสกัดอีกครั้งตั้งแต่ขั้นตอนการเติมหีสเซน แล้วจึงนำส่วนฮีสเซนที่ได้ทั้งสองส่วน มารวมกันได้เป็นสารสกัดส่วนที่ชอบไขมัน (Lipophilic) นำส่วนกากที่ได้หลังจากการแยกส่วนฮีสเซนออกมาแล้วระเหยด้วยแก๊สไนโตรเจนภายในตู้ความเย็นแห้ง เติมสารละลาย อะซิโตน : น้ำ : กรดอะซิติก เป็นอัตราส่วน 70 : 29.5 : 0.5 v/v/v ปริมาตร 10 มิลลิตร แล้วนำไปปั่นสะเทือนด้วยคลื่นเสียง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที โดยมีการกลับหลอดตัวอย่างเป็นครั้งคราว ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที และมีการกลับหลอดตัวอย่างเป็นครั้งคราวเช่นกัน นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 4,500

รอบก่อนที่ นาน 15 นาที แยกส่วนใส่ออกมาแล้วปรับปริมาตรด้วยสารละลาย อะซิโตน : น้ำ : กรดอะซิติก เป็นอัตราส่วน 70 : 29.5 : 0.5 v/v/v ให้เป็น 25 มิลลิลิตร ได้เป็นสารสกัดส่วนที่ชอบน้ำ (Hydrophilic)

2.2.4.1 การวิเคราะห์สารสกัดส่วนที่ชอบไขมัน (Lipophilic)

ระเหยเอทเธอร์ในสารสกัดส่วนไขมัน (Lipophilic) โดยใช้แก๊สไนโตรเจนจนแห้ง เติมอะซิโตน 250 ไมโครลิตร และสารละลาย RMCD ความเข้มข้นร้อยละ 7 (ละลาย RMCD ในสารละลายอะซิโตนเข้มข้นร้อยละ 50) ปริมาตร 750 ไมโครลิตร เขย่าจนตัวอย่างละลายหมด (หากต้องการเจือจางตัวอย่างให้เจือจางด้วยสารละลาย RMCD ความเข้มข้นร้อยละ 7) นำสารสกัด 20 ไมโครลิตร ใส่ใน Well plate เติมสารฟลูออเรสซิน 200 ไมโครลิตร โดยใช้สารละลายฟลูออเรสซินที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาทีแล้ว หลังจากนั้นนำ Well plate ไปใส่ในเครื่องวัดการดูดกลืนแสงฟลูออเรสเซนซ์ กำหนดให้ป้อนภายในเครื่องเติมสารละลาย AAPH ปริมาตร 75 ไมโครลิตร ลงในหลุมแล้วอ่านค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนส์ (Relative fluorescence intensity) ทันที โดยมีการตั้งค่าความยาวคลื่นที่ใช้กระตุ้น (Excitation wavelength) ที่ 480 นาโนเมตร และ Emission ที่ 520 นาโนเมตร อ่านค่าทุก 195 วินาที (Cycle time)

การวิเคราะห์ผลทำได้โดยคำนวณพื้นที่ใต้กราฟของสารสกัด จากสมการค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์กับเวลา ดังแสดงในสมการที่ 26 แล้วนำไปลบออกด้วยพื้นที่ใต้กราฟของ สารละลาย RMCD ความเข้มข้นร้อยละ 7 จากนั้นนำไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของ สารละลายมาตรฐานโทรล็อกซ์ (ภาพผนวกที่ 5) ความเข้มข้น 6.25-50 ไมโครโมลาร์

$$AUC = (0.5 + f_5/f_4 + f_6/f_4 + f_7/f_4 + \dots + f_i/f_4) \times CT \quad (26)$$

เมื่อ AUC = พื้นที่ใต้กราฟ (Area under curve)

f_4 = ค่าความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์เริ่มต้นโดยเริ่มอ่านที่รอบที่ 4 (Initial fluorescence reading at cycle 4)

f_i = ค่าความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์เมื่ออ่านที่รอบที่ i (Fluorescence reading at cycle i)

CT = เวลาที่ใช้ต่อรอบ มีหน่วยเป็นนาที (Cycle time)

2.2.4.2 การวิเคราะห์สารสกัดส่วนที่ชอบน้ำ (Hydrophilic)

ปิเปตสารสกัด 20 ไมโครลิตร ใส่ใน Well plate เติมสารละลายฟลูออเรสซิน 200 ไมโครลิตร โดยใช้สารละลายฟลูออเรสซินที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที หลังจากนั้นนำ Well plate ไปใส่ในเครื่องวัดการดูดกลืนแสงฟลูออเรสเซนซ์ กำหนดให้ป้อนภายในเครื่องเติมสารละลาย AAPH ปริมาตร 75 ไมโครลิตร ลงในหลุมแล้วทำการอ่านค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ (Relative fluorescence intensity) ทันที โดยมีการตั้งค่าความยาวคลื่นที่ใช้กระตุ้น (Excitation wavelength) ที่ 480 นาโนเมตร และ Emission ที่ 520 นาโนเมตร อ่านค่าทุก 195 วินาที (Cycle time)

การวิเคราะห์ผลทำได้โดยหาพื้นที่ใต้กราฟของการสกัด จากสมการระหว่างค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์กับเวลา (สมการที่ 26) แล้วนำไปลบออกด้วยพื้นที่ใต้กราฟของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 แล้วจึงนำค่าไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน ไทรล็อกซ์ความเข้มข้น 6.25-50 ไมโครโมลาร์ (ภาพผนวกที่ 5) ค่าที่ได้คำนวณแสดงเป็นปริมาณของไมโครโมลไทรล็อกซ์ต่อ 100 กรัมเนื้อหนักแห้ง

2.3 การตรวจสอบชนิดและวิเคราะห์ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกโดยเทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC)

วิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิก โดยใช้วิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Isabelle *et al.* (2008) โดยใช้ HPLC (Waters, Mailford, MA, USA) ระบบประกอบด้วย Waters 600 pumps (Waters, Mailford, Massachusetts, USA) Waters 996 UV diode-array detector และ Waters 717 plus auto sampler ฉีดสารละลายตัวอย่างสารสกัดจากลูกหม่อน ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เข้าสู่คอลัมน์ชนิด C18 (Symmetry®, 4.6 mm x 250 mm) (Waters, Mailford, MA, USA) โดยมีวัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile phase) เป็นน้ำปราศจากไอออน (DI water) ที่มีส่วนผสมของ กรดอะซิติก (Acetic acid) ร้อยละ 0.1 และ Acetonitrile ทั้ง 2 วัฏภาคเคลื่อนที่ (วัฏภาคเคลื่อนที่ A และ B ตามลำดับ) โดยสัดส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้ในการวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 6 ด้วยอัตราการไหล (Flow rate) 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที และใช้ UV diode-array detector ตรวจวัด ฟลาไวโนลที่ความยาวคลื่น 370 นาโนเมตร และแอนโทไซยานินส์ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ประมวลผลที่ได้โดยโปรแกรมสำเร็จรูป Empower 2 chromatography data software (Waters, Mailford, MA, USA)

ตารางที่ 6 สัดส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ในการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกโดยเทคนิค HPLC

เวลา (นาที)	วัฏภาคเคลื่อนที่ A (ร้อยละ)	วัฏภาคเคลื่อนที่ B (ร้อยละ)
0	95	5
2	88	12
26	75	25
32	10	90
36	10	90
40	95	5
44	95	5

นำตัวอย่างสารสกัดไปวิเคราะห์ ด้วยเทคนิค HPLC-PDA-ESI-MS ดังสภาวะที่กล่าวมาแล้ว ตรวจสอบแมสสเปกตรัม (Mass spectrum: MS) และประมวลผลที่ได้โดยโปรแกรมสำเร็จรูป Bruker compass data analysis 4.0 (Amazon X, Bruker, U.S.A.)

วิเคราะห์ปริมาณสาร และตรวจสอบความถูกต้องของสารประกอบฟีนอลิกที่วิเคราะห์ได้โดยการผสมสารมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนเข้าไปในตัวอย่าง และเปรียบเทียบความถูกต้องของพื้นที่ใต้กราฟที่วิเคราะห์ได้ (Spike) โดยใช้สารมาตรฐานความเข้มข้น 100 ppm และ แฟร็กชันเมทานอล ในอัตราส่วน 1:1 นำไปวิเคราะห์โดยใช้วิธี HPLC และเปรียบเทียบพื้นที่ใต้กราฟกับกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน เพื่อหาปริมาณ โดยนำพื้นที่ใต้กราฟเทียบกับกราฟมาตรฐานของเคอซีทิน-3-รูทีโนไซด์ (Quercetin-3-rutinoside) หรือรูทีน (Rutin) ที่ความยาวคลื่น 370 นาโนเมตร ที่มีความเข้มข้น 5-100 ppm (ภาพผนวกที่ 8) และไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ (Cyanidin-3-glucoside) และไซยานิดิน-3-รูทีโนไซด์ (Cyanidin-3-rutinoside) ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ที่มีความเข้มข้น 5-100 ppm (ภาพผนวกที่ 10 และ ภาพผนวกที่ 12 ตามลำดับ) และรายงานผลเป็นมิลลิกรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง

3. ศึกษาผลของความเข้มข้นของตัวทำละลายเอทานอลต่อสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดจากลูกหม่อน

สกัดตัวอย่างจากลูกหม่อนแห้งที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งโดยใช้วิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Kim *et al.* (2002) และ Rodriguez-Saona and Wrolstad (2005) โดยนำตัวอย่างจากลูกหม่อนแห้ง 1 กรัมใส่ในหลอดสำหรับหมุนเหวี่ยง เติมตัวทำละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 0, 20, 50, 80, 100 ที่มีส่วนผสมของกรดไฮโดรคลอริกร้อยละ 0.01 ปริมาตร 12 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นสะเทือนด้วยเครื่องปั่นสะเทือนด้วยคลื่นเสียง (Bandelin sonorex, model RK 52, Berlin, Germany) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงโดยเครื่องเหวี่ยงแยก (Sorvall RC 5C plus superspeed centrifuge, Minnesota, U.S.A.) ด้วยความเร็วรอบ 11,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แยกส่วนใสใส่ขวดปรับปริมาตร นำส่วนกากที่เหลือไปสกัดซ้ำอีก 1 ครั้ง แยกส่วนใสและนำไปรวมกับส่วนใสที่ได้จากการสกัดครั้งแรก แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 25 มิลลิลิตร นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินส์ทั้งหมด ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ABTS และความสามารถต้านออกซิเดชันโดยวิธี ORAC ดังวิธีที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ในข้อ 1.3

4. ศึกษาผลของอุณหภูมิ และความเป็นกรด-ด่างต่อความคงตัวของแอนโทไซยานินส์ในสารสกัดจากลูกหม่อนแห้ง

เลือกสารสกัดจากสารละลายเอทานอลที่ดีที่สุดจากข้อ 3 ระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน (Rotary evaporator: Buchi rotavapor R-114, Germany) ภายใต้ความดันสูญญากาศ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และทำแห้งด้วยวิธีทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dryer: Heto model FD 2.5, Heto lab equipment A/S, Allerød, Denmark) จนได้เป็นสารสกัดจากลูกหม่อนแห้ง นำมาทดสอบความคงตัวของแอนโทไซยานินส์ โดยใช้วิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Kirca and Cemeroglu (2003) นำตัวอย่างสารสกัดจากลูกหม่อนแห้ง 0.05 กรัม ทำการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลายซิเตรตฟอสเฟตบัฟเฟอร์ตามค่าความเป็นกรด-ด่างที่กำหนดคือ 2.5, 4.0, 6.0, 7.5 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70, 80, 90 องศาเซลเซียส ในอ่างควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยทำการเก็บตัวอย่างทุก 1 ชั่วโมง และนำตัวอย่างมาตรวจวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินส์ทั้งหมด ตามวิธีในข้อ 1.3.1

4.1 การคำนวณหาแก๊สอัตราของปฏิกิริยาการสลายตัวของแอนโรไซยานินส์ และค่าครึ่งชีวิต ($t_{1/2}$)

ในการศึกษาแก๊สอัตราเพื่อระบุอันดับของปฏิกิริยาการสลายตัวของแอนโรไซยานินส์ เพื่อตัดสินว่าเป็นปฏิกิริยาอันดับที่ศูนย์ หนึ่ง หรือสองสามารถหาได้โดยการพลอตกราฟระหว่างปริมาณแอนโรไซยานินส์ ณ เวลา ใดๆ กับปริมาณแอนโรไซยานินส์เริ่มต้น (Andersson *et al.*, 2003) ตามสมการเส้นตรง ดังนี้

$$\text{ปฏิกิริยาอันดับที่ 0} \quad C_t = -k t + C_0 \quad (27.1)$$

$$\text{ปฏิกิริยาอันดับที่ 1} \quad \ln (C_t / C_0) = -k t \quad (27.2)$$

$$\text{ปฏิกิริยาอันดับที่ 2} \quad 1/(C_t / C_0) = k t \quad (27.3)$$

เมื่อ C_t คือ ปริมาณแอนโรไซยานินส์เมื่อเวลาผ่านไป t นาที หลังจากได้รับความร้อนตามอุณหภูมิที่กำหนดไว้

C_0 คือ ปริมาณแอนโรไซยานินส์เริ่มต้น

k คือ ค่าคงที่อัตราการเกิดปฏิกิริยาที่หนึ่ง

t คือ เวลาในการเกิดปฏิกิริยา

โดยโดยกราฟของปฏิกิริยาอันดับใดเป็นกราฟเส้นตรง แสดงถึงอันดับของอัตราการเกิดปฏิกิริยา จากสมการเส้นตรงของปฏิกิริยาอันดับต่างๆ สามารถนำมาหาค่าครึ่งชีวิตได้ ตัวอย่างเช่น ปฏิกิริยาอันดับที่หนึ่ง สามารถหาค่าครึ่งชีวิตได้ดังสมการที่ 28 ซึ่งจะแสดงเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาจนความเข้มข้นของสารตั้งต้นลดลงครึ่งหนึ่งจากความเข้มข้นเริ่มต้น ซึ่งในที่นี้คือความเข้มข้นของสารสกัดแอนโรไซยานินส์ในสารสกัดจากลูกหม่อนแห้ง

$$t_{1/2} = -\ln 0.5 \times k^{-1} \quad (28)$$

เมื่อ $t_{1/2}$ คือ ค่าครึ่งชีวิต

k คือ ค่าคงที่อัตราการเกิดปฏิกิริยาที่หนึ่ง

4.2 การคำนวณพลังงานกระตุ้นโดยสมการอาร์เรเนียส

หลังจากคำนวณหาค่าคงที่อัตราการเกิดปฏิกิริยาที่หนึ่ง (k) ของสารสกัดกากลูกหม่อนแห้งที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ ในสถานะความเป็นกรด-ด่างต่างๆ แล้ว นำค่า k ที่ได้ มาคำนวณหาค่า E_a ด้วยสมการอาร์เรเนียส (สมการที่ 29)

$$k = A \times e^{-E_a/RT} \quad (29)$$

เมื่อ k คือ ค่าคงที่อัตราการเกิดปฏิกิริยาที่หนึ่ง

A คือ แฟกเตอร์ความถี่ของการชนกัน

E_a คือ พลังงานก่อกัมมันต์ของปฏิกิริยา

R คือ ค่าคงที่ของแก๊ส (8.314 J/K.mol)

T คือ อุณหภูมิสัมบูรณ์ (หน่วย K)

5. การประเมินผลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปเพื่อวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) แบบ Completely randomized design (CRD) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดย LSD (Least significant difference) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

6. สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพฯ

ห้องปฏิบัติการสาขาวิทยาศาสตร์การอาหาร ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ แห่ง National
University of Singapore ประเทศสิงคโปร์



ผลและวิจารณ์

1. ผลของวิธีการทำแห้งต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันของกากลูกหม่อน

กากลูกหม่อนสดมีลักษณะทั่วไปคือมีสีแดงเข้ม ชุ่มน้ำ ประกอบด้วยส่วนก้าน เนื้อ และ เมล็ดผสมกันอยู่ มีเมล็ดสีเหลืองน้ำตาลกระจายอยู่ทั่วไป มีกลิ่นของน้ำตาล และกรด มีปริมาณ ความชื้น 85.4% และมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ 6.7% (ภาพที่ 21 ก) เมื่อนำไปทำแห้งด้วยวิธีทำ แห้งด้วยลมร้อนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะมีสีแดงเข้มขึ้นจนเกือบเป็นสีดำ (ภาพที่ 21 ข) ส่วนวิธีการ ทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งนั้น กากลูกหม่อนแห้งจะมีน้ำหนักเบา มีรูพรุน สียังคงเป็นสีแดงเข้ม (ภาพ ที่ 21 ค) และยังคงมีปริมาตรใกล้เคียงกับกากลูกหม่อนสด



(ก)



(ข)



(ค)

ภาพที่ 21 กากลูกหม่อนสดที่เหลือทิ้งจากกระบวนการคั้นน้ำลูกหม่อน (ก) กากลูกหม่อนแห้งที่ผ่าน การทำแห้งด้วยวิธีทำแห้งด้วยลมร้อน (ข) และกากลูกหม่อนแห้งที่ผ่านการทำแห้งด้วย วิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (ค)

เมื่อตรวจสอบปริมาณกลุ่มสาร (Proximate analysis) ของกากลูกหม่อน พบว่า องค์ประกอบหลักคือคาร์โบไฮเดรต รองลงมาคือ เยื่อใยหยาบ ความชื้น เถ้า ไขมัน โปรตีน ตามลำดับ (ตารางที่ 7) สอดคล้องกับงานวิจัยของ White *et al.* (2010) ที่พบว่าองค์ประกอบหลัก ของวัตถุดิบกากแครนเบอร์รี่เป็นส่วนของผนังเซลล์ซึ่งประกอบไปด้วยเซลลูโลส เพกติน และเฮมิ เซลลูโลส เมื่อศึกษาผลของกรรมวิธีการทำแห้งตัวอย่างต่อปริมาณกลุ่มสารของกากลูกหม่อน พบว่า การทำแห้งด้วยลมร้อน และการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งให้ผลการวิเคราะห์ปริมาณกลุ่มสารคือ ปริมาณเถ้า เยื่อใยหยาบ โปรตีน ไขมัน ความชื้น และคาร์โบไฮเดรตที่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

ทางสถิติ ($p>0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Jaafar *et al.* (2009) ที่พบว่าวิธีการทำแห้งด้วยลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -45 องศาเซลเซียสนั้นไม่มีผลต่อปริมาณกลุ่มสารในแก้วมังกร

ตารางที่ 7 ปริมาณกลุ่มสาร (Proximate analysis) ของกากลูกหม่อนแห้ง (%)

ปริมาณกลุ่มสาร	ทำแห้งด้วยลมร้อน	ทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง
เถ้า	3.6 ± 0.1 ns	3.6 ± 0.1
เยื่อใยหยาบ	16.9 ± 0.5 ns	14.0 ± 2.7
โปรตีน	1.1 ± 0.1 ns	1.0 ± 0.0
ไขมัน	2.8 ± 0.2 ns	2.6 ± 0.1
ความชื้น	14.6 ± 0.2 ns	14.2 ± 0.4
คาร์โบไฮเดรต	61.1 ± 0.2 ns	64.4 ± 2.1

หมายเหตุ ข้อมูลแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตัวอักษร ns ในแต่ละแถว หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

จากการศึกษาผลของกรรมวิธีการทำแห้งต่อปริมาณแอนโทไซยานินส์ทั้งหมดที่มีในกากลูกหม่อนโดยวิธี pH-differential พบว่าตัวอย่างที่ทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งมีปริมาณแอนโทไซยานินส์ทั้งหมดเป็น 4 เท่าของตัวอย่างที่ทำแห้งด้วยวิธีทำแห้งด้วยลมร้อน ดังแสดงในตารางที่ 8 ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Kwok *et al.* (2004) ที่ศึกษาวิธีการระเหยน้ำต่อปริมาณสารพฤกษเคมีและสมบัติการต้านอนุมูลอิสระในผล Saskatoon berries โดยพบว่าปริมาณแอนโทไซยานินส์ทั้งหมดของตัวอย่างที่ทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งจะมีปริมาณสูงกว่าตัวอย่างที่ทำแห้งด้วยลมร้อนถึง 4 เท่า การที่ปริมาณแอนโทไซยานินส์ทั้งหมดในตัวอย่างกากลูกหม่อนที่ทำแห้งด้วยวิธีทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งมีปริมาณมากกว่าวิธีทำแห้งด้วยลมร้อน เนื่องจากอุณหภูมิสูงจะส่งผลต่อความคงตัวของแอนโทไซยานินส์ การใช้วิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งจะช่วยลดการสัมผัสกับความร้อนและออกซิเจนซึ่งช่วยป้องกันการสลายตัวของแอนโทไซยานินส์จากความร้อน (Kwok *et al.*, 2004)

ตารางที่ 8 ปริมาณแอนโธไซยานินส์ทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และ สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของกากลูกหม่อนแห้ง

สารประกอบฟีนอลิก และคุณสมบัติการต้านออกซิเดชัน	วิธีทำแห้งด้วย ลมร้อน	วิธีทำแห้งแบบ แช่เยือกแข็ง
แอนโธไซยานินส์ทั้งหมด (มิลลิกรัมสมมูลไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง)	505.7 ± 15.2b	1,927.6 ± 18.9a
ฟีนอลิกทั้งหมด (มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง)	2,174.7 ± 22.5b	4,067.4 ± 1.8a
ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (มิลลิกรัมสมมูลของคาเทคินต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง)	585.3 ± 1.0ns	625.0 ± 8.9
สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (มิลลิกรัมสมมูลของวิตามินซี/100 กรัม น้ำหนักแห้ง)	768.0 ± 11.0b	1,360.8 ± 1.5a

หมายเหตุ ข้อมูลแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตัวอักษร a-b ที่แตกต่างกันในแต่ละแถว หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตัวอักษร ns ในแต่ละแถว หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

จากการศึกษาผลของกรรมวิธีการทำแห้งกากลูกหม่อนเพื่อหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของกากลูกหม่อนโดยใช้วิธีโฟลิน-ซีโอเคาตู พบว่าตัวอย่างที่ทำแห้งด้วยวิธีทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเป็น 2 เท่าของตัวอย่างที่ทำแห้งด้วยวิธีทำแห้งด้วยลมร้อน ดังแสดงในตารางที่ 8 ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Asami *et al.* (2003) ที่ศึกษาการผลของการทำแห้งและสภาวะการปลูกต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในผลมาเรียนเบอร์รี่ (Marionberry) สตรอเบอร์รี่ และข้าวโพด ซึ่งพบว่าการทำแห้งด้วยวิธีทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งจะให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงกว่าวิธีทำแห้งด้วยลมร้อนเนื่องจากวิธีการทำแห้งด้วยลมร้อนที่มีการใช้ความร้อนมากกว่า 60 องศาเซลเซียสอาจทำให้เกิดการเหนียวน้ำให้เกิดการรวมตัวกันของสารประกอบฟีนอลิกโดยปฏิกิริยา Oxidative condensation หรือ เหนียวน้ำให้เกิดการสลายตัว (Decomposition) ของสารประกอบที่ไวต่ออุณหภูมิ เช่น คาเทคิน เป็นต้น นอกจากนี้ สารประกอบฟีนอลิกซึ่งเป็นสาร Metabolic intermediate สะสมอยู่ในแวคคิวโอลของพืช กระบวนการแปรรูปส่งผลต่อการแตกของเซลล์ ทำให้สารประกอบฟีนอลิกและเอนไซม์ ได้แก่

