

บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

สารสกัดแอนโทไซยานินส์จากใบผีเสื้อราตรี

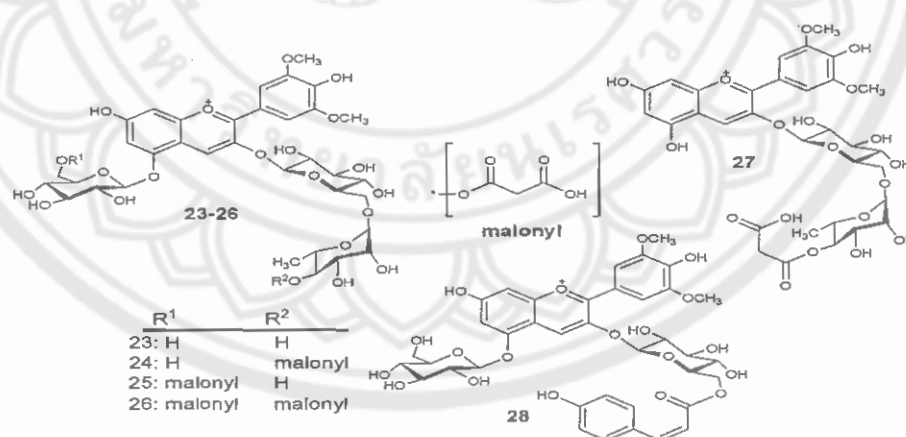
ผีเสื้อราตรี มีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Oxalis triangularis* สกุล *Oxalis* มาจากภาษากรีก oxys แปลว่า acid หรือความเป็นกรด เป็นสกุลไม้ล้มลุกขนาดเล็ก มีจำนวนมากกว่า 700 ชนิด กระจายพันธุ์อยู่ทั่วโลก โดยเฉพาะแถบอเมริกาใต้ แอฟริกาใต้ ลักษณะเด่นคือมีใบเป็นใบประกอบแบบ 3 ใบย่อย แผ่นใบรูปหัวใจกลับ ไม้หนาหรือบางมาก ผิวใบด้านบนสีม่วงเข้ม เนื่องจากผีเสื้อราตรีมีรูปร่างของใบและดอกสวยงาม จึงนิยมปลูกเป็นไม้ประดับตกแต่งอาคาร นอกจากนี้ยังมีผู้นำมาใช้เป็นสมุนไพรรักษาอาการอักเสบ (สมเพียร เกษมทรัพย์, 2540)



ภาพ 26 ต้นผีเสื้อราตรี

จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารสีที่สกัดได้จากใบผีเสื้อราตรีของ Pazmiño-Durán, E.A., et.al. (2001) พบว่ามีสารสีในกลุ่มของสารประกอบ malvidin-3,5-diglucoside สูงถึง 195 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักใบ 100 กรัม ต่อมา Fossen, T., et. al. (2005) ได้ทำการแยกบริสุทธิ์สารสีที่สกัดได้จากใบผีเสื้อราตรีด้วยเทคนิค HPLC จากนั้นทำการพิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิค 2D NMR spectroscopy และ Electrospray MS พบว่า สามารถแยกสารประกอบ malvidins ได้ 7 ชนิด คือ

1. malvidin-3-O-(6-O-(4-O-malonyl- α -rhamnopyranosyl)- β -glucopyranoside)-5-O- β -gluco-pyranoside (23)
2. malvidin-3-O-(6-O- α -rhamnopyranosyl- β -glucopyrano-side)-5-O-(6-O-malonyl- β -glucopyranoside) (24)
3. malvidin-3-O-(6-O-(4-O-malonyl- α -rhamno-pyra-nosyl)- β -glucopyranoside)-5-O-(6-O-malonyl- β -glucopyranoside) (25)
4. malvidin-3-O-(6-O-(4-O-malonyl- α -rhamnopyranosyl)- β -glucopyranoside) (26)
5. malvidin-3-O-(6-O-(Z)-*p*-coumaroyl- β -glucopyranoside)-5-O- β -glucopyranoside (27)
6. malvidin-3-O-(6-O- α -rhamnopyranosyl- β -glucopyranoside)-5-O- β -glucopyranoside (28)
7. malvidin-3-O-(6-O-(E)-*p*-coumaroyl- β -glucopyranoside)-5-O- β -glucopyranoside (29) มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายกับสารประกอบ (28) แต่มีส่วนของหมู่ acyl เป็นรูปแบบ Z isomer

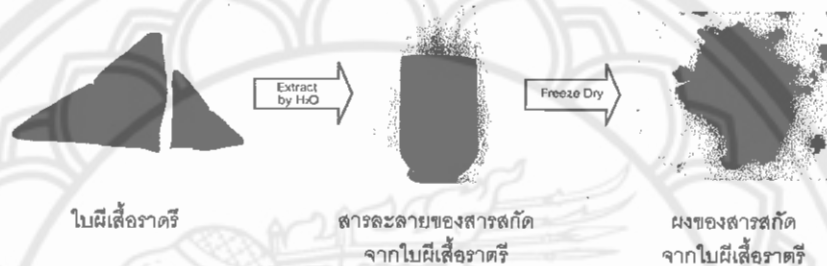


ภาพ 27 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบแอนโทไซยานินส์ที่แยกได้จากใบของต้นผีเสื้อราตรี (*Oxalis triangularis*)

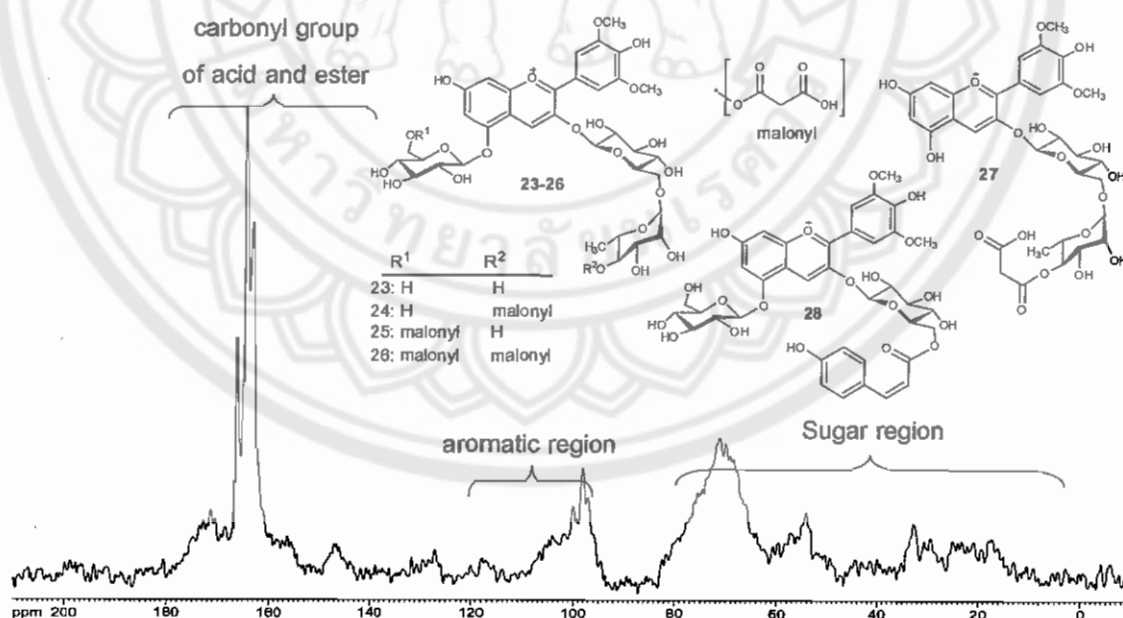
ที่มา: Fossen, T., et. al., 2005

1. การสกัดสารแอนโธไซยานินส์จากใบผีเสื้อราตรี

สารละลายของสารสกัดจากใบต้นผีเสื้อราตรี (*Oxalis triangularis*) มีสีม่วงเข้ม เมื่อนำมาทำให้เป็นผงของแข็งด้วยเครื่องทำแห้งเยือกแข็งสุญญากาศ (Freeze Drying) ผงของแข็งของสารสกัดที่ได้นี้จะเป็ผงสีม่วงเข้ม (ภาพ 28) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ยังคงสภาพที่ดี พร้อมแก่การนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

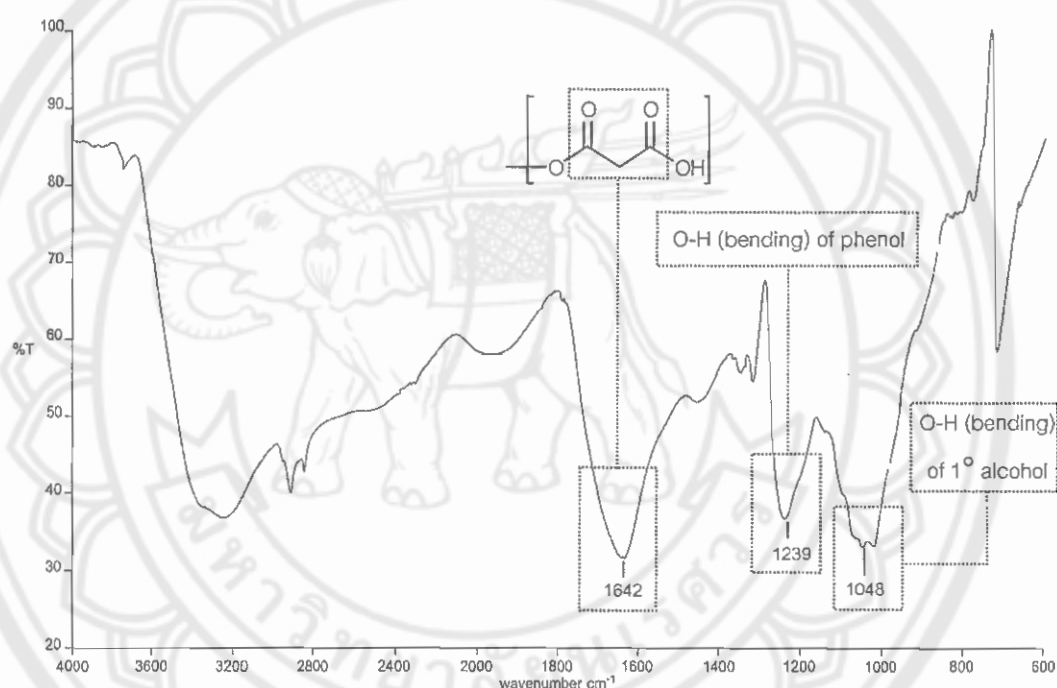


ภาพ 28 ขั้นตอนการสกัด และเตรียมสารสกัดจากใบผีเสื้อราตรี



ภาพ 29 ¹³C NMR สเปกตรัมของสารแอนโธไซยานินส์ที่สกัดได้จากใบผีเสื้อราตรี (solids state)

ผลจากการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารแอนโรไซยานินส์ที่สกัดได้จากใบผีเสื้อราตรีด้วยเทคนิค ^{13}C NMR spectroscopy (ภาพ 29) จะปรากฏกลุ่มสัญญาณอยู่ 3 กลุ่ม โดยกลุ่มแรกอยู่ในช่วง 180 - 140 ppm เป็นกลุ่มสัญญาณหมู่คาร์บอนิลของหมู่ฟังก์ชันคาร์บอกซิลิก แอซิด และเอสเทอร์ กลุ่มที่สองจะอยู่ในช่วง 120 - 100 ซึ่งเป็นกลุ่มสัญญาณของโครงสร้างในส่วนอะโรมาติก โดยส่วนนี้เป็นส่วนสำคัญที่ทำให้สารประกอบมีสี และเกิดการเปลี่ยนแปลงสีได้ สำหรับสัญญาณกลุ่มที่สามจะอยู่ในช่วง 80 - 10 ppm ซึ่งเป็นกลุ่มสัญญาณของโครงสร้างส่วนน้ำตาล ซึ่งในส่วนนี้นั้นจะเป็นส่วนสำคัญที่จะช่วยให้สีของสารประกอบมีเสถียรภาพดีขึ้น



ภาพ 30 FT-IR สเปกตรัมของของสารแอนโรไซยานินส์ที่สกัดได้จากใบผีเสื้อราตรี

ผลจากการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารแอนโรไซยานินส์ที่สกัดได้จากใบผีเสื้อราตรีด้วยเทคนิค IR spectroscopy (ภาพ 30) จะปรากฏสัญญาณ $\text{C}=\text{O}$ stretching ซึ่งเป็นสัญญาณเอกลักษณ์โครงสร้างทางเคมีของหมู่คาร์บอนิลของหมู่ฟังก์ชันคาร์บอกซิลิกแอซิด ที่ตำแหน่ง 1642 cm^{-1} และนอกจากนี้ยังปรากฏสัญญาณ O-H bending ซึ่งเป็นสัญญาณเอกลักษณ์ของอนุพันธ์ฟีนอลที่ตำแหน่ง 1239 cm^{-1} และสัญญาณ O-H bending ของ 1° แอลกอฮอล์ที่ตำแหน่ง 1048 cm^{-1} ด้วย

2. ทดสอบสมบัติการเปลี่ยนสีของสารสกัดแอนโทไซยานินส์จากใบฝี่เสื่อราตรี

เมื่อนำสารสกัดแอนโทไซยานินส์จากใบฝี่เสื่อราตรี 4% ในน้ำกลั่น ทดสอบการเปลี่ยนสีด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ pH 4.5 และ 5.0 จากนั้นทดสอบต่อด้วยเทคนิค spectrophotometry เพื่อหาค่าสี โดยใช้การวัดสีในระบบ CIELAB เพื่อวัดค่า L^* , a^* , b^* ซึ่งใช้โปรแกรมทางคอมพิวเตอร์ช่วยในการคำนวณ แสดงผลดังตาราง 5 และคำนวณหาค่าของความแตกต่างโดยรวมของสี จากสมการ (Francis, Fj., 1983)

$$\text{Total color difference (TCD, } \Delta E) = [(L^*_1 - L^*_2)^2 + (a^*_1 - a^*_2)^2 + (b^*_1 - b^*_2)^2]^{1/2}$$

โดยที่

L^*_1, a^*_1 และ b^*_1 คือ ค่าความสว่าง ค่าความแดง และค่าความเหลืองของสีที่ 1

L^*_2, a^*_2 และ b^*_2 คือ ค่าความสว่าง ค่าความแดง และค่าความเหลืองของสีที่ 2

ตาราง 5 ค่าสี (L^* , a^* , b^*) ของสารสกัดแอนโทไซยานินส์ที่ทดสอบด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ pH 4.5 และ 5.0

ตัวอย่าง	ผลการทดลอง		
	L^*	a^*	b^*
สารละลายบัฟเฟอร์ที่ pH 4.5 ครั้งที่ 1	41.09	13.64	13.63
สารละลายบัฟเฟอร์ที่ pH 4.5 ครั้งที่ 2	48.24	12.50	13.87
สารละลายบัฟเฟอร์ที่ pH 4.5 ครั้งที่ 3	47.50	13.18	14.27
สารละลายบัฟเฟอร์ที่ pH 5.0 ครั้งที่ 1	48.68	10.26	15.06
สารละลายบัฟเฟอร์ที่ pH 5.0 ครั้งที่ 2	50.73	10.39	14.92
สารละลายบัฟเฟอร์ที่ pH 5.0 ครั้งที่ 3	49.90	10.15	15.35

เมื่อพิจารณาค่าความแตกต่างโดยรวมของสี (TCD) ซึ่งตาของมนุษย์จะสามารถสังเกตเห็นความแตกต่างโดยรวมของสีได้เมื่อมีค่ามากกว่า 5 และจะสามารถแยกแยะสีได้เมื่อค่าความแตกต่างโดยรวมของสีมีค่ามากกว่า 12 (Francis, Fj., 1983) จากผลการทดลองที่ได้เมื่อคำนวณหาความแตกต่างโดยรวมของสีระหว่างสารสกัดแอนโรไซยานินส์ที่ทดสอบด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ pH 4.5 และ 5.0 พบว่า สีของสารละลายทั้งสองนั้น มีค่าความแตกต่างโดยรวมของสี เท่ากับ 5.29 โดยที่มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 2.73 ซึ่งความแตกต่างโดยรวมของสีนี้ อยู่ในระดับที่ตาของมนุษย์สามารถสังเกตเห็นความแตกต่างโดยรวมของสีได้ แต่ไม่สามารถแยกแยะสีได้ด้วยตาเปล่า

จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารสกัดแอนโรไซยานินส์ที่สกัดได้จากใบผีเสื้อราตรีนี้ พบว่า มีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Fossen (2005) โดยสารแอนโรไซยานินส์ที่สกัดได้จากใบผีเสื้อราตรีจะมีหมู่ของ malonyl ($-\text{OCOCH}_2\text{COOH}$) เชื่อมต่อกับส่วนของน้ำตาลซึ่งเกาะอยู่กับคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 และ 5 ของสารแอนโรไซยานินส์ ทำให้สารที่สกัดได้จากใบผีเสื้อราตรีมีสภาวะความเป็นกรดสูง ($\text{pH} = 1.9$) ส่งผลรบกวนถึงสภาวะความเป็นกรดของผลิตภัณฑ์หมัก ตัวอย่างที่นำมาทำการทดสอบ ($\text{pH} = 4.5$) ซึ่งนับว่าเป็นอุปสรรคและปัญหาที่สำคัญต่อการนำเอาสารสกัดแอนโรไซยานินส์ที่สกัดได้จากใบผีเสื้อราตรีนี้ไปใช้เป็นตัวชี้วัดค่าความเป็นกรดในผลิตภัณฑ์อาหารหมักประเภทหมักโดยตรง อีกทั้งงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะพัฒนาวัสดุชีวภาพจากธรรมชาติ เพื่อใช้เป็นตัวชี้วัดความปลอดภัยต่อการบริโภคผลิตภัณฑ์อาหารหมัก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ทำการปรับปรุงให้สารแอนโรไซยานินส์เกิดการเปลี่ยนสีที่สามารถสังเกตเห็นความแตกต่างได้อย่างชัดเจน บนวัสดุจับยึดที่มีรูปแบบเหมาะสม และสะดวกต่อการนำไปใช้เป็นตัวชี้วัดความปลอดภัยต่อการบริโภคผลิตภัณฑ์อาหารหมักต่อไป

การเตรียมเม็ดโคโตซาน

งานวิจัยนี้ได้เลือกใช้โพลีเมอร์ชีวภาพโคโตซาน มาทำการศึกษาพัฒนาและปรับปรุงใช้เป็นวัสดุจับยึดกับสารสีแอนโรไซยานินส์ เพื่อนำไปใช้เป็นตัวชี้วัดความปลอดภัยต่อการบริโภคผลิตภัณฑ์อาหารหมัก โคโตซานนับว่าเป็นโพลีเมอร์ชีวภาพที่มีหมู่อะมิโน ($-\text{NH}_2$) ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยาสร้างพันธะเชื่อมต่อกับหมู่ malonyl ที่มีความเป็นกรดของสารแอนโรไซยานินส์ได้ ดังนั้นผลจากการทำปฏิกิริยาน่าที่จะสามารถเชื่อมต่อกับสารแอนโรไซยานินส์กับวัสดุจับยึดได้ โดยคงความสามารถในการเป็นอินดิเคเตอร์ดั้งเดิมและช่วยลดความเป็นกรดของสารสกัดแอนโรไซยานินส์

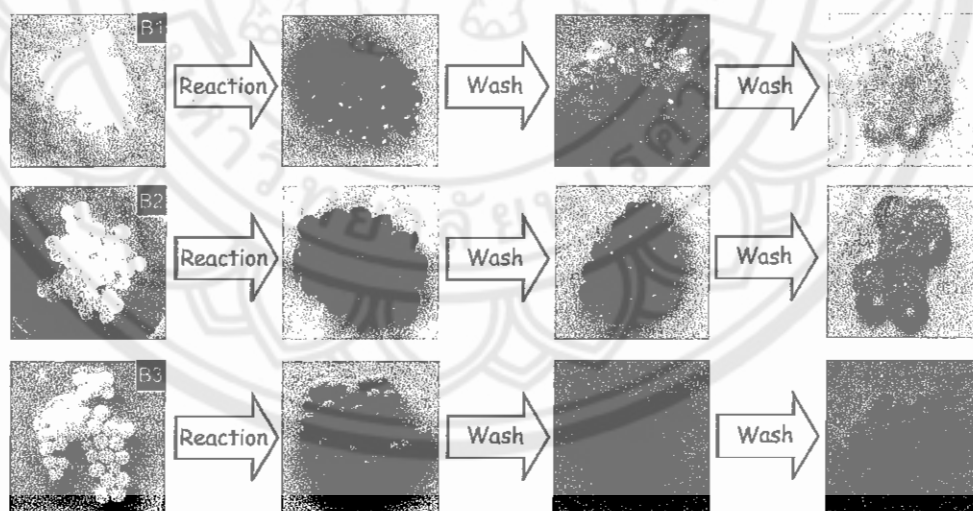
sulfonate เป็นองค์ประกอบ ซึ่งส่วนอะโรมาติกของ alkylbenzene นี้ น่าจะเป็นส่วนสำคัญที่ช่วยเพิ่มความแข็งแรงของเม็ดโคโตซาน

