



# โครงการ การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

**ชื่อโครงการ** ผลของไบโอพอลิเมอร์ต่อประสิทธิภาพในการเอนแคปซูเลชัน  
จากสารสกัดกระเจี๊ยบ

**ชื่อนิสิต** นางสาวณัฐพิมล เตโชพันธ์  
นางสาวบุณฑริกา เกิดเกียรติขจร  
นางสาวสมิตา พฤกษ์กันทรากกร

**ภาควิชา** เทคโนโลยีทางอาหาร  
**ปีการศึกษา** 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลของไบโอพอลิเมอร์ต่อประสิทธิภาพในการเอนแคปซูเลชันจากสารสกัดกระเจี๊ยบ

โดย

นางสาวณัฐพิมล	เตโชพันธ์
นางสาวบุญทริกา	เกิดเกียรติขจร
นางสาวสมิตา	พฤกษ์กันทรากร

อาจารย์ที่ปรึกษา

อาจารย์ ดร.สาริศา สุริยรักษ์

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร

ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประจำปีการศึกษา 2563

# Effect of biopolymer on roselle-extract encapsulation efficiency

Natpimol Taechopun

Boontarika Kerdkiatkajorn

Samida Prukkantragorn

Project Advisor

Sarisa Suriyarak, Ph.D.

A Report Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Bachelor of Science Program in Food Technology

Department of Food Technology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2020

หัวข้องานวิจัย ผลของไบโอพอลิเมอร์ต่อประสิทธิภาพในการเอนแคปซูเลชันจากสารสกัดกระเจี๊ยบ

โดย นางสาวณัฐพิมล เตโชพันธ์

นางสาวบุญทริกา เกิดเกียรติขจร

นางสาวสมิตา พฤกษ์กันทราร

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางอาหาร

อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ ดร.สาริศา สุริยรักษ์

ปีการศึกษา 2563

---

ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
อนุมัติให้รายงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์  
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร  
ประจำปีการศึกษา 2563

.....  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ชนิษฐา ธานานวงศ์)  
หัวหน้าภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร

.....  
(อาจารย์ ดร.สาริศา สุริยรักษ์)  
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

หัวข้องานวิจัย ผลของไปโอพอลิเมอร์ต่อประสิทธิภาพในการเอนแคปซูลชันจากสารสกัดกระเจี๊ยบ

โดย นางสาวณัฐพิมล เตโชพันธ์  
นางสาวบุณชริกา เกิดเกียรติขจร  
นางสาวสมิตา พฤกษ์กันทรากกร

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางอาหาร

อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ ดร.สาริตา สุริยรักษ์

ปีการศึกษา 2563

### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสม (อุณหภูมิและชนิดกรดอินทรีย์) ในการสกัดแอนโทไซยานินและเพกทินจากกระเจี๊ยบศึกษาผลของไคโตซานต่อประสิทธิภาพในการเอนแคปซูลสารสกัดแอนโทไซยานินโดยการเติมไคโตซาน 0.025% และ 0.05% (v/v) รวมถึงศึกษาสมบัติทางกายภาพและเคมีของเพกทินที่ได้จากการสกัดในสภาวะต่าง ๆ โดยใช้ตัวทำละลาย เอทานอล:น้ำ อัตราส่วน 1:1 (v/v) ปรับค่า pH เป็น 2.5 ด้วยกรดอินทรีย์ 3 ชนิด (กรดซิตริก กรดแลคติก และกรดมาลิก) ที่อัตราส่วน 1:2 (w/v) ของกระเจี๊ยบแดงต่อตัวทำละลาย และวิเคราะห์หาปริมาณ Anthocyanin content (ATC) ของสารสกัดที่อุณหภูมิแตกต่างกัน (50, 75 และ 90 °C) โดยวิธี pH-differential method พบว่าที่อุณหภูมิ 50 °C การสกัดด้วยตัวทำละลายที่ปรับ pH ด้วยกรดซิตริก กรดแลคติก และกรดมาลิก มีปริมาณ ATC สูงที่สุด ( $37.74 \pm 0.41$ ,  $36.86 \pm 0.86$  และ  $37.80 \pm 0.59$  mg/100ml) จากนั้นนำสารสกัดมาตกตะกอนเพกทินและนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง และวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและเคมีของเพกทิน พบว่าค่าสี มีค่าความสว่าง (L\*) อยู่ในช่วง 59.53 ถึง 65.06, สีแดง (a\*) อยู่ในช่วง 14.91 ถึง 22.47 และสีเหลือง (b\*) อยู่ในช่วง 1.58 ถึง 12.35 และที่อุณหภูมิ 90 °C การสกัดด้วยตัวทำละลายที่ปรับ pH ด้วยกรดซิตริก และกรดมาลิก ได้ %yield ( $7.10 \pm 0.11\%$  และ  $6.92 \pm 0.23\%$ ) สูงกว่าตัวทำละลายที่ปรับ pH ด้วยกรดแลคติก ( $6.72 \pm 0.16\%$ ) อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) จากการวิเคราะห์สารที่สกัดในสภาวะต่างๆ พบว่าปริมาณ Methoxyl content (%MeO) มีค่าอยู่ระหว่าง  $2.81 \pm 0.15\%$  ถึง  $3.78 \pm 0.07\%$  และ Anhydrouronic acid content (%AUA) มีค่าอยู่ระหว่าง  $53.12 \pm 0.49\%$  ถึง  $60.45 \pm 0.85\%$  ส่วน Degree of Esterification (%DE) มีค่าอยู่ระหว่าง  $30.24 \pm 0.06\%$  ถึง  $36.21 \pm 0.51\%$  ซึ่งจัดอยู่ในเพกทินชนิดที่มีปริมาณหมู่เมทอกซิลต่ำ โดยที่อุณหภูมิ 90 °C การสกัดด้วยตัวทำละลายที่ปรับ pH ด้วยกรดอินทรีย์ทั้ง 3 ชนิด แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการเอนแคปซูลแอนโทไซยานินสูงสุด 52.48% ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) โดยอุณหภูมิที่ใช้สกัดมีผลต่อร้อยละผลผลิตเพกทินและการเอนแคปซูลมากกว่าชนิดกรด อย่างไรก็ตามการเติมสารไคโตซานซึ่งเป็นไปโอพอลิเมอร์ลงในสารสกัดจากกระเจี๊ยบในความเข้มข้นข้างต้นไม่พบว่าเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการเอนแคปซูลแอนโทไซยานินร่วมกับเพกทิน

**Project Title** Effect of biopolymer on roselle-extract encapsulation efficiency

**Student** Natpimol Taechopun  
Boontarika Kerdkiatkajorn  
Samida Prukkantagorn

**Study Program** Bachelor of Science in Food Technology

**Advisor** Sarisa Suriyarak, Ph.D.

**Academic Year** 2020

---

### Abstract

The objective of this research is to study the optimal conditions (temperatures and organic acids) for extracting anthocyanins and pectin from roselle, the effect of chitosan on the efficiency of encapsulated anthocyanins under various conditions by adding 0.025% and 0.05% (v/v). The physical and chemical properties of pectin extracted under various conditions, by using a 1:1 (v/v) ethanol: water ratio, pH adjusted to 2.5 with 3 types of organic acids (citric acid, lactic acid and malic acid) at the ratio of 1:2 (w/v) of roselle to solvent were evaluated. Anthocyanin content (ATC) was determined from different temperatures (50, 75 and 90°C) by pH-differential method. It was found that at 50°C the extract that adjusts with citric acid, lactic acid and malic acid demonstrated the highest anthocyanin content ( $37.74 \pm 0.41$ ,  $36.86 \pm 0.86$  and  $37.80 \pm 0.59$  mg / 100ml). The extract was precipitated with pectin and further freeze-dried. The physical and chemical properties of pectin were analyzed, the color parameter indicates lightness ( $L^*$ ) ranging from 59.53 to 65.06, red ( $a^*$ ) ranging from 14.91 to 22.47, and yellow ( $b^*$ ) ranging from 1.58 to 12.35. At 90°C, the extraction with pH-adjusted solvent containing citric and malic acid produced higher %yield ( $7.10 \pm 0.11\%$  and  $6.92 \pm 0.23\%$ , respectively) than the solvent extracted from lactic acid ( $6.72 \pm 0.16\%$ ) with a significant difference ( $p \leq 0.05$ ). A methoxyl content (%MeO) analysis of all extracts was found to be between  $2.81 \pm 0.15\%$  to  $3.78 \pm 0.07\%$ . Anhydrouronic acid content (%AUA) was found to be between  $53.12 \pm 0.49\%$  to  $60.45 \pm 0.85\%$  while the Degree of Esterification (%DE) was between  $30.24 \pm 0.06\%$  to  $36.21 \pm 0.51\%$ , which was classified as low methoxyl pectin. At 90 °C, solvent extraction with the three organic acids showed the highest encapsulated anthocyanins efficiency of 52.48% with a significant difference ( $p \leq 0.05$ ). The extract temperature were dominate on pectin yield and encapsulate over the acid type. However, adding chitosan, a biopolymer, to roselle extract at the above concentration levels did not improve the efficiency of anthocyanins encapsulation with pectin.

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของการเรียนการสอนตามหลักสูตรในระดับปริญญาบัณฑิตของภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งงานวิจัยนี้ได้รับเงินทุนสนับสนุนจากโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ปีการศึกษา 2563 ผู้วิจัยจึงขอขอบพระคุณไว้ ณ โอกาสนี้

โครงการนี้สำเร็จล่วงได้ คณะผู้วิจัยต้องขอบพระคุณอาจารย์ ดร.สาริศา สุริยรักษ์ อาจารย์ปรึกษาโครงการที่ได้ให้คำแนะนำ ข้อเสนอแนะและช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ รวมถึงการตรวจติดตามการทำโครงการของนิสิตอย่างใกล้ชิดตลอดการดำเนินงานวิจัย

ขอขอบพระคุณหัวหน้าห้องปฏิบัติการและเจ้าหน้าที่ผู้คุมห้องปฏิบัติการทุกท่านสำหรับการให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวก รวมถึงสละเวลานอกราชการในการคุมการทำงานวิจัยของกลุ่มผู้วิจัยในช่วงเย็น งานวิจัยสำเร็จล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณเพื่อนๆภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับการช่วยเหลือ และให้กำลังใจคณะผู้วิจัยเสมอมาตลอดจนสำเร็จการศึกษา

สุดท้ายนี้คณะผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า งานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ในการนำสารสกัดจากกระเจี๊ยบไปศึกษาและประยุกต์ใช้ในอนาคตต่อไป

นางสาวณัฐพิมล เตโชพันธ์

นางสาวบุณชริกา เกิดเกียรติขจร

นางสาวสมิตา พฤกษ์กันทราร

## สารบัญ

หน้า

### บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	1
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย.....	2

### บทที่ 2 วารสารปริทัศน์

2.1 กระเจี๊ยบ.....	3
2.2 แอนโทไซยานิน.....	6
2.3 การเอนแคปซูเลชันของสารสี.....	10
2.4 ไบโอฟอลิเมอร์.....	11
2.5 ความสัมพันธ์ระหว่างไบโอฟอลิเมอร์กับแอนโทไซยานิน.....	17

### บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุ อุปกรณ์ที่ใช้ในการดำเนินงานวิจัย.....	19
3.1.1 วัสดุดิบ.....	19
3.1.2 อุปกรณ์.....	19
3.1.3 สารเคมี.....	20
3.2 ขั้นตอนและวิธีดำเนินงานวิจัย.....	21
3.2.1 การสกัดแอนโทไซยานินและเพกทิน.....	21
3.2.2 การตกตะกอนเพกทิน.....	22
3.2.3 การทำแห้งตะกอนเพกทิน.....	22
3.2.4 การวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของแอนโทไซยานิน.....	22
3.2.5 การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและเคมีของเพกทิน.....	22
3.2.6 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้นของกระเจี๊ยบ.....	23
3.2.7 การวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของสารสกัดหลังเติมโคโคซาน.....	23
3.2.8 การวางแผนการทดลอง และการวิเคราะห์ทางสถิติ.....	23

### บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

4.1 การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานิน.....	24
4.2 ปริมาณร้อยละผลผลิตเพกทิน.....	26
4.3 การวิเคราะห์ค่าสี.....	28
4.4 การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและเคมีของเพกทิน.....	30



4.5 การวิเคราะห์ประสิทธิภาพการเอนแคปซูเลชัน.....	32
4.6 การวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของสารสกัดหลังเติมโคโตซาน.....	33

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผล.....	35
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	35
เอกสารอ้างอิง.....	36
ภาคผนวก ก. วิธีวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของแอนโทไซยานิน.....	44
ภาคผนวก ข. วิธีวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและเคมีของเพกทิน.....	45
ภาคผนวก ค. วิธีวิเคราะห์ปริมาณความชื้นของกระเจี๊ยบ.....	50
ภาคผนวก ง. วิธีวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของสารสกัดหลังเติมโคโตซาน.....	51
ภาคผนวก จ. รายละเอียดโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์.....	52
ภาคผนวก ฉ. ประวัติผู้วิจัย.....	54

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ลักษณะทางเคมีของกระเจี๊ยบแดง.....	4
2 องค์ประกอบของแร่ธาตุในกระเจี๊ยบแดง.....	5
3 องค์ประกอบทางเคมีของกระเจี๊ยบแดง.....	5
4 ปริมาณแอนโทไซยานินจากแหล่งต่าง ๆ.....	8
5 สภาวะในการสกัดแอนโทไซยานินและเพกทินด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ.....	21
6 ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดที่สภาวะต่าง ๆ.....	24
7 ปริมาณร้อยละผลผลิตเพกทินที่ได้จากการสกัดและปริมาณความชื้นที่ได้จากเพกทินทำแห้ง.....	26
8 การวิเคราะห์ค่าสีของผงเพกทินเอนแคปซูเลทแอนโทไซยานินที่สกัดได้จากสภาวะต่าง ๆ.....	28
9 สมบัติทางเคมีของเพกทิน.....	30
10 ประสิทธิภาพในการเอนแคปซูเลทแอนโทไซยานินที่สภาวะการสกัดต่าง ๆ.....	32
11 ผลของการเติมโคโตซานต่อประสิทธิภาพในการเอนแคปซูเลทแอนโทไซยานิน.....	33

## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะทางกายภาพของกระเจี๊ยบแดง.....	3
2	โครงสร้างทางเคมีของแอนโทไซยานิน.....	6
3	โครงสร้างทางเคมีของแอนโทไซยานินดินและไกลโคไซด์.....	7
4	แผนภาพโครงสร้างของเพกทินแสดงพอลิแซ็กคาไรด์ทั้ง 4 ชนิด.....	11
5	โครงสร้างทางเคมีของเพกทิน.....	12
6	โมเลกุลของเพกทินในเนื้อเยื่อของผักผลไม้.....	12
7	ชนิดของเพกทินที่แบ่งตามระดับของเอสเทอร์ฟิเคชัน.....	14
8	โครงสร้างของเพกทินตามระดับของเอสเทอร์ฟิเคชัน.....	14
9	เพกทิน.....	16
10	โครงสร้างทางเคมีของโคโตซาน.....	17
11	แผนภูมิแสดงปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดจากกระเจี๊ยบที่สภาวะการสกัดต่าง ๆ..... เป็นเวลา 60 นาที	25
12	แผนภูมิแสดงร้อยละผลผลิตเพกทินที่ได้จากสารสกัดกระเจี๊ยบ.....	27
13	สีของเพกทินแอนแคปซูลเอทแอนโทไซยานินในสภาวะการสกัดที่อุณหภูมิต่างๆ..... ภายหลังจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง	29
14	แผนภูมิแสดงประสิทธิภาพในการแอนแคปซูลเอทสารสกัดกระเจี๊ยบที่สภาวะการสกัดต่าง ๆ.....	32
15	a*, b* chromaticity diagram.....	47

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ที่มาและความสำคัญ

สีเป็นหนึ่งในปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการตัดสินใจเลือกซื้อผลิตภัณฑ์อาหารของผู้บริโภค เนื่องจากช่วยในการดึงดูดใจของผู้บริโภค และเป็นคุณสมบัติทางกายภาพอย่างหนึ่งที่สามารถบ่งบอกถึงคุณภาพของอาหารได้ในอุตสาหกรรมอาหารจึงนิยมนำสีมาผสมในอาหาร โดยสีที่นำมาใช้ผสมอาหาร แบ่งเป็น 2 ประเภท คือ สีธรรมชาติ และสีสังเคราะห์ โดยในอุตสาหกรรมอาหารส่วนใหญ่ใช้สีสังเคราะห์เป็นสีผสมอาหาร ซึ่งมีข้อจำกัดในเรื่องของปริมาณการใช้ แต่หากได้รับในปริมาณที่มากเกินไป อาจก่อให้เกิดอันตรายต่อร่างกายของผู้บริโภคได้ ดังนั้นการใช้สีธรรมชาติจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ได้รับ ความสนใจมากขึ้นในปัจจุบัน

กระเจี๊ยบแดงเป็นพืชที่เจริญเติบโตได้ดีในเขตอากาศกึ่งร้อนจึงมีการปลูกมากในประเทศไทย และเป็นพืชสมุนไพรที่มีการนำมาใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลาย มีสรรพคุณช่วยต้านอนุมูลอิสระ และมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ส่งผลต่อสุขภาพ เช่น มีฤทธิ์ต้านเบาหวาน ต้านการอักเสบ และต้านมะเร็ง สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์ที่ให้ประโยชน์ทางโภชนาการได้ เนื่องจากกระเจี๊ยบแดงอุดมไปด้วยแอนโทไซยานินซึ่งเป็นรงควัตถุสีแดงที่สามารถละลายน้ำได้ จัดอยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoid) และเป็นสารสีธรรมชาติ แต่เนื่องจากแอนโทไซยานินเป็นสารที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสีและสลายตัวได้ง่าย โดยความคงตัวของแอนโทไซยานินจะขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น ความเป็นกรดต่าง ความเข้มข้น ความร้อน ออกซิเจน และการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของ ascorbic acid เป็นต้น การนำกระบวนการเอนแคปซูเลชัน (Encapsulation) มาใช้เพื่อเพิ่มความคงตัวของสารที่ถูกห่อหุ้มด้วยไบโอพอลิเมอร์ (biopolymer) ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดแอนโทไซยานินและเพกทินจากกระเจี๊ยบ สมบัติทางกายภาพและเคมีของเพกทินจากการสกัดในสภาวะต่างๆ รวมถึงนำสภาวะที่เหมาะสมไปศึกษาผลของการเติมโคโคซานต่อประสิทธิภาพในการเอนแคปซูเลชันแอนโทไซยานินร่วมกับเพกทิน

#### 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสม (อุณหภูมิ, ชนิดกรด) ในการสกัดแอนโทไซยานินและเพกทินจากกระเจี๊ยบ
2. เพื่อศึกษาสมบัติทางกายภาพและเคมีของเพกทินและแอนโทไซยานินที่ได้จากการสกัดในสภาวะต่างๆ
3. เพื่อศึกษาผลของไบโอพอลิเมอร์ต่อประสิทธิภาพในการเอนแคปซูเลชันสารสกัดแอนโทไซยานิน

### 1.3 ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดแอนโทไซยานินและเพกทินจากกระเจี๊ยบโดยใช้ตัวทำละลายที่ปรับค่าความเป็นกรดต่างด้วยกรดอินทรีย์ 3 ชนิดและที่อุณหภูมิแตกต่างกัน 3 อุณหภูมิ และนำสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดไปศึกษาประสิทธิภาพในการเอนแคปซูลเอทแอนโทไซยานินจากสารสกัดกระเจี๊ยบด้วยการเติมโคโคซานความเข้มข้น 0.025% และ 0.05%

### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. ทราบถึงสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดแอนโทไซยานินและเพกทินจากกระเจี๊ยบ
2. เพิ่มเสถียรภาพของสารที่สกัดได้จากกระเจี๊ยบด้วยไบโอพอลิเมอร์
3. สามารถนำสารสกัดที่ได้ไปศึกษาต่อและประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่มได้
4. เพิ่มมูลค่าให้กับผลิตภัณฑ์

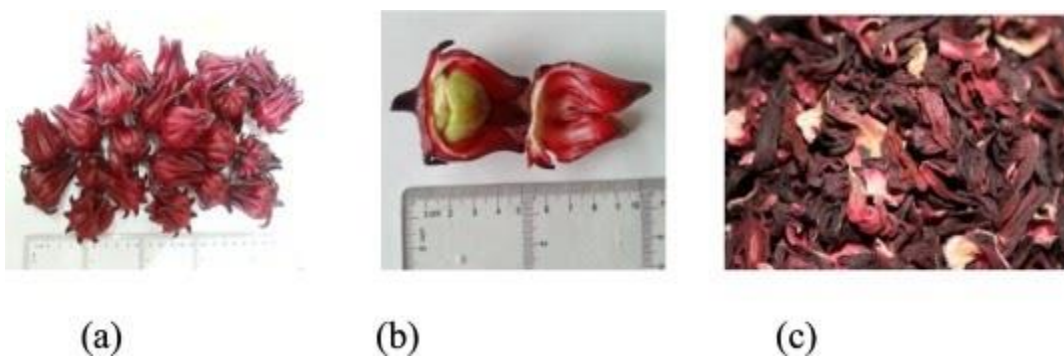
## บทที่ 2

### วารสารปริทัศน์

#### 2.1 กระเจี๊ยบ

##### 2.1.1 กระเจี๊ยบแดง

กระเจี๊ยบแดง (*Hibiscus sabdariffa* L.) เป็นพืชในวงศ์ Malvaceae มีชื่อสามัญว่า roselle, rosella, red sorrel หรือ Jamaica sorrel มีสีแดงเข้มและกลิ่นหอมคล้ายเบอร์รี่ (Maganha et al., 2010; Da, C. R. et al., 2014; Patel, 2014; Pérez, R. et al., 2015) เป็นพืชล้มลุกที่มีอายุสั้น นิยมปลูกเพื่อนำดอกมาใช้ประโยชน์ มีถิ่นกำเนิดในประเทศ 수단และแถบประเทศในทวีปแอฟริกา พบการปลูกในประเทศไทยครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2510 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกระเจี๊ยบแดงคือเป็นไม้พุ่ม สูงประมาณ 50 - 180 เซนติเมตร มีสีม่วงอมแดง เป็นใบเดี่ยวมี 3 หรือ 5 แฉก ส่วนดอกนั้นออกเป็นดอกเดี่ยวตามซอกใบมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 6 เซนติเมตร และลักษณะของผลเป็นรูปรีมีปลายแหลม ความยาวประมาณ 2.5 เซนติเมตร ผลอ่อนมีสีเขียว ผลแก่จะแห้งแตกเป็น 5 แฉก และที่ผลยังมีกลีบเลี้ยงหนาสีแดงหุ้มอยู่ เรียกว่ากลีบกระเจี๊ยบหรือกลีบรองดอก (Calyx) ซึ่งเป็นแหล่งที่อุดมไปด้วยสารแอนโทไซยานิน (Anthocyanin) สามารถละลายได้ดีในน้ำ ให้สีแดงและม่วง โดยมีสาร delphinidin-3-sambubioside และสาร cyanidin-3-sambubioside เป็นองค์ประกอบหลัก มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Aurelio et al., 2007) นอกจากนี้ยังมีสารประกอบฟีนอลิก (polyphenol compound) และกรดอินทรีย์อีกหลายชนิด เช่น ascorbic acid, citric acid, malic acid และ tartaric acid ซึ่งทำให้กระเจี๊ยบมีรสเปรี้ยวและมีวิตามินซีสูง



ภาพที่ 1 ลักษณะทางกายภาพของกระเจี๊ยบ

(a) กลีบกระเจี๊ยบ (b) กระเจี๊ยบ (capsule) (c) กระเจี๊ยบแห้ง

ที่มา: Nguyen et al. (2018)

## 2.1.2 องค์ประกอบทางเคมีของกระเจี๊ยบแดง

กระเจี๊ยบแดงเป็นพืชที่มีปริมาณแอนโทไซยานินสูง โดยมีอยู่ประมาณ 2.52g/100g มีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบหลัก และมีองค์ประกอบทางเคมีอื่นๆ อีกหลายชนิด ได้แก่ กรดอินทรีย์ เช่น ascorbic acid, citric acid, malic acid และ tartaric acid ธาตุเหล็ก แมกนีเซียม และสารในกลุ่มพอลิแซคคาไรด์ (polysaccharide) เป็นต้น โดยค่า pH, ความเป็นกรดจากการไทเทรต (titratable acidity), ปริมาณของแข็งทั้งหมด (total soluble solids) และองค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ของกระเจี๊ยบแดงดังตารางต่อไปนี้

### ตารางที่ 1 แสดงลักษณะทางเคมีของกระเจี๊ยบแดง

ที่มา: Peng K. W. et al. (2002)

Roselle	Measurement
pH	2.49 ± 0.00
Titrability acidic (g/100g malic acid)	2.42 ± 0.03
Total soluble solid (° Brix)	3.30 ± 0.12
Total anthocyanin (g/100g expressed as delphinidin-3-glucoside)	2.52 ± 0.05
Sugars (g/100g)	1.29 ± 0.15
Glucose	1.12 ± 0.26
Fructose	0.87 ± 0.21
Sucrose	0.51 ± 0.08
<b>Organic acid (g/100g)</b>	
Succinic acid	0.51 ± 0.08
Oxalic acid	0.43 ± 0.05
Tartaric acid	0.17 ± 0.03
Malic acid	0.12 ± 0.03
Ascorbic acid (mg/100g)	141.09 ± 2.54
$\beta$ -carotene (mg/100g)	1.88 ± 0.31
Lycopene ( $\mu$ g/100g)	164.34 ± 70.10

ตารางที่ 2 แสดงองค์ประกอบของแร่ธาตุในกระเจี๊ยบแดง (% dry weight basis)

ที่มา: Azza A. Abou-Arab et al. (2011)

Element	Micro-elements (mg/100g) $\pm$ SD
Potassium (K)	20.60 $\pm$ 0.02
Phosphorus (P)	36.22 $\pm$ 1.0
Sodium (Na)	6.62 $\pm$ 0.02
Calcium (Ca)	912.15 $\pm$ 2.0
Magnesium (Mg)	15.21 $\pm$ 1.0
	<b>Micro-elements (mg/100g)</b>
Copper (Cu)	4.32 $\pm$ 0.02
Manganese (Mn)	2.39 $\pm$ 0.03
Zinc (Zn)	6.51 $\pm$ 0.03
Iron (Fe)	37.80 $\pm$ 1.0
Nickel (Ni)	ND
Cobalt (Co)	ND

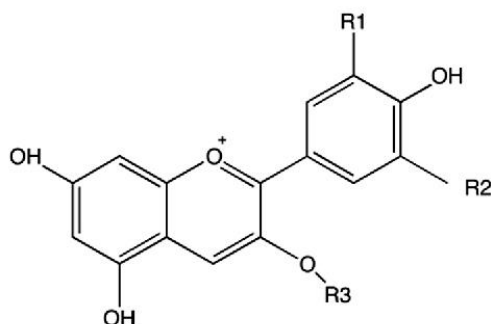
ตารางที่ 3 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของกระเจี๊ยบแดง (% dry weight basis)

ที่มา: Azza A. Abou-Arab et al. (2011)

Constituent	% dry weight basis
Moisture	12.81 $\pm$ 0.02
Protein	7.51 $\pm$ 0.02
Fat	0.46 $\pm$ 0.03
Crude fiber	11.17 $\pm$ 0.02
Ash	11.24 $\pm$ 0.02
Total carbohydrates*	69.62 $\pm$ 2.0

## 2.2 แอนโทไซยานิน

แอนโทไซยานิน (Anthocyanins) เป็นสารประกอบในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) จัดเป็นสารประกอบฟีนอล (phenolic compounds) ประเภทพอลิฟีนอล (polyphenol) สามารถละลายได้ในน้ำ โครงสร้างทางเคมีของแอนโทไซยานินเป็นสารประกอบไกลโคไซด์ (glycosides) และวงอะโรมาติก (aromatic ring) ที่มีจำนวนหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) รวมอยู่ในโมเลกุล ตั้งแต่ 2 วงขึ้นไป และเนื่องจากแอนโทไซยานินประกอบด้วยอะตอมของออกซิเจนที่มีประจุบวกในโครงสร้างของ flavonoid ซึ่งเรียกว่า flavylium (2-phenylchromenylium) ion จึงมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระและมีความคงตัวในสภาพแวดล้อมที่มี pH ต่ำ นอกจากนี้แอนโทไซยานินยังเป็นรงควัตถุที่มีบทบาทต่อสีในช่วงสีแดงจนถึงสีม่วงในดอกไม้ ใบ หรือผล พบได้ในผักผลไม้ และดอกไม้หลายชนิด เช่น ดอกกระเจี๊ยบ ดอกอัญชัน ผลองุ่น กุหลาบ เป็นต้น โดยแอนโทไซยานินเป็นอนุพันธ์พอลิไฮดรอกซี (polyhydroxy) และพอลิเมท็อกซี (polymethoxy) ของฟลาโวลีียม (flavylium) หรือ 2-phenylbenzopyrylium ซึ่งโมเลกุลประกอบด้วยแอนโทไซยานินดิโนที่เรียกว่า อะไกลโคน (aglycone) โดยทั่วไปในธรรมชาติจะพบแอนโทไซยานินดิโน 20 ชนิด แต่มี 6 ชนิดที่พบมากในพืช (Kong, J. M. et al., 2003; Duangmal, K. et al., 2008; Bueno, J. M. et al., 2012; Khoo, H. E. et al., 2017)



Cyanidin-3-sambubioside (R1= OH; R2= H; R3= Sambubioside)

Delphinidin-3-sambubioside (R1= OH; R2= OH; R3= Sambubioside)

Cyanidin-3-glucoside (R1= OH; R2= H; R3= Glucose)

Delphinidin-3-glucoside (R1= OH; R2= OH; R3= Glucose)

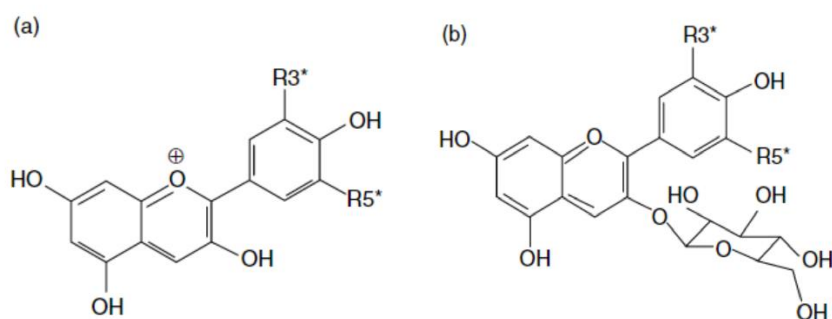
**ภาพที่ 2** โครงสร้างทางเคมีของแอนโทไซยานิน

ที่มา: Da-Costa-Rocha, I. et al. (2011)



## 2.2.1 ชนิดของแอนโทไซยานิน

สารในกลุ่มแอนโทไซยานินมี 6 ชนิดได้แก่ เพลาโกนิน (pelargonidin) ไซยานิดิน (cyanidin) เดลฟินิดิน (delphinidin) พีโอนิดิน (peonidin) เพทูนิดิน (petunidin) และมาลิวิดิน (malvidin) (Luczkiewicz and Cisowski., 1998) โดยแอนโทไซยานินเป็นสารให้สีฟลาโวนอยด์ประเภทเดียวที่ครอบคลุมเฉดสีที่หลากหลายตั้งแต่สีแดงส้ม (pelargonidin) สีแดงไปจนถึงสีน้ำเงิน - ม่วง (delphinidin) (Stintzing and Carle, 2004) ซึ่งแอนโทไซยานินที่ถูกไฮดรอกซิลเลทจะมีการเปลี่ยนแบโทโครมิก (bathochromic) ในขณะที่เกิดเมธิเลชันหรือไกลโคซิเดชันของ OH ที่ตำแหน่ง 3 ทำให้แถบการดูดซับสูงสุดของสีลดลง และความสามารถในการละลายและความคงตัวของสีเพิ่มขึ้น (Stintzing and Carle, 2004; Wrolstad et al., 2005)



โครงสร้างแอนโทไซยานิน (a) และไกลโคไซด์ (b)

ภาพที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของแอนโทไซยานินและไกลโคไซด์

ที่มา : Alihosseini, F. และ Sun, G. (2011)

**ตารางที่ 4** ปริมาณแอนโทไซยานินจากแหล่งต่างๆ

ที่มา: Yousuf, B. et al. (2015)

Name of source	Content/range	Reference
Purple skinned Jumbo	4.10 mg/g	Huang et al. (2009)
Cowart muscadine	2.60 mg/g	Huang et al. (2009)
Banana bracts	32-250 mg/100 g	Pazmino et al. (2009)b
Red radish	154 mg/100g	Giusti and Wrolstad (1996)
Different Chinese radish cultivars	63.77-160.74 mg/100g	Jing et al. (2012)
Red wine grapes	30 to 750 mg/100g	Mazza and Miniati (1993)
Strawberry	13-315 mg/100g	Silva et al. (2007)
Fresh raspberries	75 mg/100g	Ju et al. (2005); Ngo et al. (2007)
A hybrid of fresh strawberries	71.8 mg/100g	Ju et al. (2005); Ngo et al. (2007)
Capulin	31.7 mg/100g	Ordaz et al. (1999)
Black raspberries	145-607 mg/100g	Tian et al. (2006)
Acerola pulp	7.21 mg/100g	Rosso and Mercadante (2007).
Acai pulp	282.5 mg/100g	Rosso and Mercadante (2007).
Roselle	230 mg/100g	Tsai et al. (2002)
Corncoobs	290-1323 mg/100g	Jing and Giusti (2005)
Berries	23.7 mg/100g	Longo and Vasapollo (2006)
Kokum	1000-2400 mg/100g	Nayak et al. (2010).
Red onion	219±34 mg/100g	Donner et al. (1997)
Graph peel powder	171.42 mg/100g	Ma et al. (2012)
Black rice cultivars	79.5-473.7 mg/100g	Chen et al. (2012)
Red rices	7.9-34.4 mg/100g	Chen et al. (2012)

## 2.2.2 ประโยชน์ของแอนโทไซยานิน

แอนโทไซยานินมีสมบัติทางโภชนาเภสัช (nutraceutical) ซึ่งมีประโยชน์มากมายทางด้านสุขภาพ เนื่องจากเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) เช่น ช่วยป้องกันโรคหัวใจและหลอดเลือด มะเร็ง เบาหวาน การอักเสบ ชะลอความเสื่อมของเซลล์ และชะลอความเสื่อมของดวงตา (Yousuf et al., 2016) โดยในปัจจุบัน แอนโทไซยานินมีความต้องการมากขึ้นในอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากผลเสียของการใช้สีสังเคราะห์ สารสกัดสีจากพืชจึงเป็นที่ต้องการนำไปใช้ประโยชน์ทางการค้าเพื่อนำไปใช้ในการปรุงอาหาร ซึ่งแอนโทไซยานินเป็นสารสีที่ได้รับความนิยม อีกทั้งได้รับการอนุญาตให้ใช้ในการเตรียมอาหารที่มีการใช้ผักและผลไม้ได้ โดยพิจารณาจากประเด็นด้านความปลอดภัยที่เกี่ยวข้องกับผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม (Turker, N. et al., 2006; Agcam, E. et al., 2017)

## 2.2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อความคงตัวของแอนโทไซยานิน

ความคงตัวของแอนโทไซยานินขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ โครงสร้าง ความเข้มข้นของรงควัตถุ ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) อุณหภูมิ ความเข้มแสง ออกซิเจน การย่อยสลายของเอนไซม์ เช่น เพอร์ออกซิเดส (peroxidase) โพลีฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidase) และ  $\beta$ -glucosidase และปฏิสัมพันธ์กับส่วนประกอบของอาหาร เช่น กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) น้ำตาล ไอออนของโลหะ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (sulfur dioxide) และ โคพิกเมนต์ (copigments) (Cisse et al., 2009; Matsufuji et al., 2007) หากโครงสร้างของแอนโทไซยานินมีการเปลี่ยนแปลงไปจะส่งผลให้สีเปลี่ยนแปลงไปด้วย โดยปัจจัยหลักที่มีผลต่อการเปลี่ยนสีของแอนโทไซยานินคือ การเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ซึ่งทำให้โครงสร้างและสีของแอนโทไซยานินสามารถเปลี่ยนกลับไปกลับมาได้ โดยในช่วง pH 1-3 จะให้สีแดงของ flavylium cation ที่ pH 4-5 จะเปลี่ยนเป็นไม่มีสีของโครงสร้าง carbinol pseudobase และ chalcone และเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินที่ pH มากกว่า 5 ซึ่งแสดงโครงสร้างของ quinoidal anhydrobase (Jackman et al., 1987; Wrolstad, 2004)

## 2.2.4 การสกัดแอนโทไซยานิน

การเลือกใช้วิธีการสกัดแอนโทไซยานินที่เหมาะสมจะช่วยเพิ่มทั้งปริมาณ (yield) และคุณภาพของสารที่สกัดได้ และวิธีสกัดที่ใช้ต้องไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม โดยส่วนมากนิยมใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในการสกัดแอนโทไซยานิน (Bleve, M. et al., 2008) เนื่องจากแอนโทไซยานินเป็นสารประกอบที่มีขี้ จึงสามารถสกัดออกมาได้ง่ายโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขี้ เช่น อะซิโตน เมทานอล น้ำ และแอลกอฮอล์ โดยทั่วไปการใช้ตัวทำละลายที่มีขี้ความเข้มข้น 60-80% พบว่าสามารถสกัดแอนโทไซยานินออกมาจากเนื้อเยื่อของพืชได้ในปริมาณสูงที่สุด (Deng, J. et al., 2013; Ongkowijoyo, P. et al., 2018) นอกจากนี้ยังมีเทคนิคที่ใช้ในการสกัดอื่นๆ อีก เช่น microwave, supercritical fluid, pressurised fluid, electric fields, ultrasound energy เป็นต้น โดยเทคนิคเหล่านี้ถูกพัฒนาเพื่อให้การสกัดแอนโทไซยานินจากเนื้อเยื่อพืชมีประสิทธิภาพและ

มีความปลอดภัย และยังมีเทคนิคการสกัดแบบดั้งเดิมโดยใช้ Soxhlet ในการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระ รวมไปถึงแอนโทไซยานินที่ได้จากแหล่งธรรมชาติด้วย (Mane, S. et al., 2015; Celli, G. B. et al., 2017)

