

ผลของกระบวนการแปรรูปและสภาวะการเก็บรักษาต่อคุณภาพและสารประกอบที่มี
ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น

Effects of Process and Storage Conditions on the Quality and Antioxidant
Properties of Concentrated Roselle Extract Product

เพ็ญศรี เรืองศรี

Pensri Ruangsri

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of
Master of Science in Food Science and Technology

Prince of Songkla University

2553

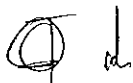
๑ ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

(1)

เลขที่	TX558.R67 พ92 2553 ค.2
Sub Key	314-272
	18 ก.พ. 2553

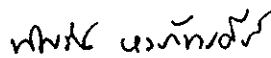
ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของกระบวนการแปรรูปและสภาวะการเก็บรักษาต่อคุณภาพและ
สารประกอบที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในผลิตภัณฑ์กระเจียบแดงสกัดเข้มข้น
ผู้เขียน นางสาวเพ็ญศรี เรืองศรี
สาขาวิชา วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก




(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัญชลี ศิริโชติ)

คณะกรรมการสอบ



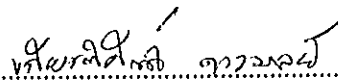
.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิพัตน์ หงษ์ทศศิริ)



..... กรรมการ


(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัญชลี ศิริโชติ)



..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เกียรติศักดิ์ ดวงมาลัย)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์
และเทคโนโลยีอาหาร



.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.เกริกชัย ทองหนู)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	ผลของกระบวนการแปรรูปและสภาวะการเก็บรักษาต่อคุณภาพและสารประกอบที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น
ผู้เขียน	นางสาวเพ็ญศรี เรืองศรี
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร
ปีการศึกษา	2552

บทคัดย่อ

กระเจี๊ยบแดงสด (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) มีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในรูปไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ เท่ากับ 842.63 ± 14.66 มิลลิกรัมต่อลิตรกระเจี๊ยบแดงสด มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 39.69 ± 0.49 มิลลิกรัมสมมูลย์กรดแกลลิกต่อกรัมกระเจี๊ยบแดงสด และมีปริมาณกรดแอสคอร์บิก เท่ากับ 2.89 ± 0.11 มิลลิกรัมต่อกรัมกระเจี๊ยบแดงสด ผลได้ของกระเจี๊ยบแดงสด (ปริมาณความชื้น 89.20%) และกระเจี๊ยบแดงแห้ง (ปริมาณความชื้น 10.38%) เท่ากับ $50.07 \pm 0.37\%$ และ $10.98 \pm 0.41\%$ ตามลำดับ นำกระเจี๊ยบแดงสดอบแห้งในตู้อบแห้งลมร้อนชนิดลาดหมุน ที่อุณหภูมิ 50.0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง กระเจี๊ยบแดงแห้งมีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในรูปไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ เท่ากับ 727.91 ± 5.14 มิลลิกรัมต่อลิตรกระเจี๊ยบแดงแห้ง มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 38.12 ± 0.89 มิลลิกรัมสมมูลย์กรดแกลลิกต่อกรัมกระเจี๊ยบแดงแห้ง และปริมาณกรดแอสคอร์บิก เท่ากับ 1.13 ± 0.22 มิลลิกรัมต่อกรัมกระเจี๊ยบแดงแห้ง ซึ่งพบว่า กระเจี๊ยบแดงสด มีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในรูปไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณกรดแอสคอร์บิก และสมบัติการจับอนุมูล ABTS สูงกว่ากระเจี๊ยบแดงแห้งอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ขณะที่สมบัติการจับอนุมูล DPPH และความสามารถในการรีดิวซ์เฟอรัริกไอออน (FRAP) ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \geq 0.05$) การสกัดกระเจี๊ยบแดงแห้งด้วยน้ำ ในอัตราส่วนกระเจี๊ยบแดงแห้งต่อน้ำ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เท่ากับ 1 ต่อ 10 ที่อุณหภูมิ 50.0 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วทำให้เข้มข้นโดยใช้เครื่องทำให้เข้มข้นแบบใช้ไอน้ำในสถานะสูญญากาศ ที่อุณหภูมิ 70.0 องศาเซลเซียส ความดัน 44.0 เซนติเมตรปรอท จนกระทั่งสารสกัดกระเจี๊ยบแดงเข้มข้นมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด เท่ากับ 25.0 องศาบริกซ์ พบว่า สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงแห้ง มีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในรูปไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สมบัติการจับอนุมูล ABTS และความสามารถในการรีดิวซ์เฟอรัริกไอออน (FRAP) สูงกว่าสารสกัดกระเจี๊ยบแดงเข้มข้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในขณะที่สารสกัดกระเจี๊ยบแดงเข้มข้น มีปริมาณกรดแอสคอร์บิกสูงกว่า

สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงแห้งอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่า สมบัติการจับอนุมูล DPPH ของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงแห้งและสารสกัดกระเจี๊ยบแดงเข้มข้นไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \geq 0.05$)

ผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น ซึ่งเตรียมจากสารสกัดกระเจี๊ยบแดง 50.00% ฟรุคโทส 31.98% น้ำผึ้ง 10.00% โอลิโกฟรุคโทส 8.00% วิตามินเอ 0.0035% และวิตามินอี 0.0013% แล้วให้ความร้อนแก่ผลิตภัณฑ์จนได้อุณหภูมิ เท่ากับ 85.0 องศาเซลเซียส และบรรจุขณะร้อนลงขวดแก้วฝาเกลียวล็อก บรรจุผลิตภัณฑ์ปริมาตร 70 มิลลิลิตร แล้วฆ่าเชื้อจุลินทรีย์แบบพาสเจอร์ไรซ์ด้วยเครื่องฆ่าเชื้อ Steam water spray automated batch ที่อุณหภูมิของเครื่องฆ่าเชื้อ เท่ากับ 101.0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นที่ได้มีคุณภาพทางจุลินทรีย์เป็นไปตามข้อกำหนดมาตรฐานเครื่องดื่มน้ำผลไม้ และเครื่องดื่มน้ำในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท และพบว่า ผลิตภัณฑ์ก่อนกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ มีปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดมาลิก ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในรูปไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ และปริมาณกรดแอสคอร์บิก สูงกว่าผลิตภัณฑ์หลังกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่า ผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นภายหลังกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ มีคุณภาพทางจุลินทรีย์และปริมาณโลหะหนัก (ตะกั่ว เหล็ก และดีบุก) เป็นไปตามข้อกำหนดเรื่องอาหารบรรจุในภาชนะบรรจุปิดสนิทของกระทรวงสาธารณสุข ผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น บรรจุผลิตภัณฑ์ปริมาตร 70 มิลลิลิตร มีพลังงาน เท่ากับ 140.0 กิโลแคลอรี ปริมาณคาร์โบไฮเดรต รวมเส้นใยอาหาร เท่ากับ 11.0% มีปริมาณวิตามินอี เท่ากับ 50.0% วิตามินเอ เท่ากับ 15.0% และวิตามินบี 1 เท่ากับ 15.0% โดยเปรียบเทียบกับร้อยละของปริมาณสารอาหารที่แนะนำให้บริโภคต่อวัน สำหรับคนไทยอายุ ตั้งแต่ 6 ปีขึ้นไป (%Thai RDI)

เมื่อศึกษาผลของสภาวะการเก็บรักษาต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น ทั้งในสภาวะที่มีแสงสว่าง (ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ กำลังไฟฟ้า 18 วัตต์) และไม่มีแสงสว่าง (บรรจุในกล่องกระดาษขาวเทา Duplex board) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 27.0 ± 1.0 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 เดือน พบว่า เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาที่นานเพิ่มขึ้น ผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น มีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในรูปไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณกรดแอสคอร์บิก และสมบัติการต้านอนุมูลอิสระลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และยังพบว่า ผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น เมื่อเก็บรักษาในสภาวะที่ไม่มีแสงสว่าง มีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในรูปไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณกรดแอสคอร์บิก และสมบัติการต้านอนุมูลอิสระคงเหลือสูงกว่าผลิตภัณฑ์ที่เก็บรักษาในสภาวะที่มีแสงสว่าง (ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์)

เซนต์ กำล้างไฟฟ้า 18 วัตต์) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) สำหรับคุณภาพทางจุลินทรีย์ของผลิตภัณฑ์ กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4.0 ± 1.0 และ 27.0 ± 1.0 องศาเซลเซียส นาน 12 เดือน ยังมีคุณภาพเป็นไปตามข้อกำหนดเรื่องอาหารบรรจุในภาชนะบรรจุปิดสนิทของกระทรวง สาธารณสุข ส่วนการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น ระหว่างการเก็บรักษาเป็นเวลา 12 เดือน ที่อุณหภูมิ 4.0 ± 1.0 และ 27.0 ± 1.0 องศาเซลเซียส พบว่า ค่าเฉลี่ยของคะแนนความชอบในคุณลักษณะด้านสี ความหวาน ความเปรี้ยว ความรู้สึกภายในปาก และการยอมรับโดยรวม มีระดับคะแนนความชอบอยู่ในช่วง 6.0-7.0 (ชอบน้อยที่สุดถึงชอบปาน กลาง) เมื่อพิจารณาคุณภาพทางจุลินทรีย์และทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัด เข้มข้น ที่เก็บรักษานาน 12 เดือน พบว่า คุณภาพของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นยังอยู่ใน ระดับที่ยอมรับของผู้บริโภค โดยเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ทางการค้าเบอร์สกัดเข้มข้น

Thesis Title Effects of Process and Storage Conditions on the Quality and Antioxidant Properties of Concentrated Roselle Extract Product

