การสกัดและวิธีการวิเคราะห์แอนโทไซยานิน
EXTRACTION AND ANALYSIS OF ANTHOCYANIN

อรุษา เชาวนลิขิต
Arusa Chaovanalikit

คณะเทคโนโลยีและนวัตกรรมผลิตภัณฑ์การเกษตร มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
Faculty of Agricultural Product Innovation and Technology, Srinakharinwirot University.

บทคัดย่อ

แอนโทไซยานินเป็นสารให้สีที่พบในธรรมชาติแบ่งได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ นอนอะซิเลตเทต แอนโทไซยานิน (Non acylated anthocyanin) และอะซิเลตเทต แอนโทไซยานิน (Acylated anthocyanin) โครงสร้างของแอนโทไซยานิน ประกอบด้วย แอนโทไซยานิดิน น้ำตาล และ/หรือ กรด ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดแอนโทไซยานิน ได้แก่ น้ำ เอทานอล เมทานอล และอะซีโตน วิธีการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง (Solid Phase Extraction) เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการทำให้แอนโทไซยานินบริสุทธิ์ การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินสามารถแบ่งเป็น 2 แบบ คือ การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด เช่น วิธีพีเอช-ดิฟเฟอเรนเชียล (pH-Differential) ด้วยสเปคโตรมิเตอร์ และการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของแอนโทไซยานิน โดยใช้เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography) การย่อยด้วยกรดและการย่อยด้วยด่างหรือการใช้แมสสเปคโตรมิเตอร์เป็นเทคนิคที่ใช้ร่วมกับเครื่อง HPLC เพื่อการวิเคราะห์แอนโทไซยานินที่ไม่ทราบชนิด

คำสำคัญ: แอนโทไซยานิน วิธีวิธีพีเอช-ดิฟเฟอเรนเชียล การย่อยด้วยกรด การย่อยด้วยด่าง

Abstract

Anthocyanin is a colorant found in nature. It is divided into Non acylated anthocyanin and acylated anthocyanin. The structure of anthocyanin is composed of anthocyanidin sugar and/or acid. The solvents used for anthocyanin extraction are water, ethanol, methanol, and acetone. Solid phase extraction is popularly used for anthocyanin purification. The analysis method of anthocyanin can be categorized into the quantification method of total anthocyanin such as a pH-Differential method using Spectrometer and the quantification and qualification method of anthocyanin using High Performance Liquid Chromatography. Acid hydrolysis and alkaline hydrolysis or mass spectrometer are techniques used with HPLC for analyzing unknown anthocyanin.

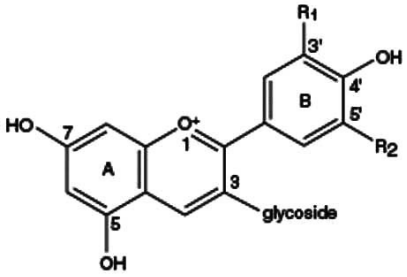
Keywords: Anthocyanin, pH-Differential method, Acid hydrolysis, Alkaline hydrolysis

บทนำ

แอนโทไซยานินเป็นรงควัตถุที่พบในพืช ทั้งในดอกและในผล ให้สีแดง น้ำเงิน ม่วง ละลายน้ำได้ดี ปัจจุบันนี้แอนโทไซยานินจัดเป็นรงควัตถุที่ได้รับความสนใจจากนักวิจัยเป็นอันมาก เนื่องจากเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) และจากการที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระทำให้แอนโทไซยานินมีบทบาทต่อการป้องการการเกิดโรคเรื้อรังต่างๆ เช่น โรคเกี่ยวกับหลอดเลือดหัวใจ (Cardiovascular disease) โรคมะเร็ง โรคเบาหวาน [1-2] เป็นต้น Ghiselle และคณะ [3] รายงานถึงประสิทธิภาพของแอนโทไซยานินในไวน์แดงมีประสิทธิภาพในการกำจัด Reactive oxygen species และยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของลิโปโปรตีน (Lipoprotein) และการตกตะกอนของเกล็ดเลือด

โครงสร้างของแอนโทไซยานิน ประกอบด้วยสารประกอบ 2 หรือ 3 ชนิด [4] ได้แก่

ชนิดที่ 1 คือ แอนโทไซยานิดิน หรืออะไกลโคน (Aglycone) โครงสร้างพื้นฐานของแอนโทไซยานิดินนั้น ประกอบด้วย คาร์บอน 6 อะตอม คาร์บอน 3 อะตอม คาร์บอน 6 อะตอม (C-6-C-3-C-6) เชื่อมต่อกันดังภาพที่ 1 ซึ่งแอนโธไซยานิดินที่พบมากในปัจจุบันจะมีอยู่ 6 ชนิด คือ เพลาโกนิดิน (Pelargonidin) ไซยานิดิน (Cyanidin) เดลฟินิดิน (Delphinidin) พีโอนิดิน (Peonidin) เพทุนิดิน (Petunidin) และมอลวิดิน (Malvidin) ซึ่งจะแตกต่างกันตรงตำแหน่ง 3′ หรือ 5′ ว่ามี หมู่ไฮดรอกซิล (Hydroxyl) หรือเมธอกซิล (Methoxyl) (ดังภาพที่ 1)



Anthocyanidins	ตำแหน่ง R1	ตำแหน่ง R2
Pelargonidin	H	H
Cyanidin	H	OH
Delphinidin	OH	OH
Peonidin	OCH_3	H
Petunidin	OCH_3	OH
Malvidin	OCH_3	OCH_3

