การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดแอนโทไซยานิน ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด จากข้าวไรซ์เบอร์รี่ เพื่อแปรรูปเป็นผงแอนโทไซยานิน

Optimizing Conditions for Anthocyanin Extraction, Antioxidant Activity, and Total Phenolic Content from Riceberry Rice for Anthocyanin Powder Processing

ศรัญญา มณีทอง และ ธัญพรรณ ฮ่อบรรทัด*

Sarunya Maneetong and Thanyapan Hobanthad

สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์

Chemistry Program, Faculty of Science, Buriram Rajabhat University

*Email: thanyapan.ht@bru.ac.th

Received : April 6, 2023
Revised : November 7, 2023
Accepted : December 8, 2023

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดแอนโทไซยานินจากข้าวไรซ์เบอร์รี่ให้ได้ปริมาณสารแอนโทไซยานิน และมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด เพื่อนำสารสกัดที่ได้ไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ผงแอนโทไซยานิน จากผลการวิจัยพบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดข้าว โดยใช้อัตราส่วนของข้าวไรซ์เบอร์รี่ต่อน้ำสะอาดเป็น 1:5 คือ การสกัดโดยวิธีให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ได้ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ และ เพลาร์โกนิดิน-3-กลูโคไซด์ เท่ากับ 37.950$\pm$4.809 และ 20.188$\pm$2.556 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (IC_{50} 97.87 มิลลิกรัมต่อลิตร) ABTS (2.58 มิลลิโมลาร์ Trolox/กรัม sample) และ FRAP (74.70 มิลลิกรัมต่อลิตร Fe^{2+}/กรัม sample) และมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (264.74 มิลลิกรัมต่อลิตร) สูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดแบบไม่ให้ความร้อน นอกจากนี้ยังได้ศึกษาการทำให้เป็นผงด้วยกระบวนการอบแห้ง (Tray dry) และทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dry) พบว่าผงแอนโทไซยานินที่ผ่านการทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่า ดังนั้นจากผลการวิจัยครั้งนี้ พบว่าสามารถนำสารสกัดแอนโทไซยานินจากข้าวไรซ์เบอร์รี่ไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ผงแอนโทไซยานิน เพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารต่อไปได้

คำสำคัญ: แอนโทไซยานิน ข้าวไรซ์เบอร์รี่ ผง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

Abstract

This research investigated the optimal conditions for extracting anthocyanin from Riceberry rice to attain the highest anthocyanin and antioxidant activity levels. The Riceberry rice extracts were further processed into anthocyanin powder products. The optimal extraction conditions, utilizing a Riceberry rice-to-water ratio of 1:5 and heating at 90 °C for 15 minutes, yielded the highest amounts of cyanidin-3-glucoside and pelargonidin-3-glucoside at 37.950±4.809 and 20.188±2.556 mg/L, respectively. The experimental outcomes were in line with the results of DPPH (IC50 97.87 mg/L), ABTS (2.58 mmolar Trolox/g sample), and FRAP (74.70 mg/L Fe2+/g sample) assays. Total phenolic content was highest (264.74 mg/L) compared to the non-thermal extraction method. Additionally, the powdering process (tray drying and freeze-drying) was explored. The results indicated that freeze-dried anthocyanin powder exhibited superior antioxidant activity. Consequently, this research concludes that anthocyanin extracted from Riceberry rice can be processed into anthocyanin powder products, suggesting potential development as a dietary supplement.

Keywords: Anthocyanin, Riceberry rice, powder, Antioxidant activity

บทนำ

จังหวัดบุรีรัมย์ เป็นพื้นที่ที่ประกอบไปด้วยภูเขาไฟ 6 ลูก ซึ่งส่งผลให้ดินบริเวณที่เดิมทีเป็นภูเขาไฟมักประกอบไปด้วยแร่ธาตุที่เกิดจากลาวาที่ปะทุจากภูเขาไฟที่ดับสนิทออกมา โดยมีแร่ธาตุที่สำคัญเป็นองค์ประกอบ ตัวอย่างเช่น ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม แคลเซียมแมกนีเซียม กำมะถัน เหล็ก ทองแดง แมงกานีส สังกะสี โบรอน โมลิบดินั่ม ซิลิก้า เป็นต้น ซึ่งเป็นสารอาหารที่สำคัญสำหรับพืชและสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ (มนตรี บุญจรัส, 2565) ทำให้ในพื้นที่จังหวัดบุรีรัมย์มีการปลูกข้าวเป็นจำนวนมาก โดยข้าวที่มีชื่อเสียงคือ ข้าวหอมมะลิดินภูเขาไฟ และข้าวที่เป็นที่นิยมอีกหนึ่งชนิด คือ ข้าวไรซ์เบอร์รี่ ซึ่งมีสารสำคัญ คือ แอนโทไซยานิน ที่เป็นรงควัตถุสีม่วง เป็นสารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงช่วยในการต้านอนุมูลอิสระ มีรายงานแอนโทไซยานินที่อยู่ในรูปผงจากเปลือกขององุ่น จากอุตสาหกรรมไวน์ได้รับการอนุญาตให้ใช้เป็นสีผสมอาหารในหลาย ๆ ประเทศทั่วโลก (Hendry, 1996) เนื่องจากแอนโทไซยามีสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) นอกจากนี้ แอนโทไซยานิน ยังมีบทบาทต่อการป้องกันการเกิดโรคต่าง ๆ เช่น โรคหัวใจ โรคเกี่ยวกับหลอดเลือด โรคเบาหวาน ลดอาการอักเสบ ช่วยปกป้องหลอดเลือด