เอนไซม์ออกซิเดทีฟและเอนไซม์ไฮโดรไลติกถูกปลดปล่อยออกมา แต่อย่างไรก็ตามเอนไซม์สามารถสลายไปด้วยความร้อนสูงจากกระบวนการแปรรูป จึงทำให้สารประกอบ ฟีนอลิกไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงจากเอนไซม์ ในทางกลับกันการวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งอาจทำให้ตัวอย่างมีประสิทธิภาพในการสกัดสูงขึ้นเนื่องจากในระหว่างขั้นตอนการแช่เยือกแข็ง ผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นสามารถทิ่มแทงเซลล์ ทำให้สารสกัดสามารถเข้าไปสกัดได้มากขึ้น ในขณะที่การทำแห้งด้วยลมร้อนจะไม่มีทำให้เซลล์แตกก่อน อีกทั้งยังมีปัจจัยเรื่องอุณหภูมิสูงเข้ามาเกี่ยวข้องด้วยจึงทำให้ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกนั้นน้อยกว่าวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Chism and Haard, 1996; Asami *et al.*, 2003)

จากการศึกษาผลของกรรมวิธีการทำแห้งต่อปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดที่มีในกากลูกหม่อน พบว่าปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในตัวอย่างที่ทำแห้งด้วยวิธีทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งและที่ทำแห้งด้วยวิธีทำแห้งด้วยลมร้อนไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) (ตารางที่ 8) กระบวนการแปรรูปหรือระหว่างกระบวนการแปรรูปด้วยการทำแห้งนั้นส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ (Rhodes and Prince, 1996) ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Chang *et al.* (2006) ที่ศึกษาคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระในมะเขือเทศที่ทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง และทำแห้งด้วยลมร้อนพบว่าในมะเขือเทศพันธุ์ Sheng-Neu มีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดไม่แตกต่างกันในตัวอย่างมะเขือเทศแห้งแช่เยือกแข็ง และมะเขือเทศทำแห้งด้วยลมร้อน แต่แตกต่างในพันธุ์ I-Tien-Hung

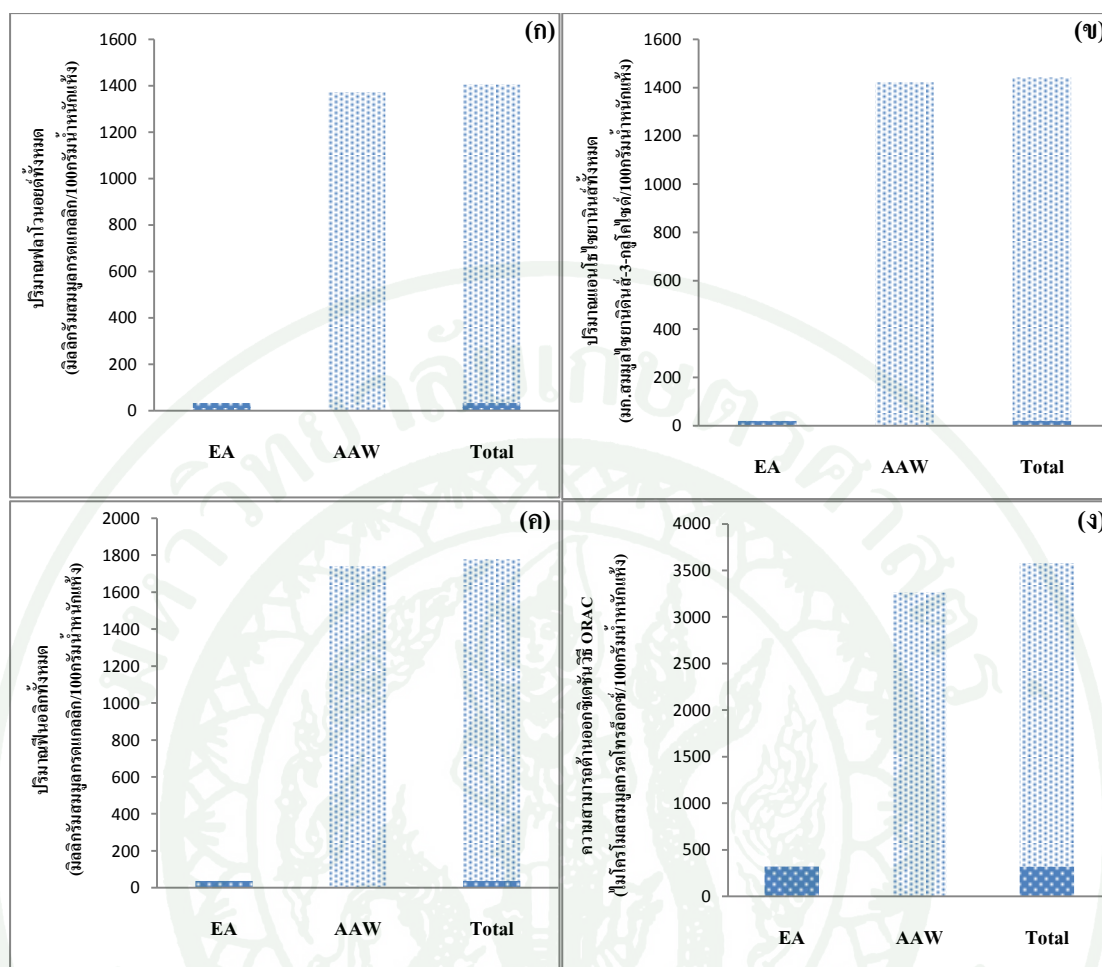
จากการศึกษาผลของกรรมวิธีการทำแห้งต่อสมบัติการต้านออกซิเดชันโดยวิเคราะห์สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ในกากลูกหม่อน พบว่าตัวอย่างที่ทำแห้งด้วยวิธีทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งมีสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ DPPH เป็น 2 เท่าของตัวอย่างที่ทำแห้งด้วยวิธีทำแห้งด้วยลมร้อน ดังแสดงในตารางที่ 8 ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Kwok *et al.* (2004) ที่ศึกษาการวิธีการระเหบน้ำต่อปริมาณสารพฤกษเคมีและสมบัติการต้านอนุมูลอิสระในผล Saskatoon berries ที่มีปริมาณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ในตัวอย่างที่ทำแห้งด้วยวิธีทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งมากกว่าตัวอย่างที่ทำแห้งด้วยลมร้อน นอกจากนี้ Michalczyk *et al.* (2009) แสดงผลของสมบัติการต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างเบอร์รี่หลายชนิดที่ทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ซึ่งสูงกว่าในตัวอย่างที่ทำแห้งด้วยลมร้อน โดยรายงานว่าผลการแสดงผลของสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ เป็นผลมาจากปริมาณแอนโทไซยานินส์ และสารประกอบฟีนอลิกอื่นๆ ที่เป็นสารประกอบหลักในการต้านออกซิเดชัน และถึงแม้จะเก็บรักษาไว้เป็นระยะเวลานาน

ผลิตภัณฑ์ที่ทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งจะยังคงสมบัติการต้านออกซิเดชันไว้ได้มากที่สุด (Michalczyk *et al.*, 2009)

2. การระบุชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกหลักในกากลูกหม่อน

ในการระบุชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกหลักในกากลูกหม่อนที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งจะถูกนำไปสกัดด้วยตัวทำละลาย (Solvent fractionation) เอทิลอะซิเตต ได้สารสกัดส่วน EA จากนั้นจึงนำกากที่ได้ไปสกัดต่อด้วย สารละลายเมทานอล : อะซิโตน : น้ำ เท่ากับ 2 : 2 : 1 ทำให้ได้สารสกัดส่วน AAW ตามลำดับ เมื่อทำการตรวจสอบปริมาณสารสำคัญในสารสกัดส่วน EA พบปริมาณฟลาโวนอยด์ 33.4 ± 2.5 มิลลิกรัมสมมูลของคาเท킨ต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด 36.5 ± 0.5 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง ปริมาณแอนโธไซยานินส์ทั้งหมด 0.1 ± 0.0 มิลลิกรัมสมมูลไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง นอกจากนั้นสารสกัดส่วน EA ยังมีความสามารถต้านออกซิเดชันที่ตรวจด้วยวิธี ORAC 318.4 ± 6.9 ไมโครโมลสมมูลโทรลิกซ์ต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง ดังแสดงในภาพที่ 22 (ก-ง) สารสกัดส่วน EA เป็นส่วนที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันน้อยที่สุด แสดงให้เห็นว่ามีไขมันหรือส่วนที่ละลายในไขมันอยู่น้อย เนื่องจากเอทิลอะซิเตตเป็นตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพในการสกัดไขมัน หรือสารประกอบที่ไม่มีขั้ว (Oreopoulou and Tzia, 2007)

เมื่อนำตัวอย่างที่ผ่านการสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตแล้วไปสกัดต่อด้วยสารละลายเมทานอล : อะซิโตน : น้ำ เท่ากับ 2 : 2 : 1 พบว่าสารสกัดส่วน AAW มีปริมาณฟลาโวนอยด์ $1,371.2 \pm 17.5$ มิลลิกรัมสมมูลของคาเท킨ต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด $1,741.1 \pm 29.8$ มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง ปริมาณแอนโธไซยานินส์ทั้งหมด $1,422.1 \pm 21.0$ มิลลิกรัมสมมูลไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง และความสามารถต้านออกซิเดชันที่ตรวจด้วยวิธี ORAC $3,262.9 \pm 29.2$ ไมโครโมลสมมูลโทรลิกซ์ต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง (ภาพที่ 22 ก-ง) Sun and Ho (2005) และ Kahkonen *et al.* (2001) กล่าวว่าโดยทั่วไปการสกัดแอนโธไซยานินส์นิยมใช้ตัวทำละลายผสมของเอทานอล เมทานอล และอะซิโตน การใช้ตัวทำละลายเพียงชนิดเดียวไม่สามารถสกัดสารประกอบฟีนอลิกทุกชนิดจากตัวอย่างได้ เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกมีความมีขั้ว (Polarity) และความสามารถในการละลาย (Solubility) ที่แตกต่างกัน



ภาพที่ 22 ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (ก) ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (ข) ปริมาณแอนโธไซยานินส์ทั้งหมด (ค) และความสามารถต้านออกซิเดชันวิธี ORAC (ง) ในสารสกัดส่วน EA (EA) สารสกัดส่วน AAW (AAW) และผลรวมของสารสกัดส่วน EA และสารสกัดส่วน AAW (Total)

แอลกอฮอล์เป็นตัวทำละลายที่นิยมใช้ในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากวัตถุดิบจากแหล่งธรรมชาติเนื่องจากให้ผลผลิตสูง การใช้ตัวทำละลายที่ผสมระหว่างแอลกอฮอล์และน้ำสามารถทำให้การสกัดสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น (Kahkonen *et al*, 2003; Cuevas-Rodriguez *et al.*, 2010) Revilla *et al.* (1998) ทำการทดลองเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการสกัดแอนโธไซยานินส์ในอุณหภูมิกรดไฮโดรคลอริกร่วมกับเมทานอล พบว่า การสกัดแอนโธไซยานินส์ที่มีความเข้มข้นจนถึง 0.12 โมลาร์จะทำให้เกิดการย่อยของพันธะเอสเทอร์ในอะซิเลทเทต แอนโธไซยานินส์

(Acylated anthocyanins) นอกจากนี้ Bakker and Timberlake (1985) พบว่า การใช้เมทานอลผสมกับกรดฟอร์มิกในอัตราส่วน 98:2 ทำให้เกิดการย่อยของแอนโธไซยานินส์เช่นกัน

จากการนำสารสกัดส่วน AAW ที่ได้มาวิเคราะห์องค์ประกอบ โดยใช้วิธีที่ดัดแปลงจาก Isabelle *et al.* (2008) โดยเทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC) สามารถแสดงโครมาโตแกรมได้ดังภาพผนวกที่ 6 ซึ่งพบว่า peak ส่วนใหญ่ยังไม่สามารถแยกออกจากกันได้ดี เนื่องจากสารสกัดที่ได้อาจยังประกอบไปด้วยสารประกอบอื่นๆ เช่น น้ำตาล และกรดอินทรีย์ต่างๆ เพราะตัวทำละลายที่ใช้ส่วนใหญ่ไม่จำเพาะสำหรับแอนโธไซยานินส์เพียงอย่างเดียว (อรุษา, 2554) ทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณได้ จึงจำเป็นต้องนำสารสกัดส่วน AAW นี้ไปทำให้บริสุทธิ์ต่อด้วยคอลัมน์ Sephadex LH-20 ต่อไป

หลังจากการนำตัวอย่างสารสกัดส่วน AAW ผ่านคอลัมน์ Sephadex LH-20 โดยใช้ตัวชะทั้งหมด 3 ชนิด คือ น้ำ เมทานอล และ อะซิโตน ตามลำดับ โดยส่วนแฟรกชันน้ำ (ภาพที่ 23 ก) พบว่ามีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด 205.1 ± 4.5 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง และความสามารถด้านออกซิเดชันที่ตรวจด้วยวิธี ORAC $1,887.1 \pm 22.7$ ไมโครโมลสมมูลโทรลล็อกซ์ต่อ 100 กรัม ดังแสดงในตารางที่ 9 ซึ่งการใช้เทคนิคการแยกส่วนด้วยตัวดูดซับของแข็ง (Solid phase extraction, SPE) เป็นวิธีการทำให้สารบริสุทธิ์ โดยใช้ของแข็งเป็นตัวจับสารที่สนใจ โดยของแข็งจะถูกบรรจุอยู่ในแท่ง SPE ของแข็งที่เป็นตัวจับแอนโธไซยานินส์ที่นิยมคือ C18 แอนโธไซยานินส์จะจับกับของแข็งใน SPE ในขณะที่น้ำตาล และกรดจะไหลผ่าน SPE ถูกชะทิ้งไป (Pazmino-Duran *et al.*, 2001; Todaro *et al.*, 2009) ซึ่งในที่นี้ใช้น้ำเป็นตัวชะน้ำตาล ฟีนอลมวลโมเลกุลต่ำ และกรดฟีนอลิก ส่วนแฟรกชันอะซิโตน (ภาพที่ 23 ค) พบว่า มีปริมาณของสารสำคัญน้อยที่สุด มีลักษณะใส ไม่มีสี ซึ่งการแยกแอนโธไซยานินส์และโปรแอนโธไซยานินส์ออกจากกันนั้นสามารถทำได้โดยการใช้คอลัมน์ Sephadex LH-20 เพื่อทำให้สารบริสุทธิ์มากขึ้น โดยแอนโธไซยานินส์สามารถชะออกได้โดยเมทานอล และโปรแอนโธไซยานินส์สามารถชะออกได้โดยอะซิโตน ตามลำดับ (Kylli, 2011)



ภาพที่ 23 ลักษณะของตัวอย่างที่ผ่านตัวชะต่างๆ แพรกชันน้ำ (ก) แพรกชันเมทานอล (ข) แพรกชันอะซิโตน (ค)

ตารางที่ 9 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากกากลูกหม่อนในแต่ละแฟรกชัน

แฟรกชัน	ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (มก.สมมูลของคาเทคินต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง)	ฟีนอลิกทั้งหมด (มก.ของกรดแกลลิกต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง)	แอนโธไซยานินส์ทั้งหมด (มก.สมมูลไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง)	ความสามารถต้านออกซิเดชันวิธี ORAC (ไมโครโมลสมมูล Trolox ต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง)
แฟรกชันน้ำ	183.2 ± 11.2b	205.1 ± 4.5b	49.2 ± 2.0b	1,887.1 ± 22.7b
แฟรกชันเมทานอล	331.9 ± 18.0a	821.6 ± 12.8a	1,231.2 ± 5.0a	3,798.3 ± 19.4a
แฟรกชันอะซิโตน	77.0 ± 3.8c	8.1 ± 0.1c	5.0 ± 0.0c	380.6 ± 12.5c

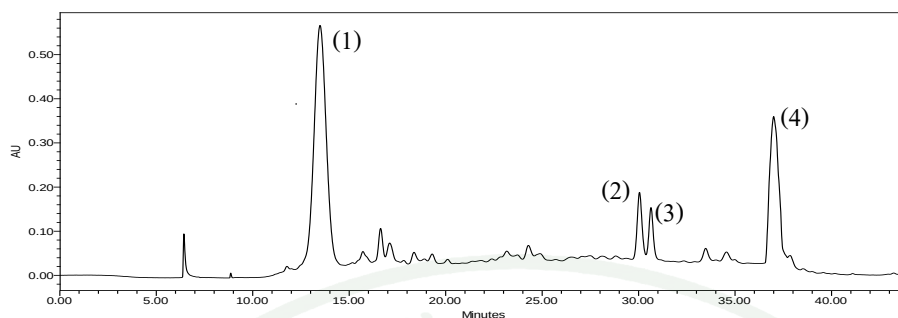
หมายเหตุ ข้อมูลแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอักษร a-c ที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์ หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ส่วนแฟรกชันเมทานอล (ภาพที่ 23 ข) พบว่าเป็นส่วนที่พบสารประกอบฟีนอลิกมากกว่าแฟรกชันน้ำ และแฟรกชันอะซิโตน ดังแสดงในตารางที่ 9 เนื่องจากสภาพขี้ของเมทานอล

ตามหลักของสารที่มีสมบัติคล้ายคลึงกันย่อมละลายกันได้ กล่าวคือ สารจะละลายในตัวทำละลายที่มีโครงสร้างหรือหมู่ฟังก์ชันที่คล้ายคลึงกัน ตัวทำละลายที่มีขั้ว (Polar solvent) จะละลายโมเลกุลที่มีขั้ว (Polar molecule) ส่วนตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว (Nonpolar solvent) จะละลายโมเลกุลที่ไม่มีขั้ว (Nonpolar molecule) โดยตัวทำละลายต้องมีสมบัติความเป็นขั้วคล้ายคลึงกัน ซึ่งตัวทำละลายควรมีความสามารถในการละลายสารที่ต้องการออกมามากที่สุด และไม่ละลายหรือละลายของค์ประกอบอื่นได้น้อย (รัตน, 2547; สมจิตร, 2544) โครงสร้างของแอนโธไซยานินส์เป็นสารประกอบฟีนอลิกที่มีหมู่ไฮดรอกซิลจับอยู่ในวงเบนซีน จึงอาจทำให้สามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายประเภทแอลกอฮอล์ที่มีหมู่ไฮดรอกซิลเป็นหมู่ฟังก์ชัน (Functional group) จึงวิเคราะห์หัชชนิดและปริมาณของสารสำคัญในกากลูกหม่อนจากแฟรกชันเมทานอลซึ่งเป็นแฟรกชันที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันสูงที่สุด

จากการแยกส่วนของสารสกัด AAW โดยการใช้คอลัมน์ Sephadex LH-20 เพื่อให้ได้แฟรกชันน้ำ แฟรกชันเมทานอล และแฟรกชันอะซิโตน ซึ่งควรจะมีผลรวมของปริมาณสารประกอบฟีนอลิก คือปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณแอนโธไซยานินส์ทั้งหมด เท่ากับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดส่วน AAW แต่จากผลการทดลองพบว่าผลรวมของสารประกอบฟีนอลิกของทั้ง 3 แฟรกชัน มีค่าน้อยกว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดส่วน AAW ทั้งนี้อาจมีการสูญเสียปริมาณสารสำคัญไปในระหว่างกระบวนการแยกส่วน การสูญเสียในที่นี้อาจเกิดได้ในช่วงการระเหยตัวทำละลายของแต่ละแฟรกชันก่อนที่จะนำมาวิเคราะห์

เมื่อนำแฟรกชันเมทานอล ซึ่งเป็นส่วนที่มีสารประกอบฟีนอลิก และคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันมากที่สุดมาวิเคราะห์ห่อ้งค์ประกอบ ด้วยเทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC) โดยใช้วิธีที่ดัดแปลงจาก Isabelle *et al.* (2008) สามารถแสดงโครมาโตแกรมได้ดังภาพที่ 24 พบ peak หลักทั้งหมด 4 peak ที่ Retention time (RT) 13.50, 30.13, 30.74, 37.03 นาที ตามลำดับ



ภาพที่ 24 ตัวอย่าง HPLC โครมาโตแกรมของแฟรกชันเมทานอล ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

หมายเหตุ หมายเลข (1) : RT = 13.50, หมายเลข (2) : RT = 30.13, หมายเลข (3) : RT = 30.74,
หมายเลข (4) : RT = 37.03

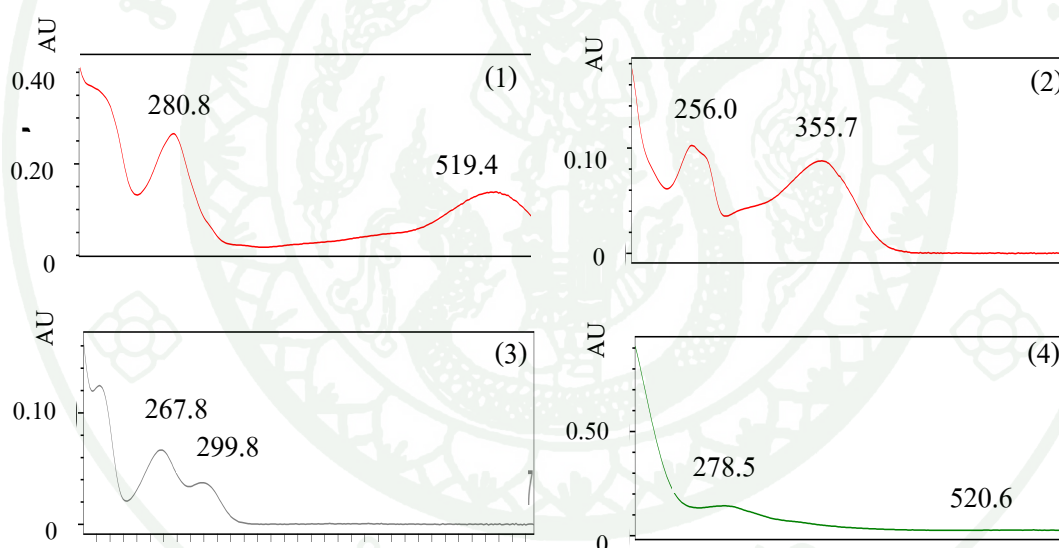
จากการตรวจวิเคราะห์ด้วย HPLC-PDA-ESI-MS สามารถยืนยันองค์ประกอบของสารประกอบฟีนอลิกในกากลูกหม่อนได้โดยใช้มวลโมเลกุล คือ ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ ไซยานิดิน-3-รูทีโนไซด์ เคอซีทิน-3-รูทีโนไซด์ ดังแสดงในตารางที่ 10 ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับ Qin *et al.* (2010) พบว่าสารประกอบหลักในลูกหม่อน คือ ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ และ ไซยานิดิน-3-รูทีโนไซด์ นอกจากนี้ Qin *et al.* (2010) ยังตรวจพบเพลาโกนิน-3-โอ-กลูโคไซด์ เพลาโกนิน-3-โอ-รูทีโนไซด์อีกด้วย โครมาโตแกรมของการตรวจวิเคราะห์ HPLC-PDA-ESI-MS ดังแสดงในภาพผนวกที่ 7

แอนโธไซยานินส์ชนิดหลัก 2 ชนิดในแฟรกชันเมทานอล คือ ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ และ ไซยานิดิน-3-รูทีโนไซด์ ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับ Du *et al.* (2008) ที่ศึกษาชนิดของแอนโธไซยานินส์ในลูกหม่อน (*Morus alba* L.) พบว่ามีไซยานิดิน-3-โอ-กลูโคไซด์ และ ไซยานิดิน-3-โอ-รูทีโนไซด์เป็นแอนโธไซยานินส์ชนิดหลักในลูกหม่อนเช่นเดียวกัน และพบแอนโธไซยานินส์ชนิดหลักอื่นอีกคือ ไซยานิดิน-3-โอ- β -ดี-กาแลคโตไพราโนไซด์ และ ไซยานิดิน-7-โอ- β -ดี-กลูโคไพราโนไซด์ เช่นเดียวกับ Pawlowska *et al.* (2008) รายงานว่าลูกหม่อนสายพันธุ์อิตาเลียน (*Morus nigra*) มีไซยานิดิน-3-โอ-กลูโคไซด์ และ ไซยานิดิน-3-โอ-รูทีโนไซด์เป็นองค์ประกอบหลัก โดยมีปริมาณคิดเป็น 66.3% และ 27.8% ของปริมาณแอนโธไซยานินส์ทั้งหมด (ตามลำดับ) นอกจากนั้นยังพบแอนโธไซยานินส์อีก 2 ชนิดคือ เพลาโกนิน-3-โอ-กลูโคไซด์ และเพลาโกนิน-3-โอ-รูทีโนไซด์ ทั้งนี้จากรายงานการวิจัยที่กล่าวมาวัตถุดิบลูกหม่อน มีองค์ประกอบหลักที่แตกต่างกัน อาจ