Author Miss Pensri Ruangsri

Major Program Food Science and Technology

Academic Year 2009

ABSTRACT

Fresh roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) has the total anthocyanin content as cyanidin 3-glucoside of 842.63 ± 14.66 mg/liter of fresh roselle, the total phenolic content of 39.69 ± 0.49 mg GAE/g of fresh roselle and the ascorbic acid content of 2.89 ± 0.11 mg/g of fresh roselle. The $50.07 \pm 0.37\%$ and $10.98 \pm 0.41\%$ yields of fresh roselle (89.20% moisture content) and dried roselle (10.38% moisture content) were observed, respectively. Fresh roselle was dried in a rotary air dryer at 50.0°C for 36 hours. Dried roselle contained the total anthocyanin content as cyanidin 3-glucoside of 727.91 ± 5.14 mg/liter of dried roselle, the total phenolic content of 38.12 ± 0.89 mg GAE/g of dried roselle and the ascorbic acid content of 1.13 ± 0.22 mg/g of dried roselle. It was found that the fresh roselle had the total anthocyanin content as cyanidin 3-glucoside, the total phenolic content, the ascorbic acid content and the ABTS radical cation scavenging activity significantly ($p < 0.05$) greater than those of dried roselle. While, the DPPH radical scavenging activity and the ferric reducing ability power (FRAP) were not significantly different ($p \geq 0.05$). The water extraction process was then performed by soaking and mixing dried roselle to water ratio (weight by volume) of 1 to 10 at the temperature of 50.0°C for 30 minutes. The extract was concentrated using a vacuum steam jacket evaporator at 70.0°C , 44.0 cmHg to achieve total soluble solids of 25.0 Brix. The extract from dried roselle had the total anthocyanin content as cyanidin 3-glucoside, the total phenolic content, the ABTS radical cation scavenging activity and ferric reducing ability power (FRAP) significantly ($p < 0.05$) higher than those of concentrated roselle extracts. However, concentrated roselle extract had the ascorbic acid content significantly ($p < 0.05$) greater than that of dried roselle extract. In addition, the extracts from dried roselle and concentrated roselle extract had no significant difference ($p \geq 0.05$) in the DPPH radical scavenging activity.

The concentrated roselle extract product was prepared by mixing 50.00% roselle extract, 31.98% fructose, 10.00% honey, 8.00% oligofructose, 0.0035% vitamin A and 0.0013% vitamin E. The mixture was subsequently heated at 85°C, then filled in a lug cap 70 ml glass containers and pasteurized with a steam water spray automated batch retort at 101.0°C for 5 minutes to meet the microbial quality requirements by law as the industrial food product standard for "Fruit Juice Beverage" and the notification from the Ministry of Public Health for "Beverage Product filled in the hermetic sealed container". It was found that the product before pasteurization had the total acidity as malic acid, the total anthocyanin content as cyanidin 3-glucoside and the ascorbic acid content significantly ($p < 0.05$) greater than those of products after pasteurization. While, the products both before and after pasteurization had no significant ($p \geq 0.05$) differences in the DPPH radical scavenging activity and the ferric reducing ability power (FRAP). It was also found that the products after pasteurization had the total phenolic content and the ABTS radical cation scavenging activity significantly ($p < 0.05$) greater than those of products before pasteurization. In addition, the concentrated roselle extract products in lug cap bottles also had the microbial qualities and metallic contents (Pb, Fe and Sn) after pasteurization following the requirements as notified by the "Food filled in the Hermetic Sealed Container" by the Ministry of Public Health. The 70 ml concentrated roselle extract product had the calories of 140.0 kcal., the carbohydrate content with the addition of dietary fiber of 11.0%, the vitamin E of 50.0%, the vitamin A of 15.0% and vitamin B1 15.0% as compared to the Thai Recommended Daily Intake (Thai RDI) for nutrient consumption per day based on Thai people at the age of ≥ 6 years old.

The study of the effects of storage conditions on the qualities of concentrated roselle extract products stored under the conditions of light (fluorescent lamp, 18 watt) and no light at the temperature of $27.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ for 0, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 months was conducted. It was found that as the storage time increased, the changes in total anthocyanin content as cyanidin 3-glucoside, total phenolic content, ascorbic acid content and antioxidant activity significantly ($p < 0.05$) decreased. The concentrated roselle extract products storage under no light condition had the ascorbic contents, the total phenolic contents, the total anthocyanin content as cyanidin 3-glucoside and the antioxidant activities significantly ($p < 0.05$) greater than those of the products stored under the light (fluorescent lamp, 18 watt) condition. The microbial qualities of

concentrated roselle extract products, stored at both 4.0 ± 1.0 and $27.0\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ for 12 months, met the requirements of the notifications as announced by the Ministry of Public Health. In addition, the sensory evaluation of concentrated roselle extract products during storage at 4.0 ± 1.0 and $27.0\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ for 12 months was also performed. The results showed that the average perceived liking scores in color, sweetness, sourness, mouthfeel and the overall acceptance characteristics were in the range of 6.0-7.0 (like slightly to like moderately). With regard to the microbial qualities and the sensory evaluation of concentrated roselle extract products stored for 12 months, it was found that the concentrated roselle extract products still had the acceptable qualities for consumption as compared to the commercial product.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัญชลี ศิริโชติ กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำในการค้นคว้าตลอดระยะเวลาการทำวิจัยและเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทิพรัตน์ หงษ์ทรีรี ประธานกรรมการผู้แทนคณะอุตสาหกรรมเกษตร ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เกียรติศักดิ์ ดวงมลาย์ กรรมการผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาสละเวลาในการสอบ ให้คำแนะนำ เสนอแนะ และแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ เพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์และถูกต้องยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคุณคตติและคุณมาลี พงศ์ประยูร ที่ช่วยเหลือในการปลุกวัตถุดิบในการทำวิจัย ขอขอบพระคุณบริษัท เฮล์มมหาบุญ จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์โวลีโอฟรุกโทสในการทำวิจัย ขอขอบพระคุณภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่อง Spectrofluorophotometer ในการทำวิจัยบางส่วน

ขอขอบพระคุณพี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ นักศึกษาทุกคนที่ให้กำลังใจและให้ความช่วยเหลือในการทำการทดลองตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ คุณตา คุณยาย และครอบครัวเรื่องศรี ที่สนับสนุนการศึกษาและให้ความช่วยเหลือในทุกๆด้าน รวมทั้งเป็นกำลังใจที่สำคัญในการศึกษา วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ตลอดมา สุดท้ายนี้ผู้เขียนขอขอบพระคุณทุกท่านที่ไม่สามารถกล่าวชื่อนามได้ทั้งหมดในที่นี้ ไว้ ณ โอกาสนี้ด้วย

เพ็ญศรี เรื่องศรี

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ.....	(10)
LIST OF TABLES.....	(11)
LIST OF APPENDIX TABLES.....	(13)
LIST OF FIGURES.....	(15)
LIST OF APPENDIX FIGURES.....	(16)
บทที่	
1 บทนำ.....	1
บทนำต้นเรื่อง.....	1
การตรวจเอกสาร.....	2
วัตถุประสงค์.....	57
2 วิธีการวิจัย.....	58
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ.....	58
วิธีการดำเนินการวิจัย.....	61
3 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	69
4 บทสรุปและข้อเสนอแนะ.....	106
เอกสารอ้างอิง.....	109
ภาคผนวก.....	124
ประวัติผู้เขียน.....	167

LIST OF TABLES

Table	Page
1. Nutrient composition of 100.0 g fresh roselle calyxes (wet weight basis).....	4
2. Anthocyanidins found in fruits and vegetables.....	9
3. Absorption maximum and shade of color changes of anthocyanins at different pH levels.....	18
4. Maximum absorption wavelength and molar extinction coefficient of anthocyanins derivative.....	19
5. Antioxidant properties of dried roselle 100 gram.....	29
6. List of chemicals.....	58
7. %Yields of fresh and dried roselle calyxes.....	69
8. Physical and chemical properties of fresh and dried roselle juice (dry weight basis)....	71
9. Changes in antioxidant properties (by DPPH, ABTS and FRAP assay) of fresh and dried roselle calyxes.....	73
10. Physical and chemical properties of dried roselle extract and concentrated roselle extract.....	75
11. Changes in antioxidant properties (by DPPH, ABTS and FRAP assay) of dried roselle extract and concentrated roselle extract.....	79
12. Pasteurization conditions of concentrated roselle extract product.....	80
13. Nutrition Facts of concentrated roselle extract product.....	81
14. Vitamin A and E contents of concentrated roselle extract products before and after pasteurization.....	81
15. Microbiological qualities of concentrated roselle extract product after pasteurization.....	82
16. Heavy metal content of concentrated roselle extract product after pasteurization.....	83
17. Effect of pasteurization on physical and chemical properties of concentrated roselle extract product before and after pasteurization.....	84

LIST OF TABLES (Cont.)