กระตุ้นการไหลเวียนของเลือด ลดคอเลสเตอรอลในเลือด ป้องกันมะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งลำไส้ ตับ มะเร็งเม็ดเลือดขาว และมะเร็งของระบบสืบพันธุ์ ยับยั้งเชื้ออีโคไลในทางเดินอาหารที่ทำให้เกิดท้องเสีย และต้านไวรัสได้ (นิศารัตน์ ศิริวัฒนเมธานันท์, 2556) และยังมีงานวิจัยที่ได้ให้ความสนใจเกี่ยวกับแอนโทไซยานินในพืช ผัก ผลไม้ ได้แก่ การหาปริมาณแอนโทไซยานินและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ในข้าวเหนียวก่ำพันธุ์พื้นเมือง 19 พันธุ์ (สุภาภรณ์ ญะเมืองมอญ และชนากานต์ เทโบลต์ พรมอุทัย, 2559) การหาปริมาณแอนโทไซยานินในมะม่วงหาวมะนาวโห่ระยะผลสุกงอม (สุภาพร ฟักเงินและศิรประภา มีรอด, 2560) และการศึกษาการสกัดสารแอนโทไซยานินจากซังข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วง (ฐานิดา รองสพุรรณ์ และสมใจ ขจรชีพพันธุ์งาม, 2562) ซึ่งจะเห็นได้ว่าแอนโทไซยานินมีประโยชน์เป็นอย่างมาก

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะแปรรูปสารสกัดแอนโทไซยานินจากข้าวไรซ์เบอรี่ ซึ่งเป็นหนึ่งในพืชเศรษฐกิจของจังหวัดบุรีรัมย์ โดยทำการแปรรูปให้เป็นชนิดผง เพื่อใช้เป็นสีแทนสีสังเคราะห์ หรือเพื่อพัฒนาเป็นใช้เติมแต่งในอาหารเสริมคุณค่าทางโภชนาการ โดยศึกษาการสกัดแอนโทไซยานินจากข้าวไรซ์เบอร์รี่ ศึกษากระบวนการทำให้เป็นผง และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ABTS และ FRAP และทำการการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

วิธีการดำเนินงานวิจัย

ตัวอย่างและวิธีการเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างข้าวไรซ์เบอร์รี่ จากกลุ่มวิสาหกิจข้าวหอมมะลิอินทรีย์บ้านหนองกก อำเภอโนนดินแดง จังหวัดบุรีรัมย์ กำจัดฝุ่นหรือรำข้าวออกจากข้าวไรซ์เบอร์รี่ โดยใช้ตะแกรงร่อนขนาด 20 mesh ก่อนนำไปวิเคราะห์

สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองมีดังนี้ โทล็อกซ์ ((trolox) 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramathylchroman-2-carboxylic acid) ดีพีพีเอช (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) เอบีทีเอช (2,2’-azinobis(3-ethylbenzothai zoline-6-sulfonic acid)) ทีพีทีแซด (2,4,6-tri (2-pyridyl)-s-triazine) จากบริษัท sigma-aldrich เฟอรัสซัลเฟต (Ferrous sulphate) และโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (di-sodium hydrogen orthophosphate) จากบริษัท APS finechem โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride) โพแทสเซียมคลอไรด์ (potassium chloride) โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (di-potassium hydrogen orthophosphate) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) และโซเดียมอะซิเตท (sodium acetate) จากบริษัท ajax finechem กรดไฮโดรคลอริก (ydrocloric acid)

จากบริษัท ACl Labscan และเฟอริกไตรคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต (Iron (III) chloride hexahydrate) จากบริษัท QReC โดยใช้น้ำกลั่น (Distilled water) ในการเตรียมสารละลายตลอดงานวิจัย

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัด

ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดแอนโทไซยานิน คือ ศึกษากระบวนการสกัด โดยเปรียบเทียบ 2 วิธี คือ การสกัดโดยให้ความร้อน และการสกัดโดยไม่ให้ความร้อน

1. การสกัดโดยให้ความร้อน

นำข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่ร่อนแล้ว มาทำการสกัดด้วยตัวทำละลาย คือ น้ำกลั่น ในอัตราส่วนข้าวไรซ์เบอรรี่ต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1:5 คือ ชั่งข้าวไรซ์เบอร์รี่ 50 กรัม ใส่ในภาชนะ ขนาด 500 มิลลิลิตร แล้วเติมตัวทำละลาย 250 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

2. การสกัดโดยไม่ให้ความร้อน

นำข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่ร่อนแล้ว มาทำการสกัดด้วยตัวทำละลาย คือ น้ำกลั่น ในอัตราส่วนข้าวไรซ์เบอรรี่ต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1:5 คือ ชั่งข้าวไรซ์เบอร์รี่ 50 กรัม ใส่ในภาชนะ ขนาด 500 มิลลิลิตร แล้วเติมตัวทำละลาย 250 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน จากนั้นทำการแช่ ที่เวลา 3 6 และ 12 ชั่วโมง ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

เมื่อครบกำหนดเวลาของทั้งสองวิธี นำสารสกัดที่ได้มากรองเอาข้าวออกก่อนด้วยตระแกรงขนาด 20 mesh และกรองอีกครั้งด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 จากนั้นเก็บสารสกัดไว้ในขวดพลาสติกเพื่อนำไปทำการวิเคราะห์ต่อไป

การวิเคราะห์หาปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (Total Anthocyanin Content หรือ TAC)