เนื่องจากปัจจัยที่หลากหลาย เช่น สายพันธุ์ สภาพภูมิอากาศ ระยะการเก็บเกี่ยว ความอุดมสมบูรณ์ของดิน และฤดูกาล เป็นต้น (Lima *et al.*, 2005; Pawlowska *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2003)

ตารางที่ 10 สารประกอบฟีนอลิกหลักในแฟรกชันเมทานอล

หมายเลข	RT	สารประกอบ	[M-H] ⁺
1	13.50	ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์	449.0
2	30.13	Unknown	338.1
3	30.74	เคอซีทิน-3-รูทีโนไซด์	611.0
4	37.03	ไซยานิดิน-3-รูทีโนไซด์	649.2



ภาพที่ 25 การดูดกลืนแสงของสารประกอบฟีนอลิกหลักในแฟรกชันเมทานอลที่ความยาวคลื่นต่างๆในช่วง UV-visible

หมายเหตุหมายเลข (1) คือ ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์, หมายเลข (2) คือ Unknown, หมายเลข (3) คือ เคอซีทิน-3-รูทีโนไซด์, หมายเลข (4) คือ ไซยานิดิน-3-รูทีโนไซด์

จากการศึกษาชนิดของสารประกอบฟีนอลิกหลักในแฟรกชันเมทานอล พบว่ามีเคอซีทิน-3-รูทีโนไซด์ (รูทีน) เป็นองค์ประกอบ เช่นเดียวกับการทดลอง ของ Pawlowska *et al.* (2008) ที่

ศึกษาเพื่อระบุชนิดของสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดจาก Black mulberry (*Morus nigra*) และ White mulberry (*Morus alba*) โดยเทคนิค HPLC-PDA-ESI-MS พบว่ามีสารประกอบกลุ่ม ฟลาโวนอล ซึ่งได้แก่ เควอซีทิน-3-โอ-รูทีโนไซด์ (Quercetin-3-*O*-rutinoside) เควอซีทิน-3-โอ-กลูโคไซด์ (Quercetin-3-*O*-glucoside) และแคมป์เฟอรอล-3-โอ-รูทีโนไซด์ (Kaempferol-3-*O*-rutinoside) เป็นองค์ประกอบ โดยเควอซีทิน-3-โอ-รูทีโนไซด์ คือฟลาโวนอลชนิดหลักของ Black mulberry และ White mulberry

ส่วน Peak หมายเลข 2 ที่ไม่สามารถระบุชนิดของสารได้ คาดว่าอาจจะเป็น p-coumaroyl quinic acid เป็นสารประกอบในกลุ่มฟลาโวนอยด์ มีมวลโมเลกุล 338.1 (Clifford *et al.*, 2006; Tatsis *et al.*, 2007) ซึ่งสามารถพบได้ใน Isomer ต่างๆ ทั้ง Cis- หรือ Trans- ที่ตำแหน่งที่ 3, 4 หรือ 5 ตัวอย่างเช่น trans-5-*O*-(4-coumaroyl)-D-quinates (Kasajima *et al.*, 2008), 3-*O*-p-coumaroyl quinic acid (Norbeak *et al.*, 2002) เป็นต้น

นอกจากนี้เมื่อ Spike ตัวอย่างด้วยสารมาตรฐาน เพื่อยืนยันชนิดของสารประกอบฟีนอลิก โดยใช้สารมาตรฐานความเข้มข้น 100 ppm และ แพรกชันเมทานอล ในอัตราส่วน 1:1 วิเคราะห์โดยใช้วิธี HPLC และเปรียบเทียบพื้นที่ใต้กราฟกับกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน เพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเทียบกับกราฟของสารตัวอย่างมาตรฐาน ดังแสดงในตารางที่ 11 ซึ่งองค์ประกอบสำคัญที่พบคือ ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์มีปริมาณ 346.5 ± 14.1 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง ไซยานิดิน-3-รูทีโนไซด์ ปริมาณ 273.0 ± 5.7 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง และ เควอซีทิน-3-รูทีโนไซด์มีปริมาณ 40.3 ± 4.1 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง จากรายงานของ มนต์วี (2552) รายงานว่าลูกหม่อนสายพันธุ์เชียงใหม่ สายพันธุ์กำแพงแสน-เอ็มบี-42-1 และสายพันธุ์บุรีรัมย์ที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง มีปริมาณของไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ตั้งแต่ 738.1 ถึง 889.3 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง และ ปริมาณของไซยานิดิน-3-รูทีโนไซด์ตั้งแต่ 654.2 ถึง 827.4 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง ซึ่งวิเคราะห์ชนิดและปริมาณด้วยวิธี HPLC Song *et al.* (2009) ที่ศึกษาชนิดและปริมาณของสารพฤกษเคมีในลูกหม่อนพันธุ์ต่างๆ ในประเทศจีน พบว่าในลูกหม่อนประกอบไปด้วยไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ปริมาณ ตั้งแต่ 13.94 ถึง 2,091.27 มิลลิกรัมต่อลิตร ไซยานิดิน-3-รูทีโนไซด์ปริมาณ ตั้งแต่ 6.01 ถึง 473.86 มิลลิกรัมต่อลิตร และเควอซีทิน-3-รูทีโนไซด์ปริมาณตั้งแต่ 3.35 ถึง 133.04 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังมีรายงาน ปริมาณแอนโทไซยานินส์ทั้งหมดในลูกหม่อน มีค่าตั้งแต่ 3 จนถึง 830 ไมโครกรัมสมมูล ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ต่อกรัม น้ำหนักเปียก (Ozgen *et al.*, 2009)

ตารางที่ 11 ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกหลักในแฟรกชันเมทานอล

ชนิดของสาร	ปริมาณ (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง)
ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์	346.5 ± 14.1
ไซยานิดิน-3-รutiโนไซด์	273.0 ± 5.7
เคอซีทิน-3-รutiโนไซด์	40.3 ± 4.1

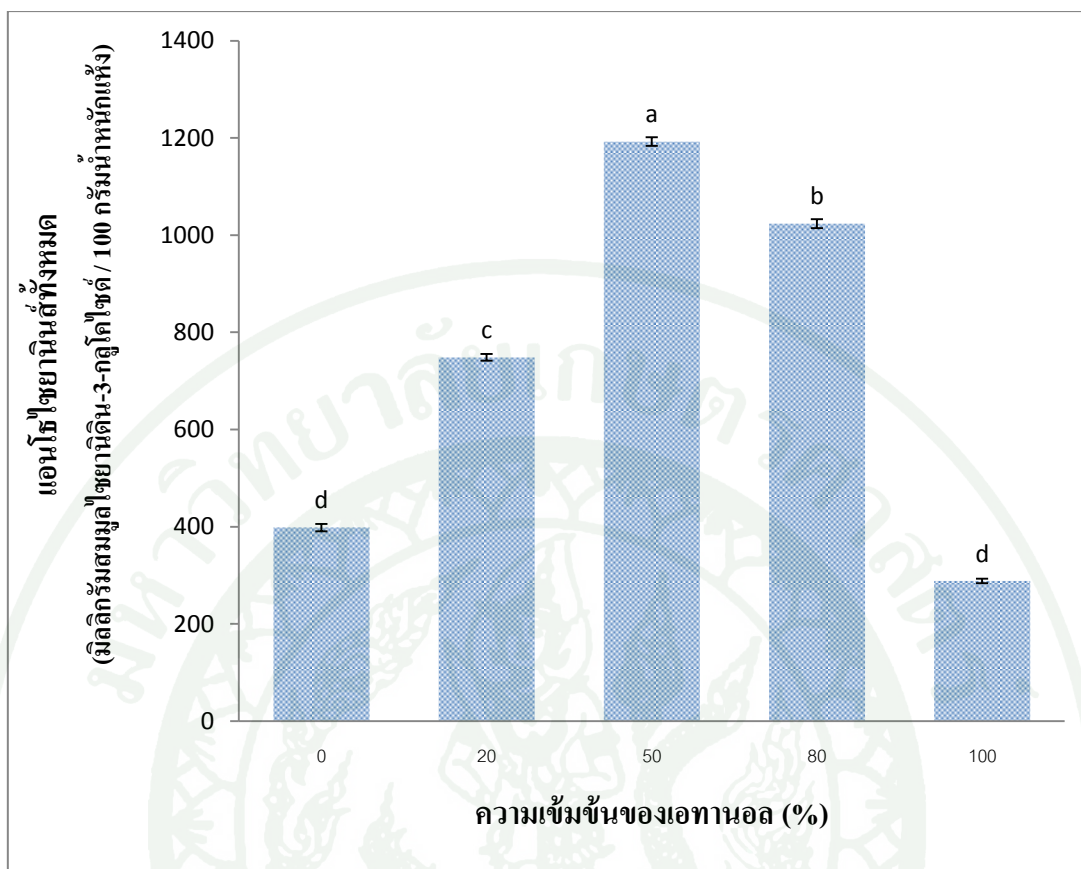
หมายเหตุ ข้อมูลแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3. การศึกษาผลของความเข้มข้นของตัวทำละลายเอทานอลต่อสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดจากลูกหม่อน

จากการทดลองข้อ 2 เห็นว่าในกากลูกหม่อนนั้นมีสารประกอบฟีนอลิกหลักคือ แอนโธไซยานินส์ ซึ่งมีคุณสมบัติในการต้านออกซิเดชัน ในทางการประยุกต์ใช้กับอาหารนิยมใช้เอทานอลในการสกัดเนื่องจากความเป็นพิษน้อย นอกจากนี้ยังมีการใช้กรดร่วมกับตัวทำละลาย เช่น น้ำ หรือ เอทานอล เพื่อทำการสกัดแอนโธไซยานินส์ ซึ่งได้รับความนิยมอย่างแพร่หลาย เนื่องจากแอนโธไซยานินส์มีความคงตัวสูงที่ pH ต่ำ เพราะอยู่ในรูปของ Flavylium cation กรดที่นิยมใช้ร่วมกับตัวทำละลาย เช่น กรดไฮโดรคลอริก กรดไตรฟลูโอโรอะซิติก กรดอะซิติก และกรดฟอร์มิก (Cacace and Mazza, 2003; Donner *et al.*, 1997; Gradinaru *et al.*, 2003; Mateus and Freitas, 2009)

จากการศึกษาของ Metivier *et al.* (1980) ทำการสกัดเนื้อขององุ่นที่เหลือจากการคั้นน้ำด้วยตัวทำละลายเอทานอล เมทานอล และน้ำ พบว่า เอทานอลเป็นตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกได้มากที่สุด ตามด้วยเมทานอล และน้ำ ทรงศิริและคณะ (2552) ทำการสกัดเปลือกองุ่นโดยใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ น้ำ น้ำร้อน และเอทานอล ในอัตราส่วน 10% 20% 50% และ 80% พบว่าเอทานอล 50% และ 80% สามารถสกัดแอนโธไซยานินส์ได้มากกว่าน้ำ ถึง 3 เท่า นอกจากนี้ Yilmaz and Toledo (2004) ยังกล่าวว่า การใช้เอทานอลหรือน้ำเป็นตัวทำละลายในการสกัดเพียงชนิดเดียวไม่มีประสิทธิภาพสำหรับการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากเมล็ดองุ่นพันธุ์ Muscadine ได้ จึงเลือกใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายในการทดลองนี้

จากการศึกษาผลของความเข้มข้นของตัวทำละลายในการสกัดโดยใช้ความเข้มข้นของเอทานอลต่อน้ำในอัตราส่วน 0 : 100, 20 : 80, 50 : 50, 80 : 20, 100:0 ที่มีส่วนผสมของกรดไฮโดรคลอริกร้อยละ 0.01 พบว่าปริมาณของแอนโธไซยานินส์ทั้งหมด มีค่า 288.5 ± 4.5 , $1,023.7 \pm 9.1$, $1,192.5 \pm 8.7$, 748.4 ± 7.1 และ 398.2 ± 7.5 มิลลิกรัมสมมูลไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ โดยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 มีค่ามากที่สุดและแตกต่างกับความเข้มข้นอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 26 ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับรายงานของ Chandrasekhar *et al.* (2012) ที่ใช้ตัวทำละลายเอทานอลที่มีความเข้มข้นต่างๆ ในการสกัดกะหล่ำปลีม่วง พบว่าความเข้มข้นของตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 50 เป็นความเข้มข้นที่สามารถสกัดแอนโธไซยานินส์ออกมาได้มากที่สุด รองลงมาคือ ความเข้มข้นของเอทานอลร้อยละ 40, 60, 20, 80 และ 0 (น้ำกลั่น) ตามลำดับ เนื่องจากคุณสมบัติความมีขั้วของตัวทำละลายเอทานอลแต่ละความเข้มข้นต่างกัน นอกจากนี้การศึกษาโดย Cacace และ Mazza (2003) ในลูกแบล็กเบอร์ แรนท์ยังพบว่า การใช้เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 60 สามารถสกัดสารแอนโธไซยานินส์ได้มากกว่าความเข้มข้นอื่น ความเข้มข้นของเอทานอลที่ต่างกันนอกจากจะมีผลทางด้านความมีขั้วแล้ว ยังสามารถเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติบางอย่างของตัวทำละลายได้ เช่น ความหนาแน่น ความหนืด และค่าคงที่ไดอิเล็กตริก การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของตัวทำละลายสามารถทำให้คุณสมบัติการละลายได้ของสารประกอบเปลี่ยนแปลงไป จึงส่งผลต่อการสารสกัดสารฟีนอลิก (Cacace and Mazza, 2003; Frank *et al.*, 1999)

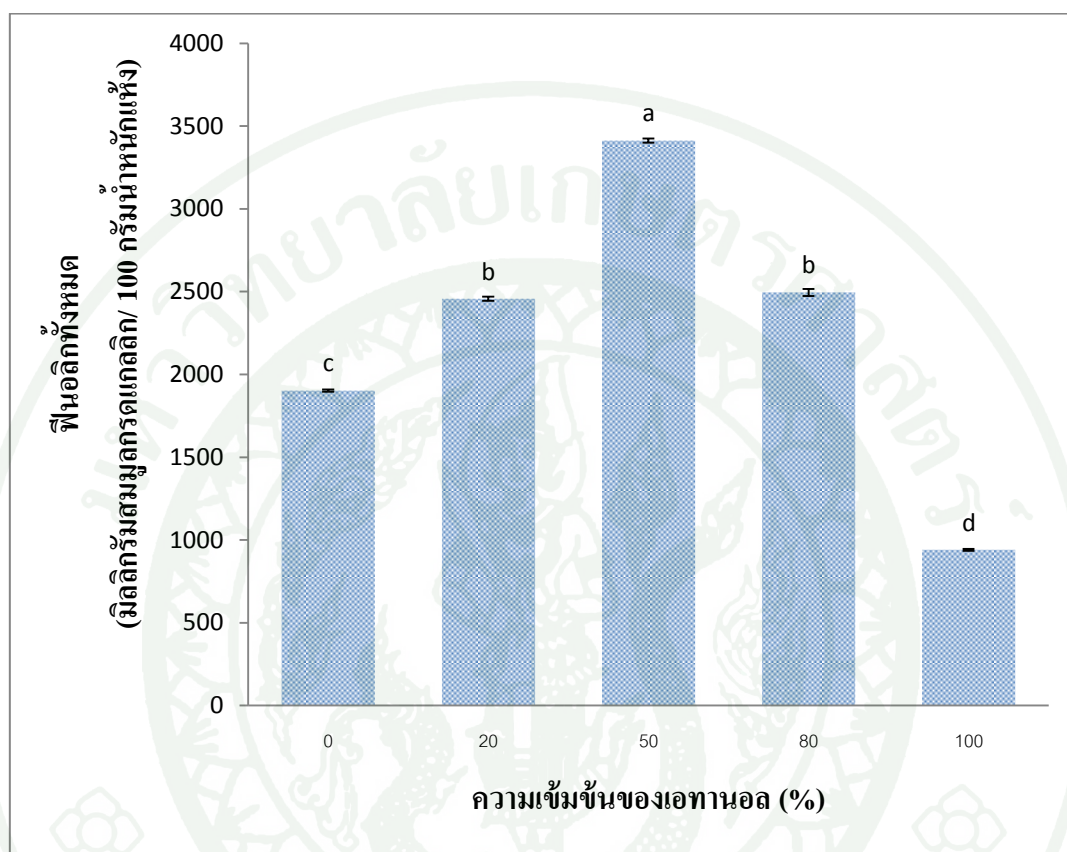


ภาพที่ 26 ปริมาณแอนโรไซยานินส์ของสารสกัดจากลูกหม่อนที่สกัดโดยเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ

หมายเหตุข้อมูลแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย และตัวอักษร a-d ที่แตกต่างกัน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

จากการศึกษาผลของความเข้มข้นของตัวทำละลายในการสกัดต่อปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด โดยใช้ความเข้มข้นของเอทานอลร้อยละ 100, 80, 50, 20 และ 0 พบว่าเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 สามารถสกัดสารประกอบฟีนอลิกได้มากที่สุด โดยมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด $3,411.7 \pm 12.5$ มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งแตกต่างกับความเข้มข้นอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) (ภาพที่ 27) รองลงมาคือ ร้อยละ 80 และ ร้อยละ 20 มีค่า $2,495.6 \pm 21.5$ และ $2,457.2 \pm 13.1$ มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับรายงานของ Zhao and Hall (2008) ที่พบว่าเอทานอลความเข้มข้น 40-60% มีประสิทธิภาพใน

การสกัดสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากลูกเกดสูงที่สุด ($p \leq 0.05$) เมื่อเทียบกับการใช้น้ำและเอทานอลเข้มข้น 80 และ 100% เป็นตัวทำละลาย

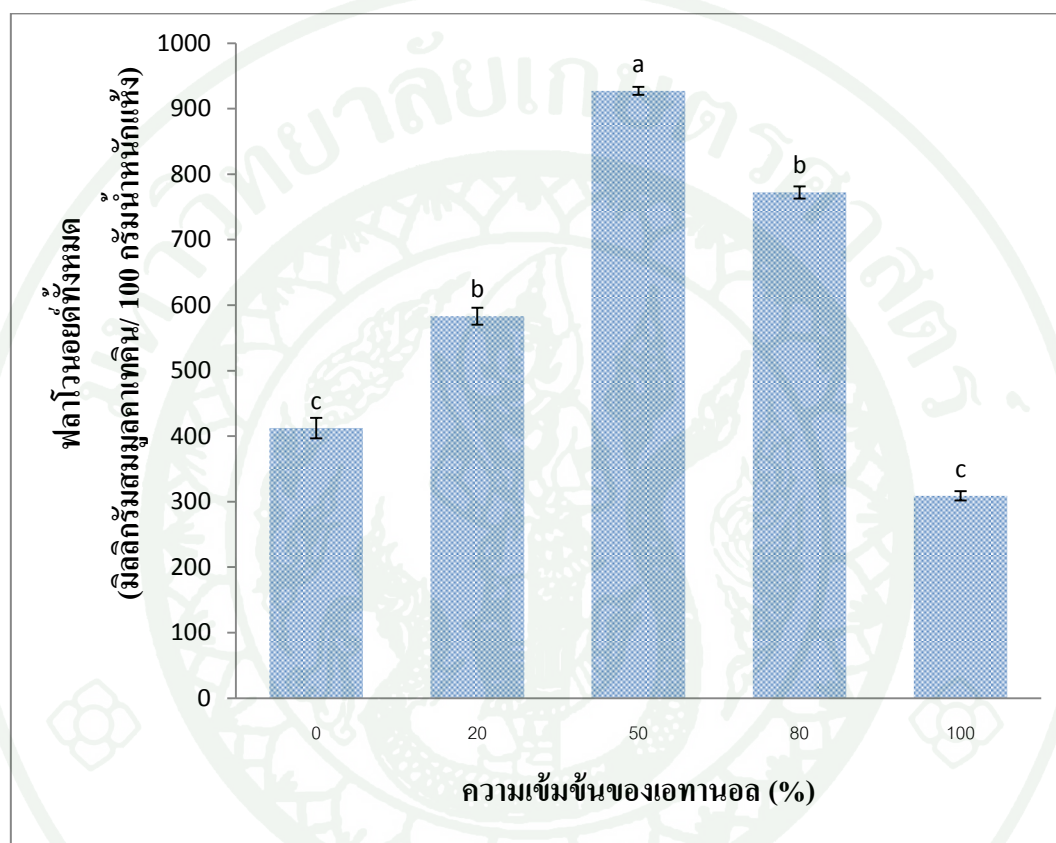


ภาพที่ 27 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากลูกหม่อนที่สกัดโดยเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ

หมายเหตุข้อมูลแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย และตัวอักษร a-d ที่แตกต่างกัน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

จากการศึกษาผลของความเข้มข้นของตัวทำละลายในการสกัดต่อปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดโดยใช้ความเข้มข้นของเอทานอลร้อยละ 100, 80, 50, 20 และ 0 พบว่าปริมาณของฟลาโวนอยด์ทั้งหมดจากสารสกัดจากลูกหม่อนที่สกัดโดยตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 เท่ากับ 927.1 ± 6.2 มิลลิกรัมสมมูลคาเท킨ต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง รองลงมาคือ ความเข้มข้นร้อยละ 20 และความเข้มข้นร้อยละ 80 เท่ากับ 583.0 ± 13.1 และ 771.8 ± 9.3 มิลลิกรัมสมมูลคาเท킨ต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ โดยที่ความเข้มข้นร้อยละ 0 และ ร้อยละ 100 มีค่าน้อย

ที่สุด เท่ากับ 412.3 ± 15.5 และ 308.9 ± 7.2 มิลลิกรัมสมมูลคาเทคินต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ($p \leq 0.05$) (ภาพที่ 28) ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับรายงานของ Xu *et al.* (2005) ที่พบว่าปริมาณฟลาโวนอยด์ในการสกัดจากราสเบอร์รี่แดง (Red raspberry) จะเพิ่มขึ้น และเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเมื่อความเข้มข้นของเอทานอลมากกว่า 75%