ภาพที่ 1 โครงสร้างของแอนโธไซยานิดิน [5]

ชนิดที่ 2 คือ น้ำตาล ซึ่งน้ำตาลจะเกิดพันธะกับคาร์บอน ตำแหน่งที่ 3 หรือตำแหน่งที่ 3 และ 5 โดยน้ำตาลที่เกิดพันธะได้ เช่น น้ำตาลกลูโคส (Glucose) น้ำตาลกาแลคโตศ (Galactose) น้ำตาลรูติโนส (Rutinose) น้ำตาลแรมโนส (Rhamnose) เป็นต้น

และชนิดที่ 3 คือ กรด ซึ่งส่วนนี้อาจมีหรือไม่มี ถ้าแอนโทไซยานินมีกรดเป็นองค์ประกอบจะเรียกว่า นอนอะซิเลตเทต แอนโทไซยานิน (Non acylated anthocyanin) แต่ถ้าไม่มีกรดเป็นองค์ประกอบจะเรียกว่า อะซิเลตเทต แอนโทไซยานิน (Acylated anthocyanin) โดยกรดจะเกิดการเอสเทอริฟิเคชั่น (Esterification) กับน้ำตาลที่จับกับ Carbon ตำแหน่งที่ 3 และ/หรือ ตำแหน่งที่ 5 กรดที่เกิดพันธะเอสเทอร์กับน้ำตาล เช่น กรดคูมาริก (Coumaric acid) กรดเฟอร์รูริก (Ferulic acid) กรดคาร์แฟอิก (Caffeic acid) เป็นต้น ซึ่งการเกิดเอซิเลชั่น (Acylation) ในโครงสร้างของแอนโทไซยานินจะทำให้ตัวแอนโทไซยานินชนิดนั้นมีความคงตัวดีขึ้น

การวิเคราะห์แอนโทไซยานินในพืช

แอนโทไซยานินเป็นรงควัตถุที่พบในพืชทั้งในดอกและในผล ดังนั้นในการวิเคราะห์ชนิดหรือปริมาณของแอนโทไซยานินจะประกอบด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ได้แก่ การสกัดให้อยู่ในรูปของสารละลาย การทำให้บริสุทธิ์ และการวิเคราะห์

การสกัด (Extraction)

การสกัดเป็นขั้นตอนแรกของการวิเคราะห์แอนโทไซยานิน การสกัดที่ดีจึงควรที่จะสกัดเอาปริมาณแอนโทไซยานินให้ได้สูงสุด มีการปนเปื้อนของสารอื่นน้อยที่สุด และมีการเปลี่ยนแปลงของแอนโทไซยานินน้อยที่สุด การสกัดแอนโทไซยานินสามารถใช้ตัวทำละลาย เช่น เอทานอล เมทานอล และอะซีโตน [6] Metivier และคณะ [7] ทำการสกัดเนื้อขององุ่นที่เหลือจากการคั้นน้ำด้วยตัวทำละลาย เอทานอล เมทานอล และน้ำ พบว่าเอทานอลเป็นตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพในการสกัดได้มากที่สุด ตามด้วยเอทานอล และน้ำ ทรงศิริ และคณะ [8] ทำการสกัดเปลือกองุ่นโดยใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ น้ำ น้ำร้อน และเอทานอลในอัตราส่วน 10% 20% 50% และ 80% พบว่าเอทานอล 50% และ 80% สามารถสกัดแอนโทไซยานินได้มากกว่าน้ำ ถึง 3 เท่า การใช้กรดร่วมกับตัวทำละลาย เช่น น้ำ เอทานอล หรือเมทานอล เพื่อสกัดแอนโทไซยานินได้รับความนิยมอย่างแพร่หลาย [9–11] เนื่องจากแอนโทไซยานินมีความคงตัวสูงที่ pH ต่ำ เพราะอยู่ในรูปของ Flavylium cation กรดที่นิยมใช้ร่วมกับตัวทำละลาย เช่น กรดไฮโดรคลอริก และกรดฟอร์มิก Revilla และ คณะ [12] ทำการทดลองเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการสกัดแอนโทไซยานินในองุ่นด้วยกรดไฮโดร-คลอริกร่วมกับเมทานอลพบว่า การสกัดแอนโท-ไซยานินด้วยเมทานอลผสมกับกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้นจนถึง 0.12 โมลาร์จะทำให้เกิดการย่อยของพันธะเอสเทอร์ในอะซิเลตเทต แอนโทไซยานิน (Acylated anthocyanin) นอกจากนี้ Bakker และ Timberlake [13] พบว่า การใช้เมทานอลผสมกับกรดฟอร์มิกในอัตราส่วน 98:2 ทำให้เกิดการย่อยของแอนโทไซยานินเช่นกัน

Chaovanalikit และ Wrolstad [14] ทำการสกัดแอนโทไซยานินจากผลเชอร์รี่ด้วยอะซีโตนและคลอโรฟอร์ม โดยวิธีนี้จะสามารถกำจัดสารสกัดที่ละลายในไขมัน (Lipophiliic) เช่น ไขมัน คลอโรฟิลล์ และแคโรทีนอยด์ ออกจากสารสกัด โดยอะซีโตนและน้ำจะเป็นตัวสกัดแอนโทไซยานินและสารอื่น ๆ ส่วนคลอโรฟอร์มทำหน้าที่แยกสารที่ละลายในน้ำและสารที่ไม่ละลายน้ำออกจากกัน ทำให้สารสกัดที่ได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มมากขึ้น จึงเหมาะสำหรับสารสกัดที่ต้องนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบของแอนโท-ไซยานิน [15] Wrolstad และ Durst [16] ทำการทดลองเปรียบเทียบการสกัดด้วยอะซีโตนและคลอโรฟอร์ม และการสกัดด้วยกรดผสมกับเมทานอล พบว่า อะซีโตนสามารถสกัดแอนโทไซยานินออกมาได้มากกว่า กรดผสมกับเมทานอล