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด ด้วยวิธีพีเอช-ดิฟเฟอเรนเชียล โดยวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดด้วยเครื่องยูวี-วิสซิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Lamda XLS; Perkin Elmer ประเทศสหรัฐอเมริกา) ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร และ 700 นาโนเมตร ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 1.0 ที่เตรียมจากสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ (potassium chloride; KCl) ความเข้มข้น 0.025 โมลาร์ และบัฟเฟอร์ pH 4.5 เตรียมจากสารละลายโซเดียมอะซีเตทความเข้มข้น 0.4 โมลาร์ ทำการปรับค่าพีเอชด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid; HCl) (Jungmin, et. al., 2005) โดยผสมสารสกัดและบัฟเฟอร์ทิ้งไว้ 10 นาที ก่อนวิเคราะห์ ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาคำนวณหาปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (TAC) โดยคำนวณจากสมการ

$$TAC = (A \times MW \times DF \times 1000) / (\varepsilon \times L) \quad (1)$$

เมื่อ A = $(A_{520\ nm} - A_{700\ nm})$pH 1.0 - $(A_{520\ nm} - A_{700\ nm})$pH 4.5

MW = ค่ามวลโมเลกุลของไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ 499.2 กรัมต่อโมล
ค่ามวลโมเลกุลของเพลาร์โกนิ ดิน-3-กลูโคไซด์ 306.7 กรัมต่อโมล

DF = dilution factor (ปริมาตรรวมของสารละลาย÷ปริมาตรของสารสกัด)

ε = โมลาร์แอบซอบติวิตี ค่านี้จะขึ้นกับชนิดของแอนโทไซยานิน และตัวทำละลายโดยทั่วไป
ใช้ค่า ของไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ และเพลาร์โกนิดิน-3-กลูโคไซด์ในสารละลายบัฟเฟอร์
pH 1.0 มีค่า เท่ากับ 26,900 และ 31,100 ลิตรต่อโมลต่อเซนติเมตร ตามลำดับ

L = ขนาดความกว้างของคิวเวต (เซนติเมตร) ที่ใช้วัดค่าดูดกลืนแสง

การวิเคราะห์หาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

1. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH assay)

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารมาตรฐานโทรล็อกซ์ (Trolox) ความเข้มข้น 125 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการปิเปตสารมาตรฐาน Trolox ความเข้มข้น 125 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 32 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 9,500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ ทำการปิเปตสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย DPPH ปริมาตร 3,900 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร จากนั้นคำนวณหาค่า %scavenging โดยคำนวณ % scavenging จากสูตรคำนวณสมการที่ (2)

$$\%\ scavenging = [(A_{Control} - A_{Sample})/ A_{Control}] \times 100 \quad (2)$$

กำหนดให้ $A_{Control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุม

A_{Sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS assay)

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารมาตรฐานโทรล็อกซ์ (Trolox) ความเข้มข้น 125 มิลลิกรัมต่อลิตรทำการปิเปตสารมาตรฐาน Trolox ความเข้มข้น 125 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมกับเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และผสมกับสารละลาย ABTS ปริมาตร 5,000 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ ทำการปิเปตสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมกับเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร และสารละลาย ABTS ปริมาตร 5,000 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืน ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร โดยคำนวณ % scavenging จากสูตรคำนวณสมการที่ (2)

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ Ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay

โดยเตรียมสารละลาย FRAP reagent (สุชาดา มานอก และปวีณา ลิ้มเจริญ, 2558) ซึ่งประกอบไปด้วย 1) อะซิเตทบัฟเฟอร์ (pH 3.6) ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ 2) TPTZ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น40 มิลลิโมลาร์ 3) $FeCl_3.6H_2O$ ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ผสมในอัตราส่วน 10:1:1 ตามลำดับ โดยต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งเมื่อทำการทดลอง ในการทดลองนำสารสกัดตัวอย่าง 50 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำปราศจากไอออน 150 ไมโครลิตร และ FRAP reagent 1.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 593 นาโนเมตร คำนวณหาความสามารถในการให้อิเล็กตรอน (ค่า FRAP value) โดยเปรียบเทียบค่าที่ได้กับกราฟมาตรฐาน Ferrous sulfate ($FeSO_4$) แสดงค่าในรูปของมิลลิโมลาร์สมมูลย์ของ Fe^{2+}/กรัมสารสกัด (mM Fe^{2+} equivalent/g sample extract)

4. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธีโฟลิน-ซิโอแคลธู (Folin-Ciocalteu assay)

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารมาตรฐานกรดแกลลิค (Gallic acid) ทำการปิเปตสารมาตรฐานกรดแกลลิคที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 1,000 2,000 3,000 4,000 และ 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย Folin-Ciocalteu ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 3 นาทีในที่มืด จากนั้นเติมสารละลาย โซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแส ที่ความยาวคลื่น 731 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าที่วัดได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแกลลิค

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ ทำการปิเปตสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย Folin-Ciocalteu ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ปริมาตร 1,250 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 3 นาที ในที่มืด เติมโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 731 นาโนเมตร จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดโดยนำค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่วัดได้เทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิค

ศึกษากระบวนการแปรรูปสารสกัดแอนโทไซยานินให้เป็นผง

1. ศึกษากระบวนการทำให้เป็นผง

ในการศึกษากระบวนการทำให้เป็นผงได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบ 2 คือ การให้เป็นผงด้วยวิธีอบแห้ง (Tray dry) และทำให้เป็นผงด้วยวิธีให้เป็นผงด้วยวิธีแช่เยือกแข็ง (Freeze dry)

การทำให้เป็นผงด้วยวิธีอบแห้งปรับปรุงจาก Gupta, et. al. (2013) โดยนำสารสกัดแอนโทไซยานินมาอบให้ความร้อนที่ 70 องศาเซลเซียส จนตัวทำละลายระเหยแห้ง

