Research Article

Received: July 15, 2019; Accepted: November 7, 2019

การเพิ่มความคงตัวของแอนโทไซยานินจากกระชายดำ โดยการใช้วิธีโคพิกเมนเทชั่น

Increasing the Stability of Anthocyanins from Black Ginger (*Kaempferia paviflora*) through Application of Copigmentation

ณิชกุล เทียนไทย, จตุรภัทร วาฤทธิ์[A], นักรบ นาคประสม[A] และกาญจนา นาคประสม[A]*

สาขาวิชาวิศวกรรมอาหาร คณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ตำบลหนองหาร อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ 50290

รัฐพงศ์ ปกแก้ว

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ

ตำบลแม่ทราย อำเภอร้องกวาง จังหวัดแพร่ 54140

Nichakul Tienthai, Jaturapatr Varith[A], Nukrob Narkprasom[A] and Kanjana Narkprasom[A]*

Department of Food Engineering, Faculty of Engineering and Agro-Industry, Maejo University,

Nong Han, Sansai, Chiang Mai 50290

Rattaphong Pokkaew

Food Technology Program, Maejo University-Phrae Campus,

Maesai, Rong Kwang, Phrae 54140

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดฟีนอลิกจากเมล็ดมะเกี๋ยงต่อความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ และอัตราส่วนของสารโคพิกเมนต์ต่อสารสกัดแอนโทไซยานินจากกระชายดำ (อัตราส่วนกระชายดำต่อน้ำ 100:370) แล้วนำสารสกัดจากแอนโทไซยานินไปอบแห้งแบบแช่เยือกแข็ง สำหรับสารโคพิกเมนต์ (สารสกัดฟีนอลิก) จากเมล็ดมะเกี๋ยงสกัดด้วยวิธีไมโครเวฟร่วมในการสกัด สารสกัดแอนโทไซยานินทำปฏิกิริยาโคพิกเมนเทชันกับสารสกัดฟีนอลิก โดยใช้อัตราส่วนโมลาร์ของแอนโทไซยานินต่อสารโคพิกเมนต์ คือ 1:0 (ควบคุม), 1:5 , 1:10 และ 1:15 ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 3, 5 และ 7 โดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา120 นาที แล้ววิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานิน ค่าสี (L*, a*, b*) และค่าครึ่งชีวิต ผลการวิจัยพบว่าการเกิดโคพิกเมน

[A] *Postharvest Technology Innovation Center, Office of the Higher Education Commission, Bangkok 10400*

***ผู้รับผิดชอบบทความ** : aoikanjana@hotmail.com

doi: 10.14456/tstj.2020.146

เทชั่นสามารถเพิ่มความคงตัวของแอนโทไซยานินต่อความร้อน โดยมีความคงตัวของแอนโทไซยานินสูงสุด 89.57 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณแอนโทไซยานิน 18.177 มิลลิกรัม/100กรัมแห้ง ที่อัตราส่วนแอนโทไซยานินต่อสารโคพิกเมนต์ 1 : 15 ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 3 เมื่อให้ความร้อนอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 นาที ค่าสี L*, a*, b* คือ 5.85, 2.43 และ 3.04 ตามลำดับ ค่าครึ่งชีวิต 63.01 นาที และมีสารฟีนอลิก 149.3 มิลลิกรัม/กรัมแห้ง

คำสำคัญ : โคพิกเมนเทชั่น; แอนโทไซยานินจากกระชายดำ; ฟีนอลิกจากเมล็ดมะเกี๋ยง; วิธีไมโครเวฟร่วมในการสกัด

Abstract

The objective of this research was to study the effect of the phenolic extract copigments from Makiang (*Cleistocalyx nervosum* var. *paniala*) seeds on pH, temperature and its ratios with black ginger anthocyanins. Anthocyanins were extracted from black ginger samples (concentration ratio 100 : 370) and then freeze-dried. The copigments from makiang seeds (phenolic compounds) were extracted using the microwave-assisted extraction (MAE). The anthocyanins extract was mixed with the phenolic extracts at the molar ratios of 1 : 0 (control), 1 : 5, 1 : 10 and 1 : 15 under pH 3, 5 and 7, heated at 70, 80 and 90 degrees Celsius for 120 minutes. The mixed extracts were analyzed for anthocyanins, color values (L*, a*, b*) and half-life ($t_{1/2}$). The results found that the copigments increased the stability of the anthocyanins. The highest anthocyanins retention (89.57 %) and anthocyanin content (18.177 mg/100g_{DW}) were shown at the anthocyanin to copigment molar ratio of 1 : 15 under pH 3 at 80 degrees Celsius for 120 minutes. The color qualities: Hunter L*, a*, b* were 5.85, 2.43 and 3.04, respectively. The $t_{1/2}$ of anthocyanins was 63.01 minutes, and phenolic content was 149.3 mg_{GAE}/g_{DW}.