Table	Page
18. Changes in antioxidant properties (by DPPH, ABTS and FRAP assay) of products before and after pasteurization.....	87
19. Changes in color ($L^* a^* b^*$) of concentrated roselle extract products during storage in the presence and absence of light at 27.0°C for 0, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 months.....	88
20. Changes in pH values and total acidity (% as malic acid) and total soluble solids ($^{\circ}\text{Brix}$) of concentrated roselle extract products during storage in the presence and absence of light at 27.0°C for 0, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 months.....	91
21. Changes in ascorbic acid (mg/g sample), total phenolic contents and total anthocyanin contents of concentrated roselle extract products during storage in the presence and absence of light at $27.0\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ for 0, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 months.....	94
22. Changes in antioxidant properties (by DPPH, ABTS and FRAP assay) of concentrated roselle extract products during storage in the presence and absence of light at $27.0\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ for 0, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 months.....	99
23. The sensory evaluation of concentrated roselle extract product during storage at 4.0°C and 27.0°C for 0 and 12 months.....	104

LIST OF APPENDIX TABLES

Table	Page
1. Analysis of variances in physical and chemical properties of fresh and dried roselle juices.....	145
2. Analysis of variance in physical and chemical properties of dried roselle extracts and concentrated roselle extracts.....	147
3. Analysis of variance in physical and chemical properties of concentrated roselle extract product before and after pasteurization.....	149
4. Analysis of variances in physical, chemical and antioxidant properties concentrated roselle extract products during storage in the presence of light at 27.0 °C for 0, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 months.....	151
5. Analysis of variances in physical, chemical and antioxidant properties concentrated roselle extract products during storage in the absence of light at 27.0 °C for 0, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 months.....	153
6. Analysis of variance of concentrated roselle extract product during storage at 4.0 °C for 0 and 12 months.....	155
7. Analysis of variance of concentrated roselle extract product during storage at 27.0 °C for 0 and 12 months.....	156
8. Analysis of variance of concentrated roselle extract product during storage at 4.0 °C and 27.0 °C for 0 months.....	157
9. Analysis of variance of concentrated roselle extract product during storage at 4.0 °C and 27.0 °C for 12 months.....	158
10. Total phenolic contents (mg GAE/g sample) of each ingredient from concentrated roselle extract products.....	162
11. Total anthocyanin contents (mg/l sample) of each ingredient from concentrated roselle extract products.....	163
12. The antioxidant properties (by DPPH assay) of each ingredient from concentrated roselle extract products.....	164

LIST OF APPENDIX TABLES (Cont.)

Table		Page
13.	The antioxidant properties (by ABTS assay) of each ingredient from concentrated roselle extract products.....	165
14.	The antioxidant properties (by FRAP assay) of each ingredient from concentrated roselle extract products.....	166

LIST OF FIGURES

Figure	Page
1. Basic structures of flavonoids ($C_6-C_3-C_6$, flavan).....	7
2. Basic structures of anthocyanins.....	7
3. Basic structures of anthocyanidins and maximum absorption wavelength (λ_{max}) in acidified methanol.....	8
4. Effect of hydroxyl (-OH) and methoxyl (-OCH ₃) on color of anthocyanins.....	13
5. Structure changes of cyanin molecule according to pH changes from 3.0 to 8.5 and 8.5 to 11.0.....	14
6. Predominant anthocyanin structural forms present at different pH levels.....	15
7. Absorption spectra of cyanidin 3-rhamnoglucoside in buffer solutions at pH 0.71 to 4.02. The concentration of pigment is 1.6×10^2 g/L.....	18

LIST OF APPENDIX FIGURES

Figure	Page
1. Concentrated roselle extract product.....	160
2. The concentrated roselle extract products during storage in the presence of light at 27.0 ± 1.0 °C for 0, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 months.....	160
3. The concentrated roselle extract products during storage in the absence of light at 27.0 ± 1.0 °C for 0, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 months.....	161
4. The concentrated roselle extract products during storage in the absence of light at 4.0 ± 1.0 and 27.0 ± 1.0 °C for 0 and 12 months.....	161

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

กระเจี๊ยบแดง จัดเป็นพืชสมุนไพรที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ ประกอบด้วยสารสำคัญหลายชนิด ซึ่งสารสำคัญที่มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในกระเจี๊ยบแดง คือแอนโทไซยานิน (Anthocyanin) ซึ่งประกอบด้วยแอนโทไซยานิดิน (Anthocyanidin) เช่น ไชยานิดิน (Cyanidin) และเดลฟินิดิน (Delphinidin) เป็นต้น และน้ำตาล กระเจี๊ยบแดงประกอบด้วยกรดอินทรีย์หลายชนิด เช่น กรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid) กรดซิตริก (Citric acid) กรดมาลิก (Malic acid) และกรดทาร์ทาริก (Tartaric acid) ซึ่งกรดเหล่านี้ทำให้กระเจี๊ยบแดงมีรสเปรี้ยว นอกจากนี้ในกระเจี๊ยบแดงยังมีวิตามินเอ (Vitamin A) เพคติน (Pectin) และแร่ธาตุชนิดต่างๆ เช่น แคลเซียม ฟอสฟอรัส และแมกนีเซียม เป็นต้น กระเจี๊ยบแดงมีสรรพคุณในการลดความดันโลหิต ด้านเชื้อแบคทีเรีย ด้านเชื้อรา ลดไขมันและลดไตรกลีเซอไรด์ในเลือด ด้านการเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง และเพิ่มกรดยูริกในปัสสาวะ เป็นต้น (นันทวัน บุญยะประกฤษ และอรนุช โชกชัยเจริญพร, 2541) กระเจี๊ยบแดง นิยมนำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น แยมกระเจี๊ยบแดง เยลลี่กระเจี๊ยบแดง น้ำกระเจี๊ยบแดง ไวน์กระเจี๊ยบแดง และผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากกระเจี๊ยบแดงอีกรูปแบบหนึ่งที่มีศักยภาพในการนำมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ที่ให้ประโยชน์ มีสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ งานวิจัยในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทำการผลิตผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นบรรจุขวดแก้วฝาเกลียวล็อก แล้วศึกษาผลของกระบวนการแปรรูปและการเก็บรักษาต่อคุณภาพทางด้านกายภาพ เคมี และสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของกระเจี๊ยบแดงสด กระเจี๊ยบแดงแห้ง สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงแห้ง สารสกัดกระเจี๊ยบแดงเข้มข้น และผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นทั้งก่อนและหลังกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ ตลอดจนผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นที่เก็บรักษาในสภาวะที่มีแสงสว่างและไม่มีแสงสว่าง ที่อุณหภูมิ 27.0 ± 1.0 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 เดือน รวมทั้งการศึกษาคุณภาพทางด้านจุลินทรีย์และทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น เมื่อเก็บรักษาในสภาวะที่ไม่มีแสงสว่าง ที่อุณหภูมิ 4.0 ± 1.0 และ 27.0 ± 1.0 องศาเซลเซียส นาน 0 และ 12 เดือน

การตรวจเอกสาร

1. กระจีบบแดง

กระจีบบแดงมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Hibiscus sabdariffa* Linn. var. *sabdariffa* เป็นพืชที่อยู่ในตระกูล *Malvaceae* มีชื่อสามัญภาษาอังกฤษว่า Jamaican Sorrel, Roselle หรือ Red roselle เป็นพืชวงศ์เดียวกับปอแก้วไทย (*Hibiscus sabdariffa* L. var. *altissima*) ชื่อพื้นเมืองอื่นๆ ของกระจีบบแดง เช่น กระจีบบเปรี้ยว, กระจีบบ (ภาคกลาง), ผักเก็งเค็ง ส้มเก็งเค็ง (ภาคเหนือ), ส้มตะเลงเครง (จ. ตาก) และส้มปู้ (จ. แม่ฮ่องสอน) พันธุ์กระจีบบแดงที่นิยมปลูกในประเทศไทย คือ พันธุ์ชูดาน, พันธุ์บราซิล, พันธุ์เอส-2760 และพันธุ์เอส 60-เอ็ม 35 (นันทวัน บุญยะประภัศร และอรนุช โชคชัยเจริญพร, 2541; สุรพงษ์ เจริญรัต และคณะ, 2545)

1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

กระจีบบแดง จัดเป็นพืชล้มลุก ตระกูลเดียวกับชบา ปอ และฝ้าย ส่วนมากลำต้นมีสีม่วงอมแดง และมีทรงพุ่มตั้งตรง สูงประมาณ 50.0-200.0 เซนติเมตร ใบมักจะแยกเป็น 3-5 แฉก แตกใบเดี่ยวสลับกัน มีเส้นใบเป็นแบบนิ้วมือ 3-7 เส้น หัวใบรีแหลมแบ่งออกเป็น 3 แฉก และมีขอบใบเรียบ ดอกออกเดี่ยวๆ ตามง่ามใบ ก้านดอกสั้น มีเกสรตัวผู้ และเกสรตัวเมียอยู่ในดอกเดียวกัน ผลมีลักษณะเป็นแคปซูลจำนวน 5 กระเปาะ ห่อหุ้มด้วยกลีบดอกมี 2 ชั้นๆ ละ 5 กลีบ ยาวประมาณ 5.0-8.0 เซนติเมตร มีสีแดงชุ่มน้ำ (สุรพงษ์ เจริญรัต และคณะ, 2545)

1.2 นิเวศวิทยา และการกระจายพันธุ์

แหล่งผลิตใหญ่อยู่ที่จังหวัดอุดรธานี ลพบุรี สระบุรี และคำบลควนมีด อำเภอนาหม่อม จังหวัดสงขลา ก็เป็นอีกแหล่งหนึ่งที่มีการปลูกกระจีบบแดง กระจีบบแดงส่วนใหญ่ปลูกขึ้นตามทุ่งหญ้าที่เป็นดินทราย หรือทุกสภาพดิน ชอบอากาศร้อน หรือค่อนข้างร้อน มีฝนตกชุ่มชื้น แต่ไม่มีน้ำขัง ต้องการน้ำระยะ 1-2 เดือนแรก หลังจากนั้นสามารถทนต่อความแห้งแล้งได้ดี การกระจายพันธุ์ใช้เมล็ดเพาะ โดยปลูกห่างกันประมาณ 50.0 เซนติเมตร รดน้ำวันละครั้ง เกษตรกรนิยมปลูกกระจีบบแดง ในช่วงปลายฤดูฝนระหว่างเดือนกรกฎาคมถึงสิงหาคม เพราะมีเวลาเจริญเติบโตทางลำต้นเพียงพอที่จะผลิตกลีบดอกได้สูงสุด ถ้าปลูกช่วงต้นฤดูฝน(พฤษภาคมถึงมิถุนายน) หรือก่อนระยะเวลาปลูกที่เหมาะสมจะให้ผลผลิตต่ำ เนื่องจากกระจีบบแดงจะมีทรงต้นใหญ่ แต่ให้ปริมาณดอกและกลีบดอกน้อย กระจีบบแดงมีอายุการเก็บเกี่ยวโดยทั่วไปประมาณ 110-120 วันหลังปลูก คือเก็บเกี่ยวได้ในช่วงเดือนตุลาคมถึงพฤศจิกายน หรือเก็บเกี่ยวเมื่อ