การทำให้เป็นผงด้วยวิธีให้เป็นผงด้วยวิธีแช่เยือกแข็ง โดยนำสารสกัดแอนโทไซยานินมาแช่แข็ง สารละลายตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นระเหิดตัวทำละลายที่ความดัน 200 mmTorr อุณหภูมิ -50 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่องแช่เยือกแข็ง (FTS SYSTEMS FD-3-85A-MP; FLEXI-DRY MP ประเทศสหรัฐอเมริกา)

2. ศึกษากระบวนการทำให้เป็นผงโดยการเติมสารทำให้แห้ง

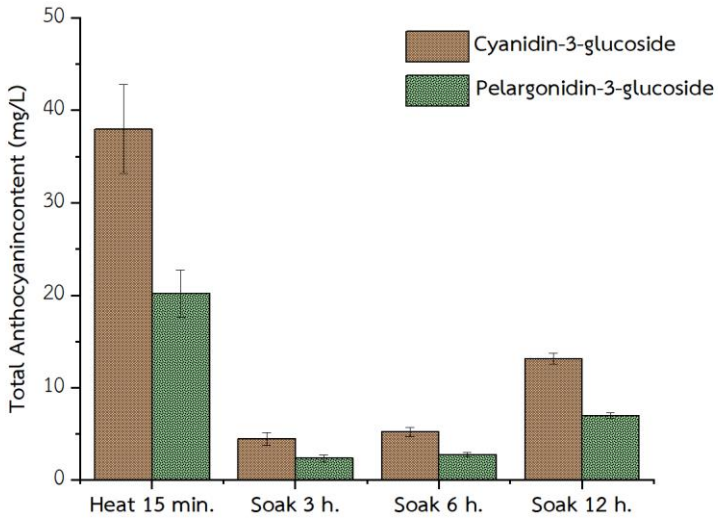
นำสารสกัดแอนโทไซยานิน เติมสารทำให้แห้งได้แก่ มอลโตสเดรกตริน (Moltose dextrin) ในอัตราส่วนสารทำให้แห้งต่อสารสกัดแอนโทไซยานิน 1:2 โดยมวล และเติมโซเดียมอัลจิเนต (Sodium alginate) ในอัตราส่วน 1:4 โดยมวล ทำให้แห้งด้วยวิธีการอบแห้ง เปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพกับผงแอนโทไซยานินที่ไม่เติมสารเพิ่มเนื้อ และวิเคราะห์ค่าสีของแอนโทไซยานิน ด้วยเครื่องวัดสี (ColorFlex EZ; Hunter Lab ประเทศสหรัฐอเมริกา)

ผลการวิจัย

ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัด

ในการศึกษาสภาวะที่เหมาสมต่อการสกัดแอนโทไซยานิน คือ ศึกษากระบวนการสกัด โดยเปรียบเทียบ 2 วิธี คือ การสกัดโดยให้ความร้อน และการสกัดโดยไม่ให้ความร้อน และเปรียบเทียบปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (Total Anthocyanin Content หรือ TAC) ที่ได้จากสารสกัดในรูปของไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร) และเพลาร์โกนิดิน-3-กลูโคไซด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร) โดยปริมาณ

แอนโทไซยานินทั้งหมดที่ได้จากการสกัดโดยให้ความร้อนที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที การสกัดโดยไม่ให้ความร้อนโดยแช่แบบธรรมดา ที่เวลา 3 6 และ 12 ชั่วโมง ผลการวิเคราะห์หาปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดจากการสกัดในแต่ละวิธีแสดงในภาพประกอบ 1



ภาพประกอบ 1 ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดจากการสกัด

จากผลการทดลองพบว่า การสกัดแอนโทไซยานินจากข้าวไรซ์เบร์รี่โดยใช้ความร้อนให้ปริมาณแอนโทไซยานินสูงที่สุด โดยได้ ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ และ เพลาร์โกนิดิน-3-กลูโคไซด์ เท่ากับ 37.950$\pm$4.809 และ 20.188$\pm$2.556 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อเทียบกับการแช่โดยไม่ให้ความร้อน ซึ่งในการไม่ให้ความร้อน เมื่อทำการแช่ตัวอย่างเป็นเวลานานจะได้แอนโทไซยานินสูงที่สุด

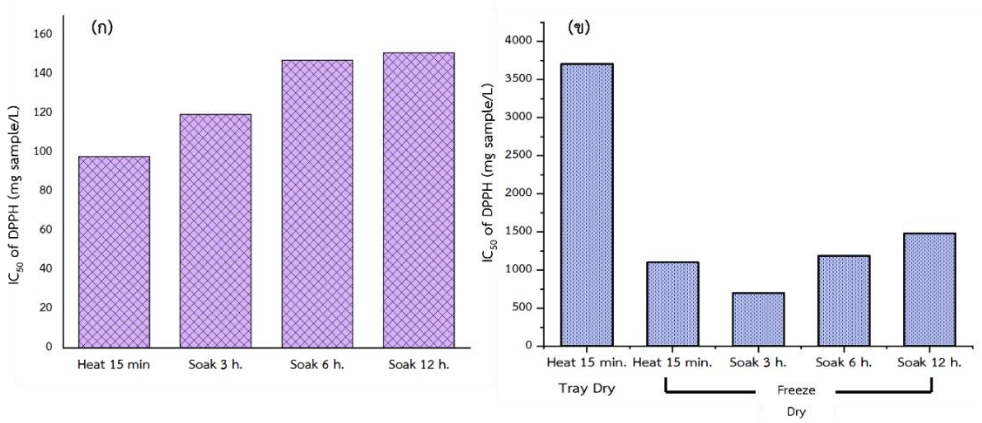
ผลการวิเคราะห์หาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

1. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH assay)

ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช ในตัวอย่างสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่ได้จากการสกัดโดยให้ความร้อนและการสกัดโดยไม่ให้ความร้อน โดยในการศึกษาได้เตรียมตัวอย่างสารสกัด 2 แบบ คือ แบบที่เป็นสารละลายและแบบทำให้แห้งด้วยการแช่เยือกแข็ง โดยการหาค่า IC_{50} การทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช ซึ่งได้กราฟแสดงร้อยละการยับยั้ง (%scavenging) ของสารสกัดด้วยการสกัดแบบให้ความร้อน 15 นาที และสารสกัดแบบไม่ให้ความร้อนที่ระยะเวลา 3 6 และ 12 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อคำนวณหาค่า IC_{50} พบว่าการเตรียมตัวอย่างสารสกัดแบบเป็นสารละลายโดยการสกัดแบบให้ความร้อน 15 นาที สารสกัดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการ

ทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอชดีสูงที่สุด โดยมีค่า IC_{50} 97.87 มิลลิกรัมต่อลิตร รองลงมาจะเป็นสารสกัดแบบไม่ให้ความร้อนที่ระยะเวลา 3 6 และ 12 ชั่วโมง มีค่า 119.46 147.18 และ 151.03 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในภาพประกอบ 2 (ก)

ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช ในตัวอย่างสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่แบบทำให้แห้ง แบบอบแห้งของสารสกัดด้วยความร้อน และทำให้แห้งด้วยการแช่เยือกแข็ง โดยการหาค่า IC_{50} พบว่าตัวอย่างที่สกัดโดยไม่ใช้ความร้อนที่ระยะเวลาการสกัด 3 ชั่วโมง สารสกัดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอชดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} 701.01 มิลลิกรัมต่อลิตร รองลงมาเป็นตัวอย่างที่สกัดโดยให้ความร้อน 15 นาที ตัวอย่างที่สกัดโดยไม่ให้ความร้อน 6 ชั่วโมง 12 ชั่วโมง และตัวอย่างอบแห้ง ตามลำดับ ดังแสดงในภาพประกอบ 2 (ข)

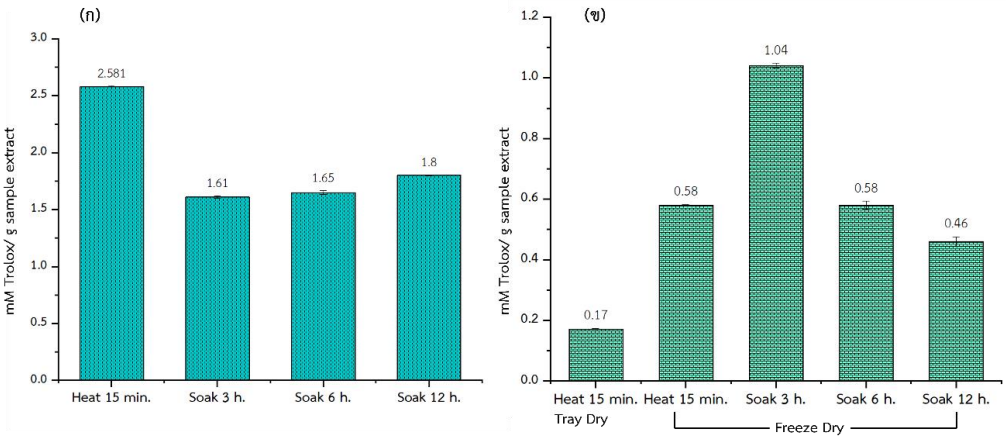


ภาพประกอบ 2 ค่า IC_{50} ของสารสกัดตัวอย่างข้าวไรซ์เบอร์รี่ (ก) และสารสกัดตัวอย่างข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่ทำให้แห้งด้วยการอบแห้งและแช่เยือกแข็ง (ข) จากสภาวะการสกัดแตกต่างกัน

2. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS assay)

ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระเอบีทีเอส ในตัวอย่างสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่ได้จากการสกัดโดยให้ความร้อนและการสกัดโดยไม่ให้ความร้อน ผลการทดลองพบว่าการเตรียมตัวอย่างสารสกัดแบบเป็นสารละลายโดยการสกัดแบบให้ความร้อน 15 นาที สารสกัดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเอบีทีเอสสูงที่สุด โดยมีค่า 2.58 มิลลิโมลาร์ Trolox/กรัม sample รองลงมาจะเป็นสารสกัดแบบไม่ให้ความร้อนที่ระยะเวลา 12 6 และ 3 ชั่วโมง ตามลำดับ ดังแสดงในภาพประกอบ 3 (ก) และผลการเตรียมตัวอย่างแบบที่ทำให้แห้งพบว่า ตัวอย่างที่สกัดโดยไม่ใช้ความร้อนที่ระยะเวลาการสกัด 3 ชั่วโมง ที่ผ่านการทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็งสารสกัดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเอบีทีเอสสูงที่สุด โดยมีค่า 1.04 มิลลิโมลาร์ Trolox/กรัม sample รองลงมาเป็นตัวอย่างที่สกัดโดยให้ความร้อน 15 นาที