Keywords: copigmentation; anthocyanin from black ginger; phenolic from Makiang seed; microwave-assisted extraction (MAE)

1. บทนำ

กระชายดำ (*Kaempferia parviflora*) มีชื่อที่รู้จักโดยทั่วไปว่าโสมไทยหรือ Black ginger เป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้านจัดอยู่ในวงศ์ของขิงและขมิ้น ซึ่งสารสำคัญอยู่ในรากหรือเหง้ามีสีม่วงอ่อน ม่วงเข้ม จนถึงสีม่วงดำเมื่อมีอายุมากขึ้น มีกลิ่นหอมเฉพาะตัว และรสชาติขมเล็กน้อย ประเทศไทยปลูกกระชายดำมากในภาคเหนือ เนื่องจากลักษณะภูมิประเทศที่เอื้อต่อการเจริญได้ดี กระชายดำสามารถนำมาใช้เป็นพืชสมุนไพรเพื่อสุขภาพและยารักษาโรคต่าง ๆ เนื่องจากพบว่ามีสารต้านการอักเสบ สารฟลาโวนอยด์ [1] สารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และสารประกอบฟีนอลิก [2] ได้แก่ ยาบำรุงกำลัง บำรุงหัวใจ แก้ปวดข้อ รักษาแผลในปาก แก้ลมวิงเวียน แน่นหน้าอก แก้กลากเกลื้อน แก้ฝีอักเสบ แก้เบาหวาน ทำให้โลหิตหมุนเวียนดีขึ้นผิวพรรณผุดผ่อง ขับปัสสาวะ เป็นยาบำรุงกำหนัด เป็นต้น

ปัจจุบันผลิตภัณฑ์จากกระชายดำมีหลากหลาย

ได้แก่ แคปซูลกระชายดำ ไวน์กระชายดำ กระชายดำผง และน้ำสมุนไพรกระชายดำ ซึ่งผู้วิจัยเล็งเห็นว่าน้ำสมุนไพรกระชายดำได้รับความนิยมในการแปรรูปเพื่อรับประทาน แต่การแปรรูปโดยการต้มสกัดต้องใช้ความร้อนสูงและใช้เวลานาน จึงอาจทำให้สารสำคัญที่มีอยู่ในกระชายดำนั้นสูญเสียไปได้ในกระบวนการผลิตที่ต้องผ่านขั้นตอนการแปรรูปต่าง ๆ และในแต่ละขั้นตอนอาจมีปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อความคงตัวของสารสำคัญที่อยู่ในกระชายดำ ซึ่งมีความสำคัญต่อคุณภาพและคุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์

การสกัดเป็นหลักการพื้นฐานที่ใช้ในการแยกสารที่ต้องการและไม่ต้องการออกจากกัน โดยอาศัยตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อการสกัดสารสำคัญแต่ละชนิดที่ต่างกัน มีรายงานว่านักวิทยาศาสตร์จำนวนมากได้พัฒนาเครื่องมือและวิธีการสกัดเพื่อให้ได้ผลผลิตในปริมาณสูงสุด ซึ่งวิธีการสกัดมีอยู่หลายวิธีที่ต่างกันไปตามชนิดของตัวอย่างที่ใช้ เช่น การใช้ตัวทำละลาย การใช้ความร้อนร่วม หรือใช้วิธีซอคเลท (Soxlhet) ซึ่งการใช้เวลาในการสกัดนานจะมีผลทำให้สารสำคัญที่ต้องการสกัดสลายหรือเสื่อมคุณค่าลงได้ โดยสารสำคัญในกระชายดำ คือ สารฟีนอลิก สารฟลาโวนอยด์ และแอนโทไซยานิน ซึ่งเป็นสารที่ต้องสกัดด้วยความร้อน แต่ความสามารถในการคงตัวต่ำมาก จะสลายตัวเมื่อมีปัจจัยอื่น ๆ เข้ามาเกี่ยวข้อง เช่น อายุการเก็บรักษา แสง ค่าความเป็นกรด-ด่าง ดังนั้นการเพิ่มความคงตัวของสารสำคัญในผลิตภัณฑ์จึงมีความสำคัญ

การเกิดโคพิกเมนต์เทชัน (copigmentation) เป็นปฏิกิริยาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างแอนโทไซยานินกับสารโคพิกเมนต์ (copigment) เช่น สารประกอบฟีนอลิก [3] และกรดอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ในธรรมชาติ ซึ่งนอกจากจะเพิ่มความคงตัวของแอนโทไซยานินแล้วยังสามารถช่วยเพิ่มความเข้มสีของแอนโทไซยานินด้วย [4] โดยวิธีนี้เป็นการเพิ่มความคงตัวของแอนโทไซยานินแบบวิธีธรรมชาติ โดยเฉพาะประกอบฟีนอลิกที่สกัดได้จากเมล็ดมะเกี๋ยงโดยใช้ไมโครเวฟ [5] ซึ่งมะเกี๋ยงเป็นหนึ่งในพืชอนุรักษ์ตามโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดา สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) เป็นพืชที่มีศักยภาพที่จะนำมาใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน นอกจากนี้สารฟีนอลิกมีสมบัติในการเป็นสารต้านออกซิเดชันที่อาจป้องกันการเกิดโรคเรื้อรังต่าง ๆ ได้ เช่น โรคมะเร็ง โรคเบาหวาน โรคหัวใจ ซึ่งสารในกลุ่มที่มีสมบัติเป็นสารออกซิเดชันเหล่านี้กำลังได้รับความสนใจอย่างมากในปัจจุบัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพและเครื่องดื่ม

2. อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

2.1 การสกัดแอนโทไซยานินในกระชายดำ

ทำความสะอาดเหง้ากระชายดำตากแห้งจากจังหวัดเพชรบูรณ์ ซึ่งมีอายุการเก็บเกี่ยวตามเวลาที่กำหนด (8-9 เดือน) สับเป็นชิ้นเล็ก ๆ หรือบดให้ละเอียด สกัดโดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลายที่อัตราส่วน 100 : 370 (กรัม/มิลลิลิตร) ให้ความร้อนเป็นเวลา 20 นาที [6] ในอ่างควบคุมอุณภูมิ แล้วกรองกากออก จากนั้นนำน้ำสารสกัดที่ได้ระเหยตัวทำละลายออกด้วยการอบแห้งแบบแช่เยือกแข็ง โดยน้ำกระชายดำสกัด 20 ลิตร ใช้ปริมาณกระชายดำ 5,400 กรัม ได้ปริมาณผงสารสกัดเข้มข้น 15 กรัม คิดเป็นร้อยละ 0.28 ของปริมาณกระชายดำที่ใช้ และนำไปวิเคราะห์ปริมาณสารเริ่มต้น คือ แอนโทไซยานิน สารฟีนอลิก และความสามารถในการต้นอนุมูลอิสระ

2.2 การสกัดสารฟีนอลิกจากเมล็ดมะเกี๋ยง

เมล็ดมะเกี๋ยงในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตน์ราชสุดาฯ นำมาอบแห้งในตู้อบลมร้อนด้วยอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนมีความชื้นน้อยกว่าร้อยละ 10 แล้ว

บดละเอียดและร่อนผ่านตะแกรงขนาด 60 ไมครอน นำผงเมล็ดมะเกี๋ยงละเอียดมาสกัดโดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย สกัดด้วยไมโครเวฟร่วมโดยใช้กำลังไมโครเวฟ 450 วัตต์ เวลา 4 นาที อัตราส่วน 1:30 (กรัม/มล.) [5]

2.3 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิก แอนโทไซยานิน ประสิทธิภาพการยับยั้งอนุมูลอิสระ และความคงตัว

2.3.1 วิธีวิเคราะห์ฟีนอลิกรวม

การวิคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกเป็นการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดด้วยเทคนิค Folin-Ciocalteu method โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 1,000 ppm โดยนำสารสกัดตัวอย่าง 0.1 มล. ใส่ในหลอดทดลองแล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่น 10 มล. แล้วดูดสารมา 0.1 มล. และเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) เข้มข้นร้อยละ 2 โดยมวลต่อปริมาตร ลงไป 2 มล. ผสมให้เข้ากัน ปิดปากหลอดด้วยกระดาษ ฟอยด์ หรือถุงฟอยด์ จากนั้นเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu phenol reagent ลงไป 0.1 มล. ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ สำหรับ blank ใช้น้ำกลั่นแทนสารสกัดตัวอย่างและคำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมทั้งหมดเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก โดยรายงานผลเป็นมิลลิกรัมต่อกรัมกรดแกลลิก (mg/g gallic acid equivalent, GAE)

2.3.2 การวิเคราะห์แอนโทไซยานิน

นำน้ำกระชายดำสกัดที่ผ่านการระเหยตัวทำละลายออกจนเป็นผงสารสกัดมาวิเคราะห์ปริมาณ monomeric anthocyanins ด้วยเทคนิค pH differential method โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Giusti และ Wrolstad โดยใช้บัฟเฟอร์ 0.025 M KCl pH 1 และ 0.4 M CH_3COONA pH 4.5 เจือจางตัวอย่างสารสกัดแอนโทไซยานินด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอช 1.0 และ 4.5 ที่ความเข้มข้น 1:50 นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 และ 700 นาโนเมตร นำมาคำนวณปริมาณ monomeric anthocyanins โดยแสดงค่าเทียบเป็น cyaniding-3-glucoside equivalents (mg/L) ดังสมการ

$$\text{Monomeric anthocyanin} = \frac{A \times MW \times 10^3 \times DF}{\varepsilon \times l}$$

โดย $A = (A_{520nm} - A_{700nm})_{pH1.0} - (A_{520nm} - A_{700nm})_{pH4.5}$; MW = 449.2 g/mol.; ε = molar extention coefficient = 26,900 M^{-1} cm^{-1}; DF = dilution factor; 1 = pathlength (cm)

2.3.3 ประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ

ทดสอบด้วยการใช้ 2,2-dlphenyl-1-plcrylhydrazyl radical scavenging capacity (DPPH) เป็นอนุมูลอิสระ โดยดัดแปลงจากวิธีการของรวินิภา และศิริจันทร์ เริ่มจากการใช้ตัวอย่างสารสกัด 0.1 มล. ใส่ในหลอดทดลองเติมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมล่าร์ ปริมาตร 2.9 มล. เขย่าให้เข้ากันเก็บในที่มืด 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร สำหรับตัวอย่างควบคุมใช้น้ำกลั่นแทนสารสกัดตัวอย่าง และคำนวณร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระ ดังสมการ

$$\%\ \text{inhibition} = \frac{(A_{control} - A_{sample})}{A_{control}} \times 100$$