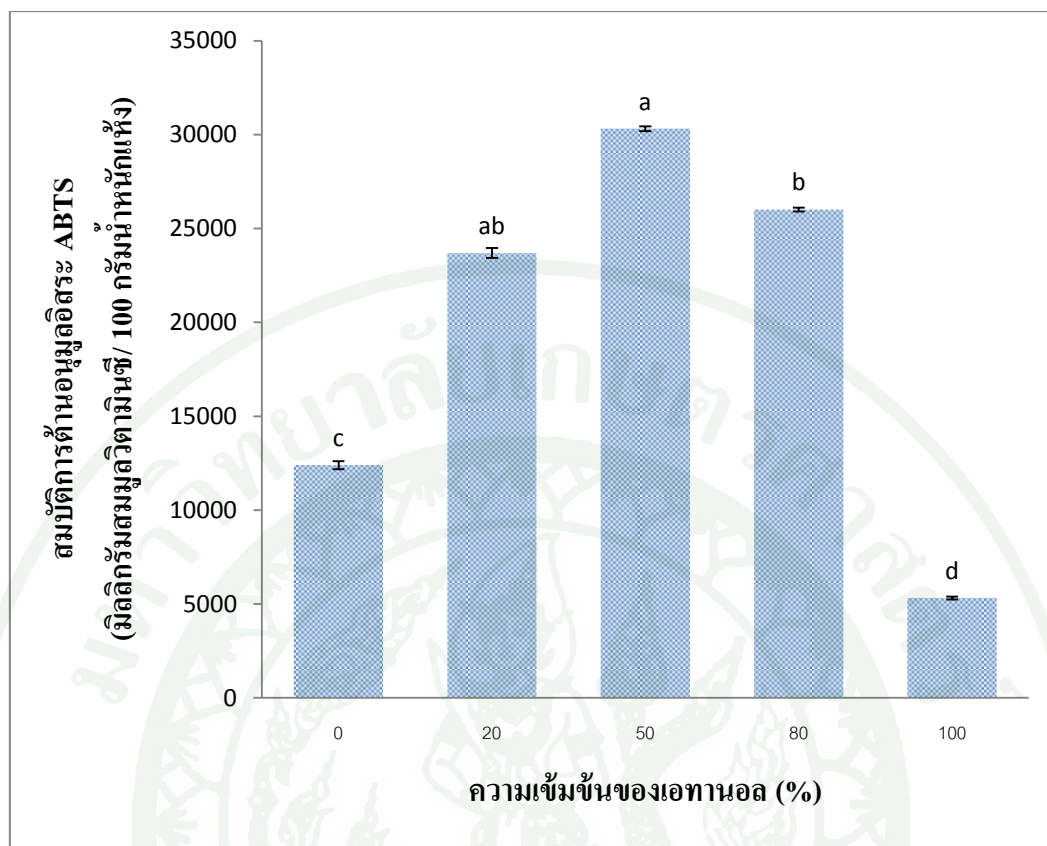


ภาพที่ 28 ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดจากลูกหม่อนที่สกัดโดยเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ

หมายเหตุข้อมูลแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย และตัวอักษร a-c ที่แตกต่างกัน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

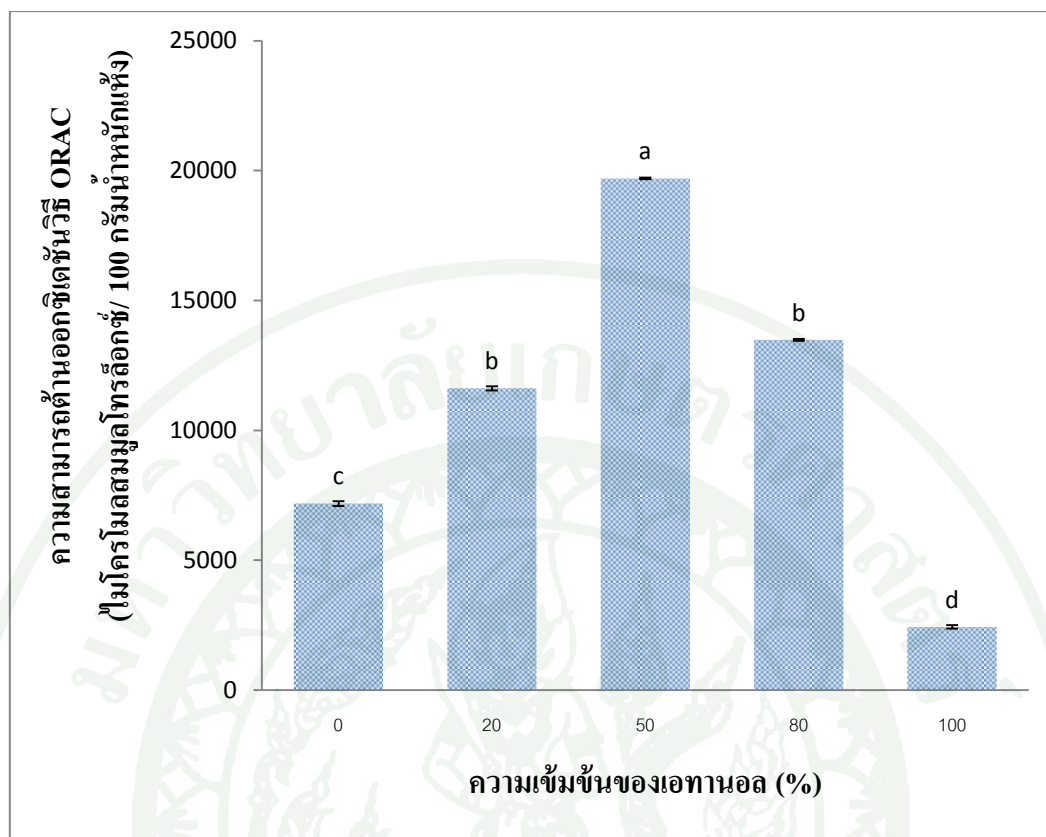
จากการศึกษาผลของความเข้มข้นของตัวทำละลายในการสกัดต่อสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ABTS โดยใช้ความเข้มข้นของเอทานอลล้อยละ 100, 80, 50, 20 และ 0 ดังแสดงในภาพที่ 29 พบว่าสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ABTS มีค่า $5,313.6 \pm 70.4$, $26,006.7 \pm 102.5$, $30,312.7 \pm 132.8$,

23,694.9 $\pm$ 267.9 และ 12,393.9 $\pm$ 215.8 มิลลิกรัมสมมูลวิตามินซีต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ โดยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 และ 80 มีค่ามากที่สุดและแตกต่างกับความเข้มข้นอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) การตรวจสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ABTS เป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว สามารถทำได้ในช่วง pH ที่กว้าง นอกจากนั้นอนุมูลอิสระ ABTS ยังสามารถละลายได้ทั้งในน้ำ และตัวทำละลายอินทรีย์ ดังนั้นจึงสามารถศึกษาได้ในตัวทำละลายที่หลากหลายทั้งในสารสกัดที่ละลายในน้ำมัน และในน้ำ (Awika *et al.*, 2003) ซึ่งวิธีนี้เป็นการทดสอบความสามารถของสารในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานซึ่งในการศึกษานี้ใช้กรดแอสคอร์บิก หรือวิตามินซี โดยถ้าค่าดังกล่าวมีค่ามาก แสดงว่าสารนั้นมีสมบัติในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ได้ดี ส่วนผลของความเข้มข้นของตัวทำละลายในการสกัดต่อความสามารถด้านออกซิเดชันโดยวิธี ORAC โดยใช้ความเข้มข้นของเอทานอลร้อยละ 100, 80, 50, 20 และ 0 พบว่าความสามารถด้านออกซิเดชันโดยวิธี ORAC ดังแสดงในภาพที่ 30 มีค่า 2,432.1 $\pm$ 65.1, 13,484.3 $\pm$ 33.5, 19,698.2 $\pm$ 31.8, 11,617.2 $\pm$ 79.2 และ 7,182.1 $\pm$ 93.7 ไมโครโมลสมมูลโทรลล็อกซ์ต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ โดยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 มีค่ามากที่สุดและแตกต่างกับความเข้มข้นอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับรายงานทางวิชาการที่ผ่านมาศึกษาใน เปลือกองุ่น (Corrales *et al.*, 2009) และ กาการาสเบอร์รี่ (Laroze *et al.*, 2010a) ที่พบว่า การใช้เอทานอลที่ความเข้มข้น 50% สกัดกาการาสเบอร์รี่ให้สารสกัดที่มีสมบัติการต้านออกซิเดชันสูงที่สุด ทั้งการตรวจสอบ สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ABTS และ ความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยวิธี ORAC นอกจากนี้ Jia *et al.* (2011) ยังรายงานว่าเมื่อใช้เอทานอลความเข้มข้น 40% ในการสกัดแบล็กเบอร์รี่ สามารถแสดงสมบัติการต้านออกซิเดชันได้ดีที่สุดเช่นกัน



ภาพที่ 29 สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดจากลูกหม่อนที่สกัดโดยเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ

หมายเหตุ ข้อมูลแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย และตัวอักษร a-d ที่แตกต่างกัน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)



ภาพที่ 30 ความสามารถต้านออกซิเดชันโดยวิธี ORAC ของสารสกัดจากลูกหม่อนที่สกัดโดยเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ

หมายเหตุ ข้อมูลแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย และตัวอักษร a-d ที่แตกต่างกัน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

จากข้อมูลทั้งหมด กล่าวได้ว่าความเข้มข้นของเอทานอลที่ร้อยละ 50 มีประสิทธิภาพในการสกัดจากลูกหม่อนมากที่สุด มีปริมาณแอนโทไซยานินส์ทั้งหมด $1,192.5 \pm 8.7$ มิลลิกรัมสมมูลไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด $3,411.7 \pm 12.5$ มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด 927.1 ± 6.3 มิลลิกรัมสมมูลของคาเทคินต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ABTS $30,312.7 \pm 132.8$ มิลลิกรัมสมมูลของวิตามินซีต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง และความสามารถต้านออกซิเดชันวิธี ORAC $19,698.2 \pm 31.8$ ไมโครโมลสมมูลทอร็อกซ์ต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง ซึ่งมีความแตกต่างกันทาง

สถิติ ($p \leq 0.05$) กับความเข้มข้นอื่นๆ จึงเลือกเอทานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 50 มาใช้ในการศึกษาต่อไป

ตารางที่ 12 ค่าสหสัมพันธ์ (Correlation coefficient) ของสารประกอบฟีนอลิกและคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากลูกหม่อน

	TF	TP	ABTS	ORAC
TA	0.995**	0.926*	0.969**	0.967**
TF		0.942*	0.958*	0.979**
TP			0.961**	0.989**
ABTS				0.968**

หมายเหตุ * แสดงความสัมพันธ์ที่ความเชื่อมั่น 95% ** แสดงความสัมพันธ์ที่ความเชื่อมั่น 99%
โดยวิธี Pearson correlation (Total anthocyanins (TA) = ปริมาณแอนโธไซยานินส์ทั้งหมด Total flavonoids (TF) = ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด Total phenolics (TP) = ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ABTS = สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ABTS และ ORAC = ความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยวิธี ORAC)

จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของสารประกอบฟีนอลิกที่พบในกากลูกหม่อนและคุณสมบัติการต้านออกซิเดชัน โดยพิจารณาเป็นคู่ ดังแสดงในตารางที่ 12 พบว่าเมื่อพิจารณาปริมาณแอนโธไซยานินส์ทั้งหมด พบว่ามีความสัมพันธ์กับปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99% และมีความสัมพันธ์กับปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยมีความสัมพันธ์ในเชิงบวกและมีระดับสูง เนื่องจากในสารสกัดจากลูกหม่อนนั้น สารสำคัญส่วนใหญ่คือแอนโธไซยานินส์ซึ่งเป็นสารประกอบในกลุ่มฟีนอลิก และมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ผลการทดลองสอดคล้องกับตัวอย่างผลไม้อื่นๆ เช่น สตรอเบอร์รี่ เอลเดอร์เบอร์รี่ บลูเบอร์รี่ในชิลี (Guerrero *et al.*, 2010) เบอร์รี่ท้องถิ่นชนิดต่างๆ ในอเมริกาเหนือ ที่พบว่าแอนโธไซยานินส์มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Lee *et al.*, 2004)

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ของความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยวิธี ORAC ต่อสารสำคัญในกากลูกหม่อน พบว่ามีความสัมพันธ์เชิงบวกกับปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ฟลาโวนอยด์เป็นสารประกอบในกลุ่มฟีนอลิก ซึ่งมีคุณสมบัติในการต้านออกซิเดชันที่ดี เนื่องจากโครงสร้างทางเคมีของฟลาโวนอยด์สามารถให้อิเล็กตรอนหรือไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระ ทำให้เกิดเป็นอนุมูลอิสระที่มีความคงตัวมากขึ้น จึงช่วยยับยั้ง หรือชะลอปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (Cook and Sanman, 1996)

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ของสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ต่อสารประกอบฟีนอลิกในกากลูกหม่อน พบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างสูงกับสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ABTS เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกมีความสามารถในการแสดงสมบัติการต้านออกซิเจนด้วยกลไกการยับยั้งการทำงานของออกซิเจนอะตอมเดี่ยว (Singlet oxygen quenching) โดยจะให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระในสารโพลีโน-ซีโอเคาทุ และแสดงกลไกการกำจัดอนุมูลอิสระ โดยสารประกอบฟีนอลิกจะเป็นตัวแสดงกลไกในการกำจัดอนุมูลอิสระ (Oktay *et al.*, 2003) เช่นเดียวกับหลักการวัดสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ที่ใช้หลักการวัดการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอนเดี่ยว (Based on single electron transfer (SET) reaction)

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ของสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ABTS พบว่ามีความสัมพันธ์ต่อความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยวิธี ORAC อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99% มีค่า 0.968 เนื่องจากแอนโทไซยานินส์มีสมบัติในการต้านการเกิดออกซิเดชัน ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองในมันเทศม่วง (Teow *et al.*, 2007) ข้าวฟ่าง (Awika *et al.*, 2003) และสารสกัดจากผลไม้ต่างๆ (Leong and Shui, 2001) ล้วนแล้วแสดงค่าความสัมพันธ์ของความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS อนุมูลอิสระ DPPH และความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยวิธี ORAC ทั้งสิ้น แสดงให้เห็นว่าทั้ง 3 วิธีนี้สามารถใช้ในการทำนายความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันได้ (Teow *et al.*, 2007)

การที่ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแอนโทไซยานินส์ทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ABTS และความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยวิธี ORAC มีค่าสูงแสดงให้เห็นว่า แอนโทไซยานินส์ ฟลาโวนอยด์ และสารประกอบฟีนอลิก เป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญในสารสกัดกากลูกหม่อน ซึ่งสอดคล้องกับ Du *et al.* (2009) ได้กล่าวไว้ว่านอกจากวิตามินซีแล้ว สารประกอบฟีนอลิกและ

ฟลาโวนอยด์จัดเป็นสารสำคัญในการทำน้ำที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระในผักและผลไม้ โดยสารประกอบฟีนอลิกจะให้ไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ส่งผลให้อนุมูลอิสระดังกล่าวถูกยับยั้งปฏิกิริยาและมีความเสถียรขึ้น (Bravo, 1998) นอกจากนี้ สารประกอบฟีนอลิกยังมีสมบัติต้านออกซิเดชันโดยสามารถจ่ายอิเล็กตรอนให้แก่สารอื่น จับกับโลหะหนักให้ไฮโดรเจนและยับยั้ง Singlet oxygen ซึ่งเป็นปัจจัยที่ก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (พิชญ์อร, 2547)

4. ผลของอุณหภูมิ และความเป็นกรด-ด่างต่อความคงตัวของแอนโธไซยานินสีในสารสกัดจากลูกหม่อนแห้ง

เมื่อสกัดจากลูกหม่อนด้วยตัวทำละลายเอทานอล 50% และนำมาทำแห้งได้เป็นสารสกัดจากลูกหม่อนแห้ง (ภาพที่ 31) ได้ผลผลิตร้อยละ (Percent yield) เท่ากับ $28.5 \pm 0.24\%$ ของกากลูกหม่อนแห้ง และมีปริมาณความชื้นร้อยละ 13.3 ± 0.1 ซึ่งมีรายงานผลผลิตร้อยละของการสกัดสารสำคัญจากวัตถุดิบเหลือทิ้งในอุตสาหกรรมดังนี้ กากองุ่นสกัดโดยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 80 ได้ผลผลิต 42% (น้ำหนักแห้ง) การที่ผลผลิตของสารสกัดฟีนอลในกากองุ่นมีปริมาณมากนั้นสัมพันธ์กับการที่ผนังเซลล์ของพืชถูกทำลายเนื่องจากเอนไซม์เพคตินเอส และเซลลูเลส (Lu and Foo, 1999) สารสกัดจากเมล็ดองุ่น สกัดโดยเอทิลอะซิเตต และเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 20 ได้ผลผลิต 22.78% (น้ำหนักแห้ง) (Yamaguchi *et al.*, 1999) ในขณะที่สารสกัดจากรำข้าวสาลี durum (Durum wheat bran) สกัดโดยเอทานอล ได้ผลผลิต 12.1% (น้ำหนักแห้ง) (Onyencho and Hettiarachchy, 1992)



ภาพที่ 31 สารสกัดจากลูกหม่อนแห้ง

อย่างไรก็ตาม ปัญหาของสารสกัดกากลูกหม่อนแห้งนี้ คือ หากโดนอากาศภายนอกแล้วจะเหนียว ติดกันเป็นก้อน ซึ่งสามารถเกิดได้ง่ายกับวัสดุที่มีสมบัติดูดความชื้นกลับได้ (Hygroscopic material) ซึ่งสารสกัดกากลูกหม่อนแห้งนี้มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ อาจอยู่ในรูปแบบอสัณฐาน (Amorphous) ที่ไม่เสถียร และพยายามจะเปลี่ยนรูปร่างให้เสถียร คืออยู่ในรูปของผลึก (Crystal) โดยโมเลกุลเคลื่อนที่เข้ามาใกล้กัน ทำให้ผงเล็กๆดูดความชื้นเข้าไปในโครงสร้างโดยเฉพาะพื้นผิวเชื่อมให้ผงเกาะติดกัน อุณหภูมิสูงขึ้นจะเร่งให้การเกาะติดกันได้เร็วขึ้น ซึ่งพิจารณาได้จาก Water sorption isotherm (นิธิยา, 2544; Adhikari *et al.*, 2004; Bhandary *et al.*, 1997; Cano-Chauca *et al.*, 2004)

สารประกอบฟีนอลิก และคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันของสารสกัดกากลูกหม่อนแห้ง ได้แก่ ปริมาณแอนโทไซยานินส์ทั้งหมด ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด สมบัติการต้านอนุมูลอิสระDPPH และความสามารถต้านออกซิเดชันที่วัดด้วยวิธี ORAC แสดงในตารางที่ 13

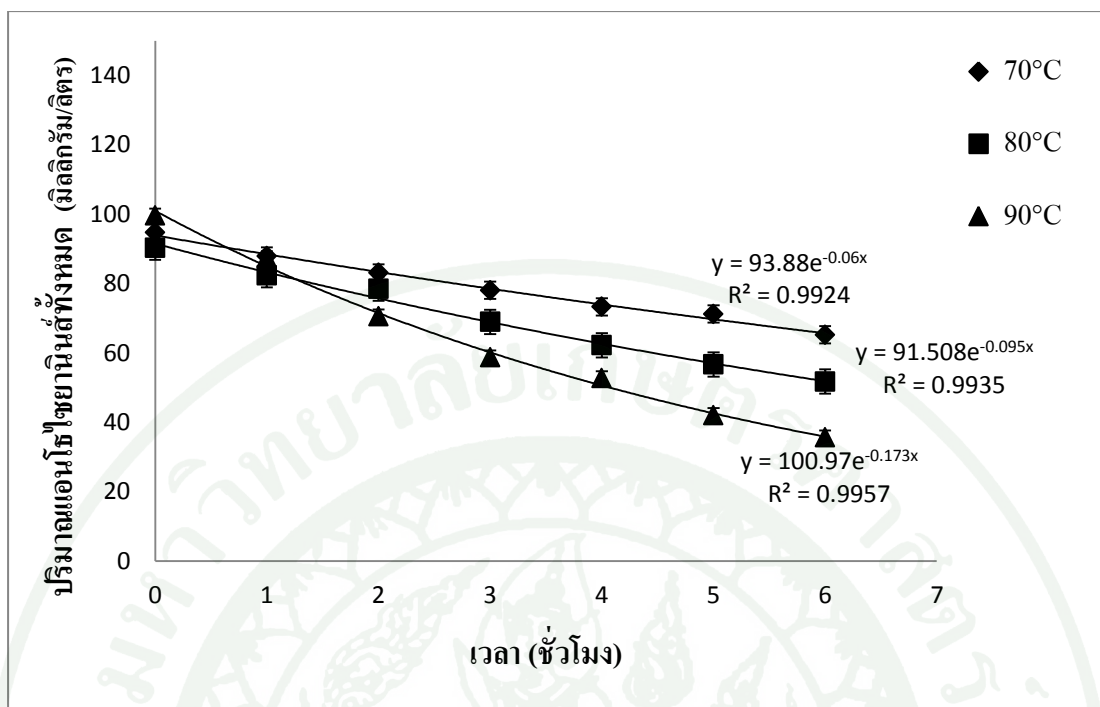
ตารางที่ 13 สารประกอบฟีนอลิกและคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันของสารสกัดกากลูกหม่อนแห้ง

สารประกอบฟีนอลิก และคุณสมบัติการต้านออกซิเดชัน	ปริมาณ
ปริมาณแอนโทไซยานินส์ทั้งหมด (มิลลิกรัมสมมูลไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง)	2,228.2 ± 28.5
ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง)	6,360.3 ± 82.4
ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (มิลลิกรัมสมมูลของคาเท킨ต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง)	3,434.1 ± 5.97
สมบัติการต้านอนุมูลอิสระDPPH (มิลลิกรัมสมมูลของวิตามินซี/100 กรัม น้ำหนักแห้ง)	4,668.2 ± 33.5
ความสามารถต้านออกซิเดชันวิธี ORAC (ไมโครโมลสมมูลโทรลออกไซด์ต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง)	11,121.9 ± 55.0

หมายเหตุ ข้อมูลแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากการศึกษาของ Laroze *et al.* (2010b) พบว่าปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดใน สารสกัดจากกราสเบอร์รี่ กากแครนเบอร์รี่และกากบลูเบอร์รี่ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล กับน้ำมีปริมาณ ตั้งแต่ 16.0 ถึง 26.5 กรัมสมมูลต่อ 100 กรัมสารสกัด และสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ DPPH มีค่าระหว่าง 0.5 ถึง 4.0 กรัมต่อลิตร ปัจจัยที่มีผลต่อการแสดงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ เช่น คุณภาพของวัตถุดิบตัวอย่างเริ่มต้น แหล่งของวัตถุดิบ สภาพภูมิอากาศ วันที่เก็บเกี่ยว และการเก็บรักษา (Moure *et al.*, 2001; Hagerman *et al.*, 1998) นอกจากนี้ยังมีรายงาน ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดลูกหม่อน (Black mulberry) ที่สกัดด้วยเมทานอลปรับกรด น้ำปรับกรด และ เมทานอลผสมน้ำ มีค่า 555, 462 และ 332 ไมโครกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมของสารสกัด ตามลำดับ ทั้งนี้การเติมกรดในตัวทำละลายจะช่วยให้สารประกอบฟีนอลคงตัวมากขึ้น แต่ไม่ได้ช่วยให้ประสิทธิภาพในการสกัดสารประกอบฟีนอลเพิ่มขึ้น (Kutlu *et al.*, 2011)

การศึกษาความคงตัวของอนุมูลของแอนโธไซยานินส์ในสารสกัดจากลูกหม่อนแห้งโดยการให้ความร้อน ณ อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลานาน 6 ชั่วโมง พบว่าการสลายตัวของแอนโธไซยานินส์เป็นไปตามอัตราการเกิดปฏิกิริยาอันดับที่หนึ่ง โดยเมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง สารสกัดจากลูกหม่อน (ความเป็นกรด-ด่าง 2.5) ที่ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70, 80, 90 องศาเซลเซียส มีการสลายตัวของแอนโธไซยานินส์ ดังแสดงในภาพที่ 32 โดยสารสกัดที่ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จะมีปริมาณแอนโธไซยานินส์สูงสุดตลอดระยะเวลา 6 ชั่วโมง รองลงมาคืออุณหภูมิ 80 และ 90 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ผลการทดลองเป็นไปในทิศทางเดียวกันทั้งที่ความเป็นกรด-ด่าง 2.5, 4.0, 6.0 และ 7.5 ดังแสดงในภาพผนวกที่ 14-16