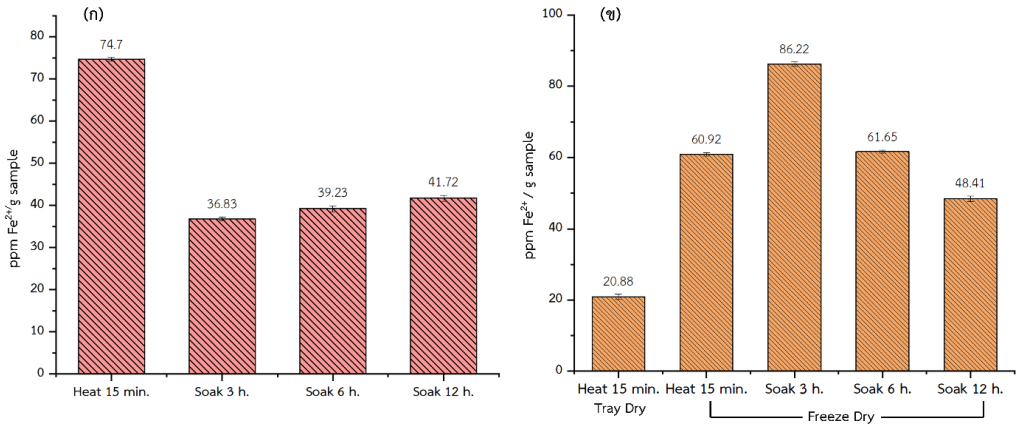
ตัวอย่างที่สกัดโดยไม่ให้ความร้อน 6 ชั่วโมง 12 ชั่วโมง และตัวอย่างอบแห้ง ตามลำดับ ดังแสดงในภาพประกอบ 3 (ข)



ภาพประกอบ 3 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเอบีทีเอสของสารสกัดตัวอย่างข้าวไรซ์เบอร์รี่ (ก) สารสกัดตัวอย่างข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่ทำให้แห้ง (ข) ที่สภาวะการสกัดแตกต่างกัน

3. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric Reducing Ability Power (FRAP) assay

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay ในตัวอย่างสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่ได้จากการสกัดโดยให้ความร้อนและการสกัดโดยไม่ให้ความร้อน พบว่า การเตรียมตัวอย่างสารสกัดแบบเป็นสารละลายโดยการสกัดแบบให้ความร้อน 15 นาที สารสกัดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay สูงที่สุด โดยมีค่า 74.70 มิลลิกรัมต่อลิตร Fe^{2+}/กรัม sample รองลงมาจะเป็นสารสกัดแบบไม่ให้ความร้อนที่ระยะเวลา 12 6 และ 3 ชั่วโมง ตามลำดับ ดังแสดงในภาพประกอบ 4 (ก) และผลการเตรียมตัวอย่างแบบที่ทำให้แห้ง พบว่าตัวอย่างที่สกัดโดยไม่ใช้ความร้อนที่ระยะเวลาการสกัด 3 ชั่วโมง ที่ผ่านการทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็งสารสกัดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay สูงที่สุด โดยมีค่า 80.22 มิลลิกรัมต่อลิตร Fe^{2+}/กรัม sample รองลงมาเป็นตัวอย่างที่สกัดโดยไม่ให้ความร้อน 6 ชั่วโมง ตัวอย่างที่สกัดโดยให้ความร้อน 15 นาที ตัวอย่างที่สกัดโดยไม่ให้ความร้อน 12 ชั่วโมง และตัวอย่างอบแห้ง ตามลำดับ ดังแสดงในภาพประกอบ 4 (ข)



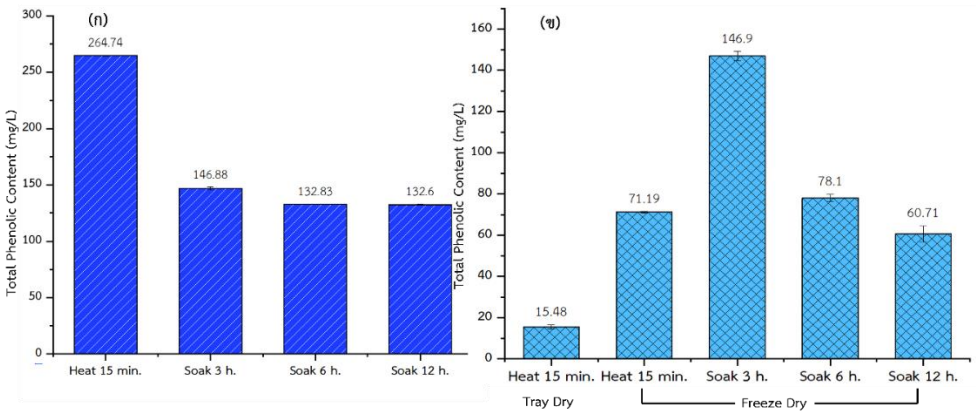
ภาพประกอบ 4 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ของสารสกัดตัวอย่างข้าวไรซ์เบอร์รี่ (ก) และ สารสกัดตัวอย่างข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่ทำให้แห้ง (ข) ที่สภาวะการสกัดแตกต่างกัน

3.4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธีโฟลิน-ซิโอแคลธู (Folin-Ciocalteu assay)

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ในตัวอย่างสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่ได้จากการสกัดโดยให้ความร้อนและการสกัดโดยไม่ให้ความร้อน โดยในการศึกษาได้เตรียมตัวอย่างสารสกัด 2 แบบ โดยเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของสารมาตรฐานแกลลิคแอซิด พบว่าการเตรียมตัวอย่างสารสกัดแบบเป็นสารละลายโดยการสกัดแบบให้ความร้อน 15 นาที สารสกัดมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด โดยมีค่า 264.74 มิลลิกรัมต่อลิตร รองลงมาจะเป็นสารสกัดแบบไม่ให้ความร้อนที่ระยะเวลา 3 6 และ 12 ชั่วโมง ตามลำดับ ดังแสดงในภาพประกอบ 5 (ก) และผลการเตรียมตัวอย่างแบบที่ทำให้แห้งพบว่า ตัวอย่างที่สกัดโดยไม่ใช้ความร้อนที่ระยะเวลาการสกัด 3 ชั่วโมง โดยทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็งมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด โดยมีค่า 146.90 มิลลิกรัมต่อลิตร รองลงมาเป็นตัวอย่างที่สกัดโดยไม่ให้ความร้อน 6 ชั่วโมง ตัวอย่างที่สกัดโดยให้ความร้อน 15 นาที ตัวอย่างที่สกัดโดยไม่ให้ความร้อน 12 ชั่วโมง และตัวอย่างอบแห้ง ตามลำดับ ดังแสดงในภาพประกอบ 5 (ข)