2.3.4 การวิเคราะห์ความคงตัวของปริมาณแอนโทไซยานินในกระชายดำ

การศึกษาการใช้วิธีโคพิกเมนเทชั่นในการเพิ่มความคงตัวของสารสกัดแอนโทไซยานินในกระชายดำได้มีการวางแผนการทดลองแบบ 3×3 factorial in completely randomized design (CRD) ประกอบด้วย 3 ปัจจัย คือ ปัจจัยที่ 1 ปริมาณสารโคพิกเมนต์หรือฟีนอลิกที่ได้จากการสกัดในเมล็ดมะเกี๋ยง คือ ร้อยละ 5, 10 และ 15 ของปริมาณสาร

สกัดแอนโทไซยานิน 15 มก. ที่ละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ 15 มล. ต่อหลอดการทดลอง ปัจจัยที่ 2 สารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 3, 5 และ 7 และปัจจัยที่ 3 อุณหภูมิในการศึกษาความคงตัวของแอนโทไซยานินที่ 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส ทดลองในอ่างควบคุมอุณภูมิระยะเวลา 0-120 นาที โดยบันทึกผลทุก 15 นาที จำนวน 3 ซ้ำ เพื่อนำมาคำนวนค่าครึ่งชีวิตซึ่งจะแสดงเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาจนความเข้มข้นของสารตั้งต้นลดลงครึ่งหนึ่งจากความเข้มข้นเริ่มต้น โดยดัดแปลงจากวิธีการของ ศุทธินี [7] ดังสมการ

$$t_{1/2} = -\ln 0.5 \times k^{-1}$$

โดยที่ $t_{1/2}$ = ค่าครึ่งชีวิต; k^{-1} = ค่าคงที่อัตราการเกิดปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง

การศึกษาค่าจลนพลศาสตร์ของสีที่เปลี่ยนแปลงไปในการศึกษาการเกิดโคพิกเมนเทชั่นโดยดัดแปลงจากวิธีการของ Brian และคณะ [8] ดังสมการ

$$\ln(a/a_0) = -kt$$

โดยที่ ln(a) = ค่าจลนพลศาสตร์ของแอนโทไซยานินเปลี่ยนแปลงไปจากการศึกษาการเกิดโคพิกเมนเทชั่น; a_0 = ปริมาณแอนโทไซยานินที่ระยะเวลาเริ่มต้น; a = ปริมาณแอนโทไซยานินที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อเทียบกับระยะเวลาเริ่มต้น

การศึกษาความคงตัวของสีของแอนโทไซยานินที่มีการเปลี่ยนแปลงไปเมื่อเทียบกับระยะเวลาโดยดัดแปลงจาก Holzwarth และคณะ [9] ดังสมการ

$$\% \text{ pigment retention} = T_{acy} - T_{acy0} \times 100$$

โดยที่ T_{acy} = ปริมาณแอนโทไซยานินสุดท้าย; T_{acy0} = ปริมาณแอนโทไซยานินเริ่มต้น

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) การวิเคราะห์ทางสถิติทำโดยใช้โปรแกรม SPSS โดยที่จำนวน n ของการทดลอง รายงานผลที่ได้เป็นค่าเฉลี่ย ± standard deviation และ $^{a, b, c...}$ แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่าเฉลี่ยในแนวตั้ง ($p < 0.05$)

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการทดลองเบื้องต้นของการเกิดโคพิกเมนเทชั่นที่อัตราส่วนแอนโทไซยานินต่อสารโคพิกเมนต์ 1 : 0, 1 : 5, 1 : 10, 1 : 15 และ 1 : 20 ในสารละลายพีเอช 3 โดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 อ งศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 นาที ดังแสดงในตารางที่ 1 การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินและค่าครึ่งชีวิตพบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณสารโคพิกเมนต์ทำให้ค่าครึ่งชีวิตของแอนโทไซยานินเพิ่มขึ้น โดยที่อัตราส่วนแอนโทไซยานินต่อสารโคพิกเมนต์ 1 : 15 และ 1 : 20 มีค่าครึ่งชีวิตสูงสุด ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาอัตราส่วนแอนโทไซยานินต่อสารโคพิกเมนต์ 1 : 15 ดังแสดงในตารางที่ 2