การเตรียมเม็ดสารประกอบแอนโรไซยานินส์-โคโตซาน

เนื่องจากงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะพัฒนาและปรับปรุงตัวชี้วัดความปลอดภัยต่อการบริโภคของผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากสารแอนโรไซยานินส์โดยมีเม็ดโคโตซานเป็นตัวจับยึด ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาปฏิกิริยาที่ทำให้สารแอนโรไซยานินส์ สามารถจับยึดบนเม็ดโคโตซานได้ดังรายละเอียดต่อไปนี้

1. การเตรียมเม็ดสารประกอบแอนโรไซยานินส์-โคโตซานโดยไม่ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา

ในการทดลองนี้จะทำการเตรียมเม็ดสารประกอบแอนโรไซยานินส์-โคโตซานจากเม็ดโคโตซาน (B1), (B2) และ (B3) ที่ได้เตรียมขึ้น ซึ่งเป็นการทำปฏิกิริยากันระหว่างหมู่อะมิโนบนโคโตซานกับหมู่ malony ของแอนโรไซยานินส์ ด้วยปฏิกิริยา nucleophilic substitution โดยไม่ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นนี้ นอกจากจะเป็นการเชื่อมตอสสารแอนโรไซยานินส์กับโคโตซานด้วยพันธะโควาเลนต์แล้ว ยังสามารถลดความเป็นกรดของสารแอนโรไซยานินส์อีกด้วย

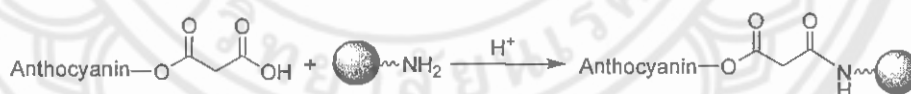


ภาพ 33 เม็ดสารประกอบแอนโรไซยานินส์-โคโตซานที่เตรียมด้วยเม็ดโคโตซานชนิดต่างๆ

จากผลการทดลองการเตรียมเม็ดสารประกอบแอนโทไซยานินส์-โคโตซาน จากเม็ดโคโตซาน (B1), (B2) และ (B3) กับสารแอนโทไซยานินส์ (ภาพ 33) จะพบว่า เม็ดโคโตซาน (B2) ซึ่งมีโครงสร้างของเม็ดที่แข็งแรง สามารถจับยึดสารแอนโทไซยานินส์ได้ดี โดยให้สีเข้มมากที่สุด และเมื่อทำการล้างเม็ดสารประกอบแอนโทไซยานินส์ที่เตรียมได้ด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลาเท่ากัน จะพบว่า เม็ดโคโตซาน (B2) ยังมีความสามารถในการจับยึดสารแอนโทไซยานินส์ได้ดีกว่าเม็ดโคโตซาน (B1) และ (B3) แต่เมื่อทำการล้างเม็ดสารประกอบแอนโทไซยานินส์-โคโตซานต่อไป จะพบว่าสีของแอนโทไซยานินส์บนเม็ดโคโตซาน (B2) ก็หลุดออกและละลายไปกับน้ำล้างจนได้ เม็ดสารประกอบแอนโทไซยานินส์-โคโตซานที่มีสีจางใกล้เคียงกับเม็ดโคโตซาน (B1) และ (B3) จากความสามารถในการจับยึดสารแอนโทไซยานินส์ของเม็ดโคโตซาน (B2) ที่ดี และนานกว่าเม็ดโคโตซาน (B1) และ (B3) ดังนั้น เม็ดโคโตซาน (B2) จึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการพัฒนา และปรับปรุงให้เกิดการจับยึดของสารแอนโทไซยานินส์บนเม็ดโคโตซานเพื่อใช้เป็นตัวชี้วัด ความปลอดภัยต่อการบริโภคของผลิตภัณฑ์อาหารหมักต่อไป

2. การเตรียมเม็ดสารประกอบแอนโทไซยานินส์-โคโตซาน โดยใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

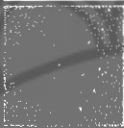
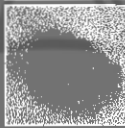
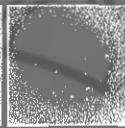
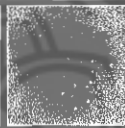
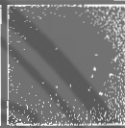
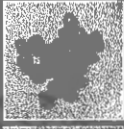



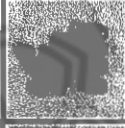
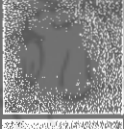
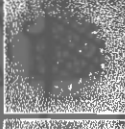
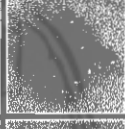
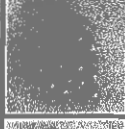
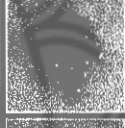
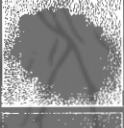
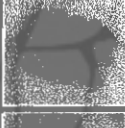


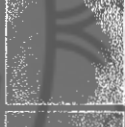


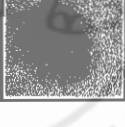


ในการทดลองนี้จะทำการเตรียมเม็ดสารประกอบแอนโทไซยานินส์-โคโตซาน ซึ่งเป็นการทำปฏิกิริยากันระหว่างหมู่อะมิโนบนโคโตซานกับหมู่ malonic acid ของแอนโทไซยานินส์ ด้วยปฏิกิริยา nucleophilic substitution จากเม็ดโคโตซาน (B2) โดยใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (ภาพ 34)



ภาพ 34 รูปแบบปฏิกิริยา nucleophilic substitution ระหว่างหมู่อะมิโนของโคโตซานกับหมู่ malonic acid ของแอนโทไซยานินส์

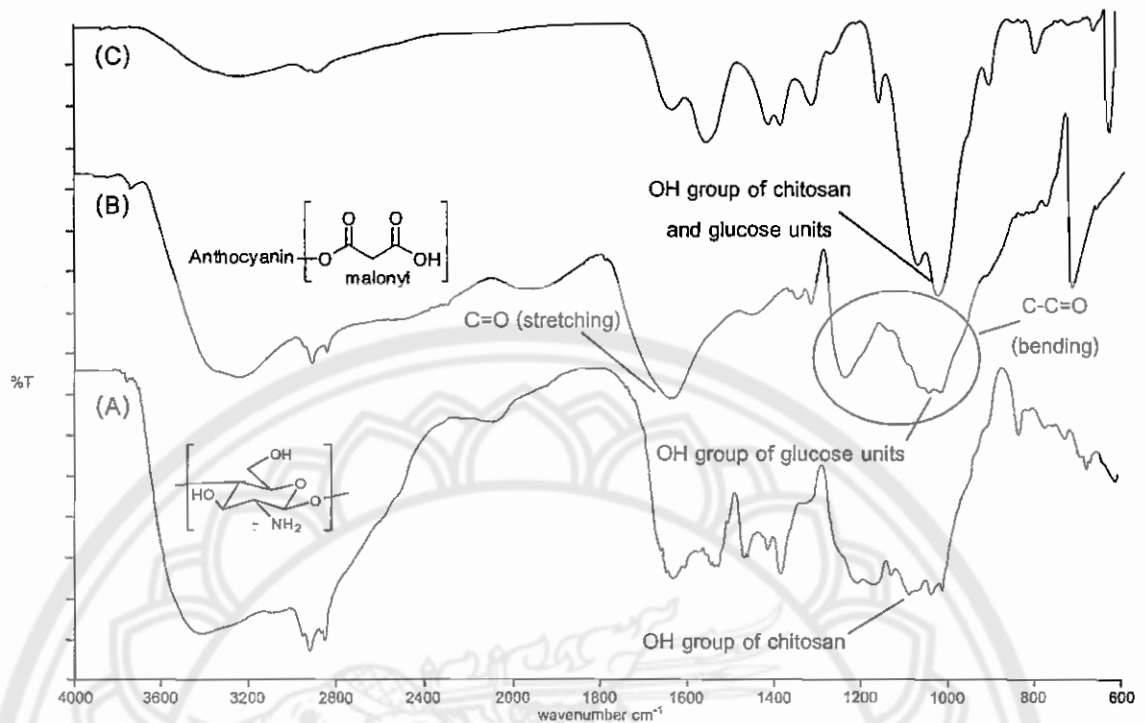
ในการศึกษาครั้งนี้ จะทำการเตรียมเม็ดสารประกอบแอนโทไซยานินส์-โคโตซานจากเม็ดโคโตซาน (B2) โดยใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งสารละลายกรดที่เลือกมาศึกษาในครั้งนี้ ได้แก่ กรดซัลฟิวริก, กรดไฮโดรคลอริก, กรดอะซิติก, กรดไตรฟลูออโรอะซิติก และกรดฟอสเฟอริกที่มีความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 โมลาร์ ผลการทดลองที่ได้จากการสังเกตสีของสารแอนโทไซยานินส์ที่จับยึดบนเม็ดโคโตซาน (ภาพ 35) พบว่า เม็ดสารประกอบแอนโทไซยานินส์-

โคโคซานที่ใช้กรดฟอสเฟอริกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา มีความสามารถในการจับยึดสารแอนโธไซยานินส์ ได้ดีที่สุด ดังนั้นจึงนำเม็ดสารประกอบแอนโธไซยานินส์-โคโคซาน ที่ใช้กรดฟอสเฟอริกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค FT-IR spectroscopy และ ^{13}C NMR spectroscopy

Type of Acids	Concentration				
	0.2 M	0.4 M	0.6 M	0.8 M	1.0 M
H_2SO_4					
CH_3COOH					
HCl					
H_3PO_4					
CF_3COOH					