จากผลการวิเคราะห์หาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในแต่ละวิธี พบว่าให้ผลการทดลองเป็นไปในทำนองเดียวกัน คือฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดที่ยังไม่ผ่านการทำให้เป็นผง การสกัดด้วยความร้อนให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณแอนโทไซยานินจากสารสกัด ในส่วนฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผงแอนโทไซยานิน พบว่ากระบวนการทำให้เป็นผงแบบแช่เยือกแข็ง ซึ่งไม่ผ่านการให้ความร้อนให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่า การทำให้เป็นผงโดยการอบแห้ง ซึ่งเป็นการให้ความร้อนสูง

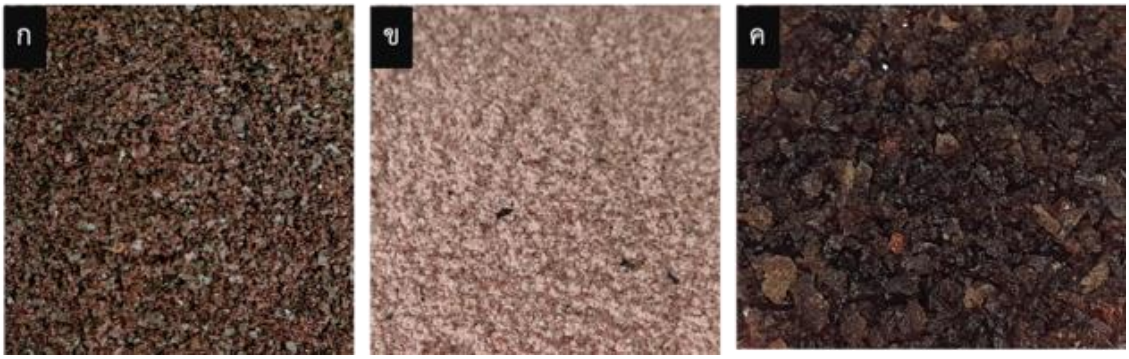
เป็นเวลานาน ทำให้สารประกอบแอนโทไซยานินเกิดการสลายตัว แต่อย่างไรก็ตามคณะผู้วิจัยยังเลือกกระบวนการทำให้แห้งแบบอบแห้งไปวิเคราะห์ต่อ เนื่องจากการทำให้แห้งโดยกระบวนการนี้มีวัสดุอุปกรณ์ที่ไม่ยุ่งยาก และมีราคาไม่แพง เหมาะสำหรับกลุ่มวิสาหกิจชุมชนจะนำไปงานต่อไป



ภาพประกอบ 5 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดตัวอย่างข้าวไรซ์เบอร์รี่ (ก) และสารสกัดตัวอย่างข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่ทำให้แห้ง (ข) ที่ภาวะการสกัดแตกต่างกัน

ผลการแปรรูปสารสกัดแอนโทไซยานินจากข้าวไรซ์เบอรี่ ให้อยู่ในรูปของผงแอนโทไซยานิน

ในการแปรรูปสารสกัดแอนโทไซยานินจากข้าวไรซ์เบอรี่ ให้อยู่ในรูปของผงแอนโทไซยานิน และแคปซูลนั้น ได้ศึกษาสารทำให้แห้งในการแปรรูปผงแอนโทไซยายนิน เพื่อศึกษาลักษณะทางกายภาพของผงแอนโทไซยานิน ที่ได้จากการเติมไม่เติมและเติมสารทำให้แห้ง ซึ่งสารทำให้แห้งที่ใช้ศึกษาในงานวิจัยนี้คือ มอลโตสเดรกตริน (Moltose dextrin) และเติมโซเดียมอัลจิเนต (Sodium alginate) ซึ่งให้ผลการทดลองดังภาพประกอบ 6 และค่าสีของผงแอนโทไซยานินทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ แอนโทไซยานินบริสุทธิ์ แอนโทไซยานินที่เติมมอลโตสเดรกตริน แอนโทไซยานินที่เติมโซเดียมอัลจิเนต เป็นดังตารางที่ 1 พบว่าสีของผงแอนโทไซยานินที่ไม่เติมสารทำให้แห้ง มีสีใกล้เคียงกับตัวอย่างข้าวไรซ์เบอร์รี่เริ่มต้นมากที่สุด เหมาะสำหรับนำไปใช้เป็นสีทดแทน หรือเติมแต่งอาหารมากที่สุด



ภาพประกอบ 6 ลักษณะทางกายภาพของผงแอนโทไซยานินที่ไม่เติมสารทำให้แห้ง (ก) เติมสารทำให้แห้งมอลโตสเดรกตริน (ข) และเติมโซเดียมอัลจิเนต (ค)

ตารางที่ 1 แสดงค่าสีของผงแอนโทไซยานิน

ตัวอย่างผงแอนโทไซยานิน	L*	a*	b*	สี
ไม่เติมสารทำให้แห้ง	17.74±0.19	3.83±0.56	2.13±0.30	สีม่วง
เติมมอลโตสเดรกตริน	50.13±0.33	8.78±0.18	8.12±0.31	สีชมพู
เติมโซเดียมอัลจิเนต	40.33±0.66	5.86±0.16	6.77±0.16	สีม่วง