ผลกระเจียบแดงแก่จัด โดยทำการแยกกลีบดอกออกจากกระเปาะทันทีไม่ให้ข้ามคืน เพราะหากปล่อยให้ข้ามคืนจะทำให้แยกกลีบดอกยาก และเสื่อมคุณภาพ (สุรพงษ์ เจริญรัต และคณะ, 2545)

1.3 สารสำคัญในกระเจียบแดง

กระเจียบแดง มีสารสีแดงเนื่องจากแอนโทไซยานิน และมีกรดอินทรีย์หลายชนิด เช่น กรดแอสคอร์บิก กรดซิตริก กรดมาลิก และกรดทาร์ทาริก เป็นต้น กรดอินทรีย์เหล่านี้ทำให้กระเจียบแดงมีรสเปรี้ยว นอกจากนี้ยังมีวิตามินเอ . เพคติน และแร่ธาตุอื่นๆ เช่น แคลเซียม ฟอสฟอรัส และแมกนีเซียม เป็นต้น ซึ่งส่วนประกอบที่มีคุณค่าทางอาหารของกระเจียบแดงสด ดังแสดงใน Table 1

นันทวัน บุญยะประภัศร และอรนุช โชคชัยเจริญพร (2541) รายงานว่า สารสำคัญที่พบในสารสกัดจากกระเจียบแดง ได้แก่ ไซยานิดิน 3-แซมบูไบโอไซด์ (Cyanidin 3-sambubioside) เคอร์เซทิน (Quercetin) กรดแกลลิก (Gallic acid) กรดทาร์ทาริก และกรดแอสคอร์บิก เป็นต้น กระเจียบแดงมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา มีสรรพคุณในการลดความดันโลหิต ด้านเชื้อแบคทีเรีย ด้านเชื้อรา ลดไขมันและลดไตรกลีเซอไรด์ในเลือด ด้านการเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง และเพิ่มกรดยูริกในปัสสาวะ เป็นต้น นอกจากนี้ Ibrahim และคณะ (1971 อ้างโดย นัยวิท เกลิมนนท์, 2538) ได้ศึกษาสมบัติทางชีวเคมีของกระเจียบแดง พบว่า การสกัดกระเจียบแดงด้วยน้ำ ในอัตราส่วนของกระเจียบแดงแห้งต่อน้ำ เท่ากับ 1 ต่อ 100 (น้ำหนักต่อปริมาตร) สามารถสกัดแอนโทไซยานิน และสารอื่นๆ ได้มากกว่าร้อยละ 60 ของน้ำหนักกระเจียบแดงแห้ง และเมื่อวิเคราะห์สารสกัดกระเจียบแดง พบว่า มีน้ำตาลอิสระเป็นองค์ประกอบ 2 ชนิด ได้แก่ กลูโคส และอะราบิโนส นอกจากนี้ยังพบกรดอะมิโน 9 ชนิด ได้แก่ กรดแอสพาร์ติก กลูตามิก เซอรีน ไกลซีน อะลานีน โพรลีน เมทไธโอนีน ลูซีน และเทรโอนีน เป็นต้น นอกจากนี้ สุรพงษ์ เจริญรัต และคณะ (2545) ยังรายงานว่ กระเจียบแดงสด มีปริมาณกรดแอสคอร์บิก ประมาณ 7.12 มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัมของผลกระเจียบแดงแห้ง และประกอบด้วยกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ ได้แก่ กรดมาลิก กรดออกซาลิก กรดซิตริก ซึ่งส่งผลให้สารสกัดกระเจียบแดงที่ได้มีค่าพีเอชต่ำ ประมาณ 2.00-3.00

Table 1. Nutritional composition of 100.0 g fresh roselle calyxes (wet weight basis)

Nutrients	Values
Water (g)	86.60
Total energy (Calories)	460.00
Crude fiber (g)	1.30
Total fat (g)	0.30
Total carbohydrate (g)	9.40
Protein (g)	1.40
Calcium (mg)	151.00
Phosphorus (mg)	59.00
Iron (mg)	1.00
Vitamin B1 (mg)	0.01
Vitamin B2 (mg)	0.24
Niacin (mg)	1.80
Vitamin A (IU)	10,833.00
pH	2.00-3.00

ที่มา : สุรพงษ์ เจริญรัต และคณะ (2545)

อรุณพร อธิรัตน์ และคณะ (2548) พบว่า สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงแห้งที่ได้จากการสกัดกระเจี๊ยบแดงแห้งด้วยน้ำ ในอัตราส่วนระหว่างกระเจี๊ยบแดงแห้งต่อน้ำ เท่ากับ 1 ต่อ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 60.0 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วทำให้เข้มข้นโดยเครื่องทำให้เข้มข้นแบบใช้ไอน้ำในสถานะสูญญากาศ ที่อุณหภูมิ 70.0 องศาเซลเซียส ความดัน 44.0 เซนติเมตรปรอท จนกระทั่งสารสกัดกระเจี๊ยบแดงเข้มข้นมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเท่ากับ 40.0 องศาบริกซ์ จากนั้นจึงทำแห้งด้วยวิธีการทำแห้งแบบสูญญากาศ ที่อุณหภูมิ 70.0 องศาเซลเซียส ความดัน 25.0 เซนติเมตรปรอท จนกระทั่งมีปริมาณความชื้น เท่ากับ 9.0-11.0% เมื่อวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ที่รายงานค่าในรูปแบบลิทธิกรัมสมมูลย์ของกรดแกลลิก (Gallic acid equivalent, GAE) จากการทดลองพบว่า สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงแห้งมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 108.98 มิลลิกรัมสมมูลย์ของกรดแกลลิกต่อกรัม และเมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการวัดสมบัติการจับอนุมูล DPPH รายงานค่าที่วัดได้ในรูป

ค่า EC_{50} (Efficient concentration; ความเข้มข้นของสารสกัดกระเจียบแดงที่ไปลดปริมาณอนุมูล DPPH ลง 50%) จากการวิเคราะห์พบว่า การใช้น้ำเป็นตัวสกัดกระเจียบแดงแห้งแล้วทำแห้งด้วยวิธีการทำแห้งแบบสุญญากาศ สารสกัดกระเจียบแดงแห้งที่ได้มีค่า EC_{50} เท่ากับ 15.10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

1.4 สมบัติการต้านจุลินทรีย์ของกระเจียบแดง

Supavita และคณะ (2004) ศึกษากิจกรรมการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดกระเจียบแดง โดยใช้วิธีการสกัด และการทำแห้งแตกต่างกัน 4 วิธี ได้แก่ วิธีแรกใช้เอทานอลเป็นตัวสกัด วิธีที่สองใช้น้ำเป็นตัวสกัดกระเจียบแดงแห้งแล้วทำแห้งด้วยวิธีการทำแห้งแบบสุญญากาศ (Vacuum dry) วิธีที่สามใช้น้ำเป็นตัวสกัดกระเจียบแดงแห้งแล้วทำแห้งด้วยวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอย (Spray dry) และวิธีที่สี่คั้นน้ำจากกระเจียบแดงสดแล้วทำแห้งด้วยวิธีการทำแห้งแบบระเหิดแห้ง (Freeze dry) วัดกิจกรรมการต้านจุลินทรีย์โดยวิธี Disc diffusion assay เชื้อจุลินทรีย์ที่ทดสอบประกอบด้วย เชื้อแบคทีเรียแกรมบวก 4 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus faecalis* และ *Bacillus subtilis* แบคทีเรียแกรมลบ 7 ชนิด ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhi*, *Salmonella Typhimurium*, *Shigella flexneri* และ *Shigella sonnei* เชื้อยีสต์และรา 4 ชนิด ได้แก่ *Candida albican*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* และ *Microsporum gypseum* โดยการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ได้ (Minimum inhibitory concentration, MIC) พบว่า สารสกัดกระเจียบแดงที่ได้จากทุกวิธีการสกัดสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ 3 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* และ *Bacillus subtilis* โดยสารสกัดที่คั้นได้จากกระเจียบแดงสดแล้วทำแห้งด้วยวิธีการทำแห้งแบบระเหิดแห้ง สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดดังกล่าวได้สูงสุด และมีค่า Inhibition zone ของการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก เท่ากับ 9.5, 10.6 และ 10.1 มิลลิเมตร ให้ค่า MIC เท่ากับ 5.0, 5.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของสารสกัด ตามลำดับ แต่การสกัดโดยใช้น้ำเป็นตัวสกัดกระเจียบแดงแห้งแล้วทำแห้งด้วยวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอย และวิธีการทำแห้งแบบสุญญากาศ พบว่า ไม่มีกิจกรรมการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ โดยไม่สามารถวัดค่า Inhibition zone ของเชื้อรา และเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้ ยกเว้นแบคทีเรียแกรมลบชนิด *Salmonella Enteritidis* ส่วนสารสกัดที่คั้นได้จากกระเจียบแดงสดแล้วทำแห้งด้วยวิธีการทำแห้งแบบระเหิดแห้ง และสารสกัดจากการใช้เอทานอลเป็นตัวสกัด มีค่า Inhibition zone ของเชื้อ *Salmonella Enteritidis* เท่ากับ 7.2 และ 6.7 มิลลิเมตร ตามลำดับ จากการทดลองดังกล่าว จึงสรุปได้ว่า สารสกัดกระเจียบแดงมีสมบัติในการต้านการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ โดยมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ

แบคทีเรียแกรมบวกได้ดี ในขณะที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้น้อยมาก และไม่สามารถยับยั้งเชื้อยีสต์และราได้