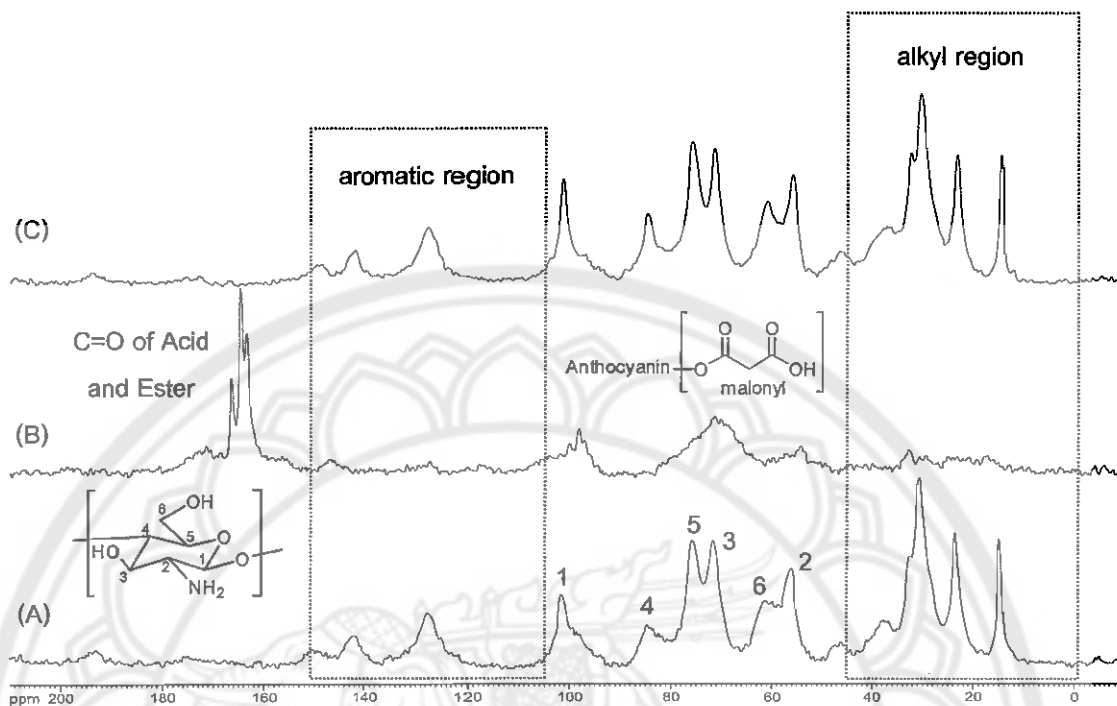
ภาพ 35 ผลของการยึดติดสารแอนโธไซยานินส์บนโคโคซาน โดยตัวเร่งปฏิกิริยากรดชนิดต่างๆ

จากการศึกษาข้อมูลสเปกตรัมแถบการดูดกลืนแสงของโคโคซาน ด้วยเทคนิค FT-IR spectroscopy จะพบแถบการดูดกลืนแสงเอกลักษณ์ของเอไมด์ I, II และ III ที่ตำแหน่ง 1660, 1560 และ 1420 cm^{-1} ตามลำดับ (Lee, Y.M., 1993) แต่จากผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเม็ดสารประกอบแอนโธไซยานินส์-โคโคซานด้วยเทคนิค FT-IR spectroscopy ไม่ปรากฏแถบการดูดกลืนแสงที่เป็นเอกลักษณ์ของเอไมด์ I, II และ III ที่ใกล้เคียงกับตำแหน่งดังกล่าว



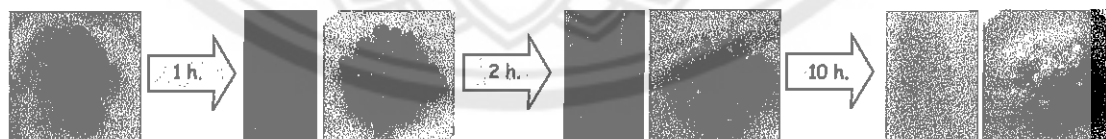
ภาพ 36 เปรียบเทียบ FT-IR สเปกตรัมของเม็ดไคโตซาน (B2) (A), สารแอนโทไซยานินส์ (B) และเม็ดสารประกอบแอนโทไซยานินส์-ไคโตซาน (กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา) (C)

และจากการศึกษาข้อมูลสเปกตรัมแถบการดูดกลืนแสงของสารประกอบไคตินที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค ^{13}C NMR spectroscopy จะพบสัญญาณของสัญญาณหมู่คาร์บอนิลของกลุ่มเอไมด์ ที่ตำแหน่ง 172.8 ppm (Lee, Y.M., 1993) แต่จากผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเม็ดสารประกอบแอนโทไซยานินส์-ไคโตซานด้วยเทคนิค ^{13}C NMR spectroscopy (solids state) ไม่ปรากฏสัญญาณหมู่คาร์บอนิลของกลุ่มเอไมด์ขึ้นใกล้กับตำแหน่ง 172.8 ppm และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับผล ^{13}C NMR สเปกตรัมกับเม็ดไคโตซาน ก็พบว่ามีความคล้ายคลึงกันมาก



ภาพ 37 เปรียบเทียบ ^{13}C NMR สเปกตรัมของเม็ดไคโตซาน (B2) (A), สารแอนโทไซยานินส์ (B) และเม็ดสารประกอบแอนโทไซยานินส์-ไคโตซาน (กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา) (C) (solids state)

และเมื่อนำเม็ดสารประกอบแอนโทไซยานินส์-ไคโตซานที่เตรียมได้ไปทำการล้างด้วยน้ำกลั่น จะพบว่า สีของแอนโทไซยานินส์หลุดออกจากเม็ดไคโตซาน และละลายไปกับน้ำล้างจนได้เม็ดไคโตซานมีสีขาวดังภาพ 38



ภาพ 38 เม็ดสารประกอบแอนโทไซยานินส์-ไคโตซานที่ผ่านการล้างในแต่ละชั่วโมง



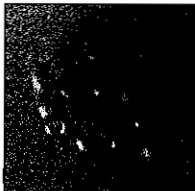

จากผลการทดลองที่พบว่าเกิดการหลุดออกของสารแอนโรไฮยานินส์ที่ถูกจับยึดบนเม็ดโคโตซานเมื่อล้างด้วยน้ำกลั่น ประกอบกับผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเม็ดสารประกอบแอนโรไฮยานินส์-โคโตซานด้วยเทคนิค FT-IR spectroscopy และ ^{13}C NMR spectroscopy (solids state) ที่ได้ อาจสามารถสรุปได้ว่า การจับยึดสารแอนโรไฮยานินส์บนเม็ดโคโตซาน น่าจะเกิดจากผลของ electrostatic interaction ร่วมกับการเกิดพันธะไฮโดรเจน และแรงแวนเดอร์วาลส์ มากกว่าการเกิดเป็นพันธะทางเคมีระหว่างหมู่อะมิโนบนโคโตซานกับหมู่ malonic acid ของแอนโรไฮยานินส์

จากงานวิจัยของ Cho, et.al. (2004) ที่ได้ศึกษาปฏิกิริยาระหว่างหมู่อะมิโนบนโคโตซานกับหมู่คาร์บอกซิลิกของสารอนุพันธ์ฟินอล โดยใช้เอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการดูดซับสารสีที่มีความเป็นกรดให้ได้มากขึ้น ซึ่งจากงานวิจัยดังกล่าว น่าจะสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการเชื่อมต่อหมู่อะมิโนของโคโตซานกับหมู่ malonyl ของแอนโรไฮยานินส์เพื่อพัฒนาให้สารแอนโรไฮยานินส์สามารถจับยึดบนเม็ดโคโตซานได้ดีขึ้นเช่นเดียวกัน

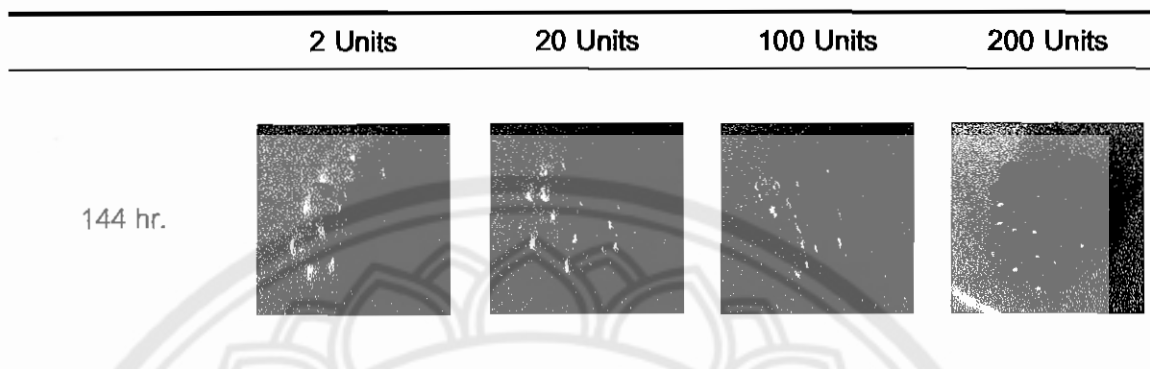
3. การเตรียมเม็ดสารประกอบแอนโรไฮยานินส์-โคโตซานโดยใช้เอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

ไทโรซิเนส เป็นเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารในกลุ่มฟินอล และมีโลหะ copper ทำหน้าที่เป็นสารโคเอนไซม์ โดยเอนไซม์ไทโรซิเนสนี้ จะมีหน้าที่ สร้างเม็ดสีให้ผิวหนัง ผมหงอก และตา ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ส่วนในพืชและผลไม้ เอนไซม์ไทโรซิเนสจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดสีหมองคล้ำ เมื่อถูกกระแทกหรือขีดข่วน เป็นต้น

ตาราง 6 เม็ดสารประกอบแอนโรไฮยานินส์-โคโตซานที่ใช้เอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา หลังทำการล้างด้วยน้ำกลั่น