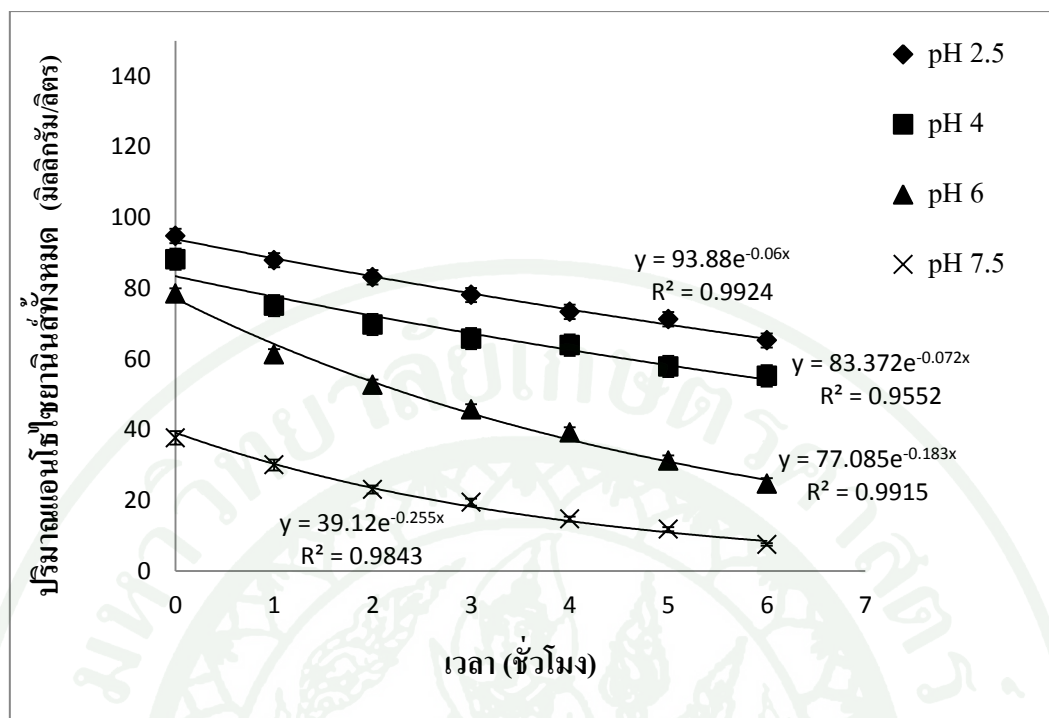
ภาพที่ 32 การสลายตัวของแอนโธไซยานินส์ของสารสกัดจากลูกหม่อนแห้งที่อุณหภูมิต่างๆ (ที่ pH 2.5)

การที่แอนโธไซยานินส์มีการสลายตัวมากขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นนั้นเนื่องมาจากอุณหภูมิเป็นปัจจัยที่ทำให้โครงสร้างของแอนโธไซยานินส์เกิดการเปลี่ยนแปลงโดยที่อุณหภูมิสูงจะเร่งการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลเซชัน (Hydrolyzation) ของ Glycoside ที่ตำแหน่งที่ 3 ทำให้ Flavylium cation เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไปเป็น Chalcone ซึ่งเป็นโครงสร้างที่มีความคงตัวน้อย (Laleh *et al.*, 2006) จึงส่งผลให้แอนโธไซยานินส์มีความคงตัวลดลงสอดคล้องกับรายงานของ Laleh *et al.* (2006) และ Kirca *et al.* (2007) ที่ทำการศึกษาใน *berberis plant* และแครอทม่วง (Black carrot) พบว่าการสลายตัวของแอนโธไซยานินส์เพิ่มขึ้นเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงขึ้น และ Wang and Xu (2007) ที่ศึกษาผลของอุณหภูมิและเวลาต่ออัตราการสลายตัวของแอนโธไซยานินส์ในน้ำแบล็คเบอร์รี่ที่มีแอนโธไซยานินส์เป็นองค์ประกอบหลัก ก็เป็นไปในทิศทางเดียวกัน

ในส่วนของความคงตัวต่อความเป็นกรด-ด่างของแอนโธไซยานินส์ในสารสกัดจากลูกหม่อนแห้งดังแสดงในภาพที่ 33 พบว่าการสลายตัวของแอนโธไซยานินส์มากขึ้นเมื่อความเป็นกรด-ด่างเพิ่มขึ้น โดยเมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง (ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส) สารสกัดจากลูกหม่อนแห้งที่มีความเป็นกรด-ด่าง 2.5 มีปริมาณแอนโธไซยานินส์สูงสุดตลอดระยะเวลา 6 ชั่วโมง

รองลงมาคือที่ความเป็นกรด-ด่าง 4.0, 6.0 และ 7.5 ตามลำดับ ผลการทดลองเป็นไปในทิศทางเดียวกันทั้งที่อุณหภูมิ 80 และ 90 องศาเซลเซียส

การสลายตัวของแอนโทไซยานินส์เพิ่มขึ้นเมื่อความเป็นกรด-ด่างเพิ่มมากขึ้น เพราะโครงสร้างของแอนโทไซยานินส์ในสถานะที่เป็นกรดมีความคงตัวมากกว่าในสถานะที่เป็นกลางหรือด่าง (Bae and Suh, 2007 และ Markakis, 1982) ดังนั้นแอนโทไซยานินส์ในสารสกัดจากลูกหม่อนแห้งที่มีความเป็นกรด-ด่าง 2.5 จึงเกิดการสลายตัวช้าที่สุดในระหว่างการให้ความร้อน ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับรายงานของ Kirca *et al.* (2007) พบว่าแอนโทไซยานินส์ของแครอทม่วง (Black carrot) เกิดการสลายตัวมากขึ้นเมื่อความเป็นกรด-ด่างเพิ่มขึ้นในระหว่างที่ให้ความร้อน ณ อุณหภูมิต่างๆ ทั้งนี้ที่ความเป็นกรด-ด่างต่ำกว่า 2 แอนโทไซยานินส์อยู่ในรูปของ Flavylium cation (สีแดง) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่มีความคงตัว แต่เมื่อความเป็นกรด-ด่างเพิ่มขึ้น Flavylium cation จะอยู่ในสถานะที่ไม่คงตัวซึ่งจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไปเป็น Colorless pseudobase (ไม่มีสี) ที่ความเป็นกรด-ด่าง 4.5, Quinoidal base (สีน้ำเงิน) ที่ความเป็นกรด-ด่าง 6-7 และ chalcone (สีเหลืองอ่อน-ไม่มีสี) ที่ความเป็นกรด-ด่างมากกว่า 7 (Markakis, 1982 และ Stintzing and Carle, 2004)



ภาพที่ 33 การสลายตัวของแอนไฮไดรด์ไซยาไนด์ของสารสกัดจากลูกหม่อนแห้งที่ pH ต่างๆ (ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส)

เมื่อพิจารณาที่ความเป็นกรด-ด่าง 7.5 พบว่าปริมาณแอนไฮไดรด์ไซยาไนด์เริ่มต้นมีค่าน้อยกว่าที่ความเป็นกรด-ด่าง 2.5, 4.0 และ 6.0 (ภาพที่ 33) เนื่องจากแอนไฮไดรด์ไซยาไนด์ส่วนมากอยู่ในรูปของ Chalcone ซึ่งเป็นโครงสร้างที่มีความคงตัวน้อย (Markakis, 1982) จึงอาจเกิดการสลายตัวอย่างรวดเร็วทำให้มีปริมาณแอนไฮไดรด์ไซยาไนด์เริ่มต้นน้อยกว่าที่ความเป็นกรด-ด่างอื่นๆ

ตารางที่ 14 สมการอัตรา และค่า R^2 ของการเปลี่ยนแปลงปริมาณแอนโรไซยานินส์ในสารสกัดจากลูกหม่อนแห้งระหว่างการให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ

สมการอันดับที่	สมการอัตรา	อุณหภูมิ	$y = mx+b$	R^2
n = 0	$C_t = -k t + C_0$	70 °C	$y = -0.0497x + 0.9835$	0.9874
		80 °C	$y = -0.0725x + 0.9938$	0.9924
		90 °C	$y = -0.1147x + 0.9654$	0.9832
n = 1	$\ln (C_t / C_0) = -k t$	70 °C	$y = -0.0596x - 0.0094$	0.9924
		80 °C	$y = -0.0947x + 0.0128$	0.9935
		90 °C	$y = -0.1926x + 0.0294$	0.9977
n = 2	$1/(C_t / C_0) = k t$	70 °C	$y = 0.072x + 0.9994$	0.9905
		80 °C	$y = 0.1261x + 0.9571$	0.9842
		90 °C	$y = 0.3526x + 0.8061$	0.9583

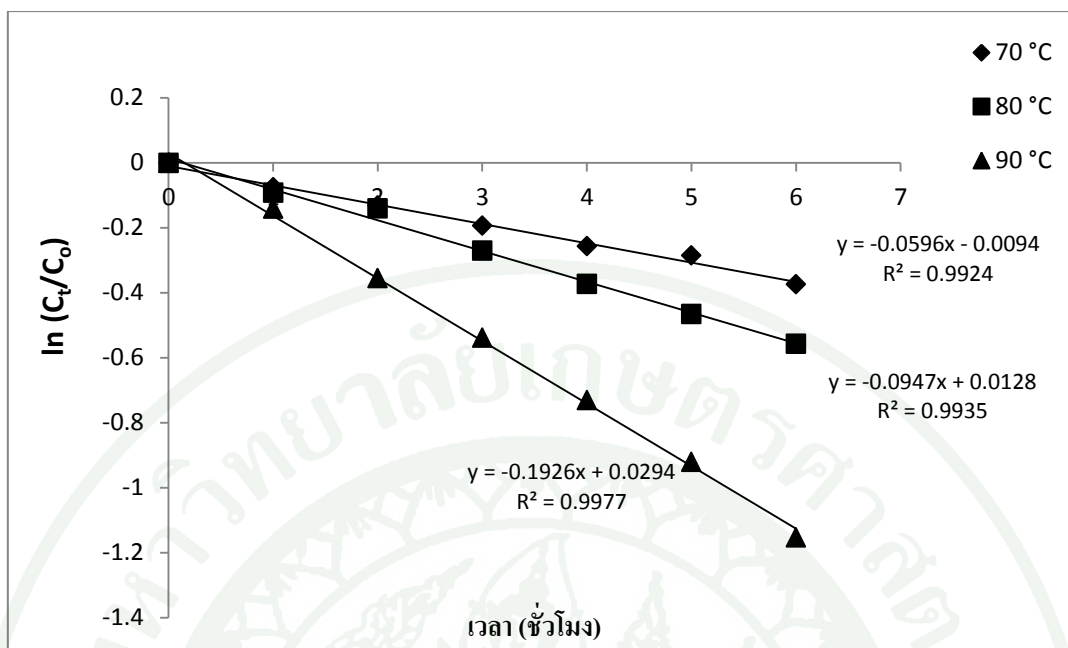
จากการศึกษาความคงตัวของอุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่างของแอนโรไซยานินส์ในสารสกัดจากลูกหม่อนแห้ง เมื่อพิจารณาข้อมูลปริมาณแอนโรไซยานินส์ทั้งหมดที่นำมาสร้างกราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแอนโรไซยานินส์ทั้งหมดที่ลดลง C_t/C_0 กับเวลา (ภาพผนวกที่ 17), $\ln (C_t/C_0)$ กับเวลา (ภาพที่ 34) และ $1/(C_t/C_0)$ กับเวลา (ภาพผนวกที่ 18) (เมื่อ C_t คือปริมาณแอนโรไซยานินส์ทั้งหมด ณ เวลาใดๆ และ C_0 คือปริมาณแอนโรไซยานินส์ทั้งหมด ณ จุดเริ่มต้น) เพื่อทดสอบอัตราการสลายตัวของแอนโรไซยานินส์ว่าเป็นอันดับที่ 0, 1 หรือ 2 ตามลำดับ พบว่ากราฟ $\ln (C_t/C_0)$ กับเวลา มีค่า r^2 มากที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 14 จึงกล่าวได้ว่าการสลายตัวของแอนโรไซยานินส์เป็นแบบปฏิกิริยาอันดับที่ 1 ซึ่งจากกราฟจะได้ค่าความชันเป็นค่าคงที่ของอัตราการเกิดปฏิกิริยาอันดับที่หนึ่ง ($-k$) ตามสมการ $\ln (C_t/C_0) = -k x t$ นอกจากนี้ยังสามารถหาค่าครึ่งชีวิต ($t_{1/2}$) ของแอนโรไซยานินส์ได้ จากการคำนวณตามสมการ $t_{1/2} = -\ln 0.5 \times k^{-1}$ ดังแสดงในตารางที่ 15

เมื่อพิจารณาที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่าค่าคงที่อัตราการเกิดปฏิกิริยาอันดับที่หนึ่งมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น แสดงให้เห็นว่าแอนโรไซยานินส์มีอัตราการสลายตัวเพิ่มขึ้น ส่งผลทำให้ครึ่งชีวิตมีค่าน้อยลง และเมื่อพิจารณาที่ความเป็นกรด-ด่างต่างๆ พบว่าที่ความเป็นกรด-ด่าง 2.5 มี

ค่าคงที่ของอัตราการเกิดปฏิกิริยาอันดับหนึ่งน้อยที่สุด (ที่อุณหภูมิ 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส) นั้นคือมีอัตราการสลายตัวของแอนโซไซยานินส์ซ้าที่สุด ทำให้ความเป็นกรด-ด่าง 2.5 มีค่าครึ่งชีวิตมากที่สุด รองลงมาคือที่ความเป็นกรด-ด่าง 4.0, 6.0 และ 7.5 ตามลำดับ

ตารางที่ 15 ตัวแปรจลนพลศาสตร์ (Kinetic parameter) ค่าคงที่อัตราการเกิดปฏิกิริยาอันดับที่หนึ่ง และค่าครึ่งชีวิตของสารสกัดจากลูกหม่อนแห้งที่สภาวะต่างๆ ในซีเตรท-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์

pH	อุณหภูมิ	k (hour ⁻¹)	t _{1/2} (hour)	E _a (kJ/mol)
2.5	70	0.0596	11.6	60.6
	80	0.0947	7.3	
	90	0.1926	3.6	
4.0	70	0.0719	9.6	57.2
	80	0.1482	4.7	
	90	0.2161	3.2	
6.0	70	0.1826	3.8	20.5
	80	0.2565	2.7	
	90	0.2708	2.6	
7.5	70	0.1916	3.6	28.1
	80	0.2550	2.7	
	90	0.3294	2.1	



ภาพที่ 34 ค่า $\ln (C/C_0)$ ของปริมาณแอนโทไซยานินส์ของสารสกัดจากลูกหม่อนแห้งระหว่างการให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ ปฏิกริยาอันดับ 1 (ที่ pH 2.5)

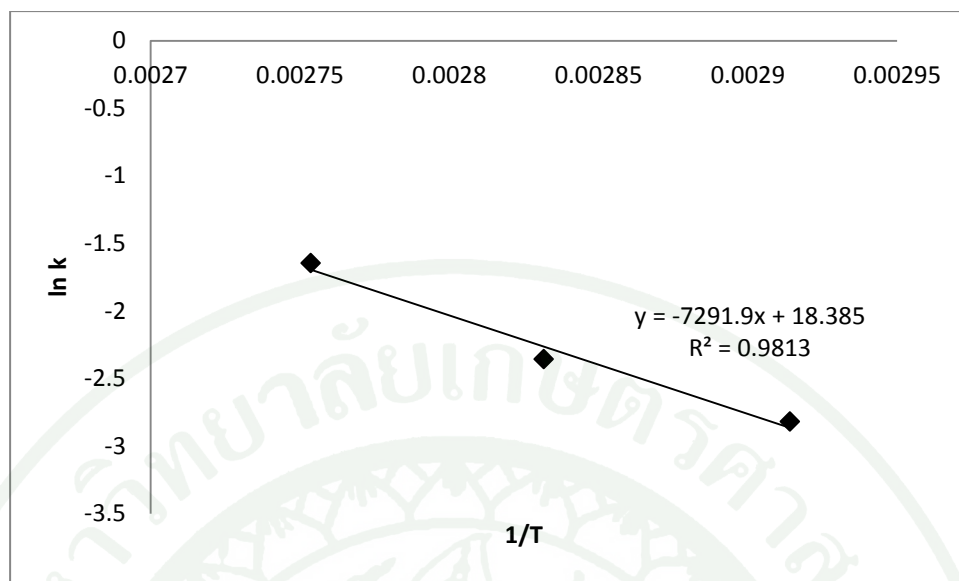


ภาพที่ 35 ตัวอย่างสารสกัดจากลูกหม่อนแห้งที่ความเป็นกรด-ด่างต่างๆ (pH 2.5, 4.0, 6.0 และ 7.5)

ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับรายงานของ Kirca *et al.* (2007) ที่พบว่าค่าคงที่ของอัตราการสลายตัวของแอนโทไซยานินส์ในแครอทม่วง (Black carrot) มีค่าเพิ่มขึ้นและมีค่าครึ่งชีวิตลดลงเมื่ออุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่างสูงขึ้น โดยที่ 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 2.5 ค่าครึ่งชีวิตของแครอทม่วงเท่ากับ 25.1, 12.6 และ 5.6 ตามลำดับ ในขณะที่ค่าครึ่งชีวิตของแอนโทไซยานินส์ของสารสกัดจากลูกหม่อนแห้งเท่ากับ 11.6, 7.3 และ 3.6 ตามลำดับ การที่

แอนโรไซยานินส์ในแครอทม่วงมีความคงตัวมากกว่าสารสกัดจากลูกหม่อนแห้ง อาจเนื่องมาจาก ชนิดแอนโรไซยานินส์และสารประกอบฟีนอลิกแตกต่างกันในผลไม้ต่างชนิดกัน อาจมีผลต่อความ คงตัวของแอนโรไซยานินส์ นอกจากนี้ Wang and Xu (2007) ที่ศึกษาถึงอัตราเร็วของการเกิด ปฏิริยาการสลายตัวของแอนโรไซยานินส์ในน้ำเบสลิเคอร์รี่ที่ความเข้มข้น 8.90 ถึง 65.0 องศา บริกซ์ ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 ถึง 37 องศาเซลเซียส พบว่าอัตราการสลายตัวของ แอนโรไซยานินส์จะแปรผันตามอุณหภูมิและแปรผกผันกับค่าครึ่งชีวิต ($t_{1/2}$)

จากการนำค่า $\ln k$ และ อุณหภูมิ ($1/T$) มาสร้างเป็นกราฟความสัมพันธ์ ดังภาพที่ 36 ความ ชันของกราฟที่ได้ คือ $-E_a/R$ ตามสมการ $k = A \times e^{-E_a/RT}$ เมื่อคำนวณค่าพลังงานกระตุ้น (E_a) ซึ่งเป็น ค่าที่บ่งบอกถึงพลังงานต่ำสุดที่ใช้ในการเกิดปฏิริยาการสลายตัวของแอนโรไซยานินส์ในสารสกัด จากลูกหม่อน พบว่าที่ pH 2.5 มีค่าพลังงานกระตุ้นสูงที่สุด คือ 60.6 kJ/mol รองลงมาคือ 57.2, 28.1 และ 20.5 ที่ pH 4.0, 7.5 และ 6.0 ตามลำดับ กล่าวคือ สารสกัดจากลูกหม่อนที่ pH 6.0 จะเกิด ปฏิริยาการสลายตัวได้ง่ายที่สุด ผลการทดลองเป็นแนวโน้มเดียวกับการศึกษาของ Kirca *et al.* (2007) ที่ศึกษาค่าพลังงานกระตุ้นของแอนโรไซยานินส์ในแครอทม่วงสูงสุดที่ pH 2.5 มีค่า 78.1 kJ/mol รองลงมาคือ 72.4, 72.4, 56.8, 47.4 และ 42.0 kJ/mol ที่ pH 3.0, 4.0, 5.0, 7.0 และ 6.0 ตามลำดับ จะเห็นว่าที่ pH 2.5 มีค่าพลังงานกระตุ้นมากที่สุดและ ที่ pH 6.0 มีค่าพลังงานกระตุ้นน้อย ที่สุดเช่นเดียวกัน นอกจากนี้ยังมีรายงานค่าพลังงานกระตุ้นแอนโรไซยานินส์ในน้ำดอกโทะ (Downy rose-myrtle) มีค่าตั้งแต่ 45.0 kJ/mol (ที่ pH 4.0) ถึง 63.2 kJ/mol (ที่ pH 2.0) (Liu *et al.*, 2013) อย่างไรก็ตามค่าพลังงานกระตุ้นของแอนโรไซยานินส์ในวัตถุดิบที่แตกต่างกัน จะให้ค่า พลังงานกระตุ้นที่แตกต่างกัน (Garzon and Wrolstad, 2002)



ภาพที่ 36 กราฟอาร์เรเนียสของการสลายตัวของแอนโรไซยานินสังเคราะห์สกัดจากลูกหม่อนแห้งระหว่างการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส (ที่ pH 2.5)

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. กรรมวิธีการทำแห้งกากลูกหม่อนด้วยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งและวิธีทำแห้งด้วยลมร้อน ไม่มีผลต่อปริมาณกลุ่มสาร (เต้า เยื่อใยหยาบ โปรตีน ไขมัน ปริมาณความชื้น และ คาร์โบไฮเดรต) ของกากลูกหม่อน ($p > 0.05$) โดยกรรมวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งถือเป็นวิธีที่สามารถคงปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และมีสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้มากกว่าการทำแห้งด้วยลมร้อนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ปริมาณแอนโทไซยานินส์ทั้งหมด และสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ DPPH มีค่าเท่ากับ 4,067.4 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกในตัวอย่าง 100 กรัม น้ำหนักแห้ง 625.0 มิลลิกรัมสมมูลของคาเทคินในตัวอย่าง 100 กรัม น้ำหนักแห้ง 1,927.6 มิลลิกรัมสมมูลไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ในตัวอย่าง 100 กรัม น้ำหนักแห้ง และ 1,360.8 มิลลิกรัมสมมูลของวิตามินซีในตัวอย่าง 100 กรัม น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ

2. เมื่อศึกษาชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกในกากลูกหม่อนโดยเทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC) และเทคนิคการแยกขนาดของมวลด้วยแมสสเปกโตรมิเตอร์ (MS) พบว่าสารประกอบฟีนอลิกชนิดหลักของกากลูกหม่อนหม่อนคือ ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ และไซยานิดิน-3-รูทีโนไซด์ และ เควอซีทิน-3-รูทีโนไซด์ มีปริมาณเท่ากับ 346.5 ± 14.1 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง 273.0 ± 5.7 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง และ 40.3 ± 4.1 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ

3. ความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดเพื่อใช้ในการสกัดกากลูกหม่อนคือ ร้อยละ 50 โดยให้สารสกัดกากลูกหม่อนที่มีปริมาณแอนโทไซยานินส์ทั้งหมด 1,192.5 มิลลิกรัมสมมูลไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด 3,411.7 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด 927.1 มิลลิกรัมสมมูลของคาเทคินต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ABTS มีค่าเท่ากับ 30,312.7 มิลลิกรัมสมมูลของวิตามินซีต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง และความสามารถต้านออกซิเดชันโดยวิธี ORAC มีค่า 19,698.2 ไมโครโมลสมมูลโทร็อกซ์ต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง

4. อุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่างมีผลต่อความคงตัวของแอนโไซยานินส์ในสารสกัดจากลูกหม่อนแห้ง โดยการสลายตัวของแอนโไซยานินส์เป็นไปตามอัตราการเกิดปฏิกิริยาอันดับที่หนึ่ง เมื่ออุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่างเพิ่มขึ้นทำให้มีการสลายตัวของแอนโไซยานินส์มากขึ้น ส่งผลให้ค่าคงที่อัตราการเกิดปฏิกิริยาอันดับที่หนึ่งมีค่าเพิ่มขึ้นในขณะที่ค่าครึ่งชีวิต ($t_{1/2}$) มีค่าลดลง ดังนั้นในการแปรรูปสารสกัดจึงควรหลีกเลี่ยงการใช้อุณหภูมิสูง และผลิตภัณฑ์ควรมีค่าความเป็นกรด-ด่างที่ต่ำ (pH 2.5) เพื่อป้องกันการเสื่อมสลายของแอนโไซยานินส์