การทำให้บริสุทธิ์ (Purification)

เมื่อสกัดแอนโทไซยานินออกจากวัตถุดิบแล้ว สารสกัดที่ได้จะประกอบด้วยแอนโทไซยานินและสารประกอบอื่น ๆ เช่น น้ำตาล และกรดอินทรีย์ต่าง ๆ เพราะตัวทำละลายที่ใช้ส่วนใหญ่จะไม่จำเพาะสำหรับแอนโทไซยานินเพียงอย่างเดียว ดังนั้นการทำให้บริสุทธิ์จึงเข้ามามีบทบาทในการแยกแอนโท-ไซยานินออกจากสารประกอบอื่น ๆ

เทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง (Solid Phase Extraction, SPE) เป็นวิธีการทำให้สารบริสุทธิ์ โดยใช้ของแข็งเป็นตัวจับสารที่สนใจ โดยของแข็งจะถูกบรรจุอยู่ในแท่ง SPE ของแข็งที่เป็นตัวจับแอนโทไซยานินที่นิยม คือ C18 [17–18] แอนโทไซยานินจะจับกับของแข็งใน SPE ในขณะที่น้ำตาล และกรดจะไหลผ่าน SPE ถูกชะทิ้งไป

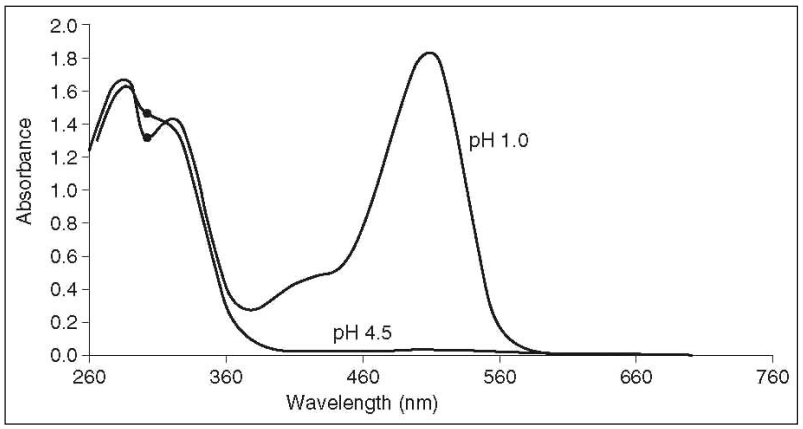
หลังจากนั้นนำ SPE มาชะด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม เช่น เอทิลอะซีเตท ใช้ในการชะเอาสารประกอบฟีนอลลิก และเมทานอล เพื่อชะแอนโทไซยานินทั้งหมดออกจาก SPE [15] ซึ่งแอนโทไซยานินที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์มักจะถูกนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography) และแมสสเปคโตรเมตรี (Mass Spectroscopy)เพื่อศึกษาชนิดและโครงสร้างของแอนโทไซยานิน

การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานิน

การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินสามารถจำแนกเป็น 2 แบบ คือ การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด และการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของแอนโทไซยานิน

การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดสามารถทำได้หลายวิธี [18–21] เช่น การวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นหนึ่งๆ และวิธีพีเอช-ดิฟเฟอเรนเชียล [18, 20, 22] ในวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสง [23] สารสกัดถูกนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่นสูงสุด ซึ่งสำหรับแอนโทไซยานินความยาวคลื่นสูงสุดที่ถูกดูดกลืนจะอยู่ในช่วง 490–550 นาโนเมตร ซึ่งจะห่างจากสารฟีนอลิกอื่นๆ ที่สามารถดูดกลืนได้ในช่วง 260–320 นาโนเมตร ทำให้สามารถวัดแอนโทไซยานินแยกจากสารฟีนอลิก อย่างไรก็ดีวิธีนี้มีข้อจำกัด คือ สารพวกเมลานอยดิน (Melanoidin) และสารอื่นๆ ที่ได้จากการสลายตัวของแอนโทไซยานิน (Anthocyanin degradation products) สามารถดูดกลืนแสงในช่วงเดียวกับแอนโทไซยานินทำให้ค่าที่วัดได้ไม่ถูกต้อง ดังนั้นวิธีพีเอช-ดิฟเฟอเรนเชียล จึงได้ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อแก้ข้อบกพร่องในจุดนี้ และปัจจุบันเป็นวิธีการวัดปริมาณแอนโทไซยานินที่ได้รับความนิยมมากที่สุด