### 2.3 การเอนแคปซูลของสารสี

การเอนแคปซูลเป็นเทคโนโลยีที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันการสลายตัวของแอนโทไซยานิน กระบวนการ Microencapsulation เป็นกระบวนการเคลือบสารที่เป็นวัสดุหลัก (core material) ด้วยสารห่อหุ้ม (wall material) เพื่อสร้างแคปซูลในระดับไมโครเมตรหรือนาโนเมตร สามารถช่วยป้องกันการสลายตัวที่เกิดจากแสง ความชื้น pH และความร้อน ได้ มักใช้ห่อหุ้มสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพในอุตสาหกรรมอาหาร และยาเพื่อให้ความเสถียรมากขึ้น (Mansour et al., 2020) และใช้ในการปกปิดรสชาติที่ไม่พึงปรารถนาและเพิ่มความสามารถในการละลาย (Shahidi and Han, 1993) ปัจจุบันมีวิธีที่ใช้ในการเอนแคปซูลหลายวิธี วิธีที่พบมากที่สุดคือการ spray drying ซึ่งเป็นการทำให้ส่วนผสมที่เป็นเนื้อเดียวกันของวัสดุหลักและสารห่อหุ้ม เกิดเป็นละอองภายในเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย (Gibbs et al., 1999) โดยอนุภาคแห้งที่ได้มักจะเป็นทรงกลม

จากงานวิจัยของ Zaidel et al. (2014) ศึกษาการเอนแคปซูลชันโดยใช้เทคนิคไมโครเวฟ และมอลโตเด็คซ์ตรินเป็นสารให้ความคงตัว โดยทำการศึกษาลักษณะการเก็บรักษา และความคงตัวของแอนโทไซยานินในระบบอิมัลชันแบบน้ำในน้ำมัน ทำการศึกษาในมาการีนที่มีแอนโทไซยานินซึ่งผ่านการเอนแคปซูล และไม่ผ่านการเอนแคปซูลที่สกัดจากกระเจี๊ยบแดง พบว่ามาการีนที่มีแอนโทไซยานินซึ่งผ่านการเอนแคปซูล แสดงให้เห็นถึงความเสถียรที่ดีขึ้นเมื่อเทียบกับแอนโทไซยานินที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูล

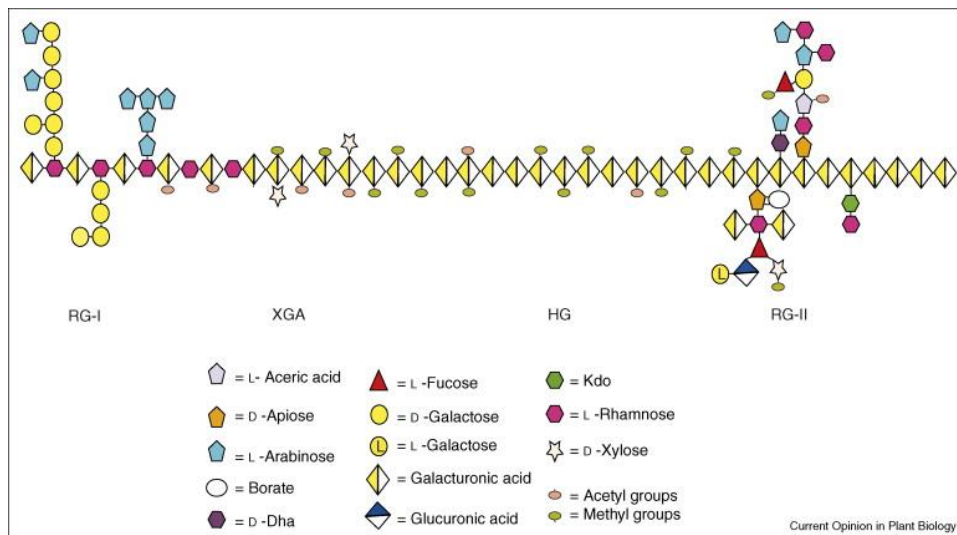
จากงานวิจัยของ Ersus Yurdagel (2006) ศึกษาการทำไมโครเอนแคปซูลชัน โดยใช้ spray drier โดยการกักส่วนผสมไว้ในสารเคลือบผิว โดยใช้มอลโตเด็คซ์ตรินซึ่งเป็นสารที่สามารถละลายน้ำได้ ปกป้องส่วนผสมที่ถูกห่อหุ้มจากการเกิดออกซิเดชัน และมีความหนืดต่ำที่อัตราส่วนของแข็งสูง สำหรับ spray drying ของแอนโทไซยานินที่สกัดได้จาก black carrot การใช้อุณหภูมิอากาศขาเข้าที่สูง (air inlet temperature) (> 160–180 องศาเซลเซียส) จะทำให้เกิดการสูญเสียแอนโทไซยานินมาก นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้ 20–21 DE maltodextrin ซึ่งคือ Glucodry 210 เป็นวัสดุผนังจะให้ผงที่มีปริมาณแอนโทไซยานินสูงสุด และการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจะเพิ่มครึ่งชีวิตของเม็ดสีแอนโทไซยานินที่ได้จากการ spray dry เป็น 3 เท่า เมื่อเทียบกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

## 2.4 ไบโอฟอลิเมอร์

ไบโอฟอลิเมอร์ (biopolymer) คือพอลิเมอร์ที่พบในสิ่งที่มีชีวิต ได้แก่ โปรตีน (protein) พอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) และกรดนิวคลีอิก (nucleic acid) เป็น colloidal structure ซึ่งสามารถนำไปใช้ประยุกต์ในอุตสาหกรรมอาหารได้ เช่น นำไปใช้ในการเอนแคปซูเลทและป้องกันสาร bioactive ingredients นอกจากนี้ยังใช้เพื่อทำให้เกิดความคงตัวเกี่ยวกับเนื้อสัมผัส และสร้างคุณสมบัติต่างๆให้กับอาหาร (Gunasekaran, Ko, & Xiao, 2007; Weiss, Takhistov, & McClements, 2006)

### 2.4.1 เพกทิน

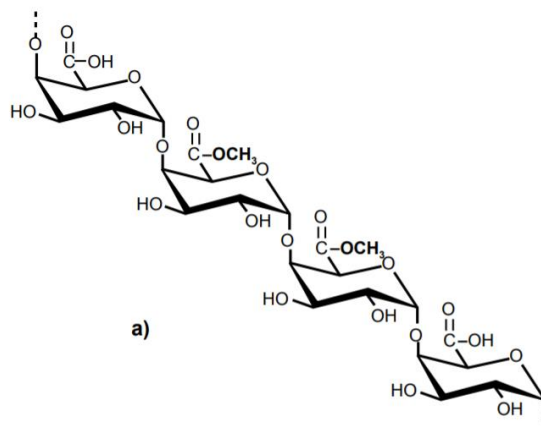
เพกทิน (Pectin) เป็นกลุ่มของพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) ประเภท heteropolysaccharide ที่ประกอบด้วยโครงสร้างที่เป็นเส้นตรงและโครงสร้างที่เป็นกิ่ง (De Vries et al., 1983) โครงสร้างส่วนใหญ่ประกอบด้วยกรดกาแลคทูโรนิก (D-galacturonic acid) ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ  $\alpha$ -1,4 glycosidic bonds ซึ่งประกอบด้วย homogalacturonan (HG) ประมาณ 60%, rhamnogalacturonan I (RG I) 20–35% และ rhamnogalacturonan II (RG II) เป็นส่วนประกอบเล็กน้อยของเพกทิน 0.5–8% โดยประมาณ (Hilz, H. et al., 2006; Mohnen et al., 2008) และมีการพบน้ำตาลอีกหลายชนิด เช่น กาแล็กโทส (galactose), อะราบินโนส (arabinose) และแรมนโนส (rhamnose) (องอาจ, 2553)



จากแผนภาพแสดง homogalacturonan (HG), xylogalacturonan (XGA), rhamnogalacturonan I (RG-I) และ rhamnogalacturonan II (RG-II) ที่เชื่อมต่อกัน

ภาพที่ 4 แผนภาพโครงสร้างของเพกทินแสดงพอลิแซ็กคาไรด์ทั้ง 4 ชนิด

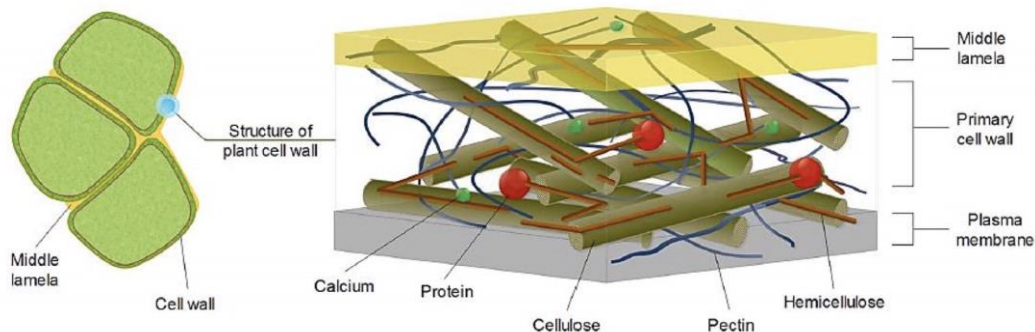
ที่มา : Mohnen, D. (2008)



ภาพที่ 5 โครงสร้างทางเคมีของเพกทิน

ที่มา: Sundar Raj, A. A. et al. (2012)

เพกทินพบตามธรรมชาติในผนังเซลล์ของพืช (plant cell wall) และรอยต่อระหว่างผนังเซลล์ โดยรวมตัวอยู่กับเซลลูโลส (cellulose) เพกทินช่วยยึดเกาะผนังเซลล์ให้ติดกัน ทำหน้าที่เป็นเจลและเป็นพอลิเมอร์ที่มีความเสถียรในอาหาร และมีการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อื่นๆ นอกจากนี้ยังมีการนำมาใช้ประโยชน์ในทางชีวการแพทย์หลายอย่าง (Sakai et al., 1993)



ภาพที่ 6 โมเลกุลของเพกทินในเนื้อเยื่อของผักผลไม้บริเวณ middle lamella และผนังเซลล์ (cell wall)

ที่มา: Dranca and Oroian (2018)

#### 2.4.1.1 ชนิดของสารประกอบเพกทิน

โดยทั่วไปเพกทินที่พบในผักผลไม้จะพบได้ทั้งที่เป็นชนิดละลายน้ำและชนิดไม่ละลายน้ำ โดยขึ้นอยู่กับการสุกของผักผลไม้ ในผลไม้ที่ยังคงดิบหรือห่ามอยู่ จะมีเพกทินในรูปที่ไม่ละลายน้ำ และเมื่อผลไม้สุกเต็มที่ จะพบเพกทินในรูปของเพกทินที่สามารถละลายน้ำได้ (รัชนี และริญ, 2554)

สารประกอบเพกทิน เป็นเพกทินที่พบในพืชประกอบไปด้วยสาร 4 ชนิด ได้แก่ โพรโทเพกทิน (protopectin) กรดเพกทินิก (pectinic acid) กรดเพกติก (pectic acid) และเพกทิน (pectin)

โปรโตเพกทิน เป็นเพกทินที่มีหมู่แคลเซียมหรือแมกนีเซียม ไม่สามารถละลายน้ำได้ เมื่อนำไปทำปฏิกิริยากับกรด จะสามารถละลายน้ำได้ เนื่องจากไฮโดรเจนจากกรดจะเข้าไปแทนที่แคลเซียมหรือแมกนีเซียม หรือถูกไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์จะทำให้เกิดเป็นกรดเพกทินิกที่สามารถละลายน้ำได้

กรดเพกทินิก เป็นคอลลอยด์ในสารประกอบเพกทินหรือพอลิเมอร์ของกรดกาแลคทูโรนิก (poygalacturonic acid) ที่มีหมู่เมทิลเอสเทอร์เหลืออยู่บางส่วน สามารถเกิดเจลได้เมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสม และเมื่อถูกไฮโดรไลซ์เอาหมู่เมทิลออกจนหมดจะได้เป็นกรดเพกติก

กรดเพกติก เป็นคอลลอยด์ในสารประกอบเพกทินหรือพอลิเมอร์ของกรดกาแลคทูโรนิก (poygalacturonic acid) ที่ไม่มีหมู่เมทิลเอสเทอร์เป็นองค์ประกอบในโครงสร้าง จะประกอบด้วยหน่วยของกรดกาแลคทูโรนิกที่เชื่อมต่อกันอย่างเดี่ยว เพกทินชนิดนี้จะไม่สามารถเกิดเจลได้ทุกสภาวะ

เพกทิน เป็นสารที่สามารถละลายน้ำได้ จะมีโครงสร้างเป็นกรดกาแลคทูโรนิกที่มีหมู่เมทอกซิลอยู่ในโครงสร้าง โดยปริมาณเมทิลเอสเทอร์และระดับความเป็นกรดต่างที่เป็นกลางจะส่งผลต่อการเกิดเจล

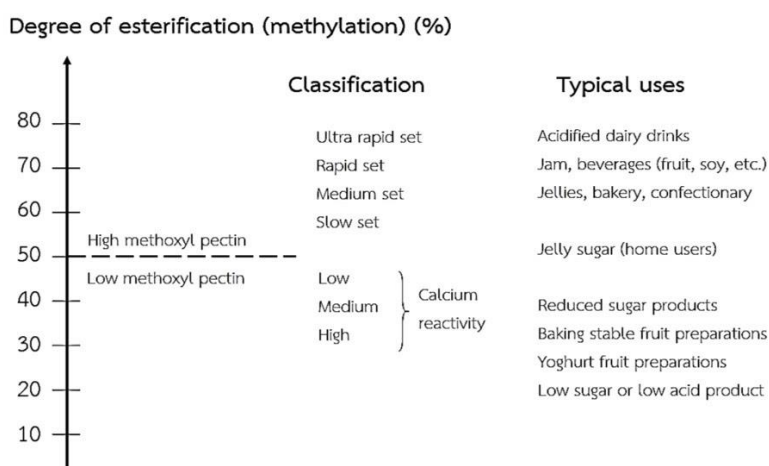
#### 2.4.1.2 ชนิดของเพกทิน

เพกทินสามารถแบ่งตามระดับของเอสเทอริฟิเคชัน (degree of esterification หรือ ค่า DE) ซึ่งมีผลต่อคุณสมบัติของเพกทิน โดยเฉพาะความสามารถในการละลายและลักษณะการขึ้นรูปของเจล โดยแบ่งได้ 2 ระดับคือ

1. เพกทินที่มีเมทอกซิลสูง (High methoxyl pectin, HM) เป็นเพกทินที่มีระดับของเมทิลเอสเทอริฟิเคชัน (degree of methyl esterification, DE) มากกว่า 50% (May และ Colin D., 1990) ในพอลิเมอร์ประเภทนี้ จะมีขนาดโมเลกุลที่แตกต่างกันในพอลิเมอร์โดยจับกันด้วยพันธะไฮโดรเจนและเกิดอันตรกิริยาแบบ hydrophobic มีคุณสมบัติทำให้เกิดเจล โดยกลไกการเกิดเจลจะต้องอาศัยการเติมน้ำตาลและปรับค่า pH ให้อยู่ในสภาวะที่เป็นกรด และจะเกิดได้ดีเมื่อมีของแข็งที่ละลายได้ในน้ำ (total soluble solid) หรือน้ำตาลอยู่ 55 - 65 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) และมีค่า pH เท่ากับ 2.9 - 3.1 โดยสายเพกทินจะช่วยดึงน้ำออกจนเกิดการเพิ่มของประจุลบให้แก่เพกทิน ผลิตภัณฑ์ที่ใช้เพกทินชนิดนี้ ได้แก่ แยม และเยลลี่ เพกทินชนิดนี้ แบ่งย่อยออกเป็น 3 ชนิดตามเวลาที่ใช้ในการทำให้เกิดเจล (gel) ได้แก่

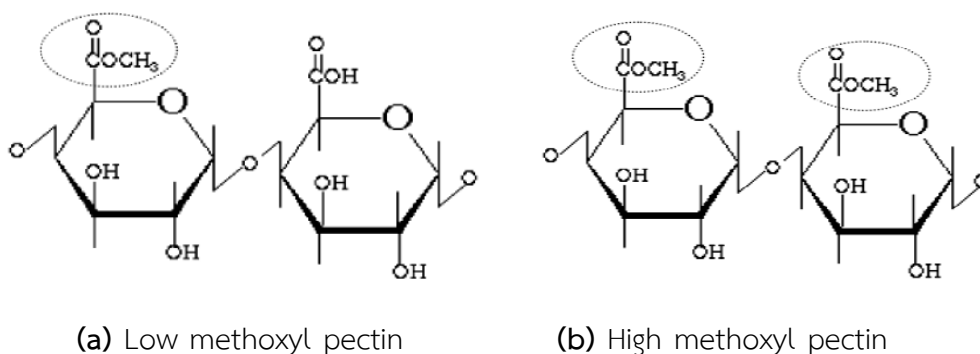
- ชนิดเซตตัวเร็ว (rapid set) มีค่า DM 68-72%
- ชนิดเซตตัวปานกลาง (rapid set) มีค่า DM 59-64%
- ชนิดเซตตัวช้า (rapid set) มีค่า DM มากกว่า 50% แต่น้อยกว่า 59% ซึ่งเป็นชนิดที่นิยมใช้มากที่สุด เพราะในผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่มักมีของแข็งละลายเป็นองค์ประกอบอยู่สูง และในแต่ละช่วงระดับของการเอสเทอริฟิเคชัน (ค่า DE) ค่า DE จะมีความสามารถในการเกิดเจลที่ต่างกันซึ่งขึ้นอยู่กับการขึ้นรูปกับเวลา และค่า pH (แสดงดังภาพที่ 6) ดังนั้นการนำเพกทินมาใช้ประโยชน์จึงขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ ค่า pH ของอาหาร และชนิดของผลิตภัณฑ์ (กรวิทย์, 2019)

2. เพกตินที่มีเมทอกซิลต่ำ (Low methoxyl pectin) เป็นเพกตินที่มีระดับของเมทิลเอสเทอร์ฟิเคชัน (degree of methyl esterification, DE) น้อยกว่า 50% สามารถเกิดเจลได้ง่ายกว่า แบบ high methoxyl pectin แต่ต้องอาศัยประจุของแคลเซียมไอออนจึงจะเกิดเจลได้ ซึ่งการเกิดเจลเป็นแบบ egg-box model โดยมีแคลเซียมไอออน ( $\text{Ca}^{2+}$ ) อยู่ประมาณ 3% มีของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (total soluble solid) ตั้งแต่ 10-80% และมีช่วง pH ตั้งแต่ 2.9-5.5 เจลที่ได้จะเป็นชนิด thermoreversible gel มีคุณสมบัติ คือ ช่วยเพิ่มความนุ่ม และเนื้อสัมผัสที่ดีให้แก่อาหารซึ่งได้จากไอออนของแคลเซียม (William, G. T. W. et al., 2006; Leroux, J. et al., 2003; Sharma, B. R. et al., 2006)



ภาพที่ 7 ชนิดของเพกตินที่แบ่งตามระดับของเอสเทอร์ฟิเคชัน

ที่มา : กรวิทย์ (2563)



ภาพที่ 8 โครงสร้างของเพกตินตามระดับของเอสเทอร์ฟิเคชัน

ที่มา : Anonymous (2005)



### 2.4.1.3 การสกัดเพกทิน

เพกทินมีการสกัดด้วยกรดหรือสารคีเลต (chelating agent) ซึ่งสารสกัดที่ได้ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น วัสดุตั้งที่ใช้ ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ของสารละลายที่ใช้ในการสกัด อุณหภูมิ และเวลาในการสกัด (Arellanes et al., 2011; Canteri-Schemin et al., 2005; Happi-Emaga et al., 2012; Nazaruddin et al., 2013) โดยในการสกัดเพกทินมีการใช้กรดอินทรีย์หลายชนิด เช่น กรดทาร์ทาริก (tartaric acid), กรดมาลิก (malic acid), กรดซิตริก (citric acid), กรดแลคติก (lactic acid), กรดอะซิติก (acetic acid) และกรดฟอสฟอริก (phosphoric acids) นอกจากนี้ยังมีการใช้กรดอนินทรีย์ เช่น กรดซัลฟิวริก (sulfuric acid), กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) และกรดไนตริก (nitric acids)