Angsujinda (2004) ศึกษาผลของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก โดยใช้สารสกัดกระเจี๊ยบแดงที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 5 ระดับ ได้แก่ 25.0, 50.0, 100.0, 150.0 และ 200.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก 4 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Lactobacillus plantarum* และ *Pediococcus pentosaceus* และเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ 2 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli* และ *Salmonella Anatum* ผลพบว่า สารสกัดกระเจี๊ยบแดง ที่ระดับความเข้มข้น 25.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Listeria innocua* ได้เพียงชนิดเดียว ในขณะที่ระดับความเข้มข้น 50.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคชนิดแบคทีเรียแกรมบวกได้ทั้งหมด และที่ระดับความเข้มข้น 100.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ นอกจากนี้ สารสกัดกระเจี๊ยบแดงที่ระดับความเข้มข้น 150.0 และ 200.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้ทั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค และแลคติกแอซิดแบคทีเรีย (Lactic acid bacteria)

2. แอนโทไซยานิน

แอนโทไซยานิน เป็นรงควัตถุที่พบในน้ำหล่อเลี้ยงของเซลล์พืช (Cell sap) อยู่ในรูปของไกลโคไซด์ (Glycosides) ให้สีแดง สีม่วง และสีม่วง ในผัก ผลไม้ และดอกไม้ชนิดต่างๆ เช่น กะหล่ำปลีสีม่วง องุ่น กระเจี๊ยบแดง มังคุด สตรอเบอรี่ และอัญชัน เป็นต้น (นิธิยา รัตนานันท์, 2549; Deman, 1990; Turker *et al.*, 2004)

แอนโทไซยานิน เป็นสารประกอบในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) มีโครงสร้างหลักประกอบด้วยคาร์บอน 15 ตัว ($C_6-C_3-C_6$) ซึ่งเป็นอนุพันธ์โพลีไฮดรอกซี (Polyhydroxy) และโพลีเมทอกซี (Polymethoxy) ของเกลือ Hydroxylated 2-phenylbenzopyrylium หรือเกลือของฟลาวิลีียม (Flavylium salt) ซึ่งโครงสร้างของแอนโทไซยานิน ประกอบด้วยโมเลกุลที่เป็นน้ำตาลและส่วนที่เป็นแอนโทไซยานิดิน เรียกว่า อะไกลโคน (Aglycone) โครงสร้างพื้นฐานในโมเลกุลของแอนโทไซยานิดิน ประกอบด้วยวงแหวนเบนโซไพแรน (Benzopyran) จำนวน 2 วง ต่อกับวงแหวนฟีนิล (Phenyl ring) ดังแสดงใน Figure 1 ในเนื้อเยื่อพืชพบอะไกลโคนที่อยู่ในรูปไกลโคไซด์ คือ จับกับน้ำตาลด้วยพันธะ β -glycosidic และมักจับที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ของโครงสร้างแอนโทไซยานิดิน ซึ่งน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในโครงสร้างของแอนโทไซยานิน อาจเป็นโมโนแซ็กคาไรด์ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส กาแล็กโทส แรมโนส อะราบิโนส และไซโลส เป็นต้น หรืออาจเป็นไดแซ็กคาไรด์ หรือไตรแซ็กคาไรด์ก็ได้ (Wrolstad, 2004; Von Elbe and

Schwartz, 1996; Mazza and Miniati, 1993) แอนโทไซยานิน มีสมบัติละลายน้ำได้ดี แต่ไม่ละลายในตัวทำละลายประเภท Non-hydroxyl solvents เช่น อะซีโตน (Acetone) เบนซีน (Benzene) คลอโรฟอร์ม (Chloroform) และอีเทอร์ (Ether) เป็นต้น (นิธิยา รัตนาปนนท์, 2549)

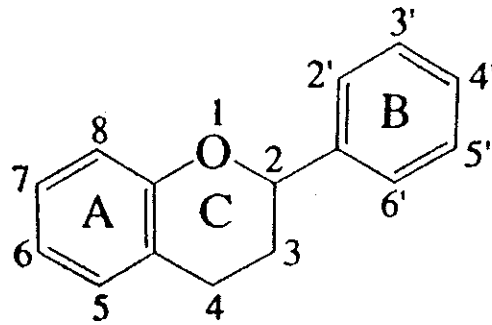


Figure 1. Basic structures of flavonoids ($C_6-C_3-C_6$, flavan)

ที่มา : Spanos และ Wrolstad (1992 อ้าง โดย Skrede and Wrolstad, 2002)

สีของแอนโทไซยานินขึ้นอยู่กับโครงสร้างของวงแหวน A และ B หากมีการเติมหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) หรือหมู่เมทอกซิล (-OCH₃) ในตำแหน่ง R₁ และ R₂ ของวงแหวน B ทำให้แอนโทไซยานินมีโครงสร้างแตกต่างกัน โดยมีโมเลกุลของน้ำตาลเข้ามาจับ ซึ่งอาจจะเป็นโมโนแซ็กคาไรด์ ไดแซ็กคาไรด์ หรือไตรแซ็กคาไรด์ และมักจับที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ของวงแหวน A (Wrolstad, 2004) โครงสร้างพื้นฐานของแอนโทไซยานิน ดังแสดงใน Figure 2

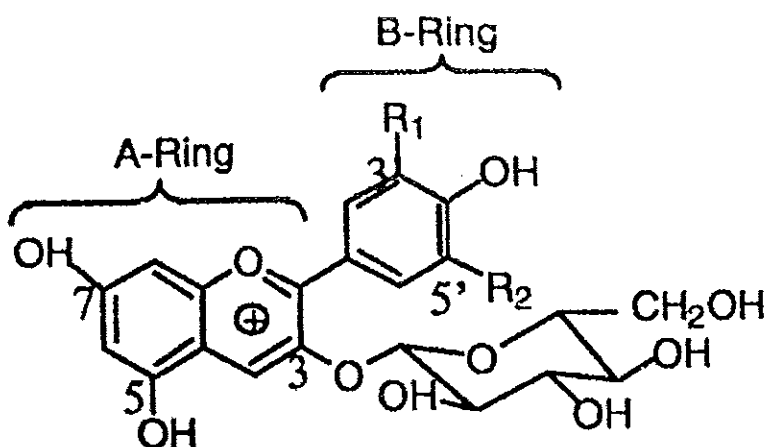
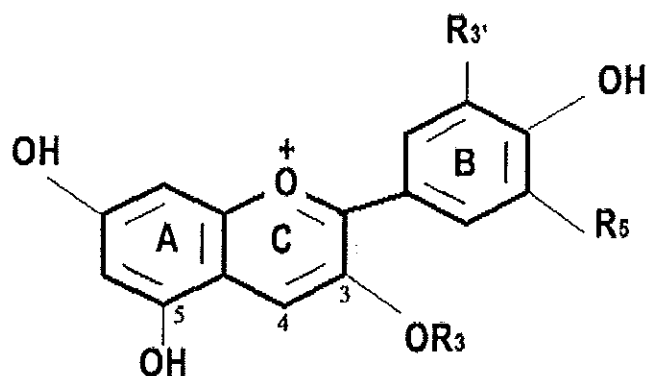


Figure 2. Basic structures of anthocyanins

ที่มา : Wrolstad (2004)

แอนโทไซยานิดิน หรืออะไกลโคน มีอยู่ประมาณ 20 ชนิด แต่ที่พบทั่วไปในผักและผลไม้ มี 6 ชนิด คือ ไชยานิดิน เดลฟินิดิน พีลาร์โกนิดิน (Pelargonidin) พีโอนิดิน (Peonidin) เปตุนิดิน (Petunidin) และมัลวิดิน (Malvidin) (Mazza and Miniati, 1993; Mazza, 2007) ดังแสดงใน Figure 3 และตัวอย่างแอนโทไซยานิดินที่เป็นองค์ประกอบในโครงสร้างของแอนโทไซยานินในผักและผลไม้บางชนิด ดังแสดงใน Table 2



Anthocyanidins	R ₃	R _{3'}	R ₅	$\lambda_{\text{vis,max}}$ (nm)
Pelargonidin (Pg)	H	H	H	520
Cyanidin (Cy)	H	OH	H	535
Delphinidin (Dp)	H	OH	OH	546
Peonidin (Pn)	H	OCH ₃	H	532
Petunidin (Pt)	H	OCH ₃	OH	543
Malvidin (Mv)	H	OCH ₃	OCH ₃	542
Pelargonidin 3-glucoside	Glc	H	H	516
Cyanidin 3-glucoside	Glc	OH	H	530
Delphinidin 3-glucoside	Glc	OH	OH	543
Peonidin 3-glucoside	Glc	OCH ₃	H	536
Petunidin 3-glucoside	Glc	OCH ₃	OH	546
Malvidin 3-glucoside	Glc	OCH ₃	OCH ₃	546

Figure 3. Basic structures of anthocyanidins and maximum absorption wavelength (λ_{max}) in acidified methanol

ที่มา : Stintzing และ Carle (2004)

Table 2. Anthocyanidins found in fruits and vegetables

Fruits and vegetables	Anthocyanidins
Apple	Cyanidin
Blackcurrant	Cyanidin and delphinidin
Blueberry	Cyanidin delphinidin malvidin petunidin and peonidin
Cranberry	Peonidin
Cherry	Cyanidin and peonidin
Grape	Cyanidin malvidin peonidin delphinidin petunidin and pelargonidin
Orange	Cyanidin and delphinidin
Peach	Cyanidin
Plum	Cyanidin and peonidin
Radish	Pelargonidin
Raspberry	Cyanidin
Strawberry	Pelargonidin and cyanidin

ที่มา : Deman (1990)