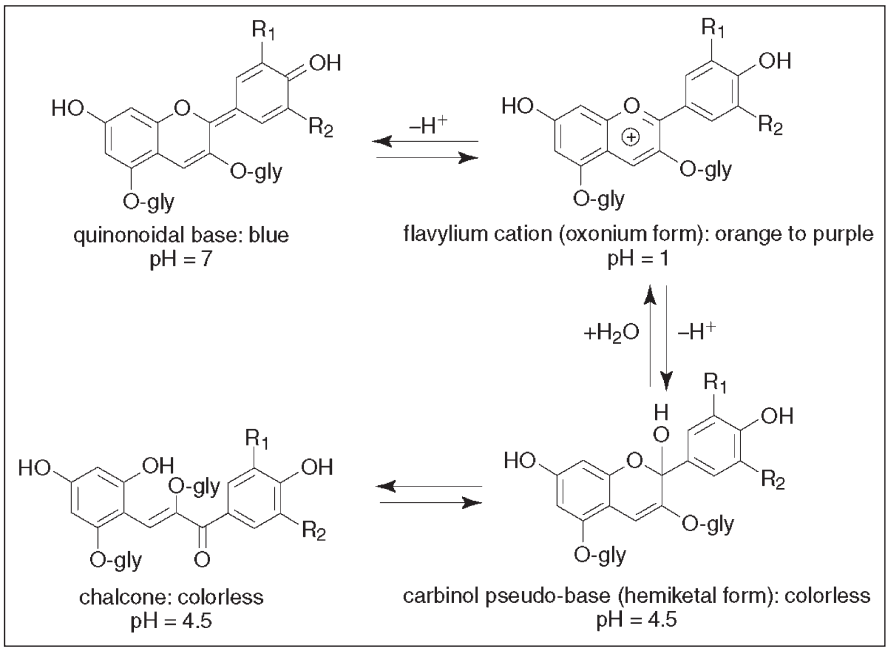
วิธีพีเอช-ดิฟเฟอเรนเชียล [20] เป็นวิธีที่พัฒนาจากการที่โครงสร้างของแอนโทไซยานินเปลี่ยนแปลงไปได้ตามการเปลี่ยนแปลงค่า pH ทำให้การดูดกลืนแสงของแอนโทไซยานินเปลี่ยนไป (ดังภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 อัลตราไวโอเลตวิสิเบิลสเปกตรัมของแอนโทไซยานินจากหัวแรดิช (Radish) ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 1.0 และ 4.5 [20]

เมื่อนำสารสกัดแอนโทไซยานินจากหัวแรดิช (Radish) ปรับ pH ให้เป็น 1 และนำไปค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นระหว่าง 260–700 นาโนเมตร พบว่า แอนโทไซยานินดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นระหว่าง 460–560 นาโนเมตร และเมื่อปรับ pH ให้เป็น 4.5 การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นดังกล่าวหายไป เนื่องจากที่ pH 1 โครงสร้างของแอนโทไซยานินจะอยู่ในรูปออกโซเนียม (Oxonium form)

ซึ่งมีสี และที่ pH 4.5 โครงสร้างแอนโทไซยานินจะอยู่ในรูปเฮมิคีทอล (Hemiketal form) ซึ่งไม่มีสี ดังภาพที่ 3 ในขณะที่ถ้าในตัวอย่างมีสารอื่นๆ ที่ดูดกลืนแสงช่วงเดียวกับแอนโทไซยานิน เมื่อเปลี่ยน pH เป็น 4.5 ค่าการดูดกลืนแสงของสารอื่นๆ จะเท่าเดิมในขณะที่ค่าการดูดกลืนแสงของแอนโท-ไซยานินจะหายไป



ภาพที่ 3 โครงสร้างของ แอนโทไซยานินที่ pH ต่างๆ [20]

ดังนั้น การวัดด้วยวิธีนี้จะต้องวัดค่าการดูดกลืนแสงของแอนโทไซยานินที่ความยาวคลื่นสูงสุดที่ pH 1 และ 4.5 นำมาหักลบกันเพื่อกำจัดการดูดกลืนแสงจากสารอื่นๆ ที่ไม่ใช่แอนโทไซยานิน และการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร เพื่อหักลบค่าความขุ่นที่อาจเกิดขึ้น เพื่อให้ผลที่ได้มีความถูกต้องและแม่นยำมากขึ้น เมื่อได้ค่าทั้งหมดนำไปหาปริมาณแอนโทไซยานิน ตามสมการที่ 1

$$\text{Monomeric anthocyanin (mg/liter)} = (A \times MW \times DF \times 1000)/(\varepsilon \times 1)$$

โดยที่ A = $(A_{\lambda vis\ max} - A_{700})_{pH\ 1.0} - (A_{\lambda vis\ max} - A_{700})_{pH\ 4.5}$

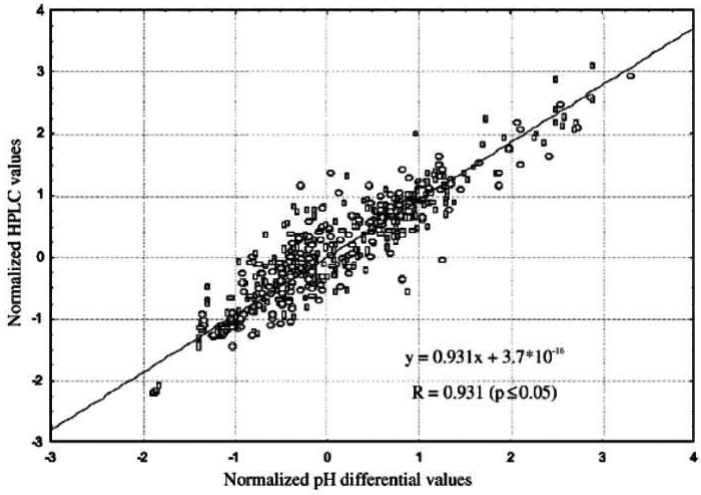
= (ค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่นสูงสุดของตัวอย่างที่ใส่สารละลายบัฟเฟอร์ pH 1.0 – ค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่นที่ 700 นาโนเมตร ของตัวอย่างที่ใส่สารละลายบัฟเฟอร์ pH 1.0) – (ค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่นสูงสุดของตัวอย่างที่ใส่สารละลายบัฟเฟอร์ pH 4.5 – ค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่นที่ 700 นาโนเมตร ของตัวอย่างที่ใส่สารละลายบัฟเฟอร์ pH 4.5)