จากผลการวิจัยของ Canteri-Schemin, M. H. et al. (2005) พบว่าการใช้กรดฟอสฟอริก และมาลิก ให้ปริมาณผลผลิตที่ต่ำสุด ส่วนกรดไนตริกให้ปริมาณผลผลิตที่สูงสุดแต่มีค่าการกระจายที่กว้าง นอกจากนี้การใช้กรดซิตริกให้ค่าเฉลี่ยของผลผลิตที่สูงที่สุด และให้ผลดีกว่ากรดอื่นๆ ในแง่ของทางเศรษฐกิจ และสิ่งแวดล้อม จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนของผลผลิตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Canteri-Schemin, M. H. et al., 2005; Merino et al., 2019)

จากผลการวิจัยของ Angsutornrangsri and Makaumporn (2018) ในการศึกษาการสกัดเพกทินจากกระเจี๊ยบ เมื่อพิจารณาปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณร้อยละของเพกทิน พบว่าปัจจัยที่มีผลมากที่สุดคือ อุณหภูมิ และเวลา ปัจจัยที่มีผลน้อยที่สุดคือ ชนิดของตัวทำละลาย โดยการสกัดเพกทินด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.03 N ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 240 นาที สกัดได้เพกทินออกมามากที่สุด มีปริมาณร้อยละ  $21.85 \pm 0.87$  ส่วนการสกัดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที สกัดได้เพกทินออกมาน้อยที่สุด มีปริมาณร้อยละ  $2.52 \pm 0.10$  และจากผลของชนิดตัวทำละลาย พบว่าการสกัดที่ใช้กรดไฮโดรคลอริกได้ปริมาณร้อยละของเพกทินที่สกัดได้มากกว่าการสกัดโดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลายในทุกสภาวะ ซึ่งให้ผลเป็นไปตามการศึกษาของ Norazelina et al. (2012)

### 2.4.1.4 การใช้เพกทินในอาหาร

เพกทินเป็นไบโอพอลิเมอร์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ และเป็นไฮโดรคอลลอยด์ซึ่งมีโครงสร้างเป็นแบบโครงข่ายร่างแหของโพลีเมอร์ (polymeric cross-linked network) (Joel, J. M. et al., 2018) โดยเพกทินมีคุณสมบัติที่หลากหลาย เช่น เป็นสารก่อเจล (gelling agent) สารเพิ่มความคงตัว (stabilizer) อิมัลซิไฟเออร์ (emulsifier) และสารให้ความข้นหนืด (thickening agent) (Ralet, M. C. et al., 2008) โดยเพกทินส่วนใหญ่ที่ใช้ในอุตสาหกรรมสกัดมาจากผลไม้ตระกูลส้ม (citrus fruits) กากแอปเปิล (apple pomace) และแหล่งอื่นๆ เช่น กากน้ำตาลพืช เปลือกมะม่วง ดอกทานตะวัน และเปลือกกล้วย ในเชิงการค้าจะพบเพกทินอยู่ในรูปของผงสีขาวจนถึงสีน้ำตาลอ่อน นิยมใช้เป็นส่วนผสมของผลิตภัณฑ์อาหารเครื่องดื่ม ผลิตภัณฑ์ขนมเบเกอรี่ และซอส (Chan et al., 2015)

ในปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้เพกทินในอุตสาหกรรมอาหารและยา พบว่าเพกทินสามารถทนต่อการย่อยสลายในระบบทางเดินอาหารของลำไส้ส่วนบนได้ดี จึงมีการนำมาพัฒนาโดยใช้การเอนแคปซูเลชันมากขึ้น (Rinaudo, M., 1996; Liu, P. et al., 2003) นอกจากนี้เพกทินยังช่วยลดระดับน้ำตาลกลูโคสและคอเลสเตอรอลได้ โดยมีปริมาณบริโภค 6 กรัมต่อวัน (Borzelleca et al., 1996; Laufenberg et al., 2003)



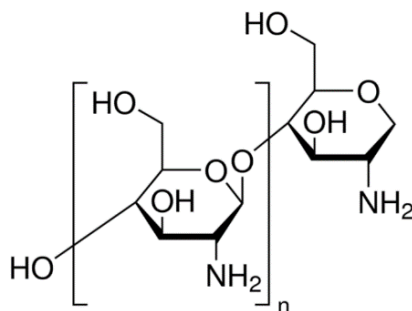
ภาพที่ 9 เพกทิน

ที่มา: <https://www.siamchemi.com/เพกติน/>

#### 2.4.2 ไคโตซาน

ไคโตซาน (Chitosan) มีเป็นไบโอพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วย  $\beta$  (1-4) D-glucosamine และ  $\beta$  (1-4) N-acetyl-D-glucosamine (Peniche, C., 2001) ซึ่งสามารถเตรียมได้จากการเกิดปฏิกิริยา Deacetylation คือการกำจัดหรือดึงเอาหมู่อะซิไทลออกจากไคตินซึ่งเป็นพอลิเมอร์ของ N-Acetyl Glucosamine ทำให้โครงสร้างเปลี่ยนเป็น Glucosamine (สุธิตา คงทอง, 2552) และพบได้หลากหลายตามธรรมชาติในสิ่งมีชีวิต เช่น ครัสเตเชีย (ปู กุ้ง และกั้ง) เห็ดรา แมลง แอนนิลิด หอย เป็นต้น ซึ่งส่วนใหญ่ไคโตซานผลิตจากโครงกระดูกภายนอกที่เป็นผลพลอยได้จากการแปรรูปอาหารของสัตว์จำพวกครัสเตเชีย (Brine, C. J., 1991)

ไคโตซานมีลักษณะเป็นสีขาวหรือสีครีม ไม่มีกลิ่น มีคุณสมบัติต่างๆ เช่น ไม่มีความเป็นพิษ มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ และสามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Onishi, H. and Machida, Y., 1999; Paul, W. and Sharma, C. P., 2000; Mi, F. L. et al., 2002) นอกจากนี้ยังสามารถละลายได้ในสารละลายกรดอินทรีย์อ่อนที่มีค่า pH ต่ำกว่า 6.0 เช่น กรดอะซิติก กรดแลคติก และกรดฟอร์มิก เป็นต้น เนื่องจากในโครงสร้างมีหมู่อะมิโน ( $-NH_2$ ) ในสถานะที่เป็นกรดจะมีความสามารถในการรับโปรตอนกลายเป็นประจุบวก ( $-NH_3^+$ ) ที่ทำให้มีความสามารถในการละลายน้ำที่ดีขึ้น (Pillai et al., 2009)



ภาพที่ 10 โครงสร้างทางเคมีของไคโตซาน

ที่มา:<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/448869?lang=en&region=TH#productDetailSafetyRelatedDocs>

#### 2.4.2.1 การใช้ประโยชน์ของไคโตซาน

ไคโตซานถูกนำมาใช้ประโยชน์ทางอุตสาหกรรมมากมาย ทั้งในรูปแบบของแข็งและในรูปของสารละลาย โดยการละลายไคโตซานด้วยกรดอินทรีย์จะได้สารละลายที่มีลักษณะเหนียวใส สามารถนำไปขึ้นรูปได้หลายรูปแบบ เช่น แผ่นเยื่อบาง เจล เม็ด เส้นใย คอลลอยด์และสารเคลือบผิว (ปวย อุ๋นใจ, 2544) และนอกจากนี้ไคโตซานเป็นสารที่มีอยู่ในธรรมชาติ ย่อยสลายได้ง่าย ไม่เป็นพิษ ปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อมและร่างกาย มีคุณสมบัติต้านจุลชีพและสารอนุมูลอิสระ ทางด้านการแพทย์และสุขภาพจึงพบการนำมาใช้ทำไหมเย็บแผล ผิวนางเทียม และเป็นตัวขนส่งยาในรูปแคปซูล อีกทั้งพบว่ามีการนำมาใช้เป็นสารกันเสีย (Preservative) ในการยืดอายุของอาหารและเครื่องดื่ม สารเคลือบผักผลไม้เพื่อยืดอายุการเก็บรักษา สารให้ความคงตัว (Stabilizing agent) สารตกตะกอน (Flocculants) รวมถึงใช้ผลิตแผ่นฟิล์มในรูปรับประทานได้ (Edible film) เป็นบรรจุภัณฑ์สำหรับอาหาร (ชินจิต สีพญา และ อุตมลักษณ์ เวียงงาม., 2557) และนอกจากนี้ไคโตซานยังมีหมู่อะมิโนที่มีประจุบวกจึงมีความไวต่อการทำปฏิกิริยาจึงทำให้มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) และมีฤทธิ์ในการต้านจุลชีพและเชื้อรา (Kulawik et al., 2020)

#### 2.5 ความสัมพันธ์ระหว่างไบโอพอลิเมอร์กับแอนโทไซยานิน

จากงานวิจัยของ Pinelo, M. et al. (2006) พบว่าเพกทินซึ่งเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีปฏิสัมพันธ์กับแอนโทไซยานินด้วยพันธะชนิดอ่อนเช่น แรงไฮโดรโฟบิก (hydrophobic forces) และพันธะไฮโดรเจน โดยเกิดการรวมตัวกันระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลของแอนโทไซยานินกับ GalAc ที่ยังไม่ผ่านการเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ิฟิเคชันในโครงสร้างของเพกทิน ซึ่ง pH ของน้ำผลไม้จะช่วยเสริมปฏิกิริยาข้างต้น เนื่องจากอยู่ในสภาวะสมดุล pH ของแอนโทไซยานินจะสามารถสร้างเป็น flavylum cations และกรดในกลุ่มคาร์บอกซิลิกที่มีประจุลบของเพกทินได้ (Buchweitz, M. et al., 2013; Fernandes, A. et al., 2014) และจากผลงานวิจัยของ Padayachee et al. (2012) และ Phan et al. (2017) พบว่าสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง

แอนโทไซยานินกับเพกทิน มีประโยชน์หลากหลายทั้งในด้านเทคโนโลยีและสุขภาพ ซึ่งผนังเซลล์ของพืชที่มีเพกทิน จะมีความสามารถในการจับกับแอนโทไซยานินได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับเซลลูโลสหรือองค์ประกอบอื่น ๆ ที่มีเซลลูโลส

จากงานวิจัยของ Izlia, J. et al. (2015) กล่าวว่า สารที่เป็นไบโอพอลิเมอร์สามารถสร้างพันธะด้วย electrostatic complexation ของโปรตีนและพอลิแซ็กคาไรด์ ซึ่งสามารถใช้ในการเอนแคปซูลสารที่เป็น hydrophobic nutraceuticals เช่น DHA, CLA แอนโทไซยานิน และ วิตามิน D เพื่อป้องกันจากการถูกทำลายและสลายตัวทางเคมีได้ (chemical degradation) และจากงานวิจัยของ Arts et al. (2002) แสดงให้เห็นว่าการดักจับสารประกอบฟีนอลิกในอนุภาคของไบโอพอลิเมอร์อาจช่วยเพิ่มความเสถียรเนื่องจากความร้อนได้ ในทางกลับกันแอนโทไซยานินที่ถูกเอนแคปซูลจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่าสารที่ไม่ผ่านการให้ความร้อนหรือไม่ถูกเอนแคปซูล ซึ่งการลดลงของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอาจเกิดจากการสลายตัวด้วยความร้อนของแอนโทไซยานินในระหว่างกระบวนการสร้างอนุภาคของไบโอพอลิเมอร์ หรือเกิดการเข้าไปจับภายในโมเลกุลของไบโอพอลิเมอร์ โดยแอนโทไซยานินที่ถูกเอนแคปซูลไว้ภายในไบโอพอลิเมอร์ก่อนการให้ความร้อนจะมีความสามารถต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าแอนโทไซยานินที่ไม่ถูกเอนแคปซูลซึ่งได้รับความร้อนในสภาวะคล้ายกัน

### บทที่ 3

#### วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

##### 3.1 วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

###### 3.1.1 วัสดุ

1. ดอกกระเจี๊ยบแดง (*Hibicus sabdariffa L.*)

###### 3.1.2 วัสดุ อุปกรณ์

1. Water bath shaker (Gesells chaft fur รุ่น GEL 1092, Burgwedel, Germany)
2. Hot air oven (Mettmert GmbH+Co.KG, Model UF110, Germany)
3. pH meter (METTLER TOLEDO™ FiveEasy™ Plus, Model FEP 20, Thailand)
4. Spectrophotometer (U-5100 HITACHI, Techcomp (Thailand) Co., Ltd.)
5. Freeze drier (Labconco® Mobile Freeze Dryer Lyophilizer Vacuum 77540)
6. Color meter (Hunter Lab รุ่น Color Quest XE, ColorTec Associates Inc)
7. Refrigerated centrifuge (Thermo scientific sorvall legend XTR)
8. เครื่องชั่งน้ำหนักตนิยม 3 ตำแหน่ง (METTLER TOLEDO®, Thailand)
9. เครื่องชั่งน้ำหนักตนิยม 4 ตำแหน่ง (METTLER TOLEDO®, Thailand)
10. Abbe Refractometer (Atago 1T, Japan)
11. Rotary evaporator
12. Desiccator
13. Waring Blender
14. Magnetic stirrer
15. Magnetic bar
16. เครื่องบีบน้ำ
17. Beakers (PYREX®, Germany)
18. Volumetric Flasks (ISO LAB, Germany)
19. Erlenmeyer Flasks (PYREX®, USA)
20. Graduated Cylinders
21. Burette (DURAN®, Germany)
22. Stands and Racks

23. Glass Funnel
24. Test Tubes
25. Parafilm
26. Nylon filter
27. Stirring Rod
28. Dispensing Spoons
29. Forceps
30. Aluminum Dish
31. Cuvette
32. Centrifuge bottles
33. Dropper pipettes
34. Graduated pipettes
35. Micropipette
36. Pipette Bulb
37. Aluminum foil
38. ถุง aluminum foil
39. ถาด
40. ขวดสีชา
41. ทัพเพอร์แวร์

### 3.1.3 สารเคมี

1. 95% Ethanol
2. Chitosan 60-80 kDa
3. Citric acid
4. Lactic acid
5. Malic acid
6. Hydrochloric acid 37%
7. Potassium chloride
8. Sodium acetate trihydrate
9. Sodium hydroxide
10. Sodium chloride
11. Phenol red

## 3.2 ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย

### 3.2.1 การสกัดแอนโทไซยานินและเพกทิน

ดัดแปลงจากวิธีของ Tulyathan et al. (1993) and Jamsazzadeh, K. et al. (2014) โดยแบ่งกลีบกระเจี๊ยบแช่แข็งที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส มาละลายที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักกลีบกระเจี๊ยบที่แบ่งมา นำกระเจี๊ยบมาแยกเมล็ดออก แล้วนำมาชั่งน้ำหนักที่เหลือ นำกลีบกระเจี๊ยบไปปั่นใน Waring blender ด้วยความเร็วสูงสุดนาน 20 วินาที โดยควบคุมเวลาในการปั่นให้เท่ากัน หลังจากนั้นเทลงใน Beaker แล้วนำไปชั่งน้ำหนักกระเจี๊ยบที่ได้ หลังผ่านการ blending เติมตัวทำละลายเอทานอล 47.5% ปริมาตร 100 ml ในอัตราส่วน 1:2 ซึ่งปรับด้วยกรดชนิดต่าง ๆ ให้ได้ค่า pH 2.5 ลงในตัวอย่างหนัก 50 กรัม ใน Erlenmeyer Flask ขนาด 250 ml จากนั้นปิดด้วยแผ่น Parafilm และห่อด้วย Aluminum Foil แล้วนำไปต้มใน Water bath shaker ที่อุณหภูมิ 50, 75 และ 90 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำสารละลายที่ผ่านการต้มมารองด้วย Nylon Filter และใช้เครื่องบีบ เพื่อให้ได้สารสกัดออกมามากที่สุด นำสารสกัดที่ได้มาวัดปริมาตรด้วยกระบอกตวง และบันทึกปริมาตรที่ได้ แล้วเทสารสกัดลงใน Erlenmeyer Flask ขนาด 500 ml ซึ่งห่อด้วย Aluminum Foil ก่อนนำไปตกตะกอนเพกทิน แบ่งสารสกัดไปวัดค่า Anthocyanin content (mg/L) ด้วยวิธี pH-differential method ทั้งก่อนและหลังตกตะกอนเพกทิน

**ตารางที่ 5** แสดงสภาวะในการสกัดแอนโทไซยานินและเพกทินด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ที่ใช้เวลาในการสกัด 60 นาที

ชนิดตัวทำละลาย	อุณหภูมิ (°C)
Citric acid	50
	75
	90
Lactic acid	50
	75
	90
Malic acid	50
	75
	90

### 3.2.2 การตกตะกอนเพกทิน

นำสารสกัดมาตกตะกอนเพกทิน โดยเติม 95% Ethanol ที่แช่เย็น อัตราส่วน 1:2 ลงใน Erlenmeyer Flask ขนาด 500 ml ที่มีสารสกัด ห่อด้วย aluminum foil แล้วตั้งทิ้งไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นแบ่งใส่ Centrifuge bottle 250 ml แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเพกทิน ด้วยเครื่อง Refrigerated centrifuge ที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที

### 3.2.3 การทำแห้งตะกอนเพกทิน

นำส่วนตะกอนไปแช่แข็งในเครื่อง Freezer ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อนำไปเข้าเครื่อง freeze drier ที่อุณหภูมิ -48 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปบดและเก็บเพกทินที่ได้ทั้งหมดในถุง aluminum foil แล้วนำไปวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและเคมีของเพกทิน

### 3.2.4 การวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของแอนโทไซยานิน

3.2.4.1 การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานิน (Total anthocyanin content) ดัดแปลงจากวิธีของ Giusti and Wrolstad (2001) ด้วยวิธี pH-differential method (ภาคผนวก ก.1)

### 3.2.5 การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ และเคมีของเพกทิน

3.2.5.1 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (Moisture content) ตามวิธีของ AOAC (2000) (ภาคผนวก ข.1)

3.2.5.2 การวิเคราะห์ปริมาณผลผลิตเพกทิน (% Yield) ปริมาณร้อยละผลผลิตเพกทินของกลีบกระเจี๊ยบ รายงานผลเป็นกรัมของน้ำหนักเพกทินที่ได้ต่อน้ำหนักเป็นกรัมของกระเจี๊ยบแห้งที่นำมาสกัด (ภาคผนวก ข.2)

3.2.5.3 การวิเคราะห์ค่าสี ดัดแปลงจากวิธีของ Liew et al. (2018) วิเคราะห์ค่าสีด้วยเครื่องวัดสี Chroma Meter CR-400 ซึ่งค่าที่อ่านได้จะเป็นไปตามระบบ  $L^* a^* b^*$  (ภาคผนวก ข.3)

3.2.5.4 การวิเคราะห์น้ำหนักสมมูล (Equivalent weight) ดัดแปลงวิธีของ Owen et al. (1952) (ภาคผนวก ข.4)

3.2.5.5 การวิเคราะห์ปริมาณเมทอกซิล (Methoxyl content: %MeO) ดัดแปลงวิธีของ Ranganna (1995) (ภาคผนวก ข.5)