ผลกระทบของสารละลายบัฟเฟอร์พีเอชต่อค่าสี และอัตราการสลายตัวของแอนโทไซยานินในการเกิดโคพิกเมนเทชั่นระหว่างค่าสีของแอนโทไซยานินจากกระชายดำกับสารสกัดฟีนอลิกจากเมล็ดมะเกี๋ยง เมื่อปรับสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 3, 5 และ 7 พบว่าสารสกัดปรากฏสีแดงในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 3 และมีสีน้ำตาลที่สารละลายบัฟเฟอร์อื่น (รูปที่ 1) เมื่อนำไปวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของความยาวคลื่นในการดูดกลืนแสง พบว่าเมื่อพีเอชเพิ่มขึ้น ความยาวคลื่นสูงสุดและการดูดกลืนแสงของสารสกัดกระชายดำนั้นเปลี่ยนไป ทำให้การแสดงออกของสีเปลี่ยนแปลงไปด้วย เนื่องจากความต่างของพีเอชมีผลต่อโครงสร้างแอนโทไซยานิน [10] รงควัตถุสีแดงในกระชายดำ ซึ่งทำให้ความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเปลี่ยนแปลงไปขึ้นอยู่กับชนิดของแอนโทไซยานิน สาร

Table 1 Kinetic parameters for degradation of black ginger anthocyanins extracts with copigmented samples from makiang seeds (phenolic compounds) in buffered aqueous solutions pH 3 and heated at 80 °C

Ratio	Time	Anthocyanin content (mg/100g DW)	Pigment retention (%)	ln(a)	k (10^3) (min^{-1})	$t_{1/2}$ (min)
1:0	0	16.31±0.02^{g}	100.00	0.000	0.020	35.55±0.01^{e}
	120	13.42±0.04^{l}	82.25	-0.195		
1:5	0	18.68±0.03^{c}	100.00	0.000	0.016	43.05±0.03^{d}
	120	15.9±0.02^{h}	85.15	-0.161		
1:10	0	19.6±0.03^{b}	100.00	0.000	0.015	45.90±0.02^{c}
	120	16.85±0.02^{f}	85.98	-0.151		
1:15	0	20.29±0.02^{a}	100.00	0.000	0.010	70.01±0.02^{b}
	120	18.38±0.01^{d}	90.58	-0.099		
1:20	0	20.33±0.03^{a}	100.00	0.000	0.010	70.73±0.04^{a}
	120	18.41±0.02^{d}	90.69	-0.098		

$^{a, b, c...}$ Values with different letters superscripts within column are significantly different ($p < 0.05$)

สกัดกระชายดำมีโครงสร้างประกอบด้วยน้ำตาลและกรดหลายชนิดจัดเป็น acylated anthocyanin ที่มีโครงสร้างประกอบด้วยน้ำตาลและกรด ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสี โดยที่พีเอช 3 สามารถรักษาความคงตัวของแอนโทไซยานินจาก กระชายดำมากที่สุด เพราะมีปริมาณ monomeric anthocyanin ที่เหลืออยู่หลังให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่าง ๆ มากกว่าที่สารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 5 และ 7 การที่ระดับสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 3 มีการสลายตัวเนื่องจากความร้อนของแอนโทไซยานินน้อยที่สุด เนื่องจากแอนโทไซยานินอยู่ในรูปของ flavylium cation จะมีความคงตัวมากกว่าที่ระดับสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 5 ซึ่งอยู่ในรูปของ quinonoidal base และที่ระดับสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 7 ซึ่งอยู่ในรูปของ pseudobase โดยแอนโทไซยานินในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอชสูง จะมีความคงตัวต่ำ ทำให้มีอัตราการสลายตัวจากความร้อนสูง โครงสร้างของสารโคพิกเมนต์มีการเคลื่อนที่ของอิเล็กตรอนอยู่เป็นจำนวนมาก ซึ่งเข้าสร้างพันธะกับโครงสร้างของแอนโทไซยานินที่อยู่ในรูปประจุของฟลาวิเลียมได้ดี เนื่องจากประจุของฟลาวิเลียมมีจำนวนของอิเล็กตรอนภายในโครงสร้างน้อย และการสร้างพันธะระหว่างสารโคพิกเมนต์กับแอนโทไซยานินสามารถป้องกันการเกิด water neucleophilic หรือการทำปฏิกิริยาของน้ำกับตำแหน่งที่ 2 ของประจุฟลาวิเลียม [11]

Cevallos- Casals และ Cisneros-Zevallos [12] ที่ศึกษาความคงตัวของสีในอุ่นแดง ข้าวโพดม่วง มันฝรั่งแดง และมันฝรั่งม่วง พบว่าสารสกัดจากข้าวโพดสีม่วงและอุ่นแดงซึ่งมีสารประกอบแอนโทไซยานินที่เป็น non-acylated anthocyanin เป็นส่วนใหญ่สีจะจางลงเมื่อปรับพีเอชเป็น 4-6 เพราะโครงสร้างเปลี่ยนจากประจุของ ฟลาวิลเลี่ยมที่มีสีแดงไปเป็น carbinal ที่ไม่มีสี ส่วนสารสกัดจากมันเทศสีแดงและแครอทม่วงซึ่งมีสารประกอบแอนโทไซยานิน

ที่เป็น acylated anthocyanin จะให้เฉดสีที่หลากหลายพีเอชจึงเป็นปัจจัยหนึ่งส่งผลกับโครงสร้างทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงส่งผลต่อการดูดกลืนแสง