2.1 ประโยชน์ของแอนโทไซยานิน

Dillard และ German (2000 อ้างโดย Skrede and Wrolstad, 2002) รายงานว่า กลุ่มของสารประกอบฟลาโวนอยด์ ได้แก่ แอนโทไซยานิน กรดฟีนอลิก และแทนนิน มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ มีผลต่อกระบวนการเมตาบอลิซึม (Metabolism) และกลไกการทำงานของเอนไซม์ และเมื่อศึกษากิจกรรมทางชีววิทยาของกลุ่มของสารประกอบฟลาโวนอยด์ ก็พบว่าสามารถยับยั้งการอักเสบ (Inflammation) โรคภูมิแพ้ (Allergies) การรวมตัวของเกล็ดเลือด (Platelet aggregation) จุลินทรีย์ (Microbes) แผลเปื่อย (Ulcers) ไวรัส (Viruses) เนื้องอก (Tumors) และตับอักเสบ (Hepatotoxins) สอดคล้องกับการรายงานของ Mazza (2000 อ้างโดย Skrede and Wrolstad, 2002) ที่ได้รวบรวมสมบัติของกลุ่มของสารประกอบฟลาโวนอยด์ และกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิกอื่นๆ ที่พบในผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้ พบว่า กลุ่มของสารประกอบฟลาโวนอยด์สามารถต้านสารก่อมะเร็ง (Anticarcinogenic) ต้านการอักเสบ (Anti-inflammatory) ต้านโรคตับอักเสบ (Antihepatotoxic) ต้านแบคทีเรีย (Antibacterial) ต้านไวรัส (Antiviral) ต้านการ

แข็งตัวของเลือด (Antithrombotic) และต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) อีกทั้งยังป้องกันการเกิดโรคภูมิแพ้ (Antiallergenic)

Frank และคณะ (2005) ศึกษาถึงผลทางเภสัชจลนพลศาสตร์เกี่ยวกับประโยชน์ของแอนโทไซยานินในสารสกัดกระเจียบแดง โดยการทดสอบกับกลุ่มคนที่มีสุขภาพดี จำนวน 6 คน โดยให้รับประทานสารสกัดกระเจียบแดงในปริมาณ 150.0 มิลลิกรัม ซึ่งมีปริมาณไซยานิดิน 3-แซมบูไบโอไซด์ และเดลฟินิดิน 3-แซมบูไบโอไซด์ เท่ากับ 62.6 และ 81.6 มิลลิกรัมของแอนโทไซยานินทั้งหมด ตามลำดับ และมีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในรูปอนุพันธ์ไซยานิดิน เท่ากับ 147.4 มิลลิกรัม เมื่อรับประทานสารสกัดกระเจียบแดง เป็นเวลา 7 ชั่วโมง พบว่า มีปริมาณไซยานิดิน 3-แซมบูไบโอไซด์, เดลฟินิดิน 3-แซมบูไบโอไซด์ และปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดที่ถูกขับออกมาทางปัสสาวะ เท่ากับ 0.016%, 0.021% และ 0.018% ของปริมาณสารสกัดที่รับประทาน ตามลำดับ ซึ่งการประเมินคุณประโยชน์ของแอนโทไซยานินต่อสุขภาพนั้น จำเป็นต้องศึกษาทั้งในรูปของแอนโทไซยานิดิน 3-ไกลโคไซด์ (Intact glycosides) และในรูปคอนจูเกต (Conjugates) ซึ่งพบในพลาสมาเลือดและในปัสสาวะ

Werlein และคณะ (2005) ศึกษาผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของแอนโทไซยานินต่อ *Escherichia coli* DSM 498 และ *Staphylococcus aureus* DSM 799 โดยแยกแอนโทไซยานินบริสุทธิ์จากแบลคเคอร์แรนท์ (Blackcurrant) ที่ประกอบด้วย ไซยานิดิน 3-รูติโนไซด์ (Cyanidin 3-rutinoside) 48.0%, เดลฟินิดิน 3-รูติโนไซด์ (Delphinidin 3-rutinoside) 21.0%, ไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ 6.0% และเดลฟินิดิน 3-กลูโคไซด์ 4.0% พบว่า แอนโทไซยานินจากสารสกัดแบลคเคอร์แรนท์ ไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งสองชนิด แต่การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์อาจมีผลมาจากสารไฟโตเคมีคอล (Phytochemical) อื่นๆ ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิก ในขณะที่ Puupponen-Pimia และคณะ (2001 อ้างโดย Werlein *et al.*, 2005) รายงานว่า สารสกัดแบลคเคอร์แรนท์ มีผลในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ *Escherichia coli* CM 871 ทั้งนี้ได้อธิบายว่าการยับยั้งกิจกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดในกลุ่มเบอร์รี่เกิดจากปัจจัยการทำงานร่วมกัน (Synergistic) ของสารประกอบฟีนอลิกชนิดต่างๆ ได้แก่ กรดฟีนอลิก จำพวกกรดคาเฟอิก และสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ เช่น เคอร์เซทิน และแอนโทไซยานิน เป็นต้น

Hirunpanich และคณะ (2006) ศึกษาผลของสารสกัดกระเจียบแดงต่อการลดปริมาณคลอเลสเตอรอล (Hypocholesterolemic) ในหนูทดลองโดยใช้หนู (*Rattus norvegicus*) สายพันธุ์ Sprague-Dawley น้ำหนักประมาณ 100.0-200.0 กรัม ที่มีภาวะคลอเลสเตอรอลในเลือดสูง (Hypercholesterolemic, 140.0 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร) นำมาป้อนอาหารที่ประกอบด้วยสารสกัดจากกระเจียบแดงแห้งในปริมาณ 500.0 และ 1,000.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักหนู เปรียบเทียบกับ

ชุดควบคุมที่ไม่มีการป้อนอาหารที่ประกอบด้วยสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงแห้ง เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า อาหารที่ประกอบด้วยสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงแห้งในปริมาณ 500.0 และ 1,000.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักหนู สามารถลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดได้ในปริมาณ 22.0% และ 26.0% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่ง Gaet (1999 อ้างโดย Hirunpanich *et al.*, 2006) รายงานว่า ในกระเจี๊ยบแดงมีองค์ประกอบทางเคมีของสารชนิดต่างๆ เช่น บีตา-ไซโตสเตอรอล (β -sitosterol) แอนโทไซยานิน (ไซยานิดิน 3-รูทีโนไซด์ และเคลฟินีดิน) เคอร์เซทิน เบตาแคโรทีน โพลีแซ็กคาไรด์ กาแล็กโทส เพคติน และแวกซ์ รวมทั้งกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ เช่น กรดแอสคอร์บิก กรดอะราคิติก (Arachidic acid) กรดซิตริก และกรดสเตียริก เป็นต้น

Mazza (2007) รายงานว่า แอนโทไซยานินสามารถถูกดูดซึม และย่อยสลายได้ในร่างกายมนุษย์ โดยเมื่อตรวจสารเมตาโบไลต์จากการย่อยสลายแอนโทไซยานินในร่างกาย พบว่า สามารถตรวจพบแอนโทไซยานินในรูปโครงสร้างพื้นฐานเดิม (Basic anthocyanin structure) และจากการศึกษาทางเภสัชจลนพลศาสตร์เบื้องต้นเป็นที่แน่ชัดว่า ความเข้มข้นของแอนโทไซยานิดินในรูปไกลโคไซด์ และกลูโคโรไซด์ (Glucuronide) จะพบได้ในตัวอย่างเลือด (0-5 ชั่วโมง) โดยพบการเพิ่มขึ้นของกระบวนการเมทิลเลชัน (Methylation) สัมพันธ์กับเวลาที่เพิ่มขึ้น สมบัติทางชีวภาพของแอนโทไซยานินจึงถูกผันแปรตามเวลาที่เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงอันเนื่องมาจากกระบวนการเมตาบอลิซึม (Metabolic transformation) ภายหลังการบริโภคแอนโทไซยานิน

2.2 แอนโทไซยานินในกระเจี๊ยบแดง

อรุณพร อธิรัตน์ และคณะ (2548) รายงานว่า เมื่อวิเคราะห์สารประกอบต่างๆ ในกระเจี๊ยบแดงด้วยระบบ HPLC พบว่า น้ำคั้นกระเจี๊ยบแดงสด ประกอบด้วยสารสำคัญจำพวก เคลฟินีดิน 3-แซมบูไบโอไซด์, ไซยานิดิน 3-แซมบูไบโอไซด์ และเคอร์เซทิน เป็นต้น

Du และ Francis (1973 อ้างโดย Gradinaru *et al.*, 2003) รายงานว่า กระเจี๊ยบแดง ประกอบด้วยแอนโทไซยานิน 2 ชนิดหลัก คือ เคลฟินีดิน 3-แซมบูไบโอไซด์ หรือเคลฟินีดิน 3-ไซโลซิลกลูโคไซด์ (Delphinidin 3-xylosylglucoside) หรือไฮบิซิน (Hybiscin) และไซยานิดิน 3-แซมบูไบโอไซด์ หรือไซยานิดิน 3-ไซโลซิลกลูโคไซด์ (Cyanidin 3-xylosylglucoside) หรือ กอสสิไพไซยานิน (Gossypicyanin) ส่วนแอนโทไซยานิน 2 ชนิดที่พบรองลงมา คือ เคลฟินีดิน 3-กลูโคไซด์ (Delphinidin 3-glucoside) และไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ (Cyanidin 3-glucoside)

Wong และคณะ (2002) ศึกษาคุณภาพทางเคมีกายภาพของกระเจี๊ยบแดง โดยวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินในกระเจี๊ยบแดงด้วยระบบ HPLC ตามวิธีของ Ancos และคณะ (2000) พบว่า ในกระเจี๊ยบแดง มีแอนโทไซยานินชนิดเคลฟินีดิน 3-แซมบูไบโอไซด์, ไซยานิดิน

3-แชนมูไบโอไซค์ และเคลฟีนิดิน 3-กลูโคไซค์ ในปริมาณ 71.40%, 26.60% และ 2.00% ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับ Pouget และคณะ (1990 อ้างโดย Bridle and Timberlake, 1996) ที่รายงานว่า กระเจี๊ยบแดง มีแอนโทไซยานินชนิดเคลฟีนิดิน 3-แชนมูไบโอไซค์ และไซยานิดิน 3-แชนมูไบโอไซค์ ในปริมาณ 70.90% และ 29.10% ตามลำดับ