**3.2.5.6 การวิเคราะห์ปริมาณกรดแอนไฮโดรยูโรนิกทั้งหมด (Total Anhydrouronic acid content: %AUA)** ปริมาณกรดแอนไฮโดรยูโรนิกทั้งหมดของเพกทินดัดแปลงจากวิธีของ Mohamed and Hasan (1995) (ภาคผนวก ข.6)

**3.2.5.7 การวิเคราะห์ระดับการเกิดเอสเทอร์ฟิเคชัน (Degree of Esterification: %DE)** ระดับการเอสเทอร์ฟิเคชันของเพกทินดัดแปลงจากวิธีของ Owens et al. (1952) (ภาคผนวก ข.7)

**3.2.5.8 การวิเคราะห์ประสิทธิภาพการเอนแคปซูลชัน (% Encapsulation efficiency)** โดยรายงานผลเป็นร้อยละเทียบกับปริมาณสารสกัดแอนโทไซยานินทั้งหมด (ภาคผนวก ข.8)

**3.2.6 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้นของกระเจี๊ยบ (AOAC, 2000) (ภาคผนวก ค.)**

**3.2.7 การวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของสารสกัดหลังเติมโคโคซาน (ภาคผนวก ง.)**

**3.2.8 การวางแผนการทดลอง และการวิเคราะห์ทางสถิติ**

วางแผนการทดลองแบบ 3x3 factorial in CRD โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติโดยใช้ analysis of variance (ANOVA) เปรียบเทียบ ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ด้วยโปรแกรม SPSS v.22 for Windows® (SPSS Inc., Chicago, IL)

## บทที่ 4

### ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

#### 4.1 การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานิน

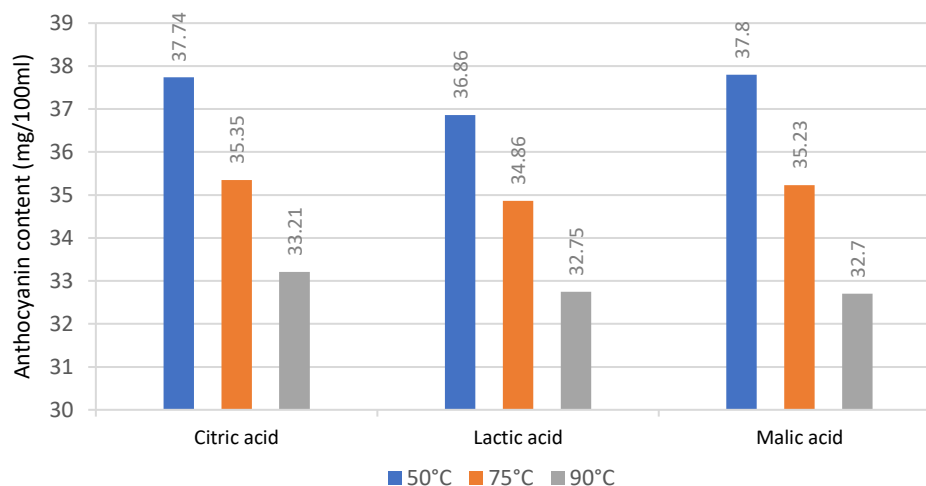
จากการทดลองศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดแอนโทไซยานินและเพกทินจากกระเจี๊ยบโดยนำกลีบกระเจี๊ยบแช่แข็ง 50 กรัม (ละลายที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง) ปั่นใน Waring blender และผสมกับตัวทำละลายเอทานอล 47.5% ปริมาตร 100 ml ในอัตราส่วน 1:2 ซึ่งปรับให้ได้ค่า pH 2.5 ด้วยกรดชนิดต่าง ๆ แล้วนำไปสกัดใน Water bath shaker ที่อุณหภูมิ 50, 75 และ 90 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที และนำสารสกัดที่ได้มาวัดค่า Anthocyanin content (mg/L) ด้วยวิธี pH-differential method ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดจากกระเจี๊ยบ ที่สภาวะการสกัดต่าง ๆ เป็นเวลา 60 นาที

Solvent	Temperature (°C)	Anthocyanin content	
		mg/100 ml	mg/100 g
Ethanol/ Citric acid	50	37.74 <sup>a</sup> ± 0.41	617.68 <sup>a</sup> ± 6.76
	75	35.35 <sup>b</sup> ± 0.21	578.56 <sup>b</sup> ± 3.36
	90	33.21 <sup>c</sup> ± 0.78	543.54 <sup>c</sup> ± 12.78
Ethanol/ Lactic acid	50	36.86 <sup>a</sup> ± 0.86	603.27 <sup>a</sup> ± 14.15
	75	34.86 <sup>b</sup> ± 0.24	570.54 <sup>b</sup> ± 3.89
	90	32.75 <sup>c</sup> ± 1.35	536.01 <sup>c</sup> ± 22.06
Ethanol/ Malic acid	50	37.80 <sup>a</sup> ± 0.59	618.66 <sup>a</sup> ± 9.67
	75	35.23 <sup>b</sup> ± 0.27	576.60 <sup>b</sup> ± 4.49
	90	32.70 <sup>c</sup> ± 0.85	535.19 <sup>c</sup> ± 13.93

หมายเหตุ: ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลองซ้ำ 3 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

a, b, c หมายถึง ตัวอักษรที่กำกับในแนวเดียวกัน เมื่อมีตัวอักษรที่เหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ )



ภาพที่ 11 แผนภูมิแสดงปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดจากกระเจี๊ยบที่สภาวะการสกัดต่างๆ เป็นเวลา 60 นาที

จากการทดลองพบว่าอุณหภูมิมีผลต่อปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดที่สกัดได้อย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ ) ในขณะที่ชนิดกรดไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p > 0.05$ ) โดยการสกัดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ด้วยตัวทำละลายที่ปรับ pH ด้วยกรดซิตริก กรดแลคติก และกรดมาลิก มีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดสูงสุด และมีแนวโน้มลดลงเมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการสกัดขึ้นเป็น 75 และ 90 องศาเซลเซียส ซึ่งให้ผลไปในทิศทางเดียวกันกับงานวิจัยของ Jing and Guiusti (2007) ที่พบว่าการสกัดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ได้ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดสูงสุด และสูงกว่าการสกัดที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เนื่องจากแอนโทไซยานินมีความไวต่อความร้อนและจะเริ่มเกิดการสลายตัวอย่างรวดเร็วเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 60 องศาเซลเซียส (Pragalyaashree et al., 2018) และสามารถเปลี่ยนสีเป็นสีที่จางลงได้ง่ายในขณะให้ความร้อน (Wrolstad et al., 2002) เช่นเดียวกับการรายงานของ Shaheer et al. (2014) ซึ่งระบุถึงการสลายตัวของแอนโทไซยานินภายใต้สภาวะการให้ความร้อน ซึ่งการสลายตัวจะถูกเร่งให้เกิดได้เร็วขึ้น หากแอนโทไซยานินสัมผัสกับอุณหภูมิสูงเป็นเวลานาน อีกทั้งเกิดการสลายตัวได้จากปฏิกิริยาออกซิเดชัน แรงยึดเหนี่ยวของพันธะโคเวเลนต์ หรือการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันเพิ่มขึ้นเนื่องจากกระบวนการให้ความร้อน

จากงานวิจัยของ Silva et al. (2007) กล่าวว่าปัจจัยที่มีผลต่อเสถียรภาพทางเคมีของแอนโทไซยานิน คือ การเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรดต่างและอุณหภูมิ โดยแอนโทไซยานินจะมีความเสถียรมากกว่าภายใต้สภาวะที่เป็นกรด เนื่องจากแอนโทไซยานินมีความไวต่อค่าความเป็นกรดต่างมาก และเกิดการเปลี่ยนรูปแบบของโครงสร้างกลับไปมาได้ในสารละลายที่มีสภาพเป็นกรดไปเป็นเบส เนื่องจากการรับและให้โปรตอน จากรูปของ flavylium cation, carbinol pseudobase, colorless chalcone และ quinonoidal base โดยในสภาวะสารละลายที่มีค่า pH ต่ำจะพบโครงสร้างของแอนโทไซยานินอยู่ในรูปของ flavylium cation เป็นส่วนมาก ซึ่งเป็นรูปแบบที่มีความเสถียรที่สุดเมื่อเทียบกับรูปแบบอื่น ๆ และอยู่ในช่วงที่ให้สีแดง ดังนั้นจึงมีการ

ปรับ pH ให้คงที่ด้วยกรดต่างๆ ในการสกัดแอนโทไซยานิน เพื่อเป็นการเพิ่มความเข้มข้นของประจุบวกให้แอนโทไซยานินมีความเสถียรมากขึ้น (Pragalyaashree et al., 2018) ดังนั้นอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดจึงส่งผลต่อปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดที่ได้ และชนิดกรดไม่มีผลต่อปริมาณแอนโทไซยานินที่สกัดได้ที่อุณหภูมิเดียวกัน

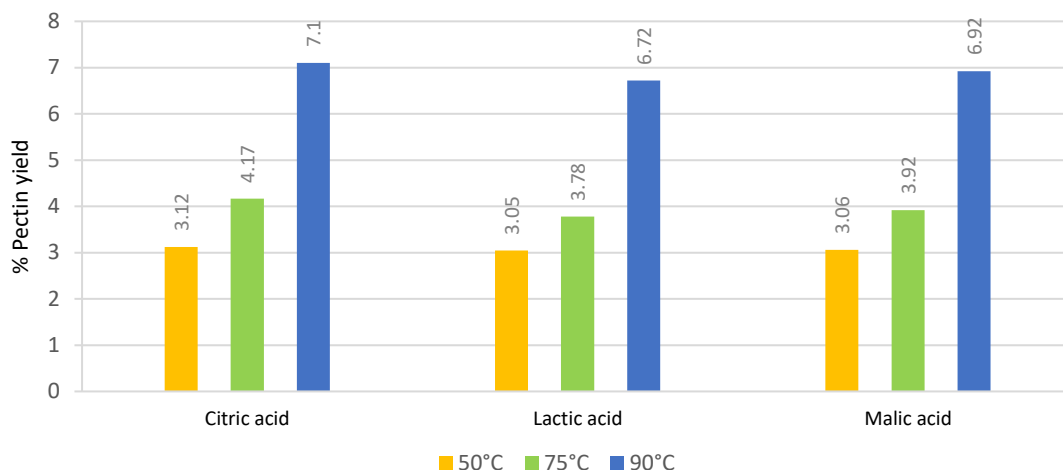
#### 4.2 ปริมาณร้อยละผลผลิตเพกทิน

นำสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบที่สกัดในสภาวะต่างๆ จากตอนที่ 4.1 มาตกตะกอนเพกทินด้วยเอทานอล อัตราส่วน 1:2 เป็นเวลา 15 ชั่วโมง แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงแยกตะกอน จากนั้นนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง และวัดค่าปริมาณร้อยละผลได้ของเพกทิน (%yield) และค่าความชื้น ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ปริมาณร้อยละผลผลิตเพกทินที่ได้จากการสกัดและปริมาณความชื้นที่ได้จากเพกทินทำแห้ง

Solvent	Temperature (°C)	Yield (%)	Moisture content (%)
Ethano/ Citric acid	50	3.12 <sup>e</sup> ± 0.04	7.02 <sup>ef</sup> ± 0.46
	75	4.17 <sup>c</sup> ± 0.03	8.18 <sup>cd</sup> ± 0.28
	90	7.10 <sup>a</sup> ± 0.11	6.75 <sup>f</sup> ± 0.65
Ethano/ Lactic acid	50	3.05 <sup>e</sup> ± 0.05	9.85 <sup>ab</sup> ± 0.24
	75	3.78 <sup>d</sup> ± 0.04	9.05 <sup>bc</sup> ± 0.26
	90	6.72 <sup>b</sup> ± 0.16	8.58 <sup>bcd</sup> ± 0.81
Ethano/ Malic acid	50	3.06 <sup>e</sup> ± 0.03	7.39 <sup>def</sup> ± 1.06
	75	3.92 <sup>d</sup> ± 0.03	7.54 <sup>def</sup> ± 0.98
	90	6.92 <sup>a</sup> ± 0.23	10.33 <sup>a</sup> ± 0.97

หมายเหตุ: ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลองซ้ำ 3 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน  
a, b, c, ... หมายถึง ตัวอักษรที่กำกับในแนวเดียวกัน เมื่อมีตัวอักษรที่เหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ )



ภาพที่ 12 แผนภูมิแสดงร้อยละผลผลิตเพกทินที่ได้จากสารสกัดกระเจียบ

จากการทดลองพบว่า อุณหภูมิและชนิดกรดมีผลต่อปริมาณร้อยละเพกทินที่สกัดได้จากกระเจียบแดง อย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ ) พบว่าได้ร้อยละผลผลิตเพกทินตั้งแต่ 3.05-7.10 % โดยได้ค่าสูงสุดที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ด้วยตัวทำละลายที่ปรับ pH ด้วยกรดซิตริกและกรดมาลิก และจากงานวิจัยของ Nazaruddin et al. (2013) ซึ่งทำการสกัดเพกทินจากกระเจียบแดงด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส ได้ร้อยละผลผลิตเพกทิน ตั้งแต่ 5.78-9.77% และเมื่อใช้อุณหภูมิในการสกัดที่เพิ่มมากขึ้น ปริมาณร้อยละเพกทินที่ได้จากการสกัดก็จะเพิ่มมากขึ้นไปด้วย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Seyed et al. (2016) พบว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการสกัดเพกทินจากเปลือกส้ม จากอุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็น 95 องศาเซลเซียส ส่งผลให้ได้ปริมาณร้อยละของเพกทินเพิ่มขึ้น เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของมวลเพกทิน และการละลายของพอลิแซคคาไรด์ในสารละลาย นอกจากนี้ระยะเวลาในการสกัดมีผลต่อปริมาณร้อยละของเพกทิน โดยสภาวะการสกัดที่เหมาะสมควรใช้เวลา 1 ชั่วโมง (Mollea et al. 2008; Wai et al. 2009)

จากงานวิจัยของ Jamsazzadeh et al. (2014) การสกัดเพกทินจากเปลือกมะม่วง พบว่ากรดซิตริก ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารคีเลต (Chelating agent) ที่ช่วยให้เกิดการละลายของเพกทินออกจากส่วนประกอบอื่นๆ ได้ดี มีผลให้ปริมาณร้อยละของเพกทินที่ได้เพิ่มขึ้น ซึ่งจากงานวิจัยของ Cristiane et al. (2019) พบว่า กรดมาลิกและกรดแลกติกสามารถเพิ่มการละลายของแร่ธาตุได้เช่นกันแต่น้อยกว่าการใช้กรดซิตริก ดังนั้น อุณหภูมิและชนิดกรดจึงมีผลต่อปริมาณร้อยละเพกทินที่สกัดได้

### 4.3 การวิเคราะห์ค่าสี

ตารางที่ 8 การวิเคราะห์ค่าสีของผงเพกทินเอนแคปซูลเอทโทไซยานินที่สกัดได้จากสภาวะต่าง ๆ

Solvent	Temperature (°C)	Color parameter		
		L*	a*	b*
Ethanol/ Citric acid	50	63.90 <sup>b</sup> ± 0.21	21.06 <sup>c</sup> ± 0.08	5.73 <sup>e</sup> ± 0.03
	75	64.44 <sup>ab</sup> ± 0.36	21.65 <sup>b</sup> ± 0.11	5.79 <sup>de</sup> ± 0.03
	90	63.95 <sup>b</sup> ± 0.19	14.91 <sup>h</sup> ± 0.10	9.27 <sup>b</sup> ± 0.10
Ethanol/ Lactic acid	50	64.36 <sup>ab</sup> ± 0.40	19.83 <sup>d</sup> ± 0.10	4.40 <sup>s</sup> ± 0.19
	75	63.82 <sup>b</sup> ± 0.68	22.47 <sup>a</sup> ± 0.21	6.16 <sup>d</sup> ± 0.42
	90	61.29 <sup>c</sup> ± 0.59	17.76 <sup>s</sup> ± 0.04	12.35 <sup>a</sup> ± 0.03
Ethanol/ Malic acid	50	65.06 <sup>a</sup> ± 0.13	18.68 <sup>f</sup> ± 0.16	1.58 <sup>h</sup> ± 0.05
	75	64.12 <sup>b</sup> ± 0.31	18.86 <sup>f</sup> ± 0.08	4.88 <sup>f</sup> ± 0.46
	90	59.53 <sup>d</sup> ± 0.47	19.48 <sup>e</sup> ± 0.06	7.90 <sup>c</sup> ± 0.18

หมายเหตุ: ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลองซ้ำ 3 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

a, b, c, ... หมายถึง ตัวอักษรที่กำกับในแนวเดียวกัน เมื่อมีตัวอักษรที่เหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ )

จากตารางที่ 8 ทำการวัดค่าสีของผงเพกทินเอนแคปซูลเอทโทไซยานินที่สกัดได้จากสภาวะต่าง ๆ หลังผ่านการทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็ง ด้วยระบบสีแบบ CIE โดยค่า L\* บ่งบอกถึงความสว่างของสี ค่า a\* บ่งบอกถึงค่าสีจากสีเขียว (-a\*) จนถึงสีแดง (a\*) และค่า b\* บ่งบอกถึงค่าสีจากสีน้ำเงิน (-b\*) จนถึงสีเหลือง (b\*) พบว่ามีค่าความสว่าง (L\*) อยู่ในช่วง 59.53 ถึง 65.06, สีแดง (a\*) อยู่ในช่วง 14.91 ถึง 22.47 และสีเหลือง (b\*) อยู่ในช่วง 1.58 ถึง 12.35 เนื่องจากสารสกัดที่ได้หลังผ่านการทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็งมี แอนโทไซยานิน ซึ่งประกอบด้วยอะตอมของออกซิเจนที่มีประจุบวกในโครงสร้างของ flavonoid เรียกว่า flavylum (2-phenylchromenylium) ion ซึ่งเป็นรงควัตถุที่ให้สีแดง (Kong et al., 2003; Duangmal et al., 2008) และเกิดการเอนแคปซูลด้วยเพกทิน จึงทำให้มีค่า a\* และ b\* เป็นบวก โดยจากการทดลองพบว่าผลของค่าสีในงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าไม่สามารถที่จะสรุปถึงแนวโน้มในการเปลี่ยนแปลงของค่าความสว่าง ค่าสีแดง และสีเหลืองของผงเพกทินเอนแคปซูลเอทโทไซยานินที่สกัดได้จากสภาวะต่าง ๆ

## Citric acid



50 °C

75 °C

90 °C

## Lactic acid



50 °C

75 °C

90 °C

## Malic acid



50 °C

75 °C

90 °C

ภาพที่ 13 สีของเพกทินเอนแคปซูลทอไซยานินในสภาวะการสกัดต่าง ๆ ภายหลังจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