ข้อเสนอแนะ

1. จากการศึกษาผลคุณสมบัติของกากลูกหม่อน พบว่ากากลูกหม่อนยังคงมีปริมาณสารสำคัญหลงเหลืออยู่มากโดยเฉพาะอย่างยิ่ง แอนโไซยานินส์ ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมต่อได้ เช่น การนำกากไปสกัดเป็นสารสกัดผง ซึ่งจะให้มูลค่ามากกว่าการนำไปทำเป็นอาหารสัตว์ ควรศึกษาเพิ่มเติมในส่วนของการนำสารสกัดนี้ไปใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร และมีการทดสอบทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ว่าผู้บริโภคสามารถยอมรับได้หรือไม่ นอกจากนี้ควรศึกษาความเป็นไปได้ทางเศรษฐศาสตร์ของผลิตภัณฑ์นี้ด้วย
2. กรรมวิธีการทำแห้งสารสกัดกากลูกหม่อน ในงานวิจัยนี้ใช้วิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง อาจทำการศึกษาเพิ่มเติมเรื่องกรรมวิธีการทำแห้ง โดยเลือกใช้เครื่องทำแห้งแบบลูกกลิ้ง (Drum dryer) เพื่อลดปัญหาการดูดความชื้นของสารสกัดแห้ง
3. ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องของขั้นตอนการกำจัดน้ำตาลออกจากวัตถุดิบกากลูกหม่อนก่อนที่จะนำไปสกัดเป็นสารสกัด เพื่อขจัดปัญหาสารสกัดเหนียว และติดกันเป็นก้อน
4. ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณแอนโไซยานินส์ทั้งหมด ด้วยวิธี pH differential อาจมีการวัด pH สุดท้ายของตัวอย่างด้วย เพื่อความถูกต้อง และเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานต่อไป เนื่องจากวิธีนี้ใช้หลักการความแตกต่างของ pH เป็นตัวบ่งชี้ค่าปริมาณที่ได้ เพื่อเป็นการลดค่าความผิดพลาดของปริมาณที่คำนวณได้ หรือใช้วิธี HPLC วัดปริมาณเพื่อเปรียบเทียบและยืนยันความถูกต้องอีกครั้ง

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- ทรงศิริ วงศ์จิตตภิญโญ, ชนิตา โชติรสเวทิน และ ศศิธร ตรงจิตภักดี. 2552. ผลของชนิดตัวทำละลายที่ใช้สกัดต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด แอนโธไซยานินส์ทั้งหมดและสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของเปลือกและเมล็ดองุ่น. 760-767. ในการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47 (สาขาอุตสาหกรรมเกษตร). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- นิธิยา รัตนานพนธ์. 2544. หลักการแปรรูปอาหารเบื้องต้น. โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ.
- ปิ่นนธร ภัทรสถาพรกุล. 2547. เทคโนโลยีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (ตอนที่ 1) Lyophilization Technology I: Basic Theory. วารสารสมาคมเครื่องทำความเย็นไทย. 11: 20-22.
- พิชญ์ อโหมสุทธิสกุล. 2547. ศักยภาพการต้านอนุมูลอิสระและการตรวจประเมินกิจกรรมการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารจากพืช. วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยหอการค้าไทย. 24(2): 18-35.
- _____. 2549. การใช้สารประกอบฟีนอลิกของพืชเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ. วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยหอการค้าไทย. 26(3): 222-238.
- มณฑนา วีระวัฒนากร. 2555. ปฏิกริยาเคมีระหว่างโปรตีนและพอลิฟีนอลและผลต่อระบบชีวภาพของปฏิกริยา. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา. 17(1): 68-79.
- มนต์วีดี หุ่นเจริญ. 2552. ผลของสายพันธุ์และระยะการเจริญเติบโตต่อสารประกอบฟีนอลิกและความสามารถต้านออกซิเดชันของผลหม่อน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วสันต์ นุ้ยภิรมย์. 2546. หม่อนรับประทานผลและการแปรรูป. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์นันทนาการกราฟฟิค การพิมพ์, กรุงเทพฯ.

- วิวัฒน์ หวังเจริญ. 2545. บทบาทของสารประกอบฟีนอลิกต่อสุขภาพ. วารสารอาหาร. 32(4): 245-253.
- ศิริพร บุญชู, ผู้เรียบเรียง. 2546. **ชาใบหม่อน**. กรมส่งเสริมการเกษตร. กรุงเทพฯ.
- อรุณา เขาวนลิขิต. 2554. การสกัดและวิธีการวิเคราะห์แอนโทไซยานิน (Extraction and analysis of anthocyanin). วารสารมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ (สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี). 3(6): 26-36.
- โอภา วัชรคุปต์, ปรีชา บุญจง, จันทนา บุญะรัตน์ และ มาลีรักษ์ อัดดีสันทอง. 2549. สารต้านอนุมูลอิสระ. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์พี. เอส. พรินท์, นนทบุรี.
- Adhikari, B., T. Howes, B.R. Bhandari and V. Troung. 2004. Effect of addition of maltodextrin on drying kinetics and stickiness of sugar and acid-rich foods during convective drying: experiments and modeling. **Journal of Food Engineering**. 62(1): 53-68.
- Andersson, N., D.I. Wilson and U. Germgard. 2003. An improved kinetic model structure for softwood kraft cooking. **Nordic Pulp and Paper Research Journal**. 18(2): 200-209.
- AOAC. 2002. **Official Method of Analysis of AOAC International**. 17th ed. Horwitz, William: Association of Official Analytical Chemists, Maryland.
- Asami, D.K., Y.J. Hong, D.M. Barrett and A.E. Mitchell. 2003. Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air dried Marionberry, Strawberry, and Corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 51: 1237-1241.
- Awika, J.M., L.W. Rooney, X. Wu, R.L. Prior and L. Cisneros-Zevallos. 2003. Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 51(23): 6657-6662.

- Bae, S.H. and H.J. Suh. 2007. Antioxidant activities of five different mulberry cultivars in Korea. **LWT-Food Science and Technology**. 40: 955-962.
- Banias, C., V. Oreopoulou and C. D. Thomopoulos. 1992. The effect of primary antioxidants and synergists on the activity of plant extracts in lard. **Journal of the American Oil Chemists Society**. 69: 520-524.
- Bhandary, S.R., N. Data and T. Howes. 1997. Problems associate with spray drying of sugar-rich foods. **Drying Technology**. 15(2): 671-684.
- Bravo, L. 1998. Polyphenols: Chemistry, dietary fiber. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 2(1): 223-226.
- Cano-Chauca, M., P.C. Stringheta, L.D. Sardagna and J. Cal-Vidal. 2004. Mango juice dehydration spray drying using different carriers and functional characterization. **Drying**. C: 2005-2012.
- Chandrasekhar, J., M.C. Madhusudhan and K.S.M.S. Raghavarao. 2012. Extraction of anthocyanins from red cabbage and purification using adsorption. **Food and Bioproducts Processing**. 90(4): 615-623.
- Chang, C.H., H.Y. Lin, C.Y. Chang and Y.C. Liu. 2006. Comparisons on the antioxidant properties of fresh, freeze-dried and hot-air-dried tomatoes. **Journal of Food Engineering**. 77: 478-485.
- Chemler, J.A., E. Leonard and M.A.G. Koffas. 2009. Flavonoid Biotransformations in Microorganisms, pp. 191-238. In K. Gould, K. Davies and C. Winefield, eds. **Anthocyanins: Biosynthesis, Functions, and Applications**. Springer Science + Business Media, LLC, New York. U.S.A.

- Chism, G.W. and N.F. Haard. 1996. Characteristics of edible plants tissues. **Food Chemistry**. 943-1011.
- Clifford, M.N., S. Marks, S. Knight and N. Kuhnert. 2006. Characterization by LC-MS(n) of four new classes of p-coumaric acid containing diacyl chlorogenic acids in green coffee beans. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. 54(12): 4095-4101.
- Cook, N.C. and S. Samman. 1996. Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **Journal of Nutritional Biochemistry**. 7: 66-76.
- Corrales, M., A.F. Garcia, P. Butz and B. Tauscher. 2009. Extraction of anthocyanins from grape skins assisted by high hydrostatic pressure. **Journal of Food Engineering**. 90(4): 415-421.
- Cuevas-Rodriguez, E.O., G.G. Yousef, P.A. Garcia-Saucedo, J. Lopez-Medina, O. Paredes-Lopez and M.A. Lila. 2010. Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in wild and domesticated Mexican blackberries (*Rubus* spp.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 58: 7458-7464.
- Djilas, S., J. Canadanovic-Brunet and G. Cetkovic. 2009. By-Products of Fruits Processing as a source of Phytochemicals. **Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly**. 15(4): 191-202.
- Donner, H., L. Gao and G. Mazza. 1997. Separation and characterization of simple and monylated anthocyanins in red onions, *Allium cepa* L. **Food Research International**. 30: 637-643.
- Du, G., M. Li, F. Ma and D. Liang. 2009. Antioxidant capacity and the relationship with polyphenol and vitamin C in *Actinidia* fruits. **Journal of Food Chemistry**. 113(2): 557-562.

- Du, Q., J. Zheng and Y. Xu. 2008. Composition of anthocyanins in mulberry and their antioxidant activity. **Journal of Food Composition and Analysis**. 21(5): 390-395.
- Ercisli, S. and E. Orhan. 2007. Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits. **Food Chemistry**. 103: 1380–1384.
- Fang, Z., M. Zhang, Y. Sun and J. Sun. 2007. Polyphenol oxidase from bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) and its role in anthocyanin degradation. **Food Chemistry**. 103: 268–273.
- Frank, T.C., J.R. Downey, S.K. Gupta. 1999. Quickly screen solvents for organic solids. **Chemical Engineering Progress**. 95: 41-61.
- Foust, A.S., L.A. Wenzel, C.W. Clump, L. Amnus and L.B. Anderson. 1980. **Principle of unit operations**. John Wiley&Son, Inc., New York.
- Garzon, G.A. and R.E. Wrolstad. 2002. Comparison of the stability of pelargonidin based anthocyanins in strawberry juice and concentrate. **Journal of Food Science**. 67: 1288-1299.
- Giusti, M.M. and R. E. Wrolstad. 2001. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-Visible spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. F1.2.1-F1.2.13.
- _____ and _____. 2005. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-Visible spectroscopy, pp. 19-31. In R.E. Wrolstad, T.E. Acree, E.A. Decker, M.H. Penner, D.S. Reid, S.J. Schwartz, C.F. Shoemaker, D. Smith and P. Sporns, eds. **Handbook of Food Analytical Chemistry**. Wiley-Interscience, Hoboken, New Jersey.

Gradinaru, G., C.G. Biliaderis, S. Kallithraka, P. Kefalas and C. Garcia-Viguera. 2003.

Thermal stability of *Hibiscus sabdariffa* L. anthocyanins in solution and in solid state: effects of copigmentation and glass transition. **Food Chemistry**. 83: 423-436.

Green, R.C. 2007. **Physicochemical properties and phenolic composition of selected**

saskatchewan fruits: buffaloberry, chokecherry and sea buckthorn. Ph.D. Thesis, Saskatchewan University.

Guerrero, J.C., L.P. Ciampi, A.C. Castilla, F.S. Medel, H.S. Schalchili, E.U. Hormazabal, E.T.

Bensch and M.L. Alberdi. 2010. Antioxidant capacity, anthocyanins, and total phenols of wild and cultivated berries in Chile. **Chilean Journal of Agricultural Research**. 70(4):537-544.

Hagerman, A.E., K.M. Riedl, G.A. Jones, K.N. Sovik, N.T. Ritchard, P.W. Hartzfeld and T.L.

Riechel. 1998. High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 46: 1887-1892.

Heimler, D., P. Vignoloni, M.G. Dini and A. Romani. 2005. Rapid tests to assess the antioxidant

activity of *Phaseolus vulgaris* L. dry beans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 52(8): 3053-3056.

Horvath-Kerkai, E. 2006. Manufacturing fruit beverage, pp. 205-216. In Y.H. Hui, eds.

Handbook of Fruits and Fruit Processing. Blackwell Publishing, UK.

Huang, D., B. Ou and R. L. Prior. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays.

Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53: 1841-1856.

Huang, H.P., T.T. Ou and C.J. Wang. 2013. Mulberry (Sang Shen Zi) and its bioactive

compounds, the chemoprevention effects and molecular mechanisms *In vitro* and *In vivo*.

Journal of Traditional and Complementary Medicine. 3(1): 7-15.

- Isabelle, M., B.L. Lee, C.N. Ong, X. Liu and D. Huang. 2008. Peroxyl radical scavenging capacity, polyphenolics, and lipophilic antioxidant profiles of mulberry fruits cultivated in Southern China. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 56: 9410–9416.
- Jaafar, R.A., A.R. Rahman, N.Z.C. Mahmood and R. Vasudevan. 2009. Proximate Analysis of Dragon Fruit (*Hylecereus polyhizus*). **American Journal of Applied Science**. 6(7): 1341-1346.
- Jia, N., B.H. Kong and H.T. Hong. 2011. Extraction and antioxidant activity of anthocyanins from blackcurrants. **Journal of Food Science**. 32(16): 162-166.
- Kahkonen, M.P., A.I. Hopia and M. Hrinonen. 2001. Berry phenolics and their antioxidant activity. **Journal of Agricultural Chemistry**. 49: 4076-4082.
- _____, J. Heinamaki, V. Ollilainen and M. Heinonen. 2003. Berry anthocyanins: isolation, identification and antioxidant activities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 83: 1403-1411.
- Kammerer, D., A. Claus, A. Schieber and R. Carle. 2005. A novel process for the recovery of polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) pomace. **Journal of Food Science**. 70(2): 157-163.
- Kasajima, N., H. Ito, T. Hatano and T. Yoshida. 2008. Phloroglucinol diglycosides accompanying hydrolysable tannins from *Kunzea ambigua*. **Phytochemistry**. 69(18): 3080-3086.
- Kim, D.O. and C.Y. Lee. 2002. Extraction and isolation of polyphenolics. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. R.E. Wrolstad. New York, Wiley: 11.2.1-11.2.12.

- _____ and _____. 2005. HPLC separation of polyphenolic, pp. 483-498. In R.E. Wrolstad, T.E. Acree, E.A. Decker, M.H. Penner, D.S. Reid, S.J. Schwartz, C.F. Shoemaker, D. Smith and P. Sporns, eds. **Handbook of Food Analytical Chemistry**. Wiley-Interscience, Hoboken, New Jersey.
- _____, K.W. Lee, H.J. Lee and C.Y. Lee. 2002. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 50: 3713-3717.
- _____, S.W. Jeong and C.Y. Lee. 2003. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. **Food Chemistry**. 81: 321-326.
- Kim, M.J., J.N. Hyun, J.A. Kim, J.C. Park, M.Y. Kim, J.G. Kim, S.J. Lee, S.C. Chun and I.M. Chung. 2007. Relationship between phenolic compounds, anthocyanins content and antioxidant activity in colored barley germplasm. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 55: 4802-4809.
- Kirca, A. and B. Cemeroglu. 2003. Degradation kinetics of anthocyanins in blood orange juice and concentrate. **Food Chemistry**. 81: 583-587.
- _____, M. Ozkan and B. Cemeroglu. 2007. Effects of temperature, solid content and pH on the stability of black carrot anthocyanins. **Food Chemistry**. 101: 212-218.
- Kong, J.M., L.S. Chia, N.K. Goh, T.F. Chia and R. Brouillard. 2003. Analysis and biological activities of anthocyanins. **Phytochemistry**. 64: 923-933.
- Kutlu, T., G. Durmaz, B. Ates, I.Yilmaz and M.S. Cetin. 2011. Antioxidant properties of different extracts of black mulberry (*Morus nigra* L.). **Turkish Journal of Biology**. 35: 103-110.

- Kwok, B.H.L., C. Hu, T. Durance and D.D. Kitts. 2004. Dehydration techniques affects phytochemical contents and free radical scavenging activities of Saskatoon berries (*Amelanchier alnifolia* Nutt.). **Journal of Food Science**. 69(3): 122-126.
- Kwon, Y.J., S.J. Rhee, J.W. Chu and S.W. Choi. 2005. Comparison of radical scavenging activity of extracts of mulberry juice and cake prepared from mulberry (*Morus* spp.) fruit. **Journal of Food Science and Nutrition**. 10: 111-117.
- Kylli, P. 2011. **Berry phenolics: isolation, analysis, identification, and antioxidant properties**. Academic dissertation, University of Helsinki.
- Laleh, G.H., H. Frydoonfar, R. Heidary, R. Jameei and S. Zare. 2006. The effect of light, temperature, pH and species on stability of anthocyanin pigments in four berberis species. **Pakistan Journal of Nutrition**. 5(1): 90-92.
- Laroze, L., C. Soto and M.E. Zuniga. 2010a. Phenolic antioxidants extraction from raspberry wastes assisted by enzymes. **Electronic Journal of Biotechnology**. 13(6). 1-11.
- _____, D.R. Beatriz, A. Moure, M.E. Zuniga and H. Dominguez. 2010b. Extraction of antioxidants from several berries pressing wastes using conventional and supercritical solvents. **European Food Research and Technology**. 231: 669-677.
- Lee, J., C.E. Finn and R.E. Wrolstad. 2004. Anthocyanin pigment and total phenolic content of three *Vaccinium* species native to the Pacific Northwest of North America. **HortScience**. 39(5): 959-964.
- Lee, J., R.W. Durst and R.E. Wrolstad. 2005. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. **Journal AOAC International**. 88(5): 1269-1278.

- Leong, L.P. and G. Shui. 2001. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. **Food Chemistry**. 76: 69-75.
- Lima, V.L.A.G., E.A. Melo, M.I.S. Maciel, F.G. Prazeres, R.S. Musser and D.E.S. Lima. 2005. Total phenolic and carotenoid contents in acerola genotypes harvested at three ripening stages. **Food Chemistry**. 90: 565-568.
- Lin, J.Y. and C.Y. Tang. 2007. Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. **Food Chemistry**. 101: 140–147.
- Liu, G., Y. Sun and H. Guo. 2013. Thermal degradation of anthocyanins and its impact on *in vitro* antioxidant capacity of downy rose-myrtle juice. **Journal of Food, Agriculture & Environment**. 11(1): 110-114.
- Longo, L. and G. Vasapollo. 2004. Extraction and identification of anthocyanins from *Smilax aspera* L. berries. **Food Chemistry**. 94: 226-331.
- Lu, Y. and L.Y. Foo. 1999. The polyphenol constituents of grape pomace. **Food Chemistry**. 65: 1-8.
- Mahmood, T., F. Anwar, M Abbas and N. Saari. 2012. Effect of maturity on phenolics (phenolic acids and flavonoids) profile of strawberry cultivars and mulberry species from Pakistan. **International Journal of Molecular Sciences**. 13(4): 4591-4607.
- Markakis P. 1982. Stability of anthocyanins in foods, pp. 163-178. In Markakis P, ed. **Anthocyanins as food colors**. Academic Press, Inc., New York.
- Mateus, N. and V.D. Freitas. 2009. Anthocyanins as Food Colorants., pp. 283-298. In K. Gould, K. Davies and C. Winefield, eds. **Anthocyanins: Biosynthesis, Functions, and Applications**. Springer Science + Business Media, LLC, New York. U.S.A.

- Memon, N., D.L. Luthria, M.I. Bhangar and A.A. Pitafi. 2010. Phenolic acids profiling and antioxidant potential of mulberry (*Morus laevigata* W., *Morus alba* L.) leaves and fruits grown in Pakistan. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**. 60(1): 25-32.
- Metivier, R.P., F.J. Francis and F.M. Clydesdale. 1980. Solvent extraction of anthocyanins from wine pomace. **Journal of Food Science**. 45: 1099-1100.
- Michalczyk, M., R. Macura and I. Matuszak. 2009. The effect of air-drying, freeze-drying and storage on the quality and antioxidant activity of some selected berries. **Journal of Food Processing and Preservation**. 33: 11-21.
- Moldovan, B., L. David, C. Chisbora and C. Cimpoiu. 2012. Degradation kinetics of anthocyanins from European Cranberrybush (*Viburnum opulus* L.) fruit extracts: Effects of temperature, pH and storage solvent. **Molecules**. 17: 11655-11666.
- Moure, A., J.M. Cruz, D. Franco, J.M. Dominguez, J. Sineiro, H. Dominguez, M.J. Nunez and J.C. Parajo. 2001. Review: Natural antioxidants from residue sources. **Food Chemistry**. 72: 145-171.
- Norbeck, R., K. Nielsen and T. Kondo. 2002. Anthocyanins from flowers of *Cichorium intybus*. **Phytochemistry**. 60(4): 357-359.
- Oki, T., M. Kobayashi, T. Nakamura, A. Okuyama, M. Masuda, H. Shiratsuchi and I. Suda. 2006. Changes in radical-scavenging activity and components of mulberry fruit during maturation. **Journal of Food Science**. 71(1): 18-22.
- Oktay, M., I. Gulcin and O. Kufrevioglu. 2003. Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**. 36: 263-271.

Onyeneho, S.N. and N.S. Hettiarachchy. 1992. Antioxidant activity of durum wheat bran.

Journal of Agricultural and Food Chemistry. 40: 1496-1500.

Oreopoulou, V. and C. Tzia. 2007. Utilization of Plant By-Product for the Recovery of Proteins, Dietary Fibers, Antioxidants and Colorants, pp. 209-232. In V. Oreopoulou and W.

Russ, eds. **Utilization of By-Products and Treatment of Waste in the Food Industry.** Springer Science + Business, LLC, New York. U.S.A.

Ozgen, M., S. Serce and C. Kaya. 2009. Phytochemical and antioxidant properties of anthocyanin-rich *Morus nigra* and *Morus rubra* fruits. **Scientia Horticulturae.** 119: 275-279.

Pawlowska, A.M., W. Oleszek and A. Braca. 2008. Quali-quantitative analyses of flavonoids of *Morus nigra* L. and *Morus alba* L. (Moraceae) fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** 56: 3377-3380.

Pazmino-Duran, A.E., M.M. Giusti, R.E. Wrolstad, M. Beatriz and A. Gloria. 2001. Anthocyanins from banana bracts (*Musa X paradisiaca*) as potential food colorant. **Food Chemistry.** 73(3): 327-332.

Prior, R. L., X. Wu and K. Schaich. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplement. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** 53: 4290-4302.

Qin, C., Y. Li, W.Niu, Y.Ding R. Zhang and X. Shang. 2010. Analysis and characterisation of anthocyanins in mulberry fruit. **Czech Journal of Food Science.** 28(2): 117-126.

Revilla, E., J.M. Ryan and G. Martin-Ortega. 1998. Comparison of several procedures used for the extraction of anthocyanins from red grape. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** 46:4592-4597.

- Rhodes, M.J.C. and K.R. Price. 1996. Analytical problems in the study of flavonoid compounds in onion. **Food Chemistry**. 57: 113-117.
- Robbins, R.J. 2003. Phenolic acids in Foods: An overview of analytical methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 51(10): 2866-2887.
- Rodriguez-Saona, L.E. and R.E. Wrolstad. 2005. Extraction, isolation, and purification of anthocyanins, pp. 7-17. In R.E. Wrolstad, T.E. Acree, E.A. Decker, M.H. Penner, D.S. Reid, S.J. Schwartz, C.F. Shoemaker, D. Smith and P. Sporns, eds. **Handbook of Food Analytical Chemistry**. Wiley-Interscience, Hoboken, New Jersey.
- Sánchez-Moreno, C. 2002. Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological system. **Food Science and Technology International**. 8: 121-137.
- Schurg, W.A., J.P. Reed and B.L. Reid. 1980. Utilization of various fruit pomace products by growing rabbits. **Food Composition**. 21(1): 55-62.
- Shahidi, F. and M. Naczki. 2004. **Phenolics in Food and Nutraceuticals**. CRC Press, New York.
- Singh, R.P., K.N. Chidambara and G.K. Jayaprakasha. 2002. Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro model. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 50: 81-86.
- Singleton, V.L., R. Orthofer and R.M. Lamuela-Raventos. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**. 299: 152-178.