งานวิจัยนี้ศึกษาปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด ในรูปไซยานิดิน 3-กลูโคไซค์ ด้วยวิธี pH differential method วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 และ 700 นาโนเมตร ในสารละลายบัฟเฟอร์ KCl-HCl (ค่าพีเอช 1.0) และ $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ -HCl (ค่าพีเอช 4.5) รายงานค่าในรูปมิลลิกรัมต่อลิตรตัวอย่าง ซึ่งที่ค่าพีเอช เท่ากับ 1.0 แอนโทไซยานินจะอยู่ในรูปฟลาเวียมแคทไอออน (Flavylium cation) ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด และที่ค่าพีเอช เท่ากับ 4.5 แอนโทไซยานินจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของคาร์บินอล เบส (Carbinol base) ให้ค่าการดูดกลืนแสงต่ำสุด ที่ความยาวคลื่นเดียวกัน ดังนั้นจึงสามารถคำนวณปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด จากค่าความแตกต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเดียวกันระหว่างสารละลายบัฟเฟอร์ที่ระดับค่าพีเอชต่างกัน ได้ ซึ่งวิธีการนี้ค่าการดูดกลืนแสงเนื่องจากการมีสารประกอบอื่น นอกเหนือจากแอนโทไซยานิน ซึ่งดูดกลืนแสงในช่วงเดียวกับแอนโทไซยานินจะถูกหักล้างไป (Fuleki and Francis, 1968)

2.3 ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อสีของแอนโทไซยานิน

แอนโทไซยานินเป็นสารประกอบที่ไม่ค่อยเสถียร ดังนั้นในระหว่างกระบวนการแปรรูปต่างๆ เช่น การสกัด การทำให้บริสุทธิ์ กระบวนการแปรรูป ตลอดจนการเก็บรักษา ล้วนมีผลทำให้โครงสร้างของแอนโทไซยานินเกิดการเปลี่ยนแปลง ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของสีแอนโทไซยานินขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง แต่ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของสีแอนโทไซยานิน คือ โครงสร้าง ค่าพีเอช แสงสว่าง ออกซิเจน อุณหภูมิ และการรวมตัวกับสารอื่นๆ (Copolymerization) เป็นต้น (Jackman and Smith, 1996; Tsai and Huang, 2004)

2.3.1 โครงสร้าง

โครงสร้างของแอนโทไซยานินที่เปลี่ยนแปลงไปจะมีผลต่อสีของแอนโทไซยานิน โดยหากในโครงสร้างวงแหวนฟีนิล (วงแหวน B) มีจำนวนหมู่ไฮดรอกซิลเพิ่มขึ้นจะทำให้มีสีเข้มขึ้น และสีของแอนโทไซยานินจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินมากขึ้น และหากมีการเพิ่มจำนวนหมู่เมทอกซิลแทนที่หมู่ไฮดรอกซิล ที่ตำแหน่ง 3' และ 5' จะทำให้สีของแอนโทไซยานินมีสีแดงเพิ่มขึ้น (นิธิยา รัตนปนนท์, 2549; Deman, 1990; Wrolstad, 2004) โดยโครงสร้างที่เปลี่ยนแปลง

ไปของแอนโทไซยานินเป็นผลมาจากการเพิ่มขึ้นของจำนวนหมู่ไฮดรอกซิล และหมู่เมทอกซิล (Braverman, 1963 อ้างโดย Deman, 1990) ดังแสดงใน Figure 4

เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างของแอนโทไซยานินจะเห็นได้ว่า แอนโทไซยานิน ขาคอิเลคตรอนที่ Flavylium nuclei จึงทำให้แอนโทไซยานินมีความว่องไวต่อปฏิกิริยาสูง ผลจากปฏิกิริยาจะได้สารประกอบซึ่งมีโครงสร้างและสีที่ไม่พึงประสงค์ บางครั้งอาจทำให้ผลิตภัณฑ์อาหารมีสีน้ำตาล

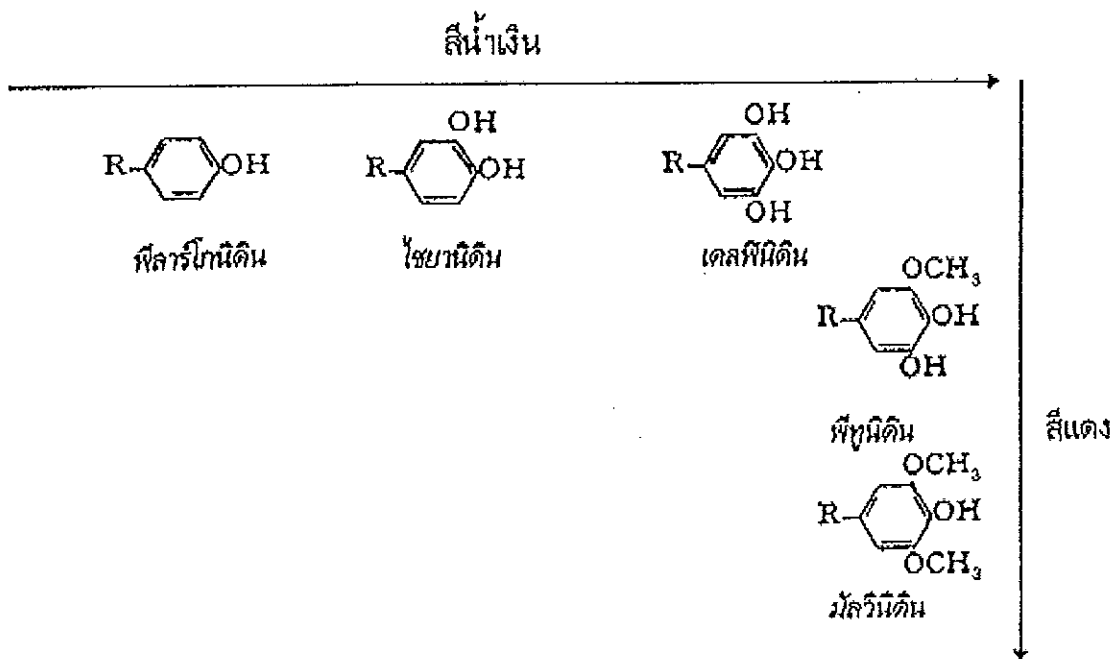


Figure 4. Effect of hydroxyl (-OH) and methoxyl (-OCH₃) on color of anthocyanins
ที่มา : Braverman (1963 อ้างโดย Deman, 1990)

2.3.2 ค่าพีเอช

ค่าพีเอชของสารละลายที่แอนโทไซยานินละลายอยู่มีผลต่ออัตราการสลายตัวของแอนโทไซยานิน ทำให้สีของแอนโทไซยานินเปลี่ยนแปลงไป เช่น ไซยานินซึ่งเป็นสีแดงของเชอร์รี่ และแครนเบอร์รี่ จะเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีม่วง และสีน้ำเงิน เมื่อค่าพีเอช 3.0 เปลี่ยนเป็นค่าพีเอช 8.5 และจากค่าพีเอช 8.5 เป็นค่าพีเอช 11.0 ซึ่งโครงสร้างโมเลกุลของแอนโทไซยานิน มีการเปลี่ยนแปลง (นิธิยา รัตนาปนนท์, 2549) ดังแสดงใน Figure 5

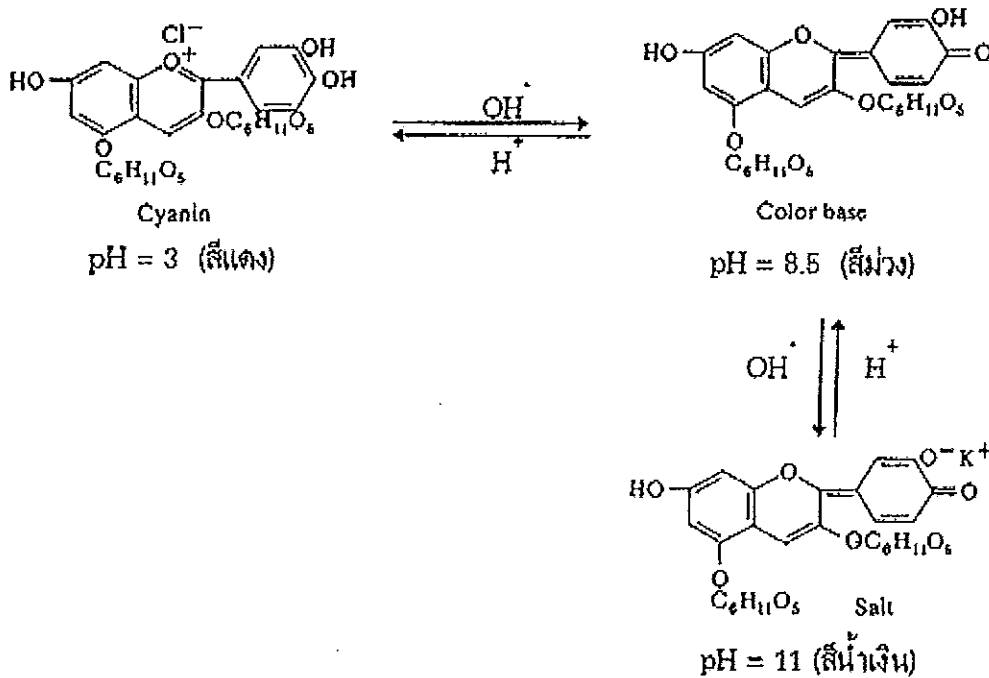


Figure 5. Structure changes of cyanin molecule according to pH changes from 3.0 to 8.5 and 8.5 to 11.0

ที่มา : Aurand และ Woods (1973)