MW = มวลโมเลกุล

DF = Dilution factor (ถ้าใช้ตัวอย่าง 0.2 มิลลิลิตร เจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์จนมีปริมาตร เป็น 3 มิลลิ-ลิตร ใช้ค่า DF เท่ากับ 15)

ε = โมลาร์แอบซอบติวิตี้ (Molar absorptivity) ค่านี้จะขึ้นกับชนิดของแอนโทไซยานินและตัวทำละลาย โดยทั่วไปมักใช้ค่าของไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ (Cyanidin-3-glucoside) ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 1.0 ซึ่งเท่ากับ 26,900 M^{-1} cm^{-1}

ข้อควรระวังของวิธีพีเอช-ดิฟเฟอเรนเชียล คือ ควรมีการตรวจสอบ pH ของสารละลายบัฟเฟอร์ก่อนใช้เพราะการที่ pH สูงหรือต่ำกว่ามาตราฐานจะทำให้การวัดปริมาณแอนโทไซยานินไม่ถูกต้อง การเจือจางตัวอย่างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ โดยใช้ปริมาตรตัวอย่างที่มากเกินไปอาจทำให้สารละลายบัฟเฟอร์ไม่สามารถในการต้านทานการเปลี่ยนแปลง pH ได้ จึงควรใช้ตัวอย่างไม่เกิน 20% ของปริมาตรทั้งหมด การวัดค่าการดูดกลืนแสงควรวัดหลังเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ เป็นเวลา 15-60 นาที การทิ้งตัวอย่างไว้นานเกินไปจะทำให้ค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มมากขึ้น ถ้าตัวอย่างเป็นแอนโทไซยานินที่มีหมู่เอซิล (Acyl) เป็นจำนวนมาก (Highly acylated anthocyains) จะไม่ตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลง pH เหมือนกับ แอนโทไซยานินที่ไม่มีหมู่เอซิล (Acyl) หรือมีหมู่ เอซิล (Acyl) เป็นจำนวนน้อย [20] Lee และคณะ [24] ทำการเปรียบเทียบการวัดปริมาณแอนโทไซยานินระหว่างวิธีพีเอช-ดิฟเฟอเรนเชียล และเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography) ในตัวอย่าง 7 ชนิดพบว่า ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดที่วัดจากทั้ง 2 วิธี มีความสัมพันธ์กัน ดังภาพที่ 4 ดังนั้นวิธีพีเอช-ดิฟเฟอเรนเชียล เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถใช้ได้เมื่อไม่มีเครื่อง HPLC



ภาพที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแอนโทไซยานินที่วิเคราะห์จากวิธีพีเอช-ดิฟเฟอเรนเชียล และเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง [24]

นอกจากการวัดปริมาณแอนโทไซยานินแล้วยังมีวิธีอื่นๆ ที่ใช้เพื่อตรวจสอบการสลายตัวของแอนโทไซยานิน เช่น การวัดดัชนีของการเกิดสีน้ำตาล (Browning index) การวัด Polymerized anthocyanin (Polymeric color หรือสีจากพอลิเมอร์) และเปอร์เซ็นต์ของสีจากพอลิเมอร์ (Percent polymeric color) [20] ซึ่งค่าทั้งหมดสามารถวิเคราะห์โดยใช้หลักที่ว่า ไบซัลไฟต์ (Bisulfite) จะทำปฏิกิริยากับแอนโทไซยานินเกิดสารประกอบที่ไม่มีสี ในขณะที่สารประกอบเชิงซ้อนระหว่างแอนโทไซยานินและแทนนิน และพอลิเมอร์ของแอนโทไซยานินจะทนต่อปฏิกิริยาและไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงสี ดังนั้นเมื่อนำ

ตัวอย่างไปผสมกับสารละลายไบซัลไฟต์ (Bisulfite) และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร ค่าที่วัดได้จะแสดงดัชนีของการเกิดสีน้ำตาล (Browning index)

การวัด Polymerized anthocyanin และเปอร์เซ็นต์ของสีของพอลิเมอร์ สามารถทำได้โดยนำตัวอย่างไปวัดสีของพอลิเมอร์ (Polymeric color) และความหนาแน่นของสี (Color Density) อัตราส่วนระหว่างสีของพอลิเมอร์ต่อความหนาแน่นของสีทั้งหมดคูณด้วย 100 จะเป็นค่าของเปอร์เซ็นต์สีจากพอลิเมอร์ ถ้าเปอร์เซ็นต์สีจากพอลิเมอร์มากแสดงว่าเกิดการสลายตัวมาก [20]

การวัดความหนาแน่นของสี (Color density) วัดโดยนำตัวอย่างไปผสมกับน้ำประมาณ 6.5% และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุด ที่ 420 นาโนเมตร และ 700 นาโนเมตร นำไปคำนวนตามสมการจะได้ค่าความหนาแน่นของสี [20]

$$\text{Color density} = ((A_{420nm} - A_{700nm}) + (A_{vis\text{-}max} - A_{700}nm)) \times DF$$