#### 4.4 การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและเคมีของเพกทิน

ตารางที่ 9 แสดงสมบัติทางเคมีของเพกทิน

Solvent	Temperature (°C)	Equivalent weight	% MeO	% AUA	% DE
Ethanol/ Citric acid	50	445.56 <sup>f</sup> ± 5.99	3.02 <sup>cd</sup> ± 0.05	56.63 <sup>cd</sup> ± 0.81	30.24 <sup>d</sup> ± 0.06
	75	477.12 <sup>bc</sup> ± 10.10	3.16 <sup>c</sup> ± 0.12	54.81 <sup>de</sup> ± 1.45	32.67 <sup>b</sup> ± 0.36
	90	471.26 <sup>bc</sup> ± 5.96	3.68 <sup>a</sup> ± 0.07	58.23 <sup>bc</sup> ± 0.67	35.86 <sup>a</sup> ± 0.52
Ethanol/ Lactic acid	50	485.32 <sup>ab</sup> ± 3.24	2.97 <sup>d</sup> ± 0.07	53.12 <sup>ef</sup> ± 0.49	31.72 <sup>c</sup> ± 0.48
	75	496.08 <sup>a</sup> ± 6.37	3.14 <sup>c</sup> ± 0.03	53.28 <sup>ef</sup> ± 0.53	33.40 <sup>b</sup> ± 0.34
	90	463.71 <sup>cd</sup> ± 15.51	3.80 <sup>a</sup> ± 0.11	59.54 <sup>ab</sup> ± 1.77	36.21 <sup>a</sup> ± 0.51
Ethanol/ Malic acid	50	484.00 <sup>ab</sup> ± 11.80	2.81 <sup>e</sup> ± 0.15	52.32 <sup>f</sup> ± 1.38	30.47 <sup>d</sup> ± 1.06
	75	464.76 <sup>cd</sup> ± 9.70	3.32 <sup>b</sup> ± 0.03	56.74 <sup>cd</sup> ± 0.88	33.24 <sup>b</sup> ± 0.46
	90	451.80 <sup>de</sup> ± 7.56	3.78 <sup>a</sup> ± 0.07	60.45 <sup>a</sup> ± 0.85	35.54 <sup>a</sup> ± 0.52

หมายเหตุ: น้ำหนักสมมูล (Equivalent weight), ปริมาณเมทอกซิล (Methoxyl content: %MeO), ปริมาณกรดแอนไฮโดรยูโรนิกทั้งหมด (Total Anhydrouronic acid content: %AUA), ระดับการเกิดเอสเทอร์ฟิเคชัน (Degree of Esterification: %DE)

ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลองซ้ำ 3 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

a, b, c, ... หมายถึง ตัวอักษรที่กำกับในแนวเดียวกัน เมื่อมีตัวอักษรที่เหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ )

จากการวิเคราะห์น้ำหนักสมมูล (Equivalent weight) ของเพกทินที่สกัดจากกระเจียบ โดยใช้สภาวะการสกัดที่แตกต่างกัน พบว่ามีน้ำหนักสมมูลอยู่ระหว่าง  $445.56 \pm 5.99$  ถึง  $496.08 \pm 6.37\%$  ซึ่งเพกทินที่มีน้ำหนักสมมูลมากจะมีโครงสร้างของเพกทินที่ใหญ่กว่าเพกทินที่มีน้ำหนักสมมูลน้อย นอกจากนี้ น้ำหนักสมมูลยังบ่งบอกถึงค่าน้ำหนักโมเลกุลสูงและความสามารถในการเกิดเจลได้ดี (ธนาวรรณ และคณะ 2556)

จากการวิเคราะห์ปริมาณกรดแอนไฮโดรยูโรนิกทั้งหมด (%AUA) ของเพกทินที่ได้จากกระเจียบ โดยใช้การปรับสภาวะความเป็นกรดต่างในการสกัดด้วยกรดซิตริก แล็กติกและมาร์ลิก พบว่ามี %AUA อยู่ระหว่าง  $53.12 \pm 0.49$  ถึง  $60.45 \pm 0.85\%$  ซึ่ง %AUA บ่งชี้ถึงควมบริสุทธิ์ของเพกทินที่ได้จากการสกัดซึ่งไม่น้อยกว่า 65% (Food Chemical Codex, 1996) โดยหากจะนำไปใช้เป็นสารเจือปนในอาหารหรือเป็นเพกทินทางการค้าควรมี %AUA อย่างน้อย 65% ตามข้อกำหนดของ FAO (Phaviphu et al., 2018) ทั้งนี้ %AUA ที่



น้อยกว่า 65% อาจบ่งชี้ได้ถึงความไม่บริสุทธิ์เนื่องจากพบว่ามี โปรตีน สตาร์ช และน้ำตาลปะปนมาพร้อมกับการตกตะกอนเพกตินจึงทำให้เพกตินมีค่าความบริสุทธิ์ลดลง (Norazalina, et al., 2012)

จากการวิเคราะห์ปริมาณเมทอกซิล (%MeO) ของเพกตินที่สกัดจากกระเจี๊ยบ พบว่ามีปริมาณเมทอกซิลอยู่ระหว่าง  $2.81 \pm 0.15$  ถึง  $3.78 \pm 0.07\%$  ซึ่งจัดอยู่ในเพกตินชนิดที่มีปริมาณหมู่เมทอกซิลต่ำ (low methoxy pectin: LMP) เนื่องจากมีหมู่เมทอกซิลน้อยกว่า 50% ซึ่งจะเกิดเจลในระบบที่มีไอออนประจุสองบวก (Divalent cation) และไม่ต้องการน้ำตาลในการเกิดเจล จึงสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการผลิตแยมและเยลลี่ที่ให้แคลลอรี่ต่ำได้

จากผลการทดลองพบว่าระดับการเกิดเอสเทอร์ฟิเคชัน (DE) ของเพกตินที่สกัดได้จากกระเจี๊ยบด้วยกรดอินทรีย์ 3 ชนิด (กรดซิตริก กรดแลคติก และกรดมาลิก) ที่อุณหภูมิต่างๆ มีค่าอยู่ระหว่าง  $30.24 \pm 0.06$  ถึง  $36.21 \pm 0.51\%$  ซึ่งมีค่าต่ำกว่า 50% ดังนั้นเพกตินที่สกัดได้จึงจัดเป็นประเภท low methoxyl pectin (LMP) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Eun-Hi et al. (2019) ซึ่งกล่าวว่าการสกัดเพกตินจากเปลือกแอปเปิ้ล ที่สกัดโดยใช้กรดมาลิกและกรดซิตริกมีค่า DE ใกล้เคียงกันและมีค่าสูงกว่าเพกตินที่สกัดจากกรดทาร์ทาลิก แต่อย่างไรก็ตามเพกตินทั้งหมดที่ได้จากการสกัดด้วยกรดอินทรีย์ทั้ง 3 ชนิด เป็นเพกตินชนิดเดียวกัน

จากงานวิจัยของ Shaha et al. (2013) กล่าวว่า DE มีช่วงที่กว้าง และขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ เนื้อเยื่อ และระยะของความสุขโดยระดับของการเอสเทอร์ฟิเคชันจะลดลงตามการเพิ่มขึ้นของความสุข และจากงานวิจัยของ Chan และ Choo (2013) ผลของอุณหภูมิต่อระดับของเอสเทอร์ฟิเคชัน (DE) ของเพกติน พบว่าการเพิ่มอุณหภูมิในการสกัดเพกตินจากเปลือกโกโก้ จาก 50 ถึง 95 องศาเซลเซียส โดยใช้กรดซิตริกที่ pH 2.5 ทำให้ได้เพกตินที่มี DE สูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Wong et al. (2010) ที่พบว่าการเพิ่มอุณหภูมิและลดเวลาในการให้ความร้อนในการสกัดเพกตินจากเปลือกทุเรียนมีผลทำให้ค่า DE เพิ่มขึ้นเนื่องจากสภาวะอุณหภูมิ และ pH ที่รุนแรงสามารถเพิ่มการสลายตัวของ polygalacturonic chain ได้ (Mort et al., 1993)

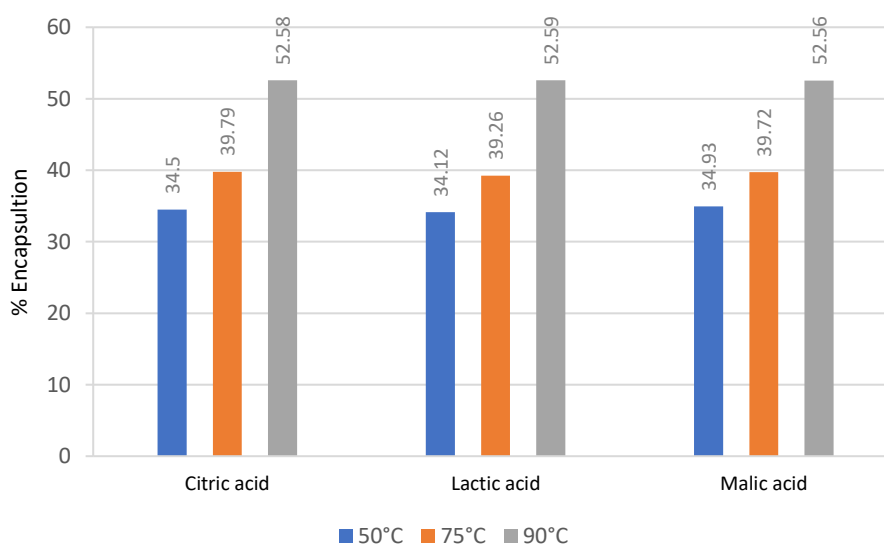
#### 4.5 การวิเคราะห์ประสิทธิภาพการเอนแคปซูลชัน

ตารางที่ 10 แสดงประสิทธิภาพในการเอนแคปซูลเลทแอนโทไซยานินที่สภาวะการสกัดต่างๆ เป็นเวลา 60 นาที

Solvent	Temperature (°C)	Encapsulation (%)	Encapsulation (mg/g dry)
Ethanol/ Citric acid	50	34.50 <sup>c</sup> ± 0.43	2.13 <sup>cd</sup> ± 0.05
	75	39.79 <sup>b</sup> ± 0.66	2.30 <sup>b</sup> ± 0.04
	90	52.58 <sup>a</sup> ± 0.50	2.86 <sup>a</sup> ± 0.07
Ethanol/ Lactic acid	50	34.12 <sup>c</sup> ± 0.59	2.06 <sup>d</sup> ± 0.08
	75	39.26 <sup>b</sup> ± 0.50	2.24 <sup>bc</sup> ± 0.07
	90	52.29 <sup>a</sup> ± 0.78	2.81 <sup>a</sup> ± 0.15
Ethanol/ Malic acid	50	34.93 <sup>c</sup> ± 0.66	2.16 <sup>bc</sup> ± 0.10
	75	39.72 <sup>b</sup> ± 0.79	2.29 <sup>b</sup> ± 0.06
	90	52.56 <sup>a</sup> ± 0.68	2.81 <sup>a</sup> ± 0.1

หมายเหตุ: ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลองซ้ำ 3 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

a, b, c, ... หมายถึง ตัวอักษรที่กำกับในแนวเดียวกัน เมื่อมีตัวอักษรที่เหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ )



ภาพที่ 14 แผนภูมิแสดงประสิทธิภาพในการเอนแคปซูลเลทสารสกัดกระเจี๊ยบที่สภาวะการสกัดต่าง ๆ

จากผลการทดลองพบว่า อุณหภูมิมีผลต่อประสิทธิภาพการเอนแคปซูลของแอนโทไซยานินอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ ) โดยพบว่า ประสิทธิภาพในการเอนแคปซูลของสารสกัดกระเจี๊ยบที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ให้ประสิทธิภาพสูงสุด ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 52.48% และมีค่าต่ำลงเมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 75 และ 50 องศาเซลเซียส ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 39.59% และ 34.52% ตามลำดับ โดยมีค่าเพิ่มขึ้นตามร้อยละผลผลิตของเพกทินที่สกัดได้

จากงานวิจัยของ Zaidel et al. (2014) ทำการศึกษาในมาการีนที่มีแอนโทไซยานินซึ่งผ่านการเอนแคปซูล และไม่ผ่านการเอนแคปซูลที่สกัดจากกระเจี๊ยบแดง พบว่ามาการีนที่มีแอนโทไซยานินซึ่งผ่านการเอนแคปซูลแสดงให้เห็นถึงความเสถียรที่ดีขึ้นเมื่อเทียบกับแอนโทไซยานินที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูล เนื่องจากเกิด ionic interaction ที่เกิดขึ้นระหว่าง protonated anthocyanins (flavylium cation) และ free carboxylated pectin โดยเกิด electrostatic interaction ระหว่างเพกทินและแอนโทไซยานิน และกล่าวไว้ว่ามีพันธะระหว่างเพกทินและแอนโทไซยานินมากขึ้นจะสามารถเพิ่มความเสถียรของแอนโทไซยานินได้

#### 4.6 การวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของสารสกัดหลังเติมโคโตซาน

##### 4.6.1 การวิเคราะห์ประสิทธิภาพการเอนแคปซูลชัน

เมื่อได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดแอนโทไซยานินและเพกทินจากกระเจี๊ยบด้วยกรดอินทรีย์ 3 ชนิดและสกัดที่อุณหภูมิแตกต่างกัน 3 อุณหภูมิ เป็นเวลา 60 นาทีจากตอนที่ 4.1 - 4.5 จากนั้นนำสภาวะที่เหมาะสมไปศึกษาประสิทธิภาพในการเอนแคปซูลสารสกัดแอนโทไซยานินจากกระเจี๊ยบโดยเปรียบเทียบผลของการเติมโคโตซานที่ความเข้มข้น 0.025% และ 0.05%

#### ตารางที่ 11 ผลของการเติมโคโตซานต่อประสิทธิภาพในการเอนแคปซูลแอนโทไซยานิน

Solvent	Temperature (°C)	Encapsulation (%)	Encapsulation (mg/g dry)
Ethanol/ Citric acid + 0% chitosan	90	91 - 95	8.6 - 8.9
Ethanol/ Citric acid + 0.025% chitosan	90	70	9.1 - 9.2
Ethanol/ Citric acid + 0.05% chitosan	90	68 - 70	9.2 - 9.3

จากตารางที่ 11 การเติมโคโตซานที่มีความเข้มข้น 0.025 และ 0.05% ลงในสารสกัดแอนโทไซยานิน จากกระเจี๊ยบ พบว่าไม่ได้มีการเพิ่มประสิทธิภาพในการเอนแคปซูลेशุเลทร่วมกับเพกทิน ซึ่งให้ประสิทธิภาพการ เอนแคปซูลेशุเลทลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดแอนโทไซยานินและเพกทินที่ไม่มีการเติมโคโตซาน อาจเป็น ผลมาจากแอนโทไซยานินที่มีประจุบวกในรูปของ flavylum เกิดอันตรกิริยาทางไฟฟ้าสถิต (Electrostatic interaction) ที่รุนแรงกับประจุลบของหมู่คาร์บอกซิลอิสระของเพกทิน (-COO<sup>-</sup>) ทำให้อัตราการปลดปล่อย แอนโทไซยานินออกมานั้นน้อยกว่าในสารสกัดแอนโทไซยานินและเพกทินที่มีการเติมสารละลายโคโตซาน ความเข้มข้น 0.025 และ 0.05% เนื่องจากโคโตซานมีคุณสมบัติเป็นสารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่มีประจุบวกบน หมู่อะมิโนอิสระ (-NH<sup>3+</sup>) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ซึ่งความเป็นประจุบวกนี้ทำให้โคโตซานสามารถจับกับสารอื่น ที่มีประจุลบได้ (บวรพล, 2545) และเป็นเพราะโคโตซานที่มีประจุบวกไปลดประจุลบสุทธิของเพกทินลงทำให้ electrostatic interaction ระหว่างแอนโทไซยานินและเพกทินลดลงจึงส่งผลให้ความเสถียรของแอนโทไซ- ยานินและประสิทธิภาพในการเอนแคปซูลेशุเลทสารสกัดแอนโทไซยานินลดลง แอนโทไซยานินจึงถูกปลดปล่อย ออกมาในสารละลายมากขึ้น นอกจากนี้ van der Waals, electrostatic, hydrophobic, hydrogen และ coordination bonding จะทำให้เกิดความแตกต่างของหมู่ฟังก์ชันในการเกิด polymer-polymer complex ระหว่างโมเลกุลของทั้งเพกทินและโคโตซาน ส่งผลให้เกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างโมเลกุลที่แข็งแรงมาก (Rashidova et al., 2004, Ghaffari et al., 2007)

จากงานวิจัยของ Kanokpanont et al. (2018) ศึกษาการเอนแคปซูลेशุเลทของสารสกัดแอนโทไซยานิน จากมัลเบอร์รี่ด้วย alginate beads เปรียบเทียบระหว่างเม็ดปิตที่สร้างขึ้นโดยหดยดสารละลายโซเดียมอัลจิเนต ลงในสารละลาย CaCl<sub>2</sub> ที่มีโคโตซานความเข้มข้น 0.10-0.20% พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของโคโตซานมีผล ทำให้ปริมาณแอนโทไซยานินที่ถูกเอนแคปซูลेशุเลทลดลง เนื่องจากโคโตซานเข้าไปอยู่ภายในเม็ดปิตและพัวพันกับ โมเลกุลของอัลจิเนต และจากการบ่ม calcium alginate beads ในสารละลายโคโตซานเข้มข้น 0.05%- 0.20% พบว่าปริมาณแอนโทไซยานินที่ถูกเอนแคปซูลेशุเลทสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (2.5-2.7mg/g beads) ซึ่งอาจเกิดจากการเคลือบของโคโตซานรอบๆอัลจิเนตที่มีประจุลบภายในเม็ดปิตไฮโดรเจล (Gåserød et al., 1998)

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดแอนโทไซยานินและเพกตินจากดอกกระเจี๊ยบ พบว่าการสกัดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ด้วยตัวทำละลายที่ปรับ pH ด้วยกรดซิตริก กรดแลคติก และกรดมาลิก มีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดสูงสุด และการสกัดที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ด้วยตัวทำละลายที่ปรับ pH ด้วยกรดซิตริกและมาลิก ได้ร้อยละผลผลิตเพกตินสูงสุด

จากการวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและเคมีของเพกติน พบว่าเพกตินที่สกัดได้จากดอกกระเจี๊ยบในทุกสภาวะ (อุณหภูมิ, ชนิดกรด) จัดเป็นเพกตินชนิดที่มีปริมาณหมู่เมทอกซีต่ำ เนื่องจากมีค่า %DE < 50 และที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส การสกัดด้วยตัวทำละลายที่ปรับ pH ด้วยกรดอินทรีย์ทั้ง 3 ชนิด ได้ปริมาณร้อยละประสิทธิภาพในการเอนแคปซูลเลทสารสกัดแอนโทไซยานินสูงสุด ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเพกตินและแอนโทไซยานินจากกระเจี๊ยบคือที่อุณหภูมิ 90

นอกจากนี้เมื่อนำสภาวะที่เหมาะสมในการสกัด (อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ซึ่งปรับค่าความเป็นกรดต่างด้วยกรดซิตริก) ไปศึกษาประสิทธิภาพในการเอนแคปซูลเลทสารสกัดแอนโทไซยานินและเพกตินจากกระเจี๊ยบโดยการเติมสารละลายโคโคซานที่ความเข้มข้น 0.025% และ 0.05% พบว่า ได้ประสิทธิภาพการเอนแคปซูลเลทลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดแอนโทไซยานินและเพกตินที่ไม่มีการเติมสารละลายโคโคซาน ดังนั้นการเติมโคโคซานความเข้มข้น 0.025% และ 0.05% ไม่ได้ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการเอนแคปซูลเลทแอนโทไซยานินร่วมกับเพกติน

#### 5.2 ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ยังไม่ได้ศึกษาเกี่ยวกับการนำสารสกัดไปประยุกต์ใช้เป็นสารแต่งสีจากธรรมชาติ และสารเจือปนในผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น gelling agent, thickener, emulsifier, stabilizer และ texturizer รวมถึงทดลองเปรียบเทียบระหว่างเพกตินที่สกัดได้กับเพกตินทางการค้า (Commercial pectin) และอาจศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับค่า water activity ของเพกติน และอายุการเก็บรักษา (Anthocyanin degradation) และศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับผลของการนำไปโอพอลิเมอร์ชนิดอื่นๆ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ มาเติมลงในสารสกัดที่ได้จากกระเจี๊ยบ สำหรับการประยุกต์ใช้เป็นสารแต่งสีธรรมชาติในผลิตภัณฑ์อาหารและเครื่องดื่มต่อไป