ในธรรมชาติแอนโทไซยานินจะมีโครงสร้างอยู่ 4 รูป คือ ควินอยดอล เบส (Quinoidal base: A) ฟลาวิลีียม แคทไอออน (Flavylium cation: AH^+) คาร์บีนอล ซูโดเบส (Carbinol pseudobase: B) และซาลโคน (Chalcone: C) ซึ่งจะเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช กล่าวคือ เมื่อค่าพีเอชอยู่ในช่วงต่ำกว่า 2.0 แอนโทไซยานินจะอยู่ในรูปของฟลาวิลีียม แคทไอออน ซึ่งมีสีแดง แต่เมื่อค่าพีเอชสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว (ค่าพีเอช อยู่ในช่วง 6.0-8.0) ฟลาวิลีียม แคทไอออนจะเกิดการสูญเสียโปรตอน แอนโทไซยานินจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของควินอยดอล เบส ซึ่งมีสีฟ้า แต่เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชต่ำกว่า 2.0 อีกครั้ง โปรตอนจะเข้ามาเกาะ (Protonate) แอนโทไซยานินจะกลับมาอยู่ในรูปของฟลาวิลีียม แคทไอออน ซึ่งมีสีแดง อีกครั้ง และเมื่อเกิดปฏิกิริยาไฮเดรชัน (Hydration) แอนโทไซยานินจะเปลี่ยนรูปจากฟลาวิลีียม แคทไอออน ซึ่งมีสีแดง มาอยู่ในรูปของคาร์บีนอล ซูโดเบส ไม่มีสี มีค่าพีเอช อยู่ในช่วง 4.0-6.0 และเมื่อเกิดการไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) แอนโทไซยานินจะเปลี่ยนแปลงโครงสร้างจากคาร์บีนอล ซูโดเบส ไม่มีสี และเปลี่ยนมาอยู่ในรูปซาลโคน ซึ่งไม่มีสีเช่นกัน ค่าพีเอชอยู่ในช่วง 3.0-5.0 เกิดการเปิดออกของวงแหวน C (Giusti และ Wrolstad, 2001; Lee, 2005; Rein, 2005) ดังแสดงใน Figure 6

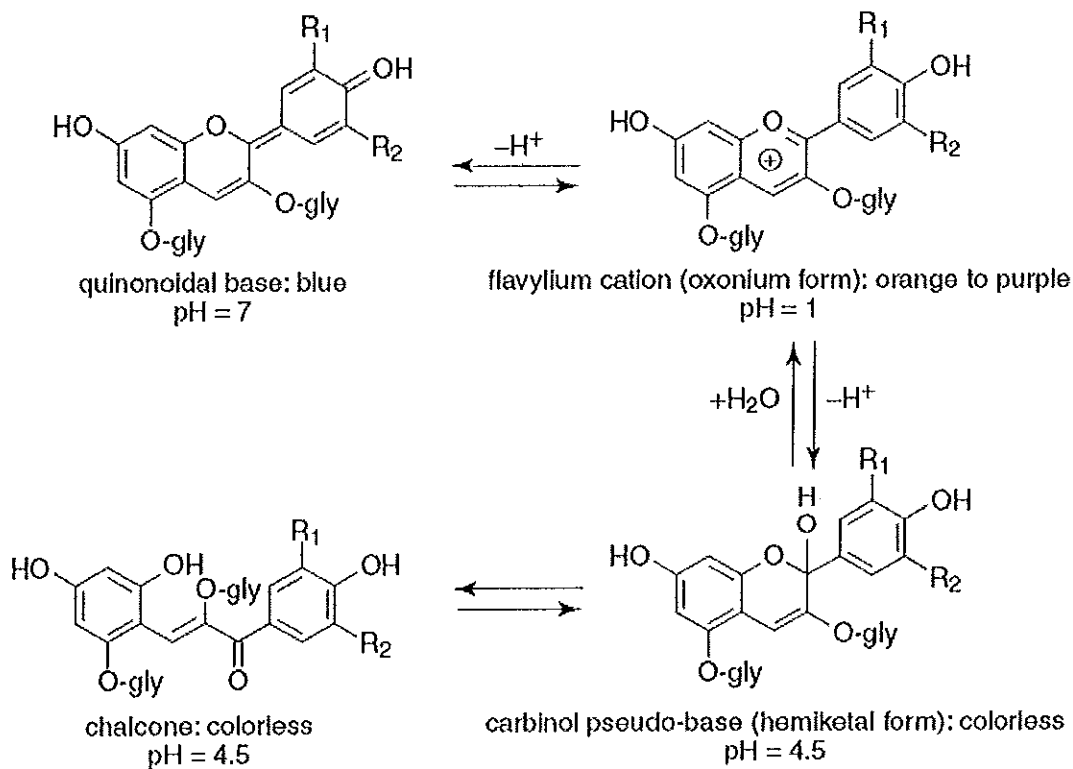


Figure 6. Predominant anthocyanin structural forms present at different pH levels

ที่มา : Giusti และ Wrolstad (2001)

Carbita และคณะ (2000) ศึกษาผลของค่าพีเอชต่อความคงตัวของอนุพันธ์แอนโทไซยานิน 6 ชนิด ซึ่งอยู่ในรูปของ 3-กลูโคไซด์ โดยใช้แหล่งของแอนโทไซยานินจากสตรอเบอร์รี่ พันธุ์ *Fragaria ananassa* (พีลาร์โกนิน 3-กลูโคไซด์) ข้าวเจ้า พันธุ์ *Oriza sativa* (ไซยานิน 3-กลูโคไซด์ และพีโอนิน 3-กลูโคไซด์) ดอกไม้ พันธุ์ *Abies koreana* (เดฟีนิน 3-กลูโคไซด์ และพิทูนิน 3-กลูโคไซด์) และบลูเบอร์รี่ พันธุ์ *Vaccinium spp.* (มัลวินิน 3-กลูโคไซด์) ที่ละลายอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 1.0-12.0 เก็บรักษาในสภาวะที่ไม่มีแสงสว่าง ที่อุณหภูมิ 10.0 และ 23.0 องศาเซลเซียส นาน 60 วัน แล้ววัดค่าความเข้มของสี (Colour intensities) ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (Maximum absorption wavelength, λ_{max}) ที่ความยาวคลื่น 240 และ 700 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV/Vis spectra พบว่า ภายใต้สภาวะที่มีความเป็นกรดสูง ค่าพีเอชอยู่ในช่วง 1.0-3.0 พบว่ามีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดคงเหลือมากกว่า 70.0% หลังเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10.0 องศาเซลเซียส นาน 60 วัน ในขณะที่สภาวะที่ค่าพีเอชอยู่ในช่วง 5.0-6.0 จะเกิดการสูญเสียปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดมากกว่า 90.0% แม้เก็บรักษาเพียง 8 วัน เช่นเดียวกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 23.0 องศาเซลเซียส แต่อย่างไรก็ดี อัตราการสลายตัวของแอนโทไซยานินที่อุณหภูมิ 23.0 องศาเซลเซียส เก็บรักษานาน 60 วัน ก็ยังสามารถวัดปริมาณ

แอนโทไซยานินทั้งหมดได้ถึง 40.0% ของปริมาณแอนโทไซยานินเริ่มต้น จึงสรุปได้ว่า ความคงตัวของอนุพันธ์แอนโทไซยานินที่อยู่ในรูป 3-กลูโคไซด์ทั้ง 6 ชนิด สามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงได้ในช่วงค่าพีเอช 1.0-12.0 ซึ่งพบว่าหากอยู่ในสถานะที่ค่าพีเอชอยู่ในช่วง 1.0-3.0 แอนโทไซยานินจะอยู่ในรูปฟลาเวียม แคทไอออน ซึ่งมีความเข้มของสีแดงสูง และมีความคงตัวของแอนโทไซยานินมากกว่า 60 วัน เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10.0 องศาเซลเซียส แต่พบว่าความคงตัวและความเข้มของสีแอนโทไซยานินจะลดลง เมื่อเข้าสู่สถานะที่มีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 5.0-7.0 เกิดการเปลี่ยนแปลงในลักษณะบาโทโครมิกชิฟต์ (Bathochromic shift) แถบการดูดกลืนแสงเลื่อนไปในทางที่มีความยาวคลื่นเพิ่มขึ้นเมื่อมีค่าพีเอชเพิ่มขึ้น ส่งผลให้แอนโทไซยานินมีสีน้ำเงิน แสดงให้เห็นว่า ค่าพีเอชแตกต่างกันส่งผลต่อความคงตัวของแอนโทไซยานินแต่ละชนิดไม่เหมือนกัน โดยปกติที่ค่าพีเอชต่ำ ซึ่งเป็นสถานะที่เป็นกรด ความคงตัวของแอนโทไซยานินจะสูงกว่าในสถานะที่มีค่าพีเอชสูง ซึ่งเป็นสถานะที่เป็นเบส

Kalt และคณะ (2000) ศึกษาผลของค่าพีเอชต่อคุณภาพทางเคมีของน้ำบลูเบอร์รี่ ซึ่งได้จากน้ำคั้นบลูเบอร์รี่สด แล้วปรับให้มีค่าพีเอช เท่ากับ 1.0, 4.0 และ 7.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก หรือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ แล้วเก็บรักษาในสถานะที่ไม่มีแสงสว่าง อุณหภูมิ 20.0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ วิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด ด้วยวิธี pH differential method ใช้ค่าคงที่ของอนุพันธ์มัลวิดิน 3-กลูโคไซด์ (Molar extinction coefficient, ϵ) เท่ากับ $28,000 \text{ Lmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ตามวิธีของ Wrolstad (1976) พบว่า น้ำบลูเบอร์รี่ ที่ค่าพีเอช 1.0, 4.0 และ 7.0 มีปริมาณมัลวิดิน 3-กลูโคไซด์ เท่ากับ 118.0, 15.7 และ 8.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของน้ำบลูเบอร์รี่ตามลำดับ และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu's reagent วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader และใช้