โดยที่ A_{420nm} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร

A_{700nm} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร

$A_{vis\text{-}max}$ = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุด

DF = Dilution factor ของตัวอย่าง ถ้ามีการเจือจาง

การวัดสีของพอลิเมอร์ (Polymeric color) วัดโดยนำตัวอย่างไปผสมกับสารละลาย ไบซัลไฟต์ (โพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ความเข้มข้น 20% (w/v)) ประมาณ 6.5% และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุด ที่ 420 นาโนเมตร และ 700 นาโนเมตรนำไปคำนวนตามสมการจะได้ค่าสีของพอลิเมอร์

$$\text{Polymeric color} = ((A_{420nm} - A_{700nm}) + (A_{vis\text{-}max} - A_{700}nm)) \times DF$$

โดยที่ A_{420nm} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร

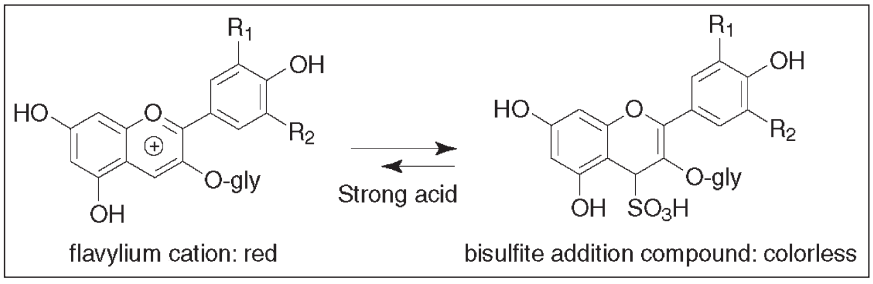
A_{700nm} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร

$A_{vis\text{-}max}$ = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุด

DF = Dilution factor ของตัวอย่าง ถ้ามีการเจือจาง

Percent polymeric color = (Polymeric color/ Color density) × 100

ข้อควรระวังของวิธีนี้ คือ วิธีนี้เหมาะกับการวิเคราะห์น้ำผลไม้ ซึ่งมี pH ประมาณ 3 ถ้าตัวอย่างเป็นกลางหรือด่างต้องมีการปรับให้เป็นกรดอ่อน ถ้าปรับเป็นกรดแก่จะทำให้เกิดปฏิกิริยาย้อนกลับของไบซัลไฟต์ ดังภาพที่ 5 นอกจากนั้นการวัดค่าการดูดกลืนแสงควรวัดหลังเติมน้ำหรือสารละลายไบซัลไฟต์ เป็นเวลา 15 ถึง 60 นาที การทิ้งตัวอย่างไว้นานเกินไปจะทำให้ค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มมากขึ้น



ภาพที่ 5 การเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างแอนโทไซยานินกับไบซัลไฟต์ [20]

การวิเคราะห์ชนิดแอนโทไซยานิน

การวิเคราะห์ชนิดของแอนโทไซยานินนิยมใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography, HPLC) เชื่อมต่อกับเครื่องตรวจจับสัญญาณต่าง ๆ เช่น เครื่อง Diode array และ เครื่อง MS [5, 17–18, 25] โดยคอลัมน์ส่วนใหญ่ที่ใช้ในการวิเคราะห์ คือ คอลัมน์ C18 ตัวทำละลายที่ใช้พาตัวอย่างเข้าไปในคอลัมน์ (Mobile phase) มีหลายชนิด เช่น สารผสมระหว่างน้ำและเมทานอล (Methanol) และสารผสมระหว่างน้ำและสารอะซิโตไนตรัล (Acetonitrile) ซึ่งอาจมีการเติมกรดบางชนิดลงไปเพื่อทำให้มีความเป็นกรดสูง เพื่อป้องกันการเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของแอนโทไซยานิน Durst และ Wrolstad [5] เสนอวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์ ตัวอย่างที่ไม่มี นอนอะซิเลตเทต แอนโทไซยานิน และตัวอย่างที่มี อะซิเลตเทต แอนโท–ไซยานิน สำหรับตัวอย่างที่ไม่ทราบว่าเป็นแอนโท–ไซยานินชนิดใดนั้นจะต้องมีการใช้เทคนิคการย่อยด้วยกรด (Acid hydrolysis) และการย่อยด้วยด่าง (Alkaline hydrolysis) เพื่อช่วยในการวิเคราะห์ว่าแอนโทไซยานินชนิดนั้น ประกอบด้วย แอนโธ–ไซยานิดิน น้ำตาล และกรดชนิดใด Pazmino–Duran และคณะ [17] ใช้เทคนิคการย่อยด้วยกรดและด่างเพื่อวิเคราะห์ชนิดของแอนโทไซยานินในกลีบดอกของกล้วยพบว่า มีแอนโธไซยานิดิน 6 ชนิด ได้แก่ เพลาโกนิดิน (Pelargonidin) ไซยานิดิน (Cyanidin) เดลฟินิดิน (Delphinidin) พีโอนิดิน (Peonidin) เพทุนิดิน (Petunidin) และมอลวิดิน (Malvidin) และบางตัวเป็น อะซิเลตเทต แอนโทไซยานิน ที่มีกรดซักซินิก (Succinic acid) เป็นส่วนประกอบ