ผลกระทบของอุณหภูมิต่อความคงตัวของสีและอัตราการสลายตัวของแอนโทไซยานิน เมื่อนำสารสกัดจากกระชายดำกับสารสกัดฟีนอลิกจากเมล็ดมะเกี๋ยงมาปรับพีเอชจะปรากฏเฉดสีต่าง ๆ โดย พีเอชที่คัดเลือกศึกษาเป็นพีเอชที่มีสีปรากฏอย่างชัดเจนนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 120 นาที โดยวัดค่าอัตราการสลายตัวของแอนโทไซยานินทุก 15 นาที พบว่าอุณหภูมิมีผลต่อความคงตัวของแอนโทไซยานินในสารสกัดที่พีเอช 5 และ 7 จะเกิดสีเหลืองน้ำตาล โดยทำให้แอนโทไซยานินที่ควรปรากฏสีแดงสลายตัว อีกทั้งทำให้อัตราการสลายตัวเพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 2 เช่นเดียวกับการศึกษาความคงตัวของแอนโทไซยานินในเครื่องดื่มที่พบว่าเมื่ออุณหภูมิในการเก็บเพิ่มขึ้นจะทำให้ความเข้มข้นของแอนโทไซยานินลดลง [13]

Table 2 Kinetic parameters for degradation of black ginger anthocyanins extracts with copigmented samples from makiang seeds (phenolic compounds) in buffered aqueous solutions pH 3, 5, 7 and heated at 70, 80, 90 °C

Temp. (°C)	pH	Time (min)	Anthocyanin (mg/100g DW)	Pigment retention (%)	ln(a)	k (10^3) (min^{-1})	$t_{1/2}$ (min)
70	3	0	22.97±0.02^{a}	100.00	0.000	0.0116	59.75±0.00^{b}
		120	20.45±0.02^{b}	89.01^{b}	-0.116		
	5	0	16.60±0.01^{f}	100.00	0.000	0.0158	43.87±0.01^{g}
		120	14.17±0.04^{k}	85.35^{g}	-0.158		
	7	0	16.59±0.02^{f}	100.00	0.000	0.0133	52.12±0.01^{c}
		120	14.53±0.03^{j}	87.58^{c}	-0.133		
80	3	0	20.29±0.03^{c}	100.00	0.000	0.0099	70.01±0.01^{a}
		120	18.38±0.01^{e}	90.58^{a}	-0.099		
	5	0	16.11±0.02^{g}	100.00	0.000	0.0140	49.51±0.02^{e}
		120	14.00±0.01^{l}	86.92^{e}	-0.140		
	7	0	14.15±0.01^{k}	100.00	0.000	0.0138	50.23±0.01^{d}
		120	12.32±0.02^{m}	87.08^{d}	-0.138		
90	3	0	18.53±0.01^{d}	100.00	0.000	0.0194	35.73±0.00^{h}
		120	15.26±0.03^{h}	82.37^{h}	-0.194		
	5	0	15.12±0.03^{i}	100.00	0.000	0.0273	25.39±0.00^{i}
		120	11.52±0.02^{o}	76.13^{i}	-0.273		
	7	0	14.15±0.01^{k}	100.00	0.000	0.0146	47.48±0.01^{f}
		120	12.23±0.02^{n}	86.43^{f}	-0.146		

$^{a, b, c...}$ Values with different letters superscripts within column are significantly different ($p < 0.05$)

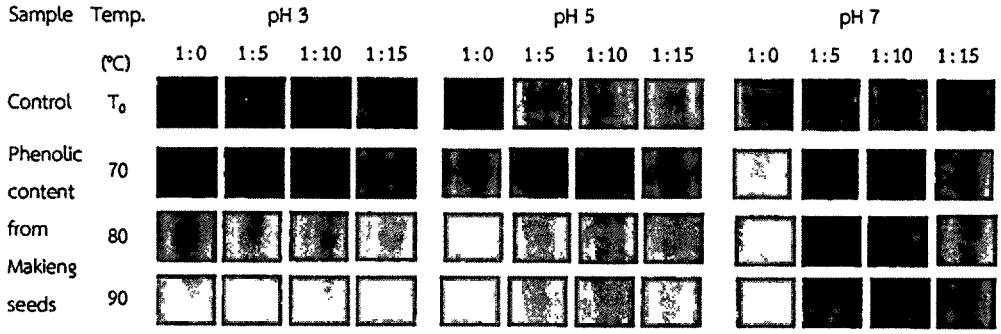

Figure 1 Photo of copigmentation on black ginger anthocyanins extracts with copigmented samples from makiang seeds (phenolic compounds) at the molar ratios of 1:0 (control), 1:5, 1:10 and 1:15 under pH 3, 5 and 7, heated at 70, 80 and 90 °C for 120 minutes.