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาวิธีการสกัดแอนโทไซยานินที่เหมาะสม และคงคุณค่าทางโภชนาการพบว่า การสกัดแอนโทไซยานินจากข้าวไรซ์เบอร์รี่แบบสารละลายที่ใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที ให้ปริมาณแอนโทไซยานินสูงที่สุด และสอดคล้องกับผลการศึกษาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดแอนโทไซยานินด้วยวิธี DPPH ABTS และ FRAP และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้อนุมูลอิสระดีพีพีเอชลดลง 50% (IC_{50}) ในส่วนการเตรียมตัวอย่างแบบให้เป็นผง พบว่าสารสกัดมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าสารสกัดก่อนแปรรูป เนื่องจากตัวอย่างผ่านการแปรรูปซึ่งผ่านขั้นตอนเพิ่มมากขึ้น ซึ่งส่งผลให้ปริมาณแอนโทไซยานินและกลุ่มสารสำคัญนั้นเสียสภาพไป

จากผลการศึกษาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดแอนโทไซยานินด้วยวิธี DPPH ABTS และ FRAP ในสารสกัดแอนโทไซยานินจากข้าวไรซ์เบอร์รี่นั้น สอดคล้องกับผลการศึกษาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ABTS และ FRAP ในสารสกัดแอนโทไซยานินจากพืชชนิดอื่น เช่น สารสกัดแอนโทไซยานินจากข้าวเหนียวก่ำพันธุ์

พื้นเมือง (สุภาภรณ์ ญะเมืองมอญ และชนากานต์ เทโบลต์ พรมอุทัย, 2559) ปริมาณแอนโทไซยานินและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์กระยาสารทข้าวพองสมุนไพร (รีนาประกา กลางนภา และคณะ, 2564) และแอนโทไซยานินจากซังข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วง (ฐานิดา รองสุพรรณ์ และ สมใจ ขจรชีพพันธุ์งาม, 2562) ซึ่งจากผลการวิจัยที่เหล่านี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดแอนโทไซยานินจากพืชชนิดต่าง ๆ มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้เป็นอย่างดี และผลจากการศึกษาค่าสีของผงสารสกัดแอนโทไซยานิน พบว่าสีของผงแอนโทไซยานินที่ไม่เติมสารทำให้แห้ง มีสีใกล้เคียงกับตัวอย่างข้าวไรซ์เบอร์รี่เริ่มต้นมากที่สุด ซึ่งเหมาะที่จะนำสารสกัดแอนโทไซยานินไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ไม่ว่าจะเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร สีผสมอาหาร หรือ เป็นส่วนประกอบในการทำขนม เพื่อเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการให้กับผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์ พ.ศ. 2565

เอกสารอ้างอิง

ฐานิดา รองสุพรรณ์ และสมใจ ขจรชีพพันธุ์งาม. (2562). ปริมาณแอนโทไซยานิน ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากซังข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงด้วยวิธีการสกัดแบบอัลตราโซนิก. *วารสารวิจัยราชภัฏพระนคร สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*, *14*(1), 47-61.

นิศารัตน์ ศิริวัฒนเมธานนท์. (2556). อาหารหลากสี มีประโยชน์หลากหลาย (ตอนที่ 3): สารเคมีที่มีประโยชน์จากผักผลไม้ที่มีสีม่วงและสีน้ำเงิน. *บทความเผยแพร่ความรู้สู่ประชาชน*. ภาควิชาเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

มนตรี บุญจรัส. (2565). หินแร่ภูเขาไฟกับการเกษตรปลอดสารพิษในประเทศไทย. *วารสารสหวิทยาการนวัตกรรมปริทรรศน์*, *5*(1), 222-245.

รีนาประกา กลางนภา, ประวีณา แก้วเมือง และมณฑา หมีไพรพฤกษ์. (2564). ปริมาณแอนโทไซยานินและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของกระยาสารทข้าวพองสมุนไพร. *รายงานสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการระดับชาติสำหรับนักศึกษา มหาวิทยาลัยราชภัฏกาแพงเพชร ครั้งที่ 1*. 22 กุมภาพันธ์ 2564. 866-874.

สุชาดา มานอก และปวีณา ลิ้มเจริญ. (2558). การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP และปริมาณ สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดสมุนไพรในตำรับยาหอมเทพจิตร. *ก้าวทันโลกวิทยาศสตร์*, *15*(1), 106-117.

สุภาภรณ์ ญะเมืองมอญ และชนากานต์ เทโบลต์ พรมอุทัย. (2559). ความแปรปรวนของปริมาณแอนโทไซยานิน และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของข้าวเหนียวก่ำพันธุ์พื้นเมืองของไทย. *วารสารเกษตร*, *32*(2), 191 – 199.

สุภาพร ฟักเงิน และ ศิรประภา มีรอด. (2560). การสกัดแยกหาปริมาณแอนโทไซยานินจากลูกมะม่วงหาวมะนาวโห่ (Extraction and Separation of Anthocyanins from *Carissa carandas* L). *รายงานสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 2*. สถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร. 1002-1011.

อรุษา เชาวนลิขิต. (2554). การสกัดและวิธีการวิเคราะห์แอนโทไซยานิน. *วารสารมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ (สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี)*, *3*(6), 26-36.

Gupta, D., Agrawal, A., Chaudhary, H., Gulrajani, M. & Gupta, C. (2013). Cleaner process for extraction of sericin using infrared. *Journal of cleaner Production*, 52, 488-494.

Hendry, B.S. (1996). Natural food colours. In G.A.F. Hendry and J.D. Houghton (2 Editions). *SpringerLink*. 40-59.

Jungmin, L., Robert, D. & Robert Ronald, E.W. (2005) Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative Study, *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, *88*(5), 1268-1278.