## เอกสารอ้างอิง

- กรวิทย์ สักแกแก้ว. (2563). คุณประโยชน์ของเพกทินจากอาหารเหลือทิ้ง. วารสารวิทยาลัยดุสิตธานี ปีที่ 14 ฉบับที่ 1, หน้า 487-499. เดือนมกราคม – เมษายน 2563.
- ชื่นจิต สีสญา และ อุดมลักษณ์ เวียงงาม. (2557). ยืดอายุอาหารได้ด้วยไคโตซาน. กรมวิทยาศาสตร์บริหาร. 62(196), 33-35.
- ป่วย อุ๋นใจ. (2544). ไคติน-ไคโตซาน สารมหัศจรรย์จากธรรมชาติ, 16 (162), 43-47.
- สุธิตา คงทอง. (2552). ไคติน-ไคโตซาน. วารสารวิชาการอุตสาหกรรมศึกษา. 3(1), 1-7.
- องอาจ เต็ดดวง. (2553). การเปรียบเทียบเพกตินสกัดจากฝรั่งสามชนิดกับเพกตินมาตรฐาน. สารนิพนธ์ กศ.ม.(เคมี). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.
- Arts, M. J. T. J., Haenen, G. R. M.M., Wilms, L. C., Beetstra, S. A. J. N., Heijnen, C. G.M., Voss, H. P., et al. (2002). Interactions between flavonoids and proteins: Effect on the total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(5), 1184–1187.
- Agcam, E., Akyildiz, A., & Balasubramaniam, V. M. (2017). Optimization of anthocyanins extraction from black carrot pomace with thermosonication. *Food Chem.* 237, 461-470.
- Alihosseini, F., & Sun, G. (2011). Antibacterial colorants for textiles. *Functional Textiles for Improved Performance, Protection and Health*. University of California, Davis, USA
- AOAC (2000) Official Methods of Analysis. 17th Edition, The Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, USA.
- Arellanes, A., Jaraba, M., Mármol, Z., Páez, G., Aiello-Mazzarri, C., & Rincón M. (2011). Pectin yield and characterization from “Manzano” banana peels (*Musa AAB*). *Faculty of Argonomy Journal University of Zulia*, 28, 523-539.
- Arroyo-Maya, I. J., & McClements, D. J. (2015). Biopolymer nanoparticles as potential delivery systems for anthocyanins: Fabrication and properties. *Food Research International*, 69, 1-8.
- Azad, A. K. M. (2014). Isolation and Characterization of Pectin Extracted from Lemon Pomace during Ripening. *Journal of Food and Nutrition Sciences*, 2(2).
- Azza A. Abou-Arab, Ferial, M., Abu-Salem, & Esmat, A. (2011). Physico-chemical properties of natural pigments (anthocyanin) extracted from Roselle calyces (*Hibiscus subdariffa*). *Journal of American Science*, 7(7), 446-448.
- Banerjee, S. & Bhattacharya, S. (2012). Food Gels: Gelling Process and New Applications, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(4), 334-346.

- Bekturov, E. A., Bimendina, L. A., & Mamitbekov, G. K. (2002). Complexes of water-soluble polymers and hydrogels. *Almati Science*, Almati, 220.
- Bernard F. Gibbs, Selim Kermasha, Inteaz Alli, Catherine N. Mulligan (1999) Encapsulation in the food industry: a review, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 50(3), 213-224.
- Bleve, M., Ciurlia, L., Erroi, E., Lionetto, G., Longo, L., Rescio, L., Schettino, T., & Vasapollo, G. (2008). An innovative method for the purification of anthocyanins from grape skin extracts by using liquid and sub-critical carbon dioxide. *Separation and Purification Technology*. 64, 192–197.
- Brine, C. J., Sandford, P. A., & Zikakis, J. P. (1991). *Advances in Chitin and Chitosan*. London: Elsevier Applied Science, 1–491.
- Buchweitz, M., Speth, M., Kammerer, D. R., & Carle, R. (2013). Stabilisation of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) anthocyanins by different pectins *Food Chemistry*, 141 (3), 2998-3006.
- Bueno, J. M., Sáez-Plaza, P., Ramos-Escudero, F., Jiménez, A. M., Fett, R., & Asuero, A.G. (2012). Analysis and antioxidant capacity of anthocyanin pigments. Part II: chemical structure, color, and intake of anthocyanins. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 42(2), 126-151.
- Canteri-Schemin M. H., Ramos-Fertonani, C. R., Waszczynskyj, N., Wosiacki, G. (2005). Extraction of pectin from apple pomace. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48(2), 259-266.
- Cai, T., Xiao, P., Yu, N., Zhou, Y., Mao, J., Peng, H., Deng, S. A novel pectin from *Akebia trifoliata* var. *australis* fruit peel and its use as a wall-material to coat curcumin-loaded zein nanoparticle, *International Journal of Biological Macromolecules*, Volume 152, 1 June 2020.
- Celli, G. B., & Brooks, M. S. L. (2017). Impact of extraction and processing conditions on betalains and comparison of properties with anthocyanins a current review. *Food Research International*, 100, 501-509.
- Cisse, M., Dornier, M., Sakho, M., Ndiaye, A., Reynes, M., & Sock, O. (2009). Le bissap (*Hibiscus sabdariffa* L.): Composition et principales utilisations. *Fruits*, 64, 179-193.
- Davidson, P. M., Sofos, J.N., & Brannen, J.L. (Eds.), *Antimicrobials in Foods* (third ed.), CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida (2005), 91-142.

- Deng, J., Chen, S., Yin, X., Wang, K., Liu, Y., Li, S., & Yang, P. (2013). Systematic qualitative and quantitative assessment of anthocyanins, flavones and flavonols in the petals of 108 lotus (*Nelumbo nucifera*) cultivars. *Food Chemistry*, 139(1-4), 307-312.
- Dranca, F., & Oroian, M. (2018). Extraction, purification and characterization of pectin from alternative sources with potential technological applications. *Food Research International*, 113, 327-350.
- Duangmal, K., Saicheua, B., & Sueeprasan, S. (2008). Colour evaluation of freeze-dried roselle extract as a natural food colorant in a model system of a drink. *LWT - Food Science and Technology*, 41(8), 1437-1445.
- Du, C. T., & Francis, F. J. (1973). Anthocyanins of roselle (*Hibiscus sabdariffa*). *Journal of Food Science*, 38, 810-812.
- Encapsulation for Potential Use in Food Systems: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56.
- Ersus, S., & Yurdagel, U. (2007). Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* L.) by spray drier. *Journal of Food Engineering*, 80(3), 805-812.
- Esparza-Merino, R. M., Macias-Rodriguez, M. E., Cabrera-Diaz, E., Valencia-Botin, A. J., & Estrada-Giron, Y. (2019). Utilization of by-products of *Hibiscus sabdariffa* L. as alternative sources for the extraction of high-quality pectin. *Food Science Biotechnology*, 28(4), 1003-1011.
- Fernandes, A., Bras, N. F., Mateus, N., & de Freitas, V. (2014). Understanding the molecular mechanism of anthocyanin binding to pectin. *Langmuir*, 30 (28), 8516-8527.
- Gåserød O., Smidsrød, O., & Skjåk-Braek G. (1998). Microcapsules of alginate-chitosan-I. A quantitative study of the interaction between alginate and chitosan. *Biomaterials*, 19, 1815-1825.
- Gazala, K., Masoodi, F. A., Masarat, H. D., Rayees, B. and Shoib, M.W. (2017). Extraction and characterisation of pectin from two apple juice concentrate processing plants. *International Food Research Journal* 24(2): 594-599.
- Ghaffari, A., Navaee, K., Oskoui, M., Bayati, K., & Rafiee-Tehrani, M. (2007). Preparation and characterization of free mixed-film of pectin/chitosan/Eudragit® RS intended for sigmoidal drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 67, 175-186.



- Gibbs B. F., Kermasha S., Alli I., & Mulligan C. N. (1999). Encapsulation in the food industry: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 50, 213-224.
- Giusti M. M., & Wrolstad R. E. (2001). Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. In: Wrolstad, R. E., Acree, T. E., An, H., Decker, E. A., Penner, M. H., Reid, D. S., Schwartz, S. J., Shoemaker, C. F., Sporns, P. (eds) *Current protocols in food analytical chemistry*, 1st edn. Wiley, New York, F1.2.1–1.2.13.
- Gurtler, J. B., & Mai, T. L. (2014). PRESERVATIVES | Traditional Preservatives – Organic Acids. In *Encyclopedia of Food Microbiology* (pp. 119-130).
- Hilz, H., Williams, P., Doco, T., Schols, H. A., & Voragen, A. (2006). The pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II is present as a dimer in pectic populations of bilberries and black currants in muro and in juice. *Carbohydrate Polymer*, 65 (4), 521–528.
- Hosseini, S. S., Khodaiyan, F., & Yarmand, M. S. (2016). Aqueous extraction of pectin from sour orange peel and its preliminary physicochemical properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 82, 920-926.
- Kanokpanont, S., Yamdech, R., & Aramwit, P. (2018). Stability enhancement of mulberry-extracted anthocyanin using alginate/chitosan microencapsulation for food supplement application. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology, An International Journal* Volume 46(4).
- Khamsucharit, P., Laohaphatanalert, K., Gavinlertvatana, P., Sriroth, K., & Sangseethong, K. (2018). Characterization of pectin extracted from banana peels of different varieties. *Food Science Biotechnology*, 27(3), 623-629.
- Khoo, H. E., Azlan, A., Tang, S. T., & Lim, S. M. (2017). Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food & Nutrition Research*, 61(1), 136-1779.
- Koh, J., Xu, Z., & Wicker, L. (2020). Blueberry pectin and increased anthocyanins stability under in vitro digestion. *Food Chemistry*, 302, 125-343.
- Kong, J. M., Chia, L. S., Goh, N. K., Chia, T. F., & Brouillard, R. (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* 64, 923–933.
- Kulawik, P., Jamróz, E., & Özogul, F. (2020). Chitosan role for shelf-life extension of seafood. *Environmental Chemistry Letters*. 18(1), 61-74.
- Soltoft-Jensen, J. & Hansen, F. (2005). in *Emerging Technologies for Food Processing*.

- Larsen, L. R., Buerschaper, J., Schieber, A., & Weber, F. (2019). Interactions of Anthocyanins with Pectin and Pectin Fragments in Model Solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(33), 9344-9353.
- Leroux, J., Langendorff, V., Schick, G., Vaishnav, V., & Mazoyer, J. (2003). Emulsion stabilizing properties of pectin. *Original Research Article Food Hydrocolloids*, 17(4), 455-462.
- Lide, D. R. (Ed.), *CRC Handbook of Chemistry and Physics* (eighty fifth ed.), CRC Press, Boca Raton, FL (2005)
- Liu, P., Zhai, M., Li, J., Peng, J. & Wu, J. (2003). Radiation preparation and swelling behavior of sodium carboxymethyl cellulose hydrogels. *Radiation Physics and Chemistry* 63, 525–528.
- Luczkiewicz, M., & Cisowski, W. (1998). The RP-HPLC Analysis of Anthocyanins. Department of Pharmacognosy, Medical University of Gdańsk, 48, 360-364.
- Maciel, V. B., Yoshida, C. M., & Franco, T. T. (2015). Chitosan/pectin polyelectrolyte complex as a pH indicator. *Carbohydrate Polymer*, 132, 537-545.
- Mane, S., Bremner, D. H., Tziboula-Clarke, A., & Lemos, M. A. (2015). Effect of ultrasound on the extraction of total anthocyanins from Purple Majesty potato. *Ultrason. Sonochem*, 27, 509–514.
- Mansour, M., Salah, M., & Xu, X. (2020). Effect of microencapsulation using soy protein isolate and gum arabic as wall material on red raspberry anthocyanin stability, characterization, and simulated gastrointestinal conditions. *Ultrasonics Sonochemistry*, 63, 104-927.
- Matsufuji, H., Kido, H., Misawa, H., Yaguchi, J., Otsuki, T., Chino, M., Takeda, M., & Yamagata, K. (2007). Stability to light, and Hydrogen Peroxide at Different pH Values and DPPH Radical Scavenging Activity of Acylated Anthocyanins from Red Radish Extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 3692-3701.
- Mi, F. L., Tan, Y. C., Liang, H.F., & Sung, H. W. (2002). In vivo biocompatibility and degradability of a novel injectable-chitosan-based implant. *Biomaterials*, 23 (1), 181-191.
- Mohamed S. & Hasan Z. (1995). Extraction and characterization of pectin from various tropical agrowastes. *ASEAN Food Journal*, 2: 43-50.
- Mohnen, D. (2008). Pectin structure and biosynthesis. *Curr Opin Plant Biol*, 11(3), 266-277.

- Muralikrishna, G. & Tharanathan, R. N. (1994). Characterization of pectic polysaccharides from pulse husks. *Food Chemistry*, 50(1), 87-89.
- Nanasombat S., Khanha K., Phan-im J., Jitaied J., Wannasomboon S., Patradisakorn S., Wongsil A. (2012). Antimicrobial and antioxidant activities of Thai local fruit extracts: application of a selected fruit extract, *Phyllanthus emblic* Linn. as a natural preservative in raw ground pork during refrigerated storage. *The Online Journal of Science Technical*, 2.
- Norazelina, S. M. I., Nazaruddin, R., Norziah, M. H. & Zainudin, M. (2012). Extraction and Characterization of Pectin from Dragon Fruit (*Hylocereus polyrhizus*) using Various Extraction Conditions. *Sains Malaysiana*, 41(1), 41–45.
- Onishi, H., & Machida, Y. (1999). Biodegradation and distribution of water-soluble chitosan in mice. *Biomaterials*, 20 (2), 175-182.
- Ongkowijoyo, P., Luna-Vital, D. A., & de Mejia, E. G. (2018). Extraction techniques and analysis of anthocyanins from food sources by mass spectrometry: an update. *Food Chem.* 250, 113-126.
- Owens, H. S., McCready, R. M., Shepherd, A. D., Schultz, S. H., pippen, E. I., Swenso, H. A., Miers, J. C., Erlandsen, R. F. & Maclay, W. D. (1952). Methods used at western regional research Laboratory for extraction and Analysis of pectic materials. Western regional Research Laboratory, Albania California AIC-340.
- Pagan, J., Ibraz, M., Loria, A., Pagan, A. and Barbosa–Canovas, G.V. (2001). Extraction and characterization of pectin from stored peach pomace. *Food Research International* 34: 605–612.
- Paul, W., & Sharma, C. P. (2000). Chitosan, a drug carrier for the 21st century: a review *STP Pharmaceutical Science*, 10 (1), 5-22.
- Peniche, C., & Argüelles-Monal, W. (2001). Chitosan Based Polyelectrolyte Complexes. In: Argüelles-Monal W (Ed.) *Natural and Synthetic Polymers: Challenges and Perspectives*. Wiley-VCH, Weinheim, Germany. *Macromolecular Symposia*, 168, 103-116.
- Pillai, C.K.S., Paul, W., & Sharma, C.P. (2009). Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*. 34, 641-678.
- Pinelo, M., Arnous, A., & Meyer, A. S. (2006). Upgrading of grape skins: Significance of plant Cell - wall structural components and extraction techniques for phenol release *Trends in Food Science & Technology*, 17(11), 579-590.

- Ralet, M. C., Crépeau, M. J. & Bonnin, E. (2008). Evidence for a block wise distribution of acetyl groups onto homogalacturonan from a commercial sugar beet (*Beta vulgaris*) pectin. *Phytochemistry*, 69, 1903-1909.
- Rashidova, S. S., Milusheva, R. Y., Semenova, L. N., Mukhamedjanova, M. Y., Voropaeva, N. L., & Vasilyeva, S. (2004). Characteristics of interactions in the pectin-chitosan system. *Chromatographia*, 59, 779-782.
- Ridley, B. L., O'Neill, M. A., & Mohnen, D. (2001). Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, 57(6), 929-967.
- Rinaudo, M. (1996). Physicochemical properties of pectins in solution and gel states, In: Visser, J. and Voragen, A.G.J. (Eds). *Pectin and Pectinase*. Elsevier, New York, 21–34.
- Sakai, T., Sakamoto, T., Hallaert, J., & Vandamme, E. J. (1993). Pectin, Pectinase, and Protopectinase: Production, Properties, and Applications., 213-294.
- Shahidi F, & Han X. Q. (1993). Encapsulation of food ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 33, 501-47.
- Sharma, B. R., Naresh, L., Dhuldhoya, N. C., Merchant, S. U., & U. C. (2006). Merchant An Overview on Pectins. *Times Food Processing Journal*, 44-51.
- Shivamathi, C. S., Moorthy, I. G., Kumar, R. V., Soosai, M. R., Maran, J. P., Kumar, R. S., & Varalakshmi, P. (2019). Optimization of ultrasound assisted extraction of pectin from custard apple peel: Potential and new source. *Carbohydrate Polymers*, 225, 115-240.
- Sundar Raj, A. A., Rubila, S., Jayabalan, R., Ranganathan, T. V. (2012) A Review on Pectin: Chemistry due to General Properties of Pectin and its Pharmaceutical Uses. 1, 550.
- Turker, N., & Erdogdu, F. (2006). Effects of pH and temperature of extraction medium on effective diffusion coefficient of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* var. L.). *Journal of Food Engineering*. 76(4), 579-583.
- Walter, R. H. and Taylor, S. (1991). *The chemistry and technology of pectin*. 1st edn. San Diego, CA: Academic Press Inc.
- William, G. T. W., Paul Knox, J., & Mikkelsen, J. D., (2006). Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel Original Research Article *Trends in Food Science & Technology*, 17(3), 97-104.
- Wong, P. K., Yusof, S., Ghazali, H. M., & Che Man, Y. B. (2002). Physico-chemical characteristics of roselle (*Hibiscus sabdariffa*L.). *Nutrition & Food Science*, 32(2), 68-73.

- Yousuf, B., Gul, K., Wani, A. A., & Singh, P. (2015). Health Benefits of Anthocyanins and Their Encapsulation for Potential Use in Food Systems: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56.
- Zhang, C., Taihua M. U. (2011). Optimisation of pectin extraction from sweet potato (*Ipomoea batatas*, *Convolvulaceae*) residues with disodium phosphate solution by response surface method. *International Journal of Food Science & Technology*, 46 (11), 2274–2280.