	2 Units	20 Units	100 Units	200 Units
24 hr.				

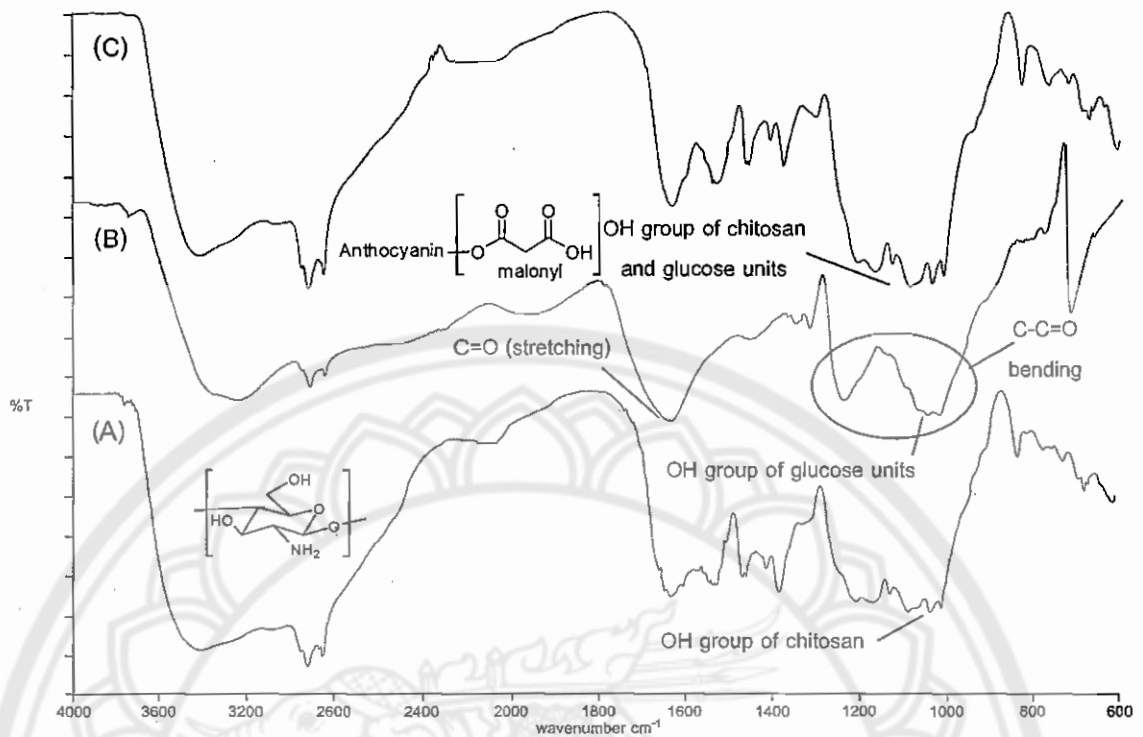
ตาราง 6 (ต่อ)



ในการเตรียมเม็ดสารประกอบแอนโรไฮยานินส์-โคโตซานโดยใช้เอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่ความเข้มข้น 2, 20, 100 และ 200 Units ที่เวลา 24 และ 144 ชั่วโมง จะได้เม็ดสารประกอบแอนโรไฮยานินส์-โคโตซานที่มีสีจาง (ตาราง 6) โดยจากการทดลองพบว่า ความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาที่เพิ่มขึ้น ไม่ทำให้การติดสีของแอนโรไฮยานินส์บนเม็ดโคโตซานดีขึ้น และเมื่อทำการล้างเม็ดสารประกอบแอนโรไฮยานินส์-โคโตซานที่เตรียมได้ด้วยน้ำกลั่น พบว่าสีของสารแอนโรไฮยานินส์หลุดออกและละลายไปกับน้ำล้าง ทำให้ได้เม็ดสารประกอบแอนโรไฮยานินส์-โคโตซานที่มีสีจางลง โดยสาเหตุสำคัญที่ทำให้ปฏิกิริยาระหว่างหมู่อะมิโนบนโคโตซานกับหมู่คาร์บอกซิลิกของสารแอนโรไฮยานินส์ โดยมีเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้ไม่ดีนั้นน่าจะเกิดจากความเป็นกรดที่สูงของสารละลายแอนโรไฮยานินส์เอง (pH ~2) โดยเป็นผลมาจากหมู่ malonyl ที่เป็นองค์ประกอบ ซึ่งที่สภาวะนี้อาจส่งผลให้เอนไซม์ไทโรซิเนส เสื่อมสภาพ หรือหยุดการทำงาน

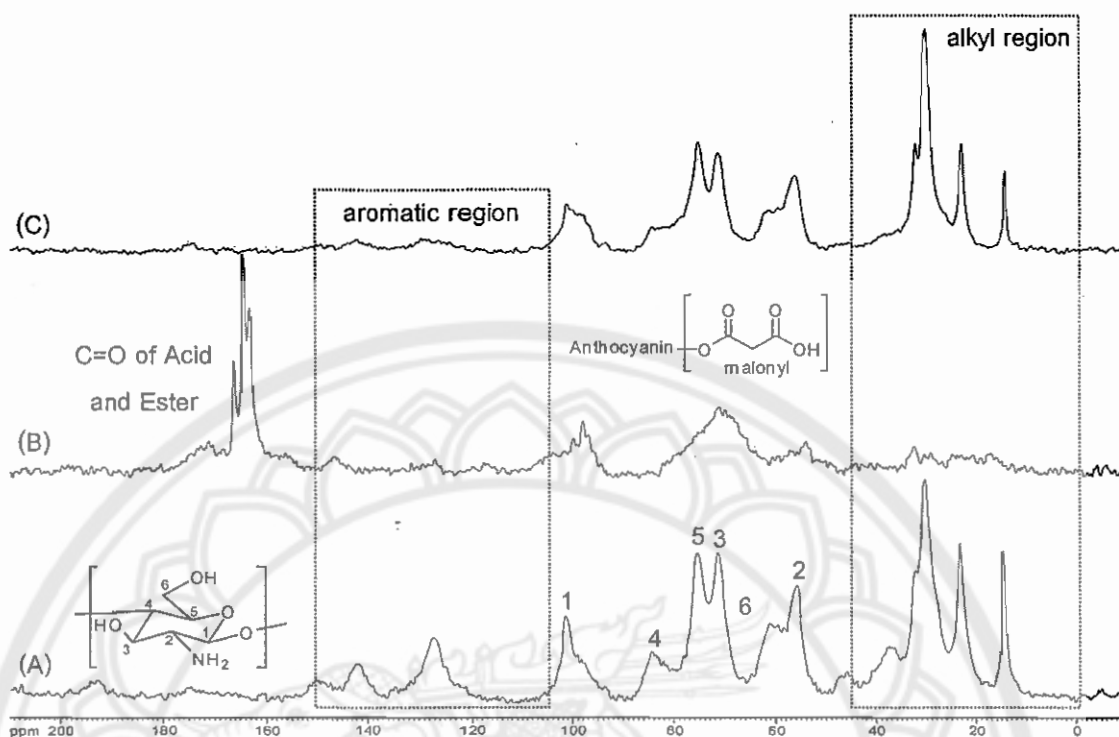
เมื่อนำเม็ดสารประกอบแอนโรไฮยานินส์-โคโตซานที่เตรียม โดยใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยามาทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค FT-IR spectroscopy และ ^{13}C NMR spectroscopy ให้ผลการทดลองดังนี้

จากผลการพิสูจน์เอกลักษณ์เม็ดสารประกอบแอนโรไฮยานินส์ด้วยเทคนิค FT-IR spectroscopy (ภาพ 39) พบว่า ไม่ปรากฏแถบการดูดกลืนแสงที่เป็นเอกลักษณ์ของเอไมด์ I, II, และ III ที่ตำแหน่งใกล้เคียงกับ 1660, 1560 และ 1420 cm^{-1} ตามลำดับ



ภาพ 39 เปรียบเทียบ FT-IR สเปกตรัมของเม็ดโคโตซาน (B2) (A), สารแอนโทไซยานินส์ (B), เม็ดสารประกอบแอนโทไซยานินส์-โคโตซาน (แอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา) (C)

จากผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเม็ดสารประกอบแอนโทไซยานินส์-โคโตซานด้วยเทคนิค ^{13}C NMR spectroscopy (solid state) พบว่า ไม่ปรากฏสัญญาณ C=O ของพันธะเอไมด์ ขึ้นใกล้เดียวกับตำแหน่ง 172.8 ppm และเมื่อเปรียบเทียบผล ^{13}C NMR สเปกตรัมกับเม็ดโคโตซาน ก็พบว่า มีรูปแบบของสเปกตรัมที่คล้ายคลึงกันมาก



ภาพ 40 เปรียบเทียบ ^{13}C NMR สเปกตรัมของเม็ดโคโตซาน (B2) (A), สารแอนโทไซยานินส์ (B) และเม็ดสารประกอบแอนโทไซยานินส์-โคโตซาน (เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา) (C) (solids state)

จากผลการทดลองการเตรียมเม็ดสารประกอบแอนโทไซยานินส์-โคโตซานด้วยเม็ดโคโตซาน (B2) ทั้ง 3 วิธี คือ การเตรียมโดยไม่ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา การเตรียมโดยใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และการเตรียมโดยใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำให้ได้เม็ดสารประกอบแอนโทไซยานินส์-โคโตซานที่มีสีเข้มใกล้เคียงกัน แต่เมื่อทำการล้างด้วยน้ำกลั่น สีของแอนโทไซยานินส์จะเกิดการหลุดออกและละลายไปกับน้ำล้างจนทำให้ได้เม็ดสารประกอบแอนโทไซยานินส์-โคโตซานมีสีซีดจางคล้ายกัน จึงอาจสรุปได้ว่าการจับยึดของสารแอนโทไซยานินส์บนเม็ดโคโตซานที่เตรียมได้ทั้ง 3 วิธี น่าจะเกิดจากผลของ electrostatic interaction ร่วมกับการเกิดพันธะไฮโดรเจน และแรงแวนเดอร์วาลส์ มากกว่าการเกิดเป็นพันธะทางเคมีระหว่างหมู่อะมิโนบนโคโตซานกับหมู่ malonic acid ของแอนโทไซยานินส์ ดังนั้นเพื่อให้เป็นการง่ายต่อการเตรียม และประหยัดต้นทุนในกระบวนการผลิตเม็ดสารประกอบแอนโทไซยานินส์-โคโตซานเป็นตัวชี้วัดความปลอดภัยต่อการบริโภคของผลิตภัณฑ์อาหารหมักประเภทขนม จึงได้เลือกใช้วิธีการเตรียมเม็ดสารประกอบแอนโทไซยานินส์-โคโตซาน โดยการไม่ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา

การศึกษาเม็ดสารประกอบแอนโทไซยานินส์-โคโตซานที่พัฒนาขึ้น

เมื่อเตรียมเม็ดสารประกอบแอนโทไซยานินส์-โคโตซานได้ ขั้นตอนต่อไปจะเป็นการหาความแตกต่างโดยรวมของสีของเม็ดสารประกอบแอนโทไซยานินส์-โคโตซานที่เกิดการเปลี่ยนสีเมื่อทดสอบกับสารละลายบัฟเฟอร์ pH 4.5 และ 5.0 ด้วยเทคนิค spectrophotometry เพื่อหาค่าสี โดยจะทำการวัดสีในระบบ CIELAB เพื่อวัดค่า L^* , a^* , b^* ซึ่งใช้โปรแกรมทางคอมพิวเตอร์ช่วยในการคำนวณ และคำนวณหาความแตกต่างของสีที่เกิดขึ้น แต่ด้วยข้อจำกัดของเครื่องมือที่สามารถทำการตรวจวัดกับตัวอย่างที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางไม่น้อยกว่า 7 มิลลิเมตรและตัวอย่างนั้นจะต้องมีความแข็งแรงพอที่จะสามารถทนต่อแรงอัดในระหว่างการเตรียมตัวอย่าง ดังนั้นในการทดลองนี้จึงทำการเตรียมเม็ดโคโตซาน (B4) ซึ่งจะมีขนาดของเม็ดโคโตซานที่ใหญ่กว่าและแข็งแรงมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับเม็ดโคโตซาน (B2)