การอธิบายเครื่องหมายในรูปที่ 2 ดังนี้ สีฟ้าแสดงถึงการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส สีส้ม ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส และสีเขียว ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เครื่องหมาย ▲ คือ ตัวอย่างควบคุมที่ไม่มีการเติมสารโคพิกเม้นต์ เครื่องหมาย × คือ ตัวอย่างที่เติมสารโคพิกเม้นต์ 5 เปอร์เซ็นต์ เครื่องหมาย ■ คือตัวอย่างที่เติมสารโคพิกเม้นต์ 10 เปอร์เซ็นต์ และเครื่องหมาย ● คือ ตัวอย่างเติมสารโคพิกเม้นต์ 15 เปอร์เซ็นต์

ผลของความเข้มข้นของสารโคพิกเม้นต์ต่อความคงตัวของแอนโทไซยานินจากกระชายดำ ที่อัตราส่วน 0 (ตัวอย่างควบคุมที่ไม่มีการเติมสารโคพิกเม้นต์), 5 ,10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ ต่อหลอดการทดลอง พบว่าเมื่อมีการทำโคพิกเมนเทชั่นร่วมกันกับแอนโทไซยานินจากกระชายดำ สารสกัดฟีนอลิกที่ได้จากเมล็ดมะเกี๋ยงสามารถเพิ่มความคงตัวของแอนโทไซยานินที่สกัดจากกระชายดำ ดังตารางที่ 1 แสดงสีที่เปลี่ยนแปลงไป จะเห็นได้ว่าเมื่อมีการใช้สารโคพิกเม้นต์จะช่วยทำให้ปริมาณ monomeric anthocyanin ที่เหลืออยู่มีความคงตัวมากขึ้น นั่นคือ อัตราการสลายตัวของแอนโทไซยานินลดลงดังแสดงในรูปที่ 2 โดยรูปที่ 2a คือ สารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 3 รูปที่ 2b คือ สารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 5 และรูปที่ 2c คือ สารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 7 แต่จะมีการเปลี่ยนแปลงของสีกลิ่น รส เมื่อเพิ่มปริมาณสารโคพิกเมนต์มากขึ้นโดยอัตราส่วนที่ให้ประสิทธิภาพสูงสุดในการเติมสารโคพิกเมนต์ คือ 15 เปอร์เซ็นต์

4. สรุป

การเกิดโคพิกเมนเทชั่นโดยใช้สารสกัดหยาบฟีนอลิกจากเมล็ดมะเกี๋ยง พบว่าที่พีเอช 3 ที่เติมสารโคพิกเมนต์ 15 เปอร์เซ็นต์ จะรักษาความคงตัวต่อการให้ความร้อนของแอนโทไซยานินได้ดีกว่าพีเอช 5 และ 7 โดยมีความคงตัวของแอนโทไซยานิน 89.575 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 18.177 มิลลิกรัม/100 กรัมแห้ง และสารฟีนอลิก 149.3 มิลลิกรัมต่อกรัมแห้ง เนื่องจากแอนโทไซยานินจะคงตัวได้ดีที่สภาวะเป็นกรดมากกว่าเบส อีกทั้งในตัวอย่างแอนโทไซยานินที่สกัดจากกระชายดำนั้น พบว่าการใช้สารสกัดฟีนอลิกจากเมล็ดมะเกี๋ยงสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาความคงตัวของแอนโทไซยานิน แต่พบว่าการให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงจะทำให้ความคงตัวของสีและอัตราการสลายตัวของแอนโทไซยานินเปลี่ยนแปลงไป