## ภาคผนวก ก.

## วิธีวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของแอนโทไซยานิน

## ก.1 การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานิน (Total anthocyanin content)

ดัดแปลงจากวิธีของ Giusti และ Wrolstad (2001) ด้วยวิธี pH-differential method

- อุปกรณ์และเครื่องมือ
  1. เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 3 ตำแหน่ง (METTLER TOLEDO®, Thailand)
  2. pH meter (METTLER TOLEDO™ FiveEasy™ Plus, Model FEP 20, Thailand)
  3. Spectrophotometer รุ่น U-500 HITACHI, Techcomp (Thailand) Co, Ltd.
- วิธีการวิเคราะห์
  1. นำสารสกัดตัวอย่างมาเจือจางด้วยบัฟเฟอร์ที่แตกต่างกัน 2 ชนิด โดยปิเปตสารสกัดลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 ml และปรับปริมาตรด้วย sodium acetate buffer ความเข้มข้น 0.4 M ที่มี pH 4.5
  2. ปิเปตสารสกัดในปริมาณที่เหมาะสมลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 ml และปรับปริมาตรด้วย potassium chloride buffer ความเข้มข้น 0.025 M ที่มี pH 1.0
  3. ทำการ dilute ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ให้ได้ Dilution factor ที่เหมาะสม
  4. ทิ้งให้สารละลายเข้าสู่สมดุลเป็นเวลา 30 นาที
  5. นำสารละลายตัวอย่างมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm และ 700 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer ทั้งความยาวคลื่นที่ 520 และ 700 nm โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank ในการเซตศูนย์ (วัดค่าการดูดกลืนแสงภายใน 1 ชั่วโมงหลังจากผสมสารละลายกับบัฟเฟอร์)

คำนวณปริมาณแอนโทไซยานินในสารละลายที่สกัดได้ตามสูตร

$$\text{Total anthocyanin content (\%w/v)} = (\Delta A \times MW \times DF \times 1000) / (\epsilon \times 1)$$

$$\Delta A = (A_{\lambda_{\text{vis-max}}} - A_{700})_{\text{pH 1.0}} - (A_{\lambda_{\text{vis-max}}} - A_{700})_{\text{pH 4.5}}$$

โดย  $A_{700 \text{ nm}}$  = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 nm

$A_{\lambda_{\text{vis-max}}}$  = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุด (ในการทดลองนี้ใช้ที่ 520 nm)

DF = Dilution factor

MW = Molecular weight of Cyanidin-3-glucoside = 449.2 g/mol

$\epsilon$  (Molar absorptivity) = 26,900  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

## ภาพผนวก ข.

### วิธีวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและเคมีของเพกทิน

#### ข.1 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (Moisture content)

ตามวิธีของ AOAC (2000)

- เครื่องมือและอุปกรณ์
  1. Hot air oven รุ่น Memmert GmbH+o.KG, Model UF110, Germany
  2. เครื่องชั่งน้ำหนักเครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 3 ตำแหน่ง (METTLER TOLEDO®, Thailand)
- วิธีการวิเคราะห์
  1. ตั้งค่าตู้อบลมร้อน ที่ 105 องศาเซลเซียส
  2. อบถ้วยอะลูมิเนียมในตู้อบลมร้อน เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที
  3. ชั่งน้ำหนักตัวอย่างลงในถ้วยที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน
  4. นำตัวอย่างเข้าอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ชั่งน้ำหนักตัวอย่างจนได้น้ำหนักคงที่

#### ข.2 การวิเคราะห์ปริมาณผลผลิตเพกทิน (% Yield)

- อุปกรณ์และเครื่องมือ
  1. Refrigerated centrifuge (Thermo scientific sorvall legend XTR)
  2. Freeze drier (Labconco® Mobile Freeze Dryer Lyophilizer Vacuum 77540)
  3. เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 3 ตำแหน่ง (METTLER TOLEDO®, Thailand)
- วิธีวิเคราะห์
  1. ปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเพกทินด้วยเครื่อง Refrigerated centrifuge ที่ 8000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที
  2. นำตะกอนไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งด้วยเครื่อง Freeze drier
  3. ชั่งน้ำหนักเพกทินหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

ซึ่งปริมาณร้อยละผลผลิตเพกทินของกลีบกระเจี๊ยบ รายงานผลเป็นกรัมของน้ำหนักเพกทินที่ได้ต่อ น้ำหนักเป็นกรัมของกระเจี๊ยบแห้งที่นำมาสกัด คำนวณได้จากสมการ

$$\%Yield = (\text{มวลของเพกทินหลังทำแห้ง (กรัม)} / \text{มวลของกระเจี๊ยบแห้งที่นำมาสกัด (กรัม)}) \times 100$$

### ข.3 การวิเคราะห์ค่าสี

ดัดแปลงจากวิธีของ Liew et al. (2018)

- อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. Color meter [Hunter Lab] รุ่น Color Quest XE, ColorTec Associates Inc

- วิธีการวิเคราะห์

วิเคราะห์ค่าสีด้วยเครื่องวัดสี Chroma Meter CR-400 ซึ่งค่าที่อ่านได้จะเป็นไปตามระบบ  $L^* a^* b^*$

ระบบแกน  $L^*$  จะบรรยายถึง ความสว่าง (lightness) จากค่า  $+L^*$  แสดงถึงสีขาว ไปจนถึง  $-L^*$  แสดงถึงสีดำ

แกน  $a^*$  จะบรรยายถึง แกนสีจากเขียว ( $-a^*$ ) ไปจนถึงแดง ( $+a^*$ )

แกน  $b^*$  จะบรรยายถึง แกนสีจากน้ำเงิน ( $-b^*$ ) ไปเหลือง ( $+b^*$ )

$L^*$  ใช้กำหนดค่าความสว่าง (Lightness)

$L$  มีค่าตั้งแต่ 0 ถึง 100;  $L=0$  แสดงสีที่มืดถึงสีดำ  $L=100$  แสดงสีสว่างถึงสีขาว

$a^*$  ใช้กำหนดสีแดง หรือสีเขียว

$a$  มีค่าเป็น บวก ;  $+a$  หมายถึง วัตถุมีสีโทนแดง

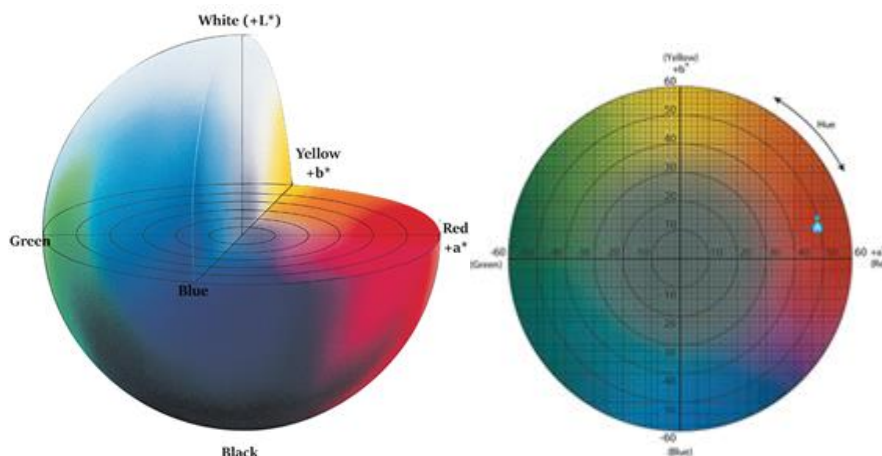
$a$  มีค่าเป็น ลบ ;  $-a$  หมายถึง วัตถุมีสีโทนเขียว

$b^*$  ใช้กำหนดสีเหลือง หรือสีน้ำเงิน

$b$  มีค่าเป็น บวก ;  $+b$  หมายถึง วัตถุมีสีโทนเหลือง

$b$  มีค่าเป็น ลบ ;  $-b$  หมายถึง วัตถุมีสีโทนน้ำเงิน





ภาพที่ 15 a\*, b\* chromaticity diagram

#### ข.4 การวิเคราะห์น้ำหนักสมมูล (Equivalent weight)

ดัดแปลงวิธีของ Owens et al. (1952)

- อุปกรณ์และเครื่องมือ
  1. เครื่อง pH meter รุ่น METTLER TOLEDO™ FiveEasy™ Plus, Model FEP 20, Thailand)
  2. เครื่องชั่งน้ำหนักเครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 3 ตำแหน่ง (METTLER TOLEDO®, Thailand)
- วิธีการวิเคราะห์
  1. Calibrate เครื่อง pH meter
  2. ชั่งน้ำหนักตัวอย่างเพกทิน 0.5 กรัม ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 ml
  3. เติม ethanol 5 ml ลงไป
  4. เติม sodium chloride (NaCl) 1 กรัม
  5. เติมน้ำกลั่น 100 ml ลงไป
  6. เติม 0.4% phenol red indicator 6 หยด
  7. ไทเทรตกับ standardized 0.1 N ของ NaOH จนได้จุดยุติของการไทเทรตเป็น สีชมพู (pH 7.5)

คำนวณ Equivalent weight จากสมการ

$$\text{Equivalent weight} = [\text{weight of sample (g)} \times 1000] / [\text{ml of alkali} \times \text{Normality of alkali}]$$

## ข.5 การวิเคราะห์ปริมาณเมทอกซิล (Methoxyl content: %MeO)

ดัดแปลงวิธีของ Ranganna (1995)

- อุปกรณ์และเครื่องมือ
  1. Hot air oven รุ่น Memmert GmbH+o.KG, Model UF110, Germany
  2. เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 3 ตำแหน่ง (METTLER TOLEDO®, Thailand)
- วิธีการวิเคราะห์
  1. นำสารละลายที่มีความเป็นกลางจากการวิเคราะห์น้ำหนักสมมูลมาเติม 0.25 N NaOH ปริมาตร 25 ml ลงไปผสมสารละลายให้เข้ากัน
  2. เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที
  3. เติม 0.25 N HCl ปริมาตร 25 ml ลงไป
  4. ไทเทรตด้วย 0.1 N NaOH จนสารละลายถึงจุดยุติอีกครั้ง

คำนวณปริมาณเมทอกซิลได้จากสมการ

$$\text{Methoxyl content (\%)} = [\text{ml of alkali} \times \text{Normality of alkali} \times 3.1] / \text{Weight of sample}$$

## ข.6 การวิเคราะห์ปริมาณกรดแอนไฮโดรยูโรนิกทั้งหมด (Total Anhydrouronic acid content: %AUA)

ดัดแปลงวิธีของ Mohamed และ Hasan (1995)

- วิธีการวิเคราะห์

ปริมาณกรดแอนไฮโดรยูโรนิกทั้งหมดของเพกทิน ซึ่งคำนวณได้ตามสมการ

$$\%AUA = [(176 \times 0.1z \times 100) / (w \times 1000)] + [(176 \times 0.1y \times 100) / (w \times 1000)]$$

โดย molecular unit ของ AUA (1 unit) = 176 g

z = ml ของ NaOH ที่ใช้ในการไทเทรต จากการวิเคราะห์น้ำหนักสมมูล (Equivalent weight)

y = ml ของ NaOH ที่ใช้ในการไทเทรต จากการวิเคราะห์ปริมาณเมทอกซิล (Methoxyl content)

w = น้ำหนักของตัวอย่าง

### ข.7 การวิเคราะห์ระดับการเกิดเอสเทอร์ฟิเคชัน (Degree of Esterification: %DE)

ดัดแปลงจากวิธีของ Owens et al. (1952)

- วิธีการวิเคราะห์

ระดับการเกิดเอสเทอร์ฟิเคชัน คำนวณได้จากค่า Methoxyl content และ AUA content จากข้อ ข.5 และ ข.6 ตามสมการ

$$\%DE = [(176 \times \%MeO) / (31 \times \%AUA)] \times 100$$

### ข.8 การวิเคราะห์ประสิทธิภาพการเอนแคปซูลชัน (% Encapsulation efficiency)

- อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. Waring Blender
2. Magnetic stirrer
3. Water bath shaker (Gesells chaft fur รุ่น GEL 1092, Burgwedel, Germany)
4. pH meter (METTLER TOLEDO™ FiveEasy™ Plus, Model FEP 20, Thailand)
5. Spectrophotometer รุ่น U-500 HITACHI, Techcomp (Thailand) Co, Ltd.
6. Rotary evaporator

- วิธีการวิเคราะห์

การวิเคราะห์ประสิทธิภาพการเอนแคปซูลชันแอนโทไซยานินมีขั้นตอนตามข้อ 3.2.1 และ ก.1

การหาปริมาณแอนโทไซยานิน (Total anthocyanin content) คำนวณได้ตามสมการ

$$\%Encapsulation\ efficiency = [Total\ anthocyanin\ content\ (ก่อน\ ตกตะกอน\ เพกทิน - หลัง\ ตกตะกอน\ เพกทิน) / (ก่อน\ ตกตะกอน\ เพกทิน)] \times 100$$

## ภาคผนวก ค.

## วิธีวิเคราะห์ปริมาณความชื้นของกระเจียบ

ตามวิธีของ AOAC (2000)

- อุปกรณ์และเครื่องมือ
  1. Hot air oven รุ่น Memmert GmbH+o.KG, Model UF110, Germany
  2. เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 4 ตำแหน่ง (METTLER TOLEDO®, Thailand)
  3. โถดูดความชื้น (Desiccator)
- วิธีวิเคราะห์
  1. อบถั่วอัลูมิเนียมในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที และนำออกจากตู้อบลมร้อน เก็บในโถดูดความชื้นทันที ทิ้งให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที แล้วชั่งและบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน (W1)
  2. ชั่งตัวอย่างประมาณ 2-3 กรัม ใส่ลงในถ้วยที่อบแห้ง และบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน (W2)
  3. นำถั่วอัลูมิเนียมที่บรรจุตัวอย่างเข้าอบที่อุณหภูมิ 105 ถึง 107 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30 นาที ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้นประมาณ 30 นาที ชั่งและบันทึกน้ำหนัก (W3)
  4. อบซ้ำครั้งละ 30 นาที จนได้น้ำหนักคงที่ (น้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งต่างกันไม่เกิน 0.002 กรัม)
  5. จดน้ำหนักที่น้อยที่สุดของถั่วอัลูมิเนียมและน้ำหนักตัวอย่างหลังจากอบแห้งแล้ว

คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นจากสมการ

เปอร์เซ็นต์ความชื้น = (น้ำหนักที่หายไป (กรัม) × 100) / น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

หรือ ความชื้น (ร้อยละโดยน้ำหนัก) =  $(W2-W3) / (W2-W1) \times 100$

วิเคราะห์ 2 ซ้ำ (duplicate) ในทุกตัวอย่าง

รายงานผลปริมาณความชื้น หน่วยเป็นร้อยละโดยน้ำหนัก ทศนิยม 2 ตำแหน่ง

## ภาคผนวก ง.

### วิธีวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของสารสกัดหลังเติมโคโตซาน

เตรียมสารละลายโคโตซานความเข้มข้น 1% ในสารละลายกรดซิตริก 2% แล้วนำไปเขย่าผสมใน water bath shaker ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลายโคโตซานลงในสารสกัดกระเจียวภายใต้สภาวะการสกัดที่เหมาะสม โดยให้ความเข้มข้นของโคโตซานเป็น 0.025 และ 0.05% ของปริมาตรสุดท้าย และนำไปวิเคราะห์ประสิทธิภาพการเอนแคปซูลแอนโทไซยานินตามข้อ ง.1

#### ง.1 การวิเคราะห์ประสิทธิภาพการเอนแคปซูล (%) Encapsulation efficiency)

- อุปกรณ์และเครื่องมือ
  1. Water bath shaker (Gesells chaft fur รุ่น GEL 1092, Burgwedel, Germany)
  2. pH meter (METTLER TOLEDO™ FiveEasy™ Plus, Model FEP 20, Thailand)
  3. Spectrophotometer รุ่น U-500 HITACHI, Techcomp (Thailand) Co, Ltd.
  4. Rotary evaporator
- วิธีการวิเคราะห์

การวิเคราะห์ประสิทธิภาพการเอนแคปซูลแอนโทไซยานินมีขั้นตอนตามข้อ ก.1

การหาปริมาณแอนโทไซยานิน (Total anthocyanin content) คำนวณได้ตามสมการ

$\% \text{Encapsulation efficiency} = \frac{[\text{Total anthocyanin content (ก่อนตกตะกอนเพกทิน) - หลังตกตะกอนเพกทิน}]}{[\text{ก่อนตกตะกอนเพกทิน}]} \times 100$

## ภาพผนวก จ.

## รายละเอียดโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

## ประจำปีงบประมาณ 2563

ชื่อโครงการ: ผลของไบโอพอลิเมอร์ต่อประสิทธิภาพในการเอนแคปซูเลชันจากสารสกัดกระเจี๊ยบ  
(Effect of biopolymer on roselle-extract encapsulation efficiency)

นิสิตผู้ร่วมโครงการ: นางสาวณัฐพิมล เตโชพันธ์ 6032519423 (ผู้ร่วมโครงการ)  
นางสาวบุญทริกา เกิดเกียรติขจร 6032535423 (หัวหน้าโครงการ)  
นางสาวสมิตา พฤษักษ์กันทรากกร 6032570323 (ผู้ร่วมโครงการ)

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ: อ.ดร. สารีศา สุริยรักษ์

## รายละเอียดและการดำเนินการ

1. ค้นคว้าและรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับโครงการนี้ จากหนังสือ รายงาน วารสาร สื่อสิ่งพิมพ์ต่าง ๆ และสื่ออิเล็กทรอนิกส์ เพื่อใช้เป็นข้อมูลสำหรับออกแบบการทดลอง และการดำเนินการต่าง ๆ
2. วางแผน และออกแบบการทดลอง จัดหาวัตถุดิบ สารเคมี เครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆที่ใช้ในการทดลอง
3. ดำเนินการทดลองตามแผนงานเพื่อให้บรรลุตามวัตถุประสงค์ที่กำหนดไว้

## งบประมาณในการดำเนินการวิจัย

- |                             |       |     |
|-----------------------------|-------|-----|
| 1. วัตถุดิบและอุปกรณ์       |       |     |
| 1.1 กระเจี๊ยบ               | 0     | บาท |
| 1.2 สารเคมี                 | 6,955 | บาท |
| 1.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง | 1,122 | บาท |
| 2. ค่าใช้จ่ายอื่นๆ          |       |     |
| 2.1 ค่าใช้จ่ายสำรอง         | 526   | บาท |
| 2.2 ค่าสำเนาและเอกสาร       | 150   | บาท |
| รวม                         | 8,753 | บาท |

## แผนการดำเนินงาน

ขั้นตอนการดำเนินงาน	2563					2564			
	ส.ค.	ก.ย.	ต.ค.	พ.ย.	ธ.ค.	ม.ค.	ก.พ.	มี.ค.	เม.ย.
1. คั่นคว้า รวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการทดลอง	←	→							
2. ออกแบบวางแผนการทดลอง จัดหาสารเคมี วัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือต่างๆ และวัสดุดิบที่ใช้ในการทดลอง		←	→						
3. ดำเนินการทดลอง			←	→					→
4. รวบรวมข้อมูล และวิเคราะห์ผลการทดลอง						←	→		→
5. จัดทำรายงาน และนำเสนอผลการทดลอง							←	→	→

## ภาคผนวก ฉ.

## ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล นางสาวณัฐพิมล เตโชพันธ์  
 ตำแหน่ง ผู้ร่วมวิจัย  
 วุฒิกการศึกษา วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ.)  
 ภาควิชา เทคโนโลยีทางอาหาร  
 คณะ วิทยาศาสตร์  
 มหาวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
 ปีที่สำเร็จการศึกษา 2563  
 โทรศัพท์ 089-787-3003  
 Email papa\_bb2541@hotmail.com



## ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล นางสาวบุญทริกา เกิดเกียรติขจร  
 ตำแหน่ง หัวหน้าโครงการ  
 วุฒิกการศึกษา วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ.)  
 ภาควิชา เทคโนโลยีทางอาหาร  
 คณะ วิทยาศาสตร์  
 มหาวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
 ปีที่สำเร็จการศึกษา 2563  
 โทรศัพท์ 081-924-5014  
 Email ploybtrk@gmail.com





## ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล นางสาวสมิตา พฤกษ์กันทรากกร  
ตำแหน่ง ผู้ร่วมวิจัย  
วุฒิการศึกษา วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ.)  
ภาควิชา เทคโนโลยีทางอาหาร  
คณะ วิทยาศาสตร์  
มหาวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีที่สำเร็จการศึกษา 2563  
โทรศัพท์ 092-116-6183  
Email pruksamida@gmail.com