งานวิจัยนี้ได้ทำการเตรียมเม็ดสารประกอบแอนโทไซยานินส์-โคโตซาน เพื่อใช้บ่งชี้ความความปลอดภัยต่อการบริโภคของผลิตภัณฑ์อาหารหมักประเภทขนม ซึ่งมีเป้าหมายหลักที่จะนำไปใช้ประโยชน์กับกลุ่มบุคคล 2 กลุ่ม คือ ผู้ประกอบการ และผู้บริโภค ดังนั้นขั้นตอนของการทดสอบประสิทธิภาพ และความสามารถในการเปลี่ยนสีของเม็ดสารประกอบแอนโทไซยานินส์-โคโตซาน ที่ได้ทำการปรับปรุงและพัฒนาขึ้นนั้น จะมีความเหมาะสมสำหรับนำไปใช้งานกับบุคคลในกลุ่มใด

1. การศึกษาเวลาที่ใช้ในการทดสอบที่เหมาะสมของตัวชี้วัดที่พัฒนาขึ้น

1.1 การศึกษาเวลาที่ใช้ในการทดสอบที่เหมาะสมของตัวชี้วัดที่พัฒนาขึ้น แนวทางที่ 1

การทดลองในแนวทางที่ 1 นี้ถูกออกแบบมาเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของตัวชี้วัดที่ถูกพัฒนาขึ้นว่าจะสามารถตอบสนองต่อความต้องการของผู้ประกอบได้หรือไม่ โดยการนำไปใช้ติดกับบรรจุภัณฑ์ เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงค่า pH ที่บ่งชี้ถึงความปลอดภัยต่อการบริโภคผลิตภัณฑ์ขนม ซึ่งจากผลการทดลอง เมื่อนำเม็ดสารประกอบแอนโทไซยานินส์-โคโตซานที่เตรียมได้ มาทดสอบการเปลี่ยนสีในสารละลายบัฟเฟอร์ เพื่อหาเวลาที่เหมาะสมตามแนวที่ 1 จากนั้นทดสอบด้วยเทคนิค spectrophotometry เพื่อหาค่าสี โดยใช้การวัดสีในระบบ CIELAB เพื่อวัดค่า L^* , a^* , b^* ซึ่งใช้โปรแกรมทางคอมพิวเตอร์ช่วยในการคำนวณ ได้ผลการทดลองดังตาราง 7

ตาราง 7 ค่าสี (L^* , a^* , b^*) ของเมล็ดสารประกอบแอนโทไซยานินส์-โคโตซานที่ทดสอบด้วย สารละลายบัฟเฟอร์ pH 4.5 และ 5.0 ที่ระยะเวลาต่างๆ ตามแนวทางที่ 1

ตัวอย่าง	ผลการทดลอง		
	L^*	a^*	b^*
แช่ในบัฟเฟอร์ pH 5.0 เป็นเวลา 20 นาที ครั้งที่ 1	33.70	10.35	9.50
แช่ในบัฟเฟอร์ pH 5.0 เป็นเวลา 20 นาที ครั้งที่ 2	34.90	10.36	9.64
แช่ในบัฟเฟอร์ pH 5.0 เป็นเวลา 20 นาที ครั้งที่ 3	37.76	8.00	10.44
แช่ในบัฟเฟอร์ pH 4.5 เป็นเวลา 20 นาที หลังจากแช่ใน บัฟเฟอร์ pH 5.0 ครั้งที่ 1	35.39	13.18	10.26
แช่ในบัฟเฟอร์ pH 4.5 เป็นเวลา 20 นาที หลังจากแช่ใน บัฟเฟอร์ pH 5.0 ครั้งที่ 2	33.18	13.59	9.16
แช่ในบัฟเฟอร์ pH 4.5 เป็นเวลา 20 นาที หลังจากแช่ใน บัฟเฟอร์ pH 5.0 ครั้งที่ 3	37.43	11.86	9.40
แช่ในบัฟเฟอร์ pH 5.0 เป็นเวลา 10 นาที ครั้งที่ 1	34.35	13.33	9.22
แช่ในบัฟเฟอร์ pH 5.0 เป็นเวลา 10 นาที ครั้งที่ 2	34.14	13.01	9.63
แช่ในบัฟเฟอร์ pH 5.0 เป็นเวลา 10 นาที ครั้งที่ 3	32.53	13.21	9.54
แช่ในบัฟเฟอร์ pH 4.5 เป็นเวลา 10 นาที หลังจากแช่ใน บัฟเฟอร์ pH 5.0 ครั้งที่ 1	32.87	14.83	10.85
แช่ในบัฟเฟอร์ pH 4.5 เป็นเวลา 10 นาที หลังจากแช่ใน บัฟเฟอร์ pH 5.0 ครั้งที่ 2	32.99	16.37	8.80
แช่ในบัฟเฟอร์ pH 4.5 เป็นเวลา 10 นาที หลังจากแช่ใน บัฟเฟอร์ pH 5.0 ครั้งที่ 3	33.94	15.08	9.13
แช่ในบัฟเฟอร์ pH 5.0 เป็นเวลา 5 นาที ครั้งที่ 1	32.59	15.67	7.05
แช่ในบัฟเฟอร์ pH 5.0 เป็นเวลา 5 นาที ครั้งที่ 2	34.01	14.89	7.30
แช่ในบัฟเฟอร์ pH 5.0 เป็นเวลา 5 นาที ครั้งที่ 3	31.72	15.72	7.60
แช่ในบัฟเฟอร์ pH 4.5 เป็นเวลา 5 นาที หลังจากแช่ใน บัฟเฟอร์ pH 5.0 ครั้งที่ 1	30.91	17.42	7.53

ตาราง 7 (ต่อ)

ตัวอย่าง	ผลการทดลอง		
	L*	a*	b*
แช่ในบัฟเฟอร์ pH 4.5 เป็นเวลา 5 นาที หลังจากแช่ใน บัฟเฟอร์ pH 5.0 ครั้งที่ 2	33.43	17.15	8.41
แช่ในบัฟเฟอร์ pH 4.5 เป็นเวลา 5 นาที หลังจากแช่ใน บัฟเฟอร์ pH 5.0 ครั้งที่ 3	33.55	17.47	8.47

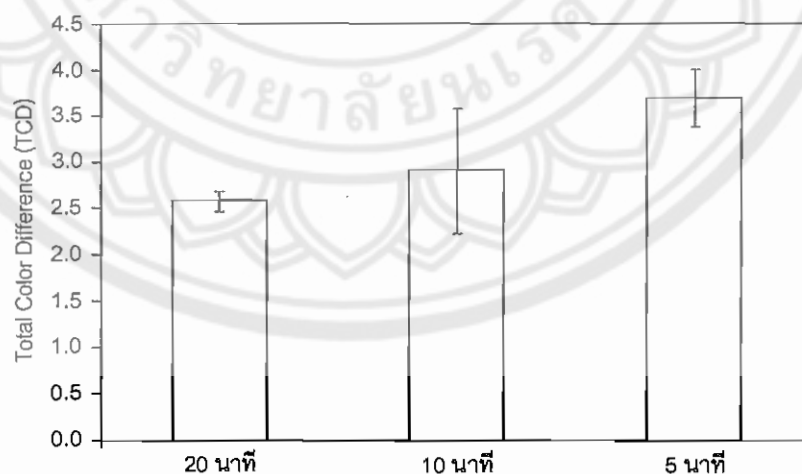
และคำนวณหาค่าของความแตกต่างโดยรวมของสีจากสมการ (Francis, Fj., 1983)

$$\text{Total color difference (TCD, } \Delta E) = [(L^*_1 - L^*_2)^2 + (a^*_1 - a^*_2)^2 + (b^*_1 - b^*_2)^2]^{1/2}$$

โดยที่

L^*_1, a^*_1 และ b^*_1 คือ ค่าความสว่าง ค่าความแดง และค่าความเหลืองของสีที่ 1

L^*_2, a^*_2 และ b^*_2 คือ ค่าความสว่าง ค่าความแดง และค่าความเหลืองของสีที่ 2



ภาพ 41 แผนภูมิเปรียบเทียบค่าความแตกต่างโดยรวมของสีที่แช่ในสารละลายบัฟเฟอร์
ในระยะเวลาที่แตกต่างกัน ตามแนวทางที่ 1

จากผลการทดลองการหาค่าความแตกต่างโดยรวมของสีเม็ดสารประกอบแอนโรไฮยานินส์-โคโตซานที่ทดสอบกับสารละลายบัฟเฟอร์ pH 4.5 และ 5.0 ที่ระยะเวลา 20, 10 และ 5 นาที ตามแนวทางที่ 1 พบว่า มีค่าเท่ากับ 2.58 (± 0.10), 2.90 (± 0.67) และ 3.69 (± 0.31) ตามลำดับ ซึ่งค่าความแตกต่างโดยรวมของสีมีค่าที่ต่ำกว่า 5 ซึ่งตาของมนุษย์ไม่สามารถแยกแยะสีได้ ดังนั้น หากจะใช้ตัวชี้วัดที่พัฒนาขึ้นนี้ติดกับบรรจุภัณฑ์เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลง pH ของผลิตภัณฑ์หมนม เพื่อตอบสนองความต้องการของผู้ประกอบการนั้น ยังไม่สามารถทำได้ ยังจะต้องมีการพัฒนาเพื่อให้ค่าความแตกต่างโดยรวมของสีให้มีค่ามากกว่านี้

1.2 การศึกษาเวลาที่ใช้ในการทดสอบที่เหมาะสมของตัวชี้วัดที่พัฒนาขึ้น แนวทางที่ 2 การทดลองในแนวทางที่ 2 ถูกออกแบบมาเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของตัวชี้วัดที่พัฒนาขึ้นว่าจะสามารถตอบสนองต่อความต้องการของผู้บริโภคได้หรือไม่ โดยผู้บริโภคจะนำตัวชี้วัดที่พัฒนาขึ้นนี้ไปใช้ทดสอบกับผลิตภัณฑ์หมนมที่ซื้อมา เพื่อบ่งชี้ถึงความปลอดภัยต่อการบริโภค ซึ่งจากผลการทดลอง เมื่อนำเม็ดสารประกอบแอนโรไฮยานินส์-โคโตซานที่เตรียมได้มาทดสอบการเปลี่ยนสีในสารละลายบัฟเฟอร์ เพื่อหาเวลาที่เหมาะสมตามแนวที่ 2 และเมื่อทดสอบด้วยเทคนิค spectrophotometry เพื่อหาค่าสี โดยใช้การวัดสีในระบบ CIELAB เพื่อวัดค่า L^* , a^* , b^* ซึ่งใช้โปรแกรมทางคอมพิวเตอร์ช่วยในการคำนวณ ได้ผลการทดลองดังตาราง 8