การย่อยด้วยกรด จะทำให้ทราบชนิดของแอนโธไซยานิดิน ทำโดยนำกรดมาย่อยพันธะไกลโค–ซิดิกและพันธะเอสเทอร์ในโครงสร้างของแอนโท–ไซยานินให้เหลือแต่โครงสร้างของแอนโธไซยานิดิน แล้วนำไปวิเคราะห์ ซึ่งการย่อยด้วยกรดทำได้โดยเติมกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 2 นอร์มัล ให้ความร้อนในอ่างน้ำเดือดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และทำให้เย็นทันทีโดยใช้อ่างน้ำแข็ง ทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านตัวดูดซับของแข็ง C18 (SPE–C18) นำไปวิเคราะห์หาชนิดของแอนโธไซยานิดิน โดยใช้เครื่อง HPLC Durst และ Wrolstad [5] ทำการพัฒนาวิธีวิเคราะห์แอนโธไซยานิดินโดยใช้คอลัมน์ C18 และ รายงานลำดับของแอนโธไซยานิดินที่ผ่านคอลัมน์มีดังนี้ เดลฟินิดิน (Delphinidin) ไซยานิดิน (Cyanidin) เพทุนิดิน (Petunidin) เพลาโกนิดิน (Pelargonidin) พีโอนิดิน (Peonidin) และมอลวิดิน (Malvidin) ตามลำดับ

การย่อยด้วยด่าง จะทำให้ทราบว่าแอนโท–ไซยานินชนิดนั้นเป็นนอนอะซิเลตเทต แอนโท–ไซยานิน หรืออะซิเลตเทต แอนโทไซยานิน เพราะด่างจะสามารถย่อยพันธะเอสเทอร์ระหว่างกรดและแอนโทไซยานินออกทำให้เหลือแต่นอนอะซิเลตเทต แอนโทไซยานิน สำหรับกรดที่แยกออกมาสามารถนำไปวิเคราะห์หาชนิดของกรดได้ด้วย เครื่อง HPLC การย่อยด้วยด่างทำได้โดยเติมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 10% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเติมกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 2 นอร์มัล ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เพื่อปรับให้เกิดภาวะสมดุลของสารละลาย หลังจากนั้นทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านตัวดูดซับของแข็ง C18 (SPE–C18) นำไปวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง HPLC นำข้อมูลของ HPLC ไปเปรียบเทียบ ถ้าตัวอย่างมีอะซิเลตเทต แอนโทไซยานิน ความสูงของพีคของอะซิเลตเทต แอนโทไซยานิน จะลดลง

นอกจากการย่อยด้วยกรดและการย่อยด้วยด่างที่สามารถช่วยในการวิเคราะห์แอนโทไซยานินที่ไม่ทราบชนิดแล้ว ปัจจุบันนี้มีการใช้เครื่องแมสสเปคโตรมิเตอร์เชื่อมต่อกับเครื่อง HPLC เพื่อวิเคราะห์ชนิดของแอนโทไซยานินโดยตรวจสอบจากมวลโมเลกุล [17, 25–27] De Rosso และคณะ [26]

ใช้เครื่อง HPLC เชื่อมต่อกับ Photo diode array และแมสสเปคโตรมิเตอร์ สองเครื่องในการวิเคราะห์ชนิดของแอนโทไซยานินใน Acerola และ Acai พบว่า การใช้แมสสเปคโตรมิเตอร์ สองเครื่องมีประโยชน์ในการวิเคราะห์ชนิดของแอนโทไซยานินเป็นอย่างยิ่ง โดยข้อมูลจากแมสสเปคโตรมิเตอร์เครื่องแรกจะบอกมวลโมเลกุลของโครงสร้างแอนโทไซยานินชนิดนั้นๆ และเครื่องที่สองทำให้โมเลกุลของแอนโทไซยานินแตกออก และได้เป็นโมเลกุลเล็กลง เช่น ไซยานิดิน-3-รูติโนไซด์ (Cyanidin-3-rutinoside) เมื่อผ่านแมสสเปคโตรมิเตอร์ตัวแรกจะได้มวลโมเลกุลเท่ากับ 595 m/z และเมื่อผ่านแมสสเปคโตรมิเตอร์ ตัวที่ 2 จะได้มวลโมเลกุล เท่ากับ 449 และ 287 ซึ่งคือ มวลโมเลกุลของไซยานิดินที่มีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเกาะอยู่ (Cyanidin monoglucoside) และ Cyanidin ตามลำดับ

สรุป

แอนโทไซยานินเป็นรงควัตถุที่พบในพืช โครงสร้างของแอนโทไซยานินประกอบด้วย แอนโธไซยานิดิน น้ำตาล และหรือกรด การสกัดแอนโทไซยานินทำได้โดยใช้ตัวทำละลาย เช่น น้ำ เมทานอล เอทานอล และอะซีโตน และสามารถทำให้บริสุทธิ์ได้โดยใช้เทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง การวิเคราะห์แอนโทไซยานินสามารถวิเคราะห์ได้โดยใช้เครื่องอัลตราไวโอเลตวิสิเบิลสเปคโตรมิเตอร์ (UV-Visible spectrometer) โดยใช้วิธีพีเอช-ดิฟเฟอเรนเชียลและเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ซึ่งวิธีพีเอช-ดิฟเฟอเรนเชียลมักใช้ในการวัดปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด ขณะที่การวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง HPLC เป็นการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของแอนโทไซยานิน ทั้งสองวิธีนี้มีความสัมพันธ์กันในเชิงบวก ดังนั้นวิธีพีเอช-ดิฟเฟอเรนเชียลเป็นอีกทางเลือกที่สามารถใช้วิเคราะห์เมื่อไม่มีเครื่อง HPLC นอกจากนั้นในการวิเคราะห์แอนโทไซยานินที่ไม่ทราบชนิดจำเป็นต้องใช้เทคนิคการย่อยด้วยกรดและการย่อยด้วยด่างก่อนวิเคราะห์ด้วย HPLC เพื่อสลายพันธะไกลโคซิดิกและพันธะเอสเทอร์ในโครงสร้างแอนโทไซยานินเพื่อให้วิเคราะห์หาชนิดของแอนโธไซยานิดิน น้ำตาล และกรดได้ หรืออาจใช้เครื่อง HPLC เชื่อต่อกับเครื่องแมสสเปคโตรมิเตอร์เพื่อให้ผลเทียบเคียงกัน

เอกสารอ้างอิง

[1] Konczak, I.; & Zhang, W. (2004). Anthocyanins-more than natures colours. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 5: 239-240.