- Skrede, G., R.E. Wrolstad and R.W. Durst. 2000. Changes in anthocyanins and polyphenolics during juice processing of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). **Journal of Food Science**. 65(2): 357-364.
- Song, W., H.J. Wang, P. Bucheli, P.F. Zhang, D.Z. Wei and Y.H. Lu. 2009. Phytochemical profiles of different mulberry (*Morus* sp.) species from China. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 57(19): 9133-9140.
- Spagna, G., R.N. Barbagallo, A. Todaro, M.J. Durante and P.G. Pifferi. 2003. A method for anthocyanin extraction from fresh grape skin. **Italian Journal of Food Science**. 3(15): 337-346.
- Stintzing, F.C. and R. Carle. 2004. Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. **Trends in Food Science and Technology**. 15: 19-38.
- Sun, T. and C.T. Ho. 2005. Antioxidant activities of buckwheat extracts. **Journal of Food Chemistry**. 90: 743-749.
- Tadaro, A., F. Cimino, P. Rapisarda, A.E. Catalano, R.N. Barbagallo and G. Spagna. 2009. Recovery of anthocyanins from eggplant peel. **Food Chemistry**. 114: 434-439.
- Tattsis, E.C., S. Boeren, V. Exarchou, A.N. Troganis, J. Vervoort and L.P. Gerothanassis. 2007. Identificaiton of the major constituents of *Hypericum perforatum* by LC/SPE/NMR and/or LC/MS. **Phytochemistry**. 68(3): 383-393.
- Teow, C.C., V Truong, R.F. McFeeters, R.L. Thompson. K.V. Pecota and G.C. Yencho. 2007. Antioxidant activities, phenolic and b-carotene contents of sweet potato genotypes with varying flesh colours. **Food Chemistry**. 103:829-838.

- United State Department of Agriculture (USDA). 2003. USDA database for the flavonoid content of selected foods. Available Source:
<http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/Flav/Flav02-1.pdf> , August 3, 2012.
- Wada, L. and B. Ou. 2002. Antioxidant activity and phenolic content of oregon cranberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 50: 3495-3500.
- Waksmundzka-Hajnos, M. and J. Sherma. 2010. **High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis**. CRC Press, New York.
- Wang W.D. and S.Y. Xu. 2007. Degradation kinetics in blackberry juice and concentrate. **Journal of Food Engineering**. 82: 271-275.
- Waterhouse, A.L. 2005. Determination of total phenolics, pp. 463-470. In R.E. Wrolstad, T.E. Acree, E.A. Decker, M.H. Penner, D.S. Reid, S.J. Schwartz, C.F. Shoemaker, D. Smith and P. Sporns, eds. **Handbook of Food Analytical Chemistry**. Wiley-Interscience, Hoboken, New Jersey.
- White, B.L., L.R. Howard and R.L. Prior. 2010. Polyphenolic composition and antioxidant capacity of extruded cranberry pomace. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 58: 4037-4042.
- Wu, X., G.R. Beecher, J.M. Holden, D.B. Haytowitz, S.E. Gebhardt and R.L. Prior. 2004. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 52: 4026-4037.
- Wu, Z., L. Song and D. Huang. 2011a. Polyphenolic antioxidants and phytoalexins changes in germinating legume seeds with food grade fungal *Rhizopus oligoporus* stress. pp. 96-107. In. **The 12th ASEAN Food Conference 2011**. Food Science and Technology Association of Thailand, Bangkok.

_____, _____ and _____. 2011b. Food grade fungal stress on germinating peanut seeds induced phytoalexins and enhanced polyphenolic antioxidants. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. 59(11): 5993-6003.

Xu, Y., R. Zhang and H. Fu. 2005. Studies on the optimal process to extract flavonoids from red-raspberry fruits. **Journal of Nature and Science**. 3(2): 43-46.

Yamaguchi, F., Y. Yoshimura, H. Nakazawa and T. Ariga. 1999. Free radical scavenging activity of grape seed extract and anti-oxidants by electron spin resonance spectrometry in and $H_2O_2/NaOH/DMSO$ system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 47: 2544-2548.

Yilmaz, Y. and R.T. Toledo. 2006. Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. **Journal of Food Composition and Analysis**. 19: 41-48.

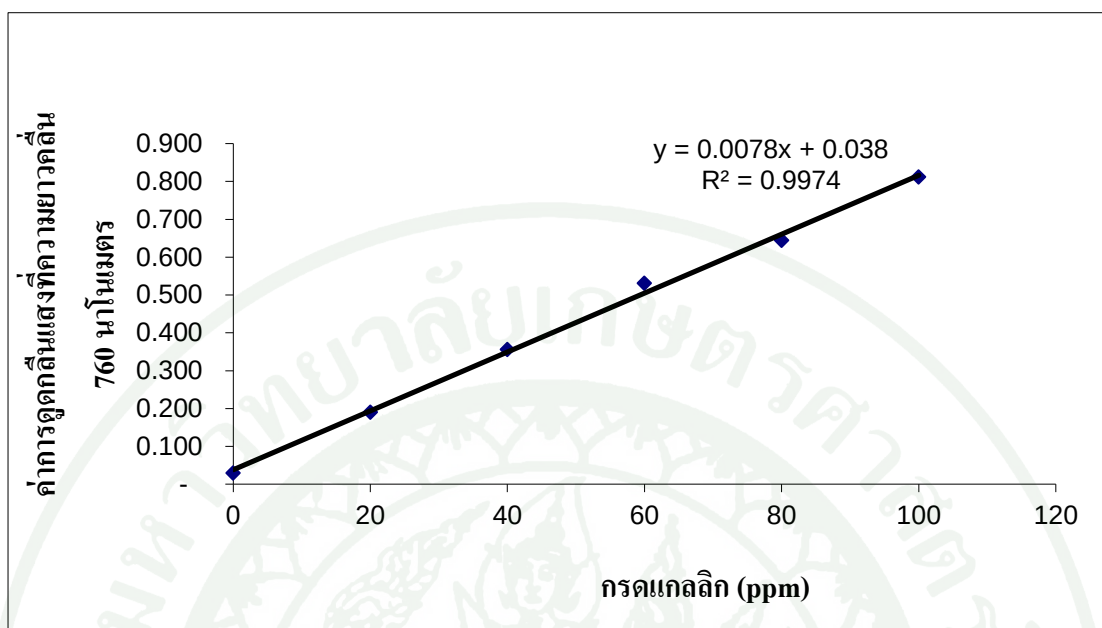
Yoshikawa, T., Y. Naito and M. Kondo. 1997. Free radicals and diseases, 11-19. *In* M. Hiramatsu, T. Yoshikawa and M. Inoue, eds. **Food and Free Radicals**, Plenum Press, New york and London.

Zadernowski, R., M. Naczek and J. Nesterowicz. 2005. Phenolic acid profile in some small berries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 53(6): 2118-2124.

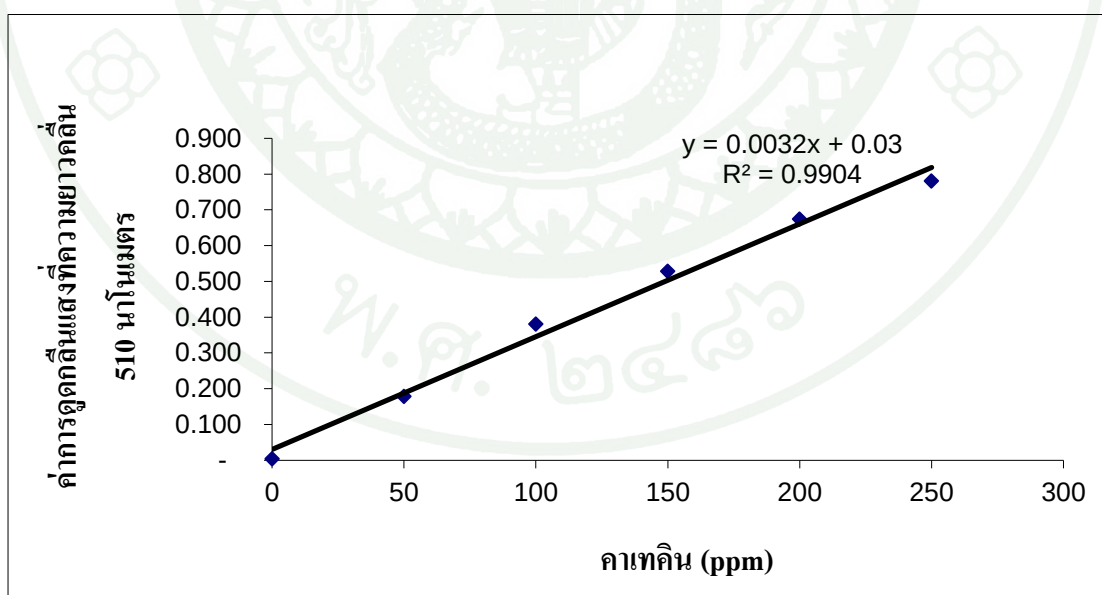
Zhao, B. and C.A. Hall. 2008. Composition and antioxidant activity of raisin extracts obtained from various solvents. **Journal of Food Chemistry**. 108: 511-518.



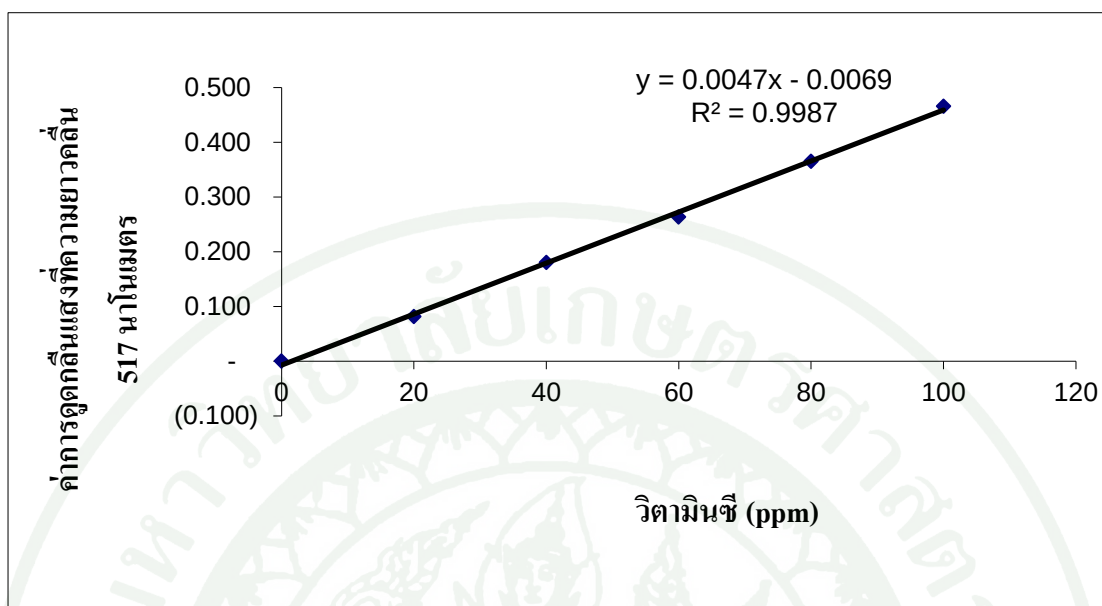
ภาคผนวก



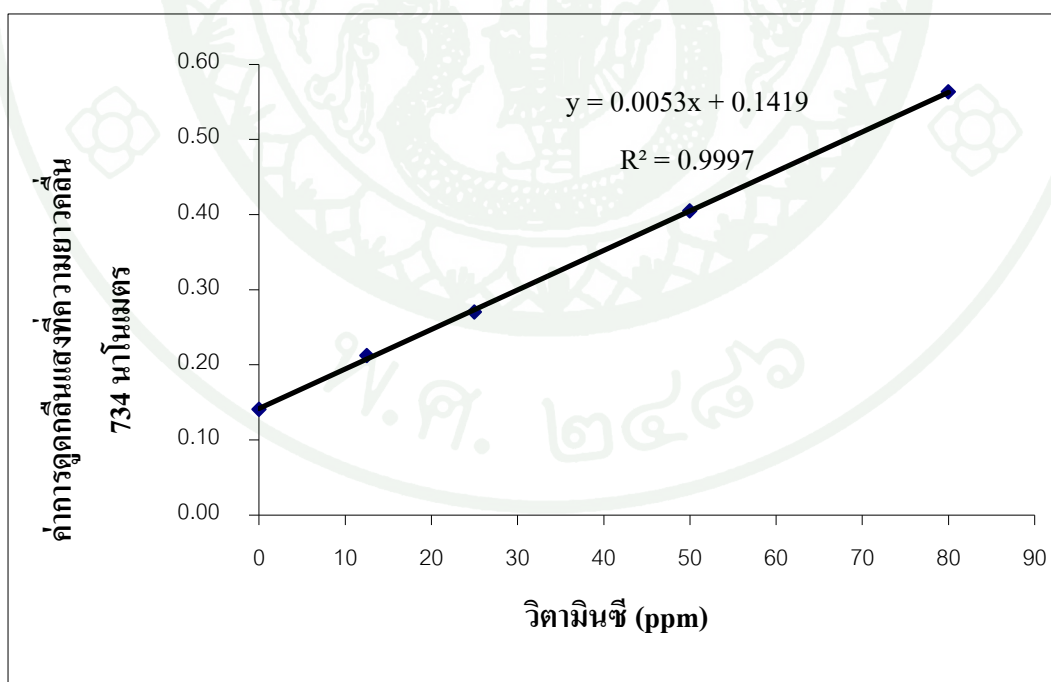
ภาพผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกสำหรับการตรวจวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด



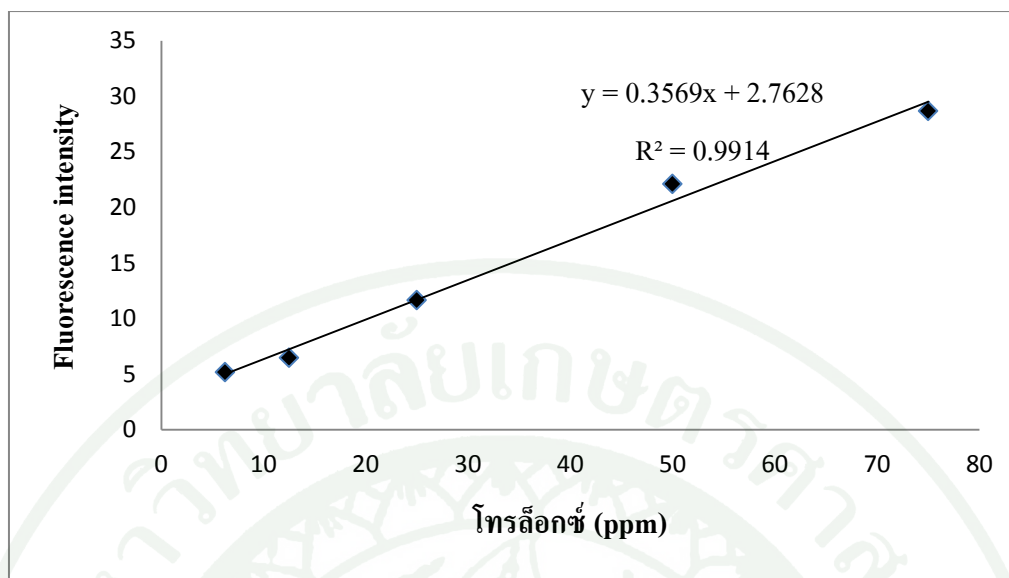
ภาพผนวกที่ 2 กราฟมาตรฐานของคาเทคินสำหรับการตรวจวัดปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด



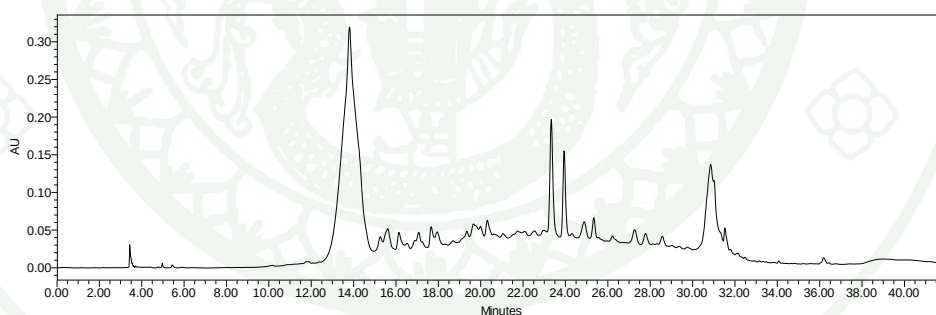
ภาพผนวกที่ 3 กราฟมาตรฐานของวิตามินซีสำหรับการตรวจสอบสมบัตการต้านอนุมูลอิสระ DPPH



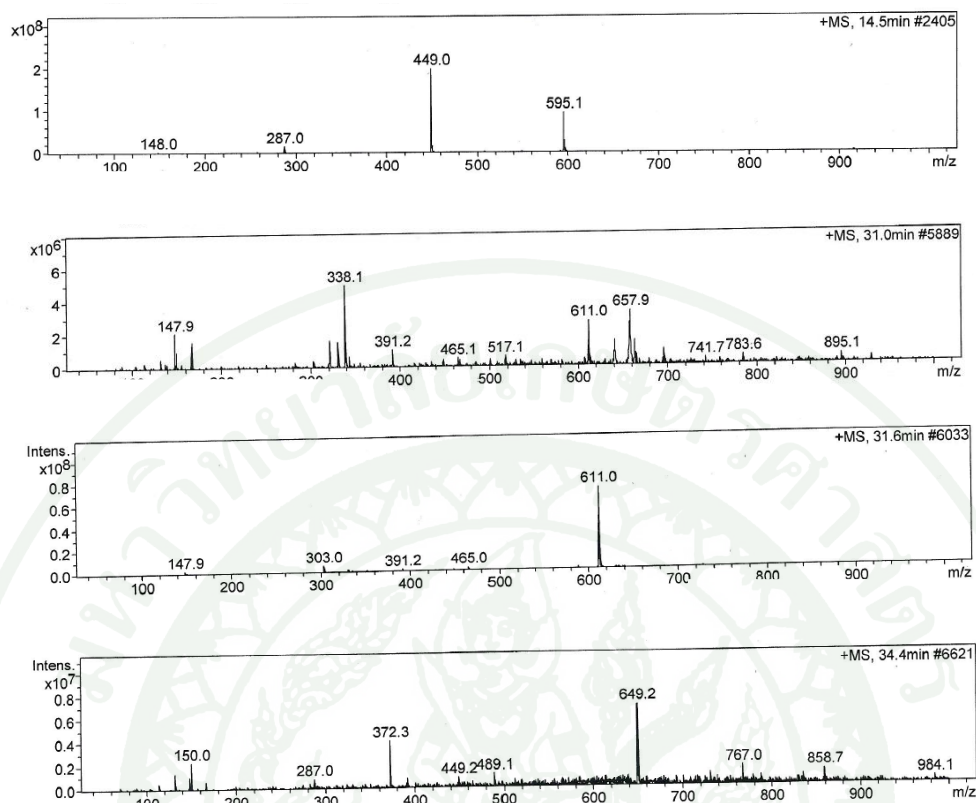
ภาพผนวกที่ 4 กราฟมาตรฐานของวิตามินซี สำหรับการตรวจสอบสมบัตการต้านอนุมูลอิสระ ABTS



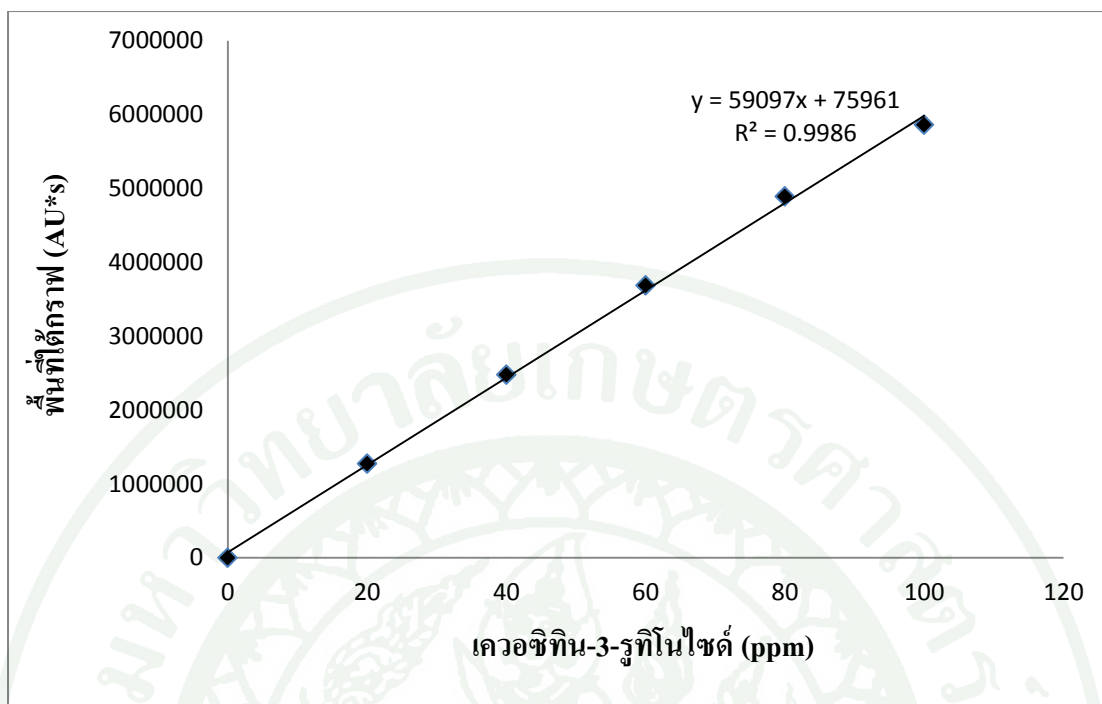
ภาพผนวกที่ 5 กราฟมาตรฐานของ Trolox สำหรับการตรวจสอบสมบัติการต้านออกซิเดชันโดยวิธี ORAC



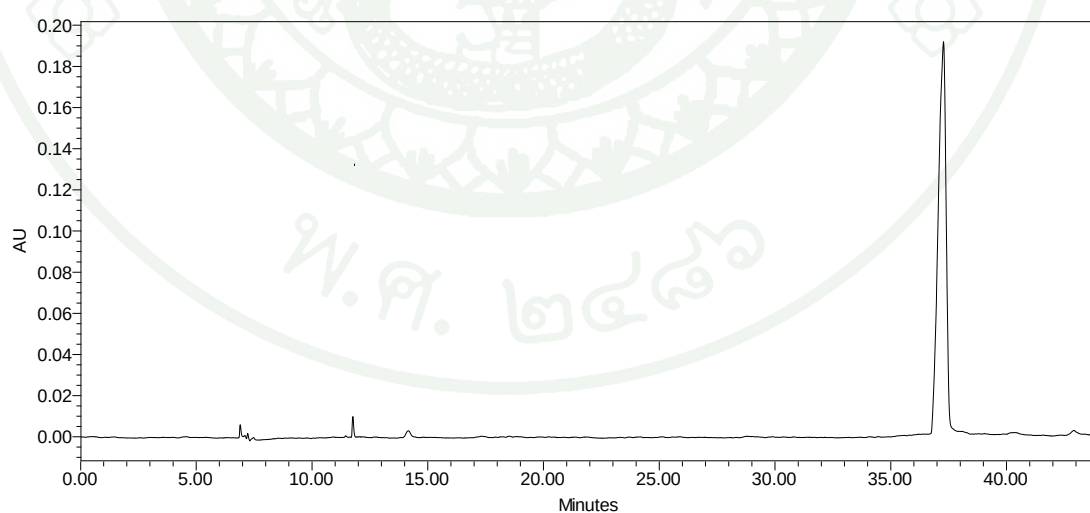
ภาพผนวกที่ 6 โครมาโตแกรมของสารสกัดส่วน AAW ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร



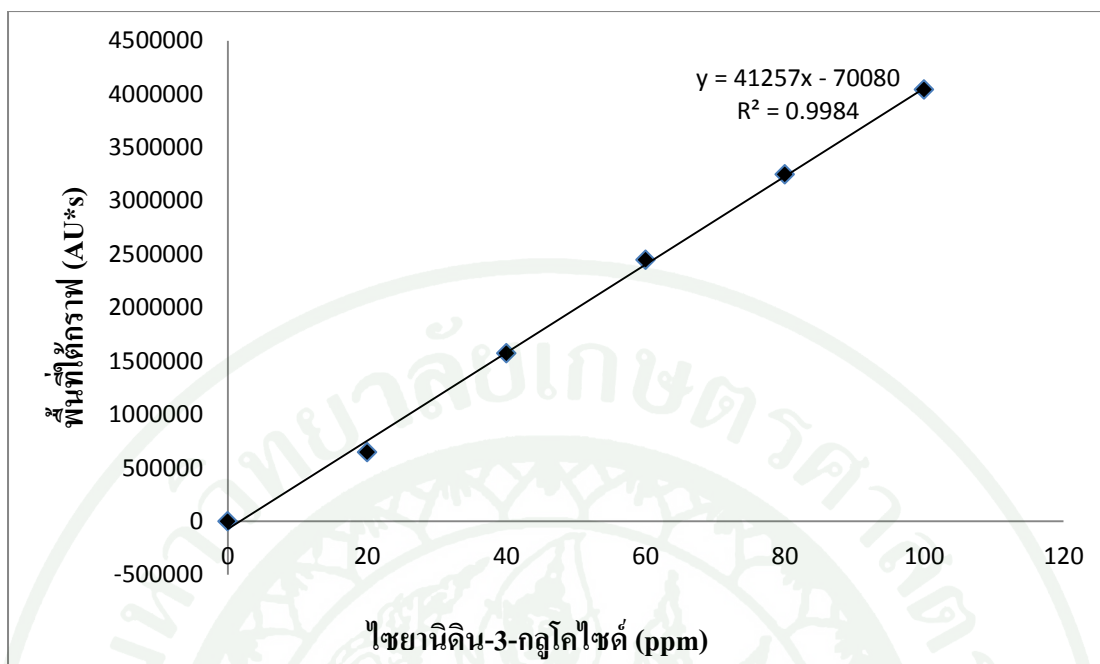
ภาพผนวกที่ 7 โครมาโตแกรมแมสสเปกตรัม MH⁺ ของ แฟรกชันเมทานอล



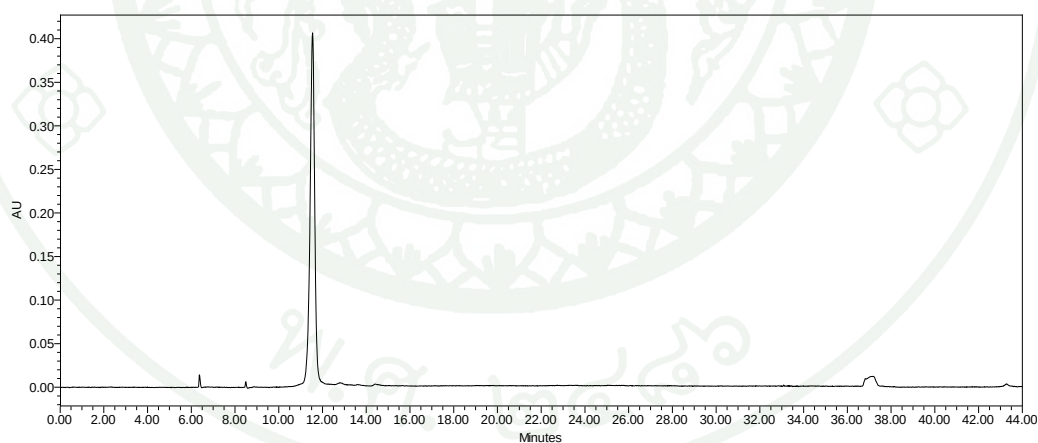
ภาพผนวกที่ 8 กราฟมาตรฐานของเคอซีทิน-3-รูทีโนไซด์ (Quercetin-3-rutinoside) ที่ความยาวคลื่น 370 นาโนเมตร



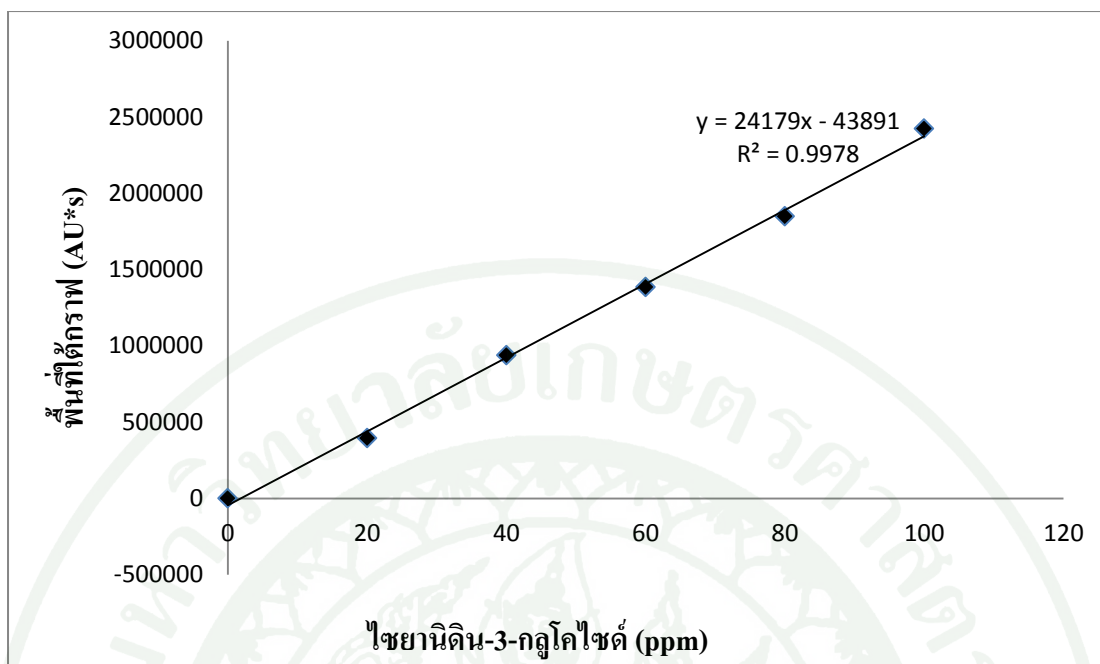
ภาพผนวกที่ 9 HPLC โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานเคอซีทิน-3-รูทีโนไซด์ (Quercetin-3-rutinoside) ที่ความยาวคลื่น 370 นาโนเมตร



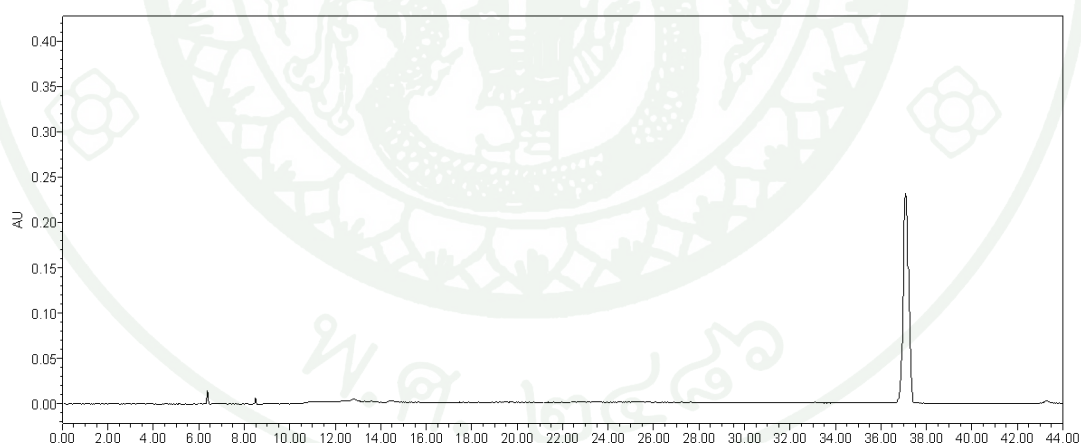
ภาพผนวกที่ 10 กราฟมาตรฐานของไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ (Cyanidin-3-glucoside) ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร



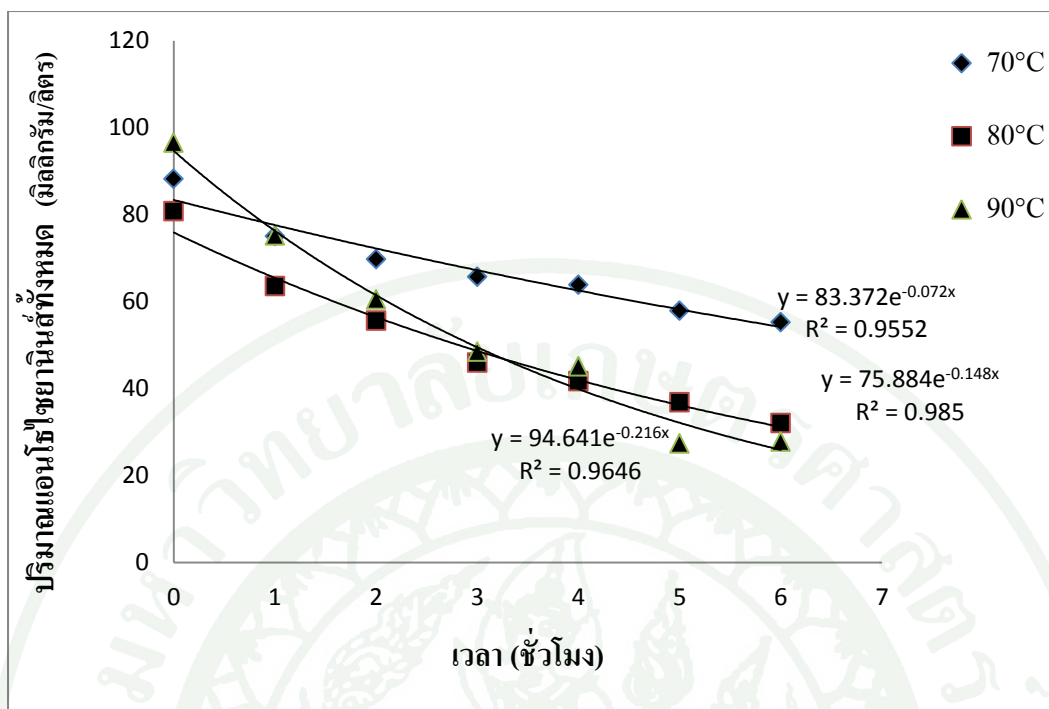
ภาพผนวกที่ 11 HPLC โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ (Cyanidin-3-glucoside) ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร



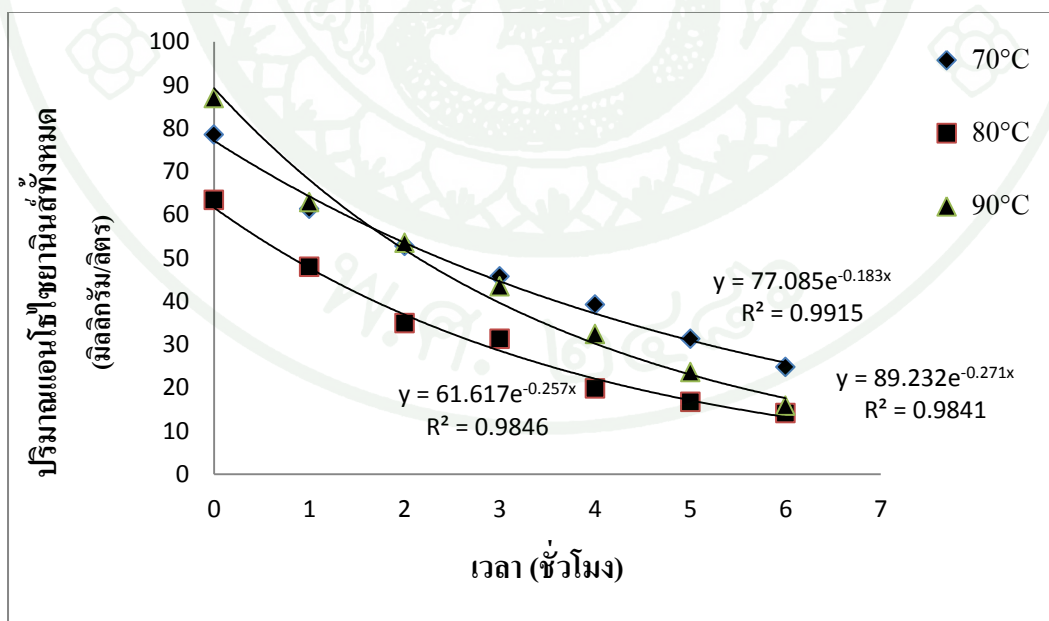
ภาพผนวกที่ 12 กราฟมาตรฐานของไซยานิดิน-3-รูทีโนไซด์ (Cyanidin-3-rutinoside) ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร



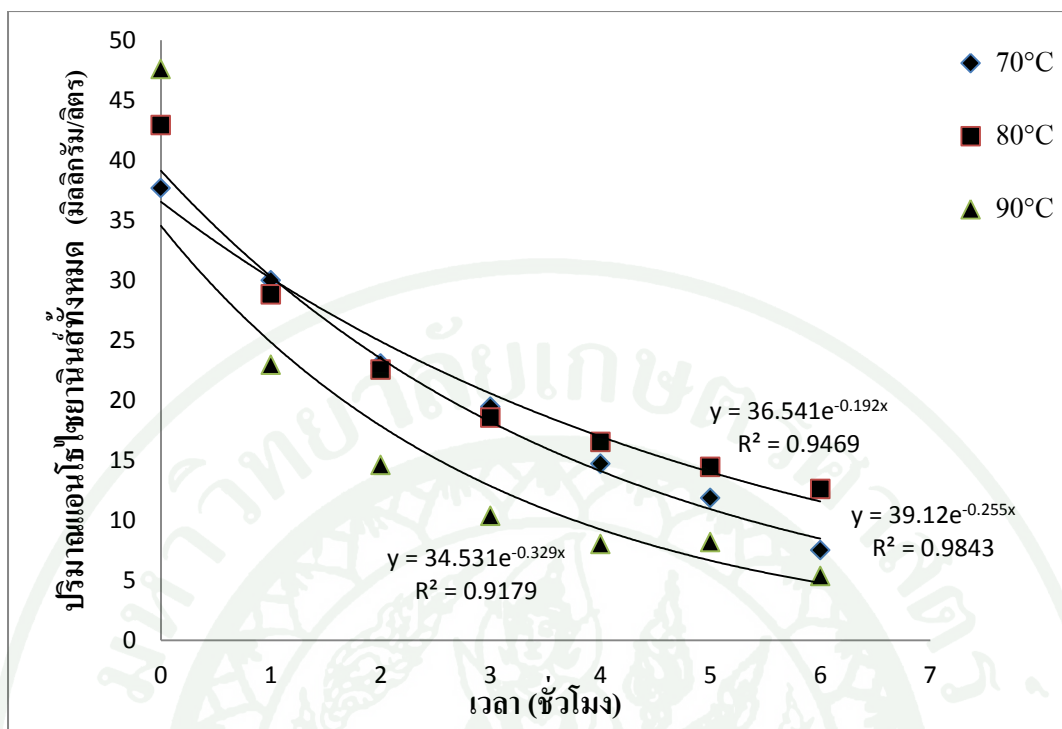
ภาพผนวกที่ 13 HPLC โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานไซยานิดิน-3-รูทีโนไซด์ (Cyanidin-3-rutinoside) ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร



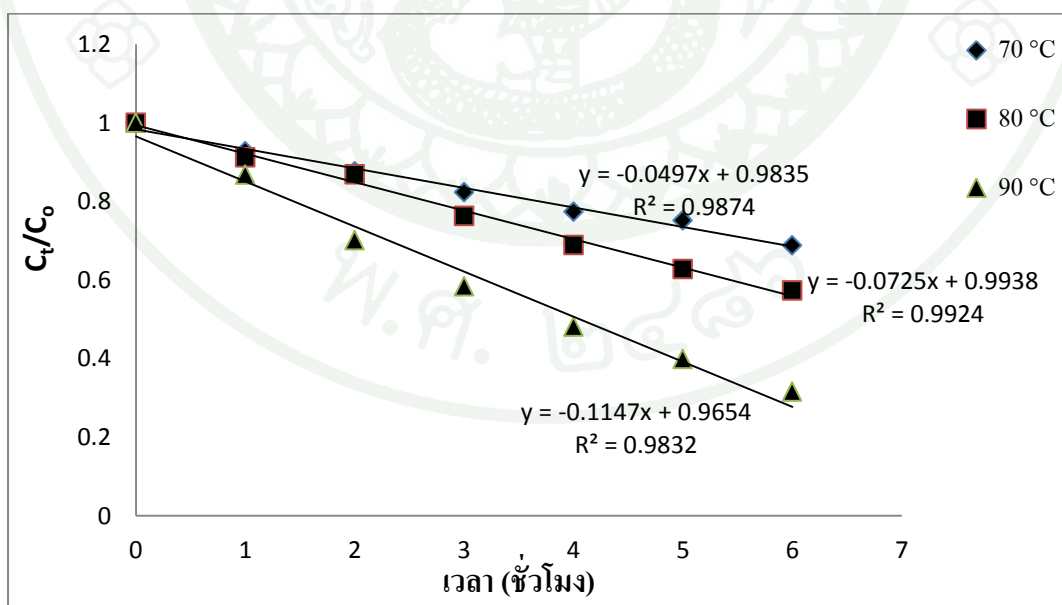
ภาพผนวกที่ 14 การสลายตัวของแอมโมเนียไนโตรเจนของสารสกัดจากลูกหม่อนแห้งที่อุณหภูมิต่าง (ที่ pH 4.0)



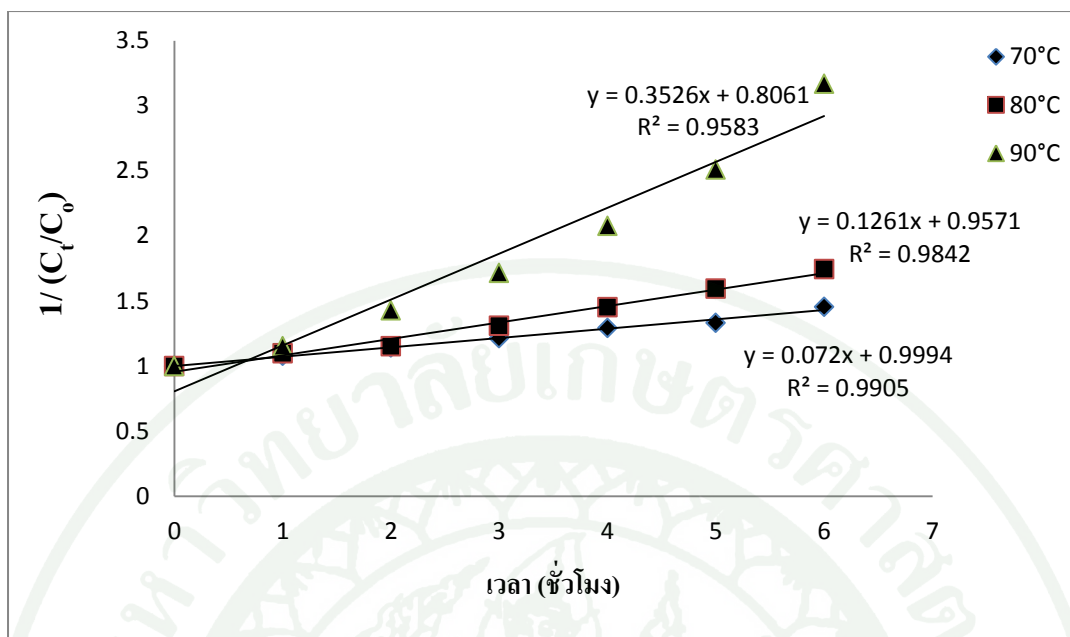
ภาพผนวกที่ 15 การสลายตัวของแอมโมเนียไนโตรเจนของสารสกัดจากลูกหม่อนแห้งที่อุณหภูมิต่างๆ (ที่ pH 6.0)



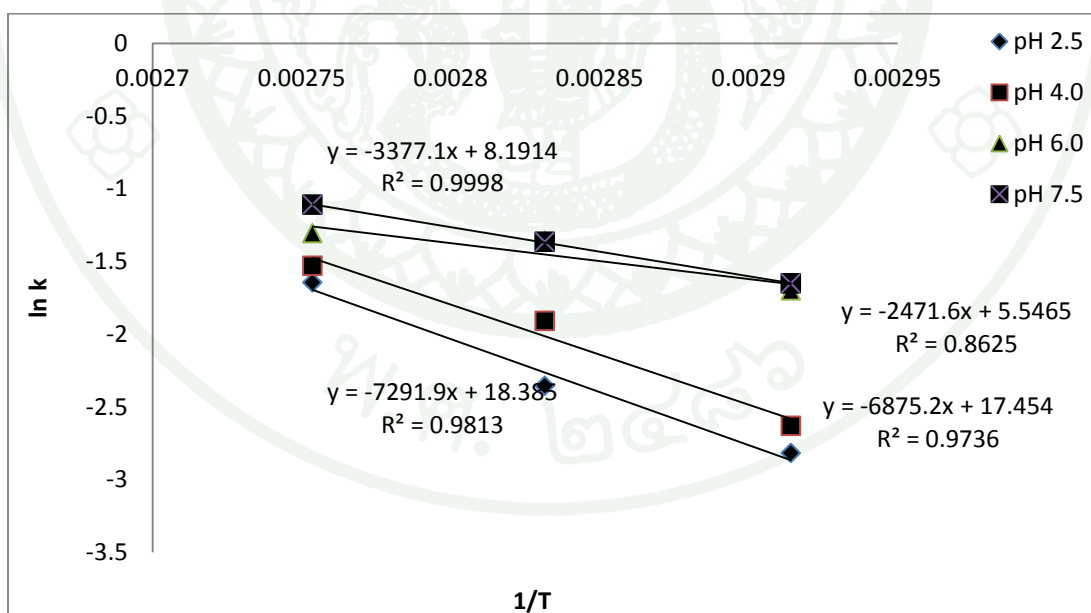
ภาพผนวกที่ 16 การสลายตัวของแอนไฮไดรอนของสารสกัดจากลูกหม่อนแห้งที่อุณหภูมิต่างๆ (ที่ pH 7.5)



ภาพผนวกที่ 17 ค่า C_t/C_0 ของปริมาณแอนไฮไดรอนของสารสกัดจากลูกหม่อนแห้งระหว่าง การให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ ปฏิริยาอันดับ 0 (ที่ pH 2.5)



ภาพผนวกที่ 18 ค่า $1/(C/C_0)$ ของปริมาณแอนโทไซยานินส์ของสารสกัดจากลูกหม่อนแห้งระหว่างการให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ ปฏิริยาอันดับ 2 (ที่ pH 2.5)



ภาพผนวกที่ 19 กราฟอาร์เรเนียสของการสลายตัวของแอนโทไซยานินส์ของสารสกัดจากลูกหม่อนแห้งระหว่างการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส (ที่ pH 2.5, 4.0, 6.0 และ 7.5)

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวศุทธิณี ลีลาเหมรัตน์
วัน เดือน ปี ที่เกิด	11 เมษายน 2530
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี การอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (พ.ศ. 2552)
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนส่งเสริมพัฒนาศักยภาพนิสิตเกษตรศาสตร์สู่สากล จากกองวิเทศสัมพันธ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประจำปีพ.ศ. 2554