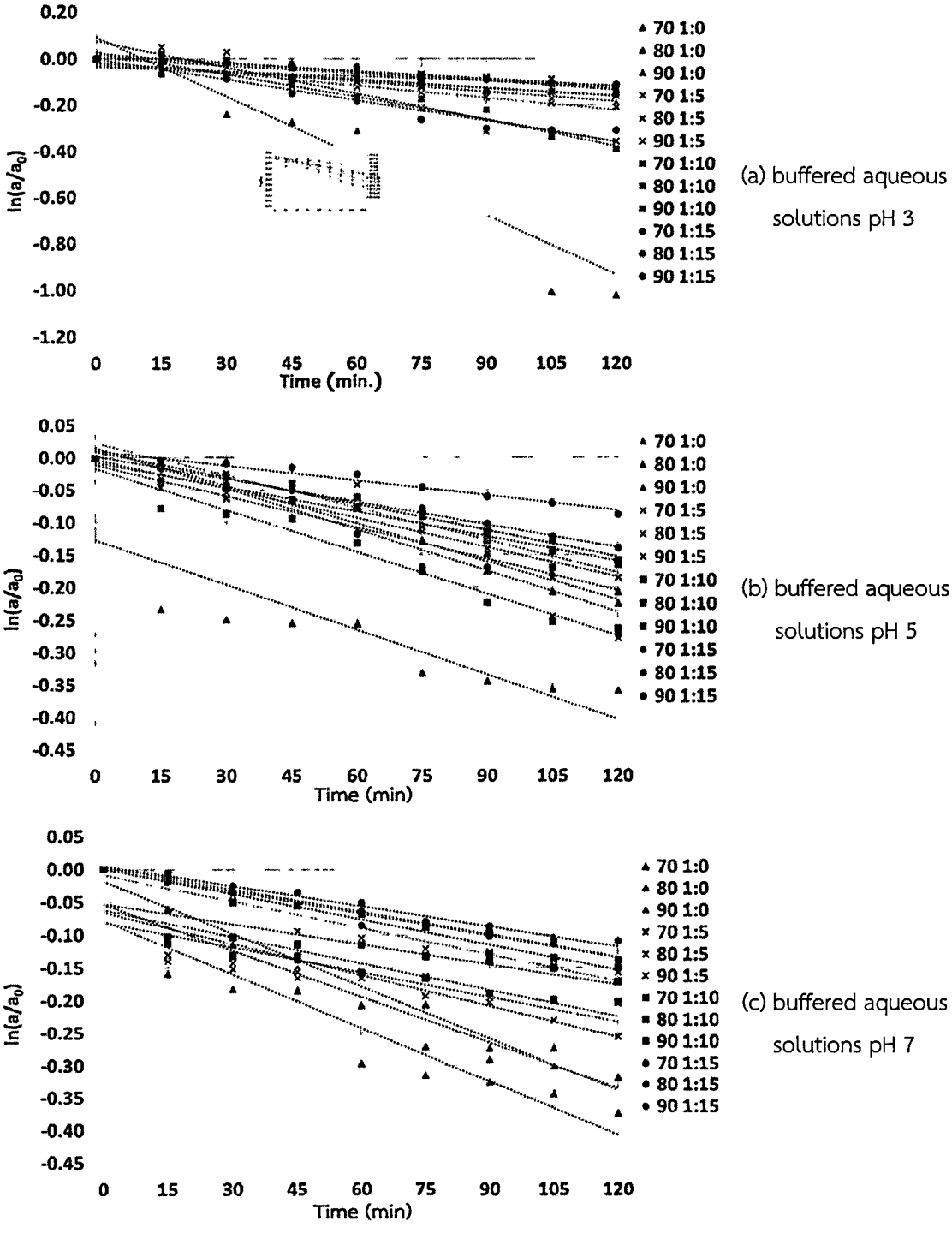

Figure 2 Kinetics plots for the anthocyanin loss of copigmentation on black ginger anthocyanins extracts with copigmented samples from makiang seeds (phenolic compounds) at the molar ratios of 1:0 (control), 1:5, 1:10 and 1:15 under pH 3, 5 and 7, heated at 70, 80 and 90 °C for 120 minutes.

5. References

[1] Daodee, S., Yenjai, C., Suttanut, C. and Supattanapong, S., 2003, Determination of flavonoids in *Kaempferia parviflora* by gas chromatographic method, Thai J. Pharm. Sci. 27(1-2): 49-57. (in Thai)

[2] Pojanagaroon, S. and Rujjanawate, C., 2006, Effect of different internal skin color of 'Kachai-Dam' (*Kaempfera parviflora*) rhizomes on adaptogenic activity, Khon Kaen Agric. J. 34(4): 286-296. (in Thai)

[3] Kongnork, M., 2013, Application of Copigmentation to Increase Stability of Pigments from Roselle and Butterfly Pea, Silpakorn University, Bangkok, 215 p.

[4] Cavacalcant, R.N., Santos, D.T. and Meireles, M.A., 2011, Non- thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems and overview, Food Res. Int. 44: 499-509.

[5] Narkprasom, K., Varith, J., Upara, U., Tanongkankit, Y. and Narkprasom, N., 2017, Optimized extraction of total phenolic compounds from *Nelumbo nucifera* Gaertn using microwave assisted extraction (MAE), KKU Sci. J. 45(2): 328-342. (in Thai)

[6] Pojanagaroon, S., Jomduang, S. and Wongpornchai, S., 2008, Study on the optimized extraction methods for raw materials and suitable mixture extracts of Krachai-Dam, Krachai and Jeougulan, Agric. Sci. J. 39(3)(Suppl): 337-340. (in Thai)

[7] Leelahemaratana, S., 2013, Determination of Phenolic Compound, Antioxdant Capacity and Stability of Anthocyanins in Mulberry Pomace Extract, Doctoral Dissertation, Kasetsart University, Bangkok, 120 p.

[8] Song, B. J., Sapper, T. N., Burtch, C. E., Brimmer, K., Goldschmidt, M. and Ferruzzi, M.G., 2013, Photo- and thermodegradation of anthocyanins from grape and purple sweet potato in model beverage systems, J. Agric. Food Chem. 61: 1364-1372.

[9] Holzwarth, M., Korhummel, S., Siekmann, T., Carle, R. and Kammerer, R. D., 2013, Influence of different pectins, process and storage conditions on anthocyanin and colour retention in strawberry jams and spreads, J. Food Sci. Technol. 52: 131-138.

[10] Cabrita, L., Fossen, T. and Andersen, Ø.M., 2000, Colour and stability of the six common anthocyanidin 3- glucosides in aqueous solution, Food Chem. 68: 101-107.

[11] Palamidis, N. and Markakis, P., 1975, Stability of grape anthocyanin in carbonated beverage, J. Food Sci. 40: 1047-1049.

[12] Cavallos- Casals, B. A. and Cisneros-Zevallos, L. , 2004, Stability of anthocyanin- based aqueous extracts of Andean purple corn and red- fleshed sweet compared to synthetic and natural colorants, J. Food Chem. 86: 69-77.

[13] Matsufuji, H., Otsuki, T., Takeda, T., Chino, M. and Takeda, M., 2003, Identification of reaction products of acylated antho cyanins from red radish with peroxyl radicals, J. Agric. Food Chem. 51: 3157-3161.