[2] Lule, S.U.; & Xia, W. (2005). Food phenolics, pros and cons: A review. *Food Reviews International*. 21: 367-388.

[3] Ghiselli, A.; et al. (1998). Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from an Italian red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46: 361-367.

[4] Mazza, G.; & Miniati, E. (1993). *Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains*. Boca Raton: CRC Press.

[5] Durst, R.W.; & Wrolstad, R.E. (2001). Seperation and characterization of anthocyanins by HPLC. *Current protocols in food analytical chemistry*. F1.3.1-F1.3.13.

[6] Kähkönen, M.; Hopia, A.I.; & Heinonen, M. (2001). Berry phenolics and their antioxidant activity. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 49: 4076-4082.

[7] Metivier, R.P.; Francis, F.J.; & Clydesdale, F.M. (1980). Solvent extraction of anthocyanins from wine pomace. *Journal of food science*. 45: 1099–1100

[8] ทรงศิริ วงศ์จิตตภิญโญ; ชนิตา โชติรสเวคิน; และ ศศิธร ตรงจิตภักดี. (2552). ผลของชนิดตัวทำละลายที่ใช้สกัดต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด แอนโทไซยานินทั้งหมดและสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของเปลือกและเมล็ดองุ่น. ใน *การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47: สาขาอุตสาหกรรมเกษตร 17–20 มี.ค. 2552 ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์*. หน้า 760–767. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

[9] Donner, H.; Gao, L.; & Mazza, G. (1997). Separation and characterization of simple and molnylated anthoycains in red onions, *Allium cepa* L. *Food Research International*. 30: 637–643.

[10] Gradinaru, G.; et al. (2003). Thermal stability of *Hisbicus sabdariffa* L. anthocyanins in solution and in solid state: effect of copigmentation and glass transition. *Food Chemistry*. 83: 423–436.

[11] Cacace, J.E.; & Mazza, G. (2002). Extraction of anthocyanins and other phenolics from black currants with sulfured water. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 50: 5939–5946.

[12] Revilla, E., Ryan, J.M.; & Martin–Ortega, G. (1998). Comparison of several procedures used for the extraction of anthocyanins from red grape. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 46: 4592–4597.

[13] Bakker, J.; & Timberlake, C.F. (1985). The distribution of anthocyanins in grape skin extracts of Port wine cultivars as determined by high performance liquid chromatography. *Journal of science food agriculture*. 35: 1315–1324.

[14] Chaovanalikit A.; & Wrolstad, RE. (2004). Total anthocyanins and total phenolics of fresh and rocessed cherries and their antioxidant properties. *Journal of food science*. 69: FCT67–FCT72.

[15] Rodriguwz–Saona, L.E.; & Wrolstad, R.E. (2001) Extraction, Isolation, and Purification of Anthocyanins. *Current protocols in food analytical chemistry*. F1.1.1–F1.1.11.

[16] Wrolstad, R.E; & Durst, R.W. (1999) Use of anthocyanin and polyphenolic analyses in authenticating in fruit juice. In *Proceedings of Fruit Authenticity Workshop*. pp. 79–86. Canada: Montreal.

[17] Pazmino–Duran, A.E.; et al. (2001). Anthocyanins from banana bracts *(Musa X paradisiaca)* as potential food colorant. *Food Chemistry*. 73: 327–332.

[18] Todaro, A.; et al. (2009). Recovery of anthocyanins from eggplant peel. *Food Chemistry*. 114: 434–439.

[19] Iland, P.G.; et al. (1996). Optimisation of methods for the determination of total and red free glycosyl-glucose in black grape berries of *Vitis vinifera*. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 2: 171-178.

[20] Giusti, M.M.; & Wrolstad, R.E. (2001). Characterization and measurement of anthocyanins by UV-Visible spectroscopy. *Current protocols in food analytical chemistry*. F1.2.1-F1.2.13.

[21] Hurtado, N.H.; et al. (2009). Color, pH stability and antioxidant activity of anthocyanin rutinosides isolated from tamarillo fruit (*Solanum betaceum Cav.*). *Food Chemistry*. 117: 88-93.

[22] Kirca, A.; Ozkan, M.; & Cemeroglu, B. (2006). Stability of black carrot anthocyanins in various fruit juices and nectars. *Food Chemistry*. 97: 598-605.

[23] Fuleki, T.; & Francis, F.J. (1968). Quantitative methods for anthocyanins. Extraction and determination of total anthocyanin in cranberries. *Journal of food science*. 33: 72.

[24] Lee, J.; Rennaker, C.; & Wrolstad, R.E. (2008). Correlation of two anthocyanin quantification methods: HPLC and spectrophotometeric methods. *Food Chemistry*. 110: 782-786.

[25] Zhang, Z.; et al. (2004). Purification and structural analysis of anthocyanin from litchi pericarp. *Food Chemistry*. 84: 601-604.

[26] De Rosso, V.V.; et al. (2008). Determination of anthocyanins from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) and acai (*Euterpe oleracea* Mart.) by HPLC-PDA-MS/MS). *Journal of food composition and analysis*. 21: 291-299.

[27] Huang, Z.; et al. (2009). Identification of anthocyanins in muscadine grapes with HPLC-ESI-MS. *LWT-Food science and technology*. 42: 819-824.