ตาราง 8 ค่าสี (L^* , a^* , b^*) ของเม็ดสารประกอบแอนโรไฮยานินส์-โคโตซานที่ทดสอบด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ pH 4.5 และ 5.0 ที่ระยะเวลาดังๆ ตามแนวทางที่ 2

ตัวอย่าง	ผลการทดลอง		
	L^*	a^*	b^*
แช่ในบัฟเฟอร์ pH 4.5 เป็นเวลา 20 นาที ครั้งที่ 1	29.28	25.47	-2.58
แช่ในบัฟเฟอร์ pH 4.5 เป็นเวลา 20 นาที ครั้งที่ 2	31.47	24.59	-2.64
แช่ในบัฟเฟอร์ pH 4.5 เป็นเวลา 20 นาที ครั้งที่ 3	32.28	23.15	-2.32
แช่ในบัฟเฟอร์ pH 5.0 เป็นเวลา 20 นาที ครั้งที่ 1	31.26	14.73	0.07
แช่ในบัฟเฟอร์ pH 5.0 เป็นเวลา 20 นาที ครั้งที่ 2	35.60	13.84	0.85
แช่ในบัฟเฟอร์ pH 5.0 เป็นเวลา 20 นาที ครั้งที่ 3	34.25	13.11	0.07
แช่ในบัฟเฟอร์ pH 4.5 เป็นเวลา 10 นาที ครั้งที่ 1	25.01	28.94	-3.81
แช่ในบัฟเฟอร์ pH 4.5 เป็นเวลา 10 นาที ครั้งที่ 2	30.44	29.88	-4.07

ตาราง 8 (ต่อ)

ตัวอย่าง	ผลการทดลอง		
	L*	a*	b*
แช่ในบัฟเฟอร์ pH 4.5 เป็นเวลา 10 นาที ครั้งที่ 3	26.89	30.41	-3.12
แช่ในบัฟเฟอร์ pH 5.0 เป็นเวลา 10 นาที ครั้งที่ 1	33.00	16.03	-1.77
แช่ในบัฟเฟอร์ pH 5.0 เป็นเวลา 10 นาที ครั้งที่ 2	32.92	16.40	-0.74
แช่ในบัฟเฟอร์ pH 5.0 เป็นเวลา 10 นาที ครั้งที่ 3	31.30	17.76	-0.71
แช่ในบัฟเฟอร์ pH 4.5 เป็นเวลา 5 นาที ครั้งที่ 1	22.72	33.04	-4.40
แช่ในบัฟเฟอร์ pH 4.5 เป็นเวลา 5 นาที ครั้งที่ 2	24.82	32.55	-4.37
แช่ในบัฟเฟอร์ pH 4.5 เป็นเวลา 5 นาที ครั้งที่ 3	26.07	31.25	-3.82
แช่ในบัฟเฟอร์ pH 5.0 เป็นเวลา 5 นาที ครั้งที่ 1	30.05	24.73	-4.22
แช่ในบัฟเฟอร์ pH 5.0 เป็นเวลา 5 นาที ครั้งที่ 2	29.08	22.55	-2.71
แช่ในบัฟเฟอร์ pH 5.0 เป็นเวลา 5 นาที ครั้งที่ 3	31.63	21.59	-2.37
แช่ในบัฟเฟอร์ pH 4.5 เป็นเวลา 1 นาที ครั้งที่ 1	23.59	41.65	-7.40
แช่ในบัฟเฟอร์ pH 4.5 เป็นเวลา 1 นาที ครั้งที่ 2	21.12	41.15	-6.23
แช่ในบัฟเฟอร์ pH 4.5 เป็นเวลา 1 นาที ครั้งที่ 3	19.93	39.32	-5.61
แช่ในบัฟเฟอร์ pH 5.0 เป็นเวลา 1 นาที ครั้งที่ 1	22.90	31.84	-6.36
แช่ในบัฟเฟอร์ pH 5.0 เป็นเวลา 1 นาที ครั้งที่ 2	21.67	34.36	-7.11
แช่ในบัฟเฟอร์ pH 5.0 เป็นเวลา 1 นาที ครั้งที่ 3	22.00	33.50	-7.07

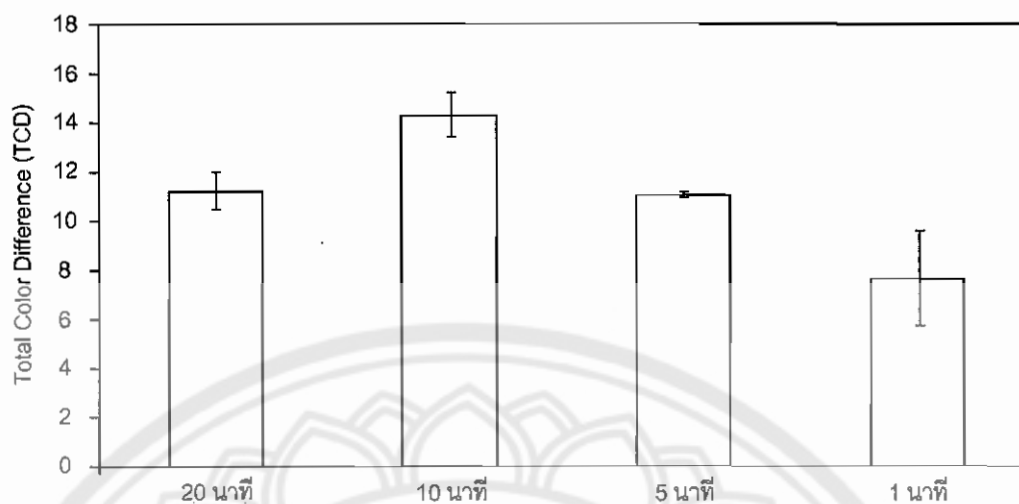
และคำนวณหาค่าของความแตกต่างโดยรวมของสีจากสมการ (Francis, Fj., 1983)

$$\text{Total color difference (TCD, } \Delta E) = [(L^*_1 - L^*_2)^2 + (a^*_1 - a^*_2)^2 + (b^*_1 - b^*_2)^2]^{1/2}$$

โดยที่

L^*_1, a^*_1 และ b^*_1 คือ ค่าความสว่าง ค่าความแดง และค่าความเหลืองของสีที่ 1

L^*_2, a^*_2 และ b^*_2 คือ ค่าความสว่าง ค่าความแดง และค่าความเหลืองของสีที่ 2



ภาพ 42 แผนภูมิเปรียบเทียบค่าความแตกต่างของสีรวมที่แช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ในระยะเวลาที่แตกต่างกัน ตามแนวทางที่ 2

จากผลการทดลองการหาค่าความแตกต่างโดยรวมของสีเม็ดสารประกอบแอนโธไซยานินส์-โคโคซานที่ทดสอบกับสารละลายบัฟเฟอร์ pH 4.5 และ 5.0 ที่ระยะเวลา 20, 10, 5 และ 1 นาที ตามแนวทางที่ 2 พบว่า มีค่าเท่ากับ 11.26 (± 0.76), 14.35 (± 0.88), 11.11 (± 0.12) และ 7.70 (± 1.91) ตามลำดับ ซึ่งการเปลี่ยนสีของเม็ดสารประกอบแอนโธไซยานินส์-โคโคซานในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 4.5 และ 5.0 เป็นเวลานาน 10 นาทีจะให้ค่าความแตกต่างโดยรวมของสีสูงสุด และอยู่ในช่วงที่ตามนุษย์สามารถแยกแยะสีได้ ดังนั้นตัวชี้วัดที่พัฒนาขึ้นนี้จึงมีความเหมาะสมกับผู้บริโภค โดยสามารถทำการใช้ตัวชี้วัดบ่งบอกความปลอดภัยต่อการบริโภคผลิตภัณฑ์ประเภทเหนมได้

2. ศึกษาความเสถียรของตัวชี้วัดที่พัฒนาขึ้น

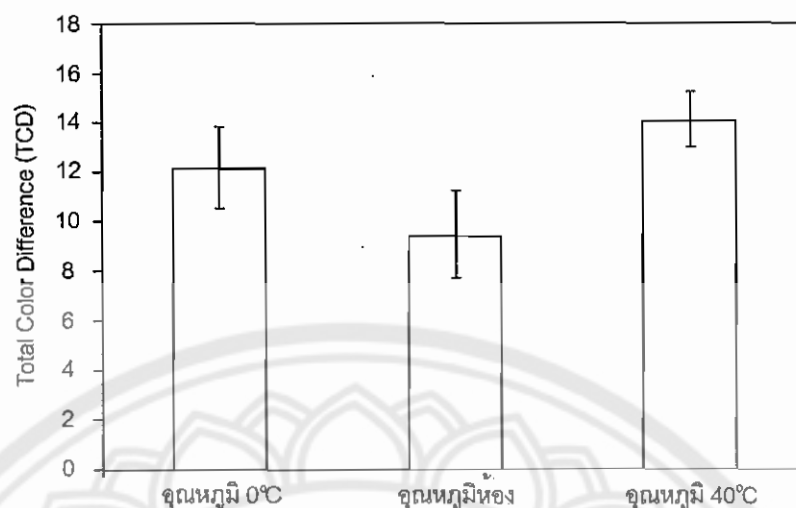
เนื่องจากเม็ดสารประกอบแอนโธไซยานินส์-โคโคซานที่เตรียมขึ้นนี้ต้องการพัฒนาเพื่อให้สามารถนำไปใช้ได้ชี้วัดความปลอดภัยต่อการบริโภคเหนมได้จริง ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องทำการทดสอบตัวชี้วัดที่พัฒนาขึ้นนี้ในสภาวะต่างๆ ซึ่งได้ออกแบบให้มีลักษณะคล้ายกับสภาวะที่ผู้บริโภคจะนำไปใช้งานจริง

จากการทดลองเมื่อนำเม็ดปิดสารประกอบสารแอนโธไซยานินส์-โคโคซานที่ได้ มาแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ pH 4.5 และ 5.0 จำนวน 10 มิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 10 นาที จากนั้นนำเม็ดสารประกอบแอนโธไซยานินส์-โคโคซานที่ได้ไปทดสอบ ณ สภาวะต่างๆ (ที่อุณหภูมิ 0 °C, อุณหภูมิห้อง, 40 °C, และภายใต้สภาวะแสงฟลูออเรสเซนซ์) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทดสอบด้วย

เทคนิค Spectrophotometry เพื่อหาค่าสี โดยใช้การวัดสีในระบบ CIELAB เพื่อวัดค่า L^* , a^* , b^* ซึ่งใช้โปรแกรมทางคอมพิวเตอร์ช่วยในการคำนวณ ให้ผลการทดลองดังตาราง 9

ตาราง 9 ค่าสี (L^* , a^* , b^*) ของเม็ดสารประกอบแอนโธไซยานินส์-โคโคซานที่ทดสอบด้วย สารละลายบัฟเฟอร์ pH 4.5 และ 5.0 ณ อุณหภูมิต่างๆ

ตัวอย่าง	ผลการทดลอง		
	L^*	a^*	b^*
แช่ในบัฟเฟอร์ pH 4.5 ณ อุณหภูมิ 0°C ครั้งที่ 1	22.94	30.61	-4.16
แช่ในบัฟเฟอร์ pH 4.5 ณ อุณหภูมิ 0°C ครั้งที่ 2	28.51	27.31	-3.94
แช่ในบัฟเฟอร์ pH 4.5 ณ อุณหภูมิ 0°C ครั้งที่ 3	26.2	29.05	-3.45
แช่ในบัฟเฟอร์ pH 5.0 ณ อุณหภูมิ 0°C ครั้งที่ 1	30.05	19.89	-1.56
แช่ในบัฟเฟอร์ pH 5.0 ณ อุณหภูมิ 0°C ครั้งที่ 2	29.94	17.52	-1.15
แช่ในบัฟเฟอร์ pH 5.0 ณ อุณหภูมิ 0°C ครั้งที่ 3	32.11	17.65	-1.03
แช่ในบัฟเฟอร์ pH 4.5 ณ อุณหภูมิห้อง ครั้งที่ 1	30.43	24.03	-1.93
แช่ในบัฟเฟอร์ pH 4.5 ณ อุณหภูมิห้อง ครั้งที่ 2	30.92	26.06	-1.91
แช่ในบัฟเฟอร์ pH 4.5 ณ อุณหภูมิห้อง ครั้งที่ 3	31.89	24.56	-0.86
แช่ในบัฟเฟอร์ pH 5.0 ณ อุณหภูมิห้อง ครั้งที่ 1	32.83	17.08	0.38
แช่ในบัฟเฟอร์ pH 5.0 ณ อุณหภูมิห้อง ครั้งที่ 2	34.90	15.86	0.39
แช่ในบัฟเฟอร์ pH 5.0 ณ อุณหภูมิห้อง ครั้งที่ 3	31.07	15.38	0.72
แช่ในบัฟเฟอร์ pH 4.5 ณ อุณหภูมิ 40°C ครั้งที่ 1	27.81	26.37	-2.11
แช่ในบัฟเฟอร์ pH 4.5 ณ อุณหภูมิ 40°C ครั้งที่ 2	32.03	26.03	-2.29
แช่ในบัฟเฟอร์ pH 4.5 ณ อุณหภูมิ 40°C ครั้งที่ 3	26.88	25.26	-1.58
แช่ในบัฟเฟอร์ pH 5.0 ณ อุณหภูมิ 40°C ครั้งที่ 1	35.60	14.34	2.12
แช่ในบัฟเฟอร์ pH 5.0 ณ อุณหภูมิ 40°C ครั้งที่ 2	35.39	14.40	1.87
แช่ในบัฟเฟอร์ pH 5.0 ณ อุณหภูมิ 40°C ครั้งที่ 3	34.50	13.33	1.83



ภาพ 43 แผนภูมิเปรียบเทียบค่าความแตกต่างโดยรวมของสี ณ อุณหภูมิต่างๆ

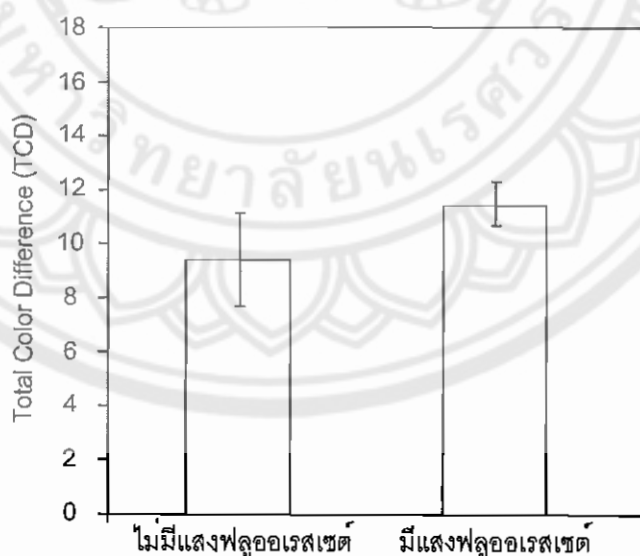
จากผลการทดลองการหาค่าความแตกต่างโดยรวมของสีเม็ดสารประกอบแอนโธไซยานินส์-โคโตซานที่ผ่านการทดสอบในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 4.5 และ 5.0 ที่อุณหภูมิ 0 °C, อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิห้อง 40 °C ได้ค่าเท่ากับ 12.16 (±1.63), 9.42 (±1.74), และ 14.10 (±1.41) ตามลำดับ โดยพบว่าที่อุณหภูมิ 40 °C จะให้ค่าความแตกต่างโดยรวมของสีมากที่สุด ซึ่งสาเหตุที่เป็นเช่นนี้น่าจะเกิดจากที่อุณหภูมิสูง 40 °C ทำให้สารหลายชนิดที่เป็นองค์ประกอบในเม็ดโคโตซานอาจเกิดอันตรกิริยาต่อกันได้มากขึ้น และอาจทำให้เกิดสารประกอบในรูปแบบหรือโครงสร้างที่มีความแตกต่างกันจำนวนมาก ประกอบกับค่า pH ที่แตกต่างกันน่าจะทำให้เกิดสารองค์ประกอบต่างๆ ที่มีความแตกต่างกันเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงค่าสี (L*, a*, b*) ของสารแอนโธไซยานินส์ที่อยู่ในสภาวะแวดล้อมของสารองค์ประกอบที่แตกต่างกันมากนี้ อาจส่งผลให้ค่าความแตกต่างโดยรวมของสี (TCD) ของเม็ดสารประกอบแอนโธไซยานินส์-โคโตซาน ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 4.5 และ 5.0 มีความแตกต่างกันมากขึ้นตามไปด้วย

ตาราง 10 ค่าสี (L*, a*, b*) ของเม็ดสารประกอบแอนโธไซยานินส์-โคโตซานที่ทดสอบด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ pH 4.5 และ 5.0 ณ สภาวะที่มีและไม่มีแสงฟลูออเรสเซนซ์

ตัวอย่าง	ผลการทดลอง		
	L*	a*	b*
ปัดที่แช่ในบัฟเฟอร์ pH 4.5 ณ สภาวะไม่มีแสง ครั้งที่ 1	30.43	24.03	-1.93

ตาราง 10 (ต่อ)

ตัวอย่าง	ผลการทดลอง		
	L*	a*	b*
บีดที่แช่ในบัฟเฟอร์ pH 4.5 ณ สภาวะไม่มีแสง ครั้งที่ 2	30.92	26.06	-1.91
บีดที่แช่ในบัฟเฟอร์ pH 4.5 ณ สภาวะไม่มีแสง ครั้งที่ 3	31.89	24.56	-0.86
บีดที่แช่ในบัฟเฟอร์ pH 5.0 ณ สภาวะไม่มีแสง ครั้งที่ 1	32.83	17.08	0.38
บีดที่แช่ในบัฟเฟอร์ pH 5.0 ณ สภาวะไม่มีแสง ครั้งที่ 2	34.9	15.86	0.39
บีดที่แช่ในบัฟเฟอร์ pH 5.0 ณ สภาวะไม่มีแสง ครั้งที่ 3	31.07	15.38	0.72
บีดที่แช่ในบัฟเฟอร์ pH 4.5 ณ สภาวะมีแสง ครั้งที่ 1	28.82	26.71	-2.3
บีดที่แช่ในบัฟเฟอร์ pH 4.5 ณ สภาวะมีแสง ครั้งที่ 2	29.23	27.93	-2.73
บีดที่แช่ในบัฟเฟอร์ pH 4.5 ณ สภาวะมีแสง ครั้งที่ 3	29.62	26.43	-2.51
บีดที่แช่ในบัฟเฟอร์ pH 5.0 ณ สภาวะมีแสง ครั้งที่ 1	32.53	15.82	0.28
บีดที่แช่ในบัฟเฟอร์ pH 5.0 ณ สภาวะมีแสง ครั้งที่ 2	31.35	16.30	-0.14
บีดที่แช่ในบัฟเฟอร์ pH 5.0 ณ สภาวะมีแสง ครั้งที่ 3	30.16	16.04	-0.67



ภาพ 44 แผนภูมิเปรียบเทียบค่าความแตกต่างโดยรวมของสี
ณ สภาวะที่มีและไม่มีแสงฟลูออเรสเซนซ์

จากผลการทดลองการหาค่าความแตกต่างโดยรวมของสีเม็ดสารประกอบแอนโร-
ไซยานินส์-โคโคซานที่ผ่านการทดสอบในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 4.5 และ 5.0 ณ สภาวะที่มีและ
ไม่มีแสงฟลูออเรสเซนส์ ได้ค่าเท่ากับ 9.42 (± 1.74) และ 11.49 (± 0.81) ตามลำดับ ซึ่งโดยทั่วไป
แล้วนั้น สารแอนโรไซยานินส์จะเกิดการสลายตัวเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีแสง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง
ช่วงแสง UV แต่ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาแสงที่เกิดจากหลอดฟลูออเรสเซนส์ ในสภาวะที่
ใกล้เคียงกับสภาวะที่มีการใช้งานจริง ซึ่งจะมีความเข้มของแสงในช่วง UV ที่ต่ำ และมีระยะเวลาที่
ใช้ในการทดสอบสั้น แสงฟลูออเรสเซนส์ดังกล่าว จึงไม่ได้ส่งผลกระทบต่อกระบวนการเปลี่ยนแปลง
โครงสร้างของแอนโรไซยานินส์มากนัก ดังนั้น ค่าความแตกต่างโดยรวมของสีเม็ดสารประกอบ
แอนโรไซยานินส์-โคโคซาน จึงไม่มีความแตกต่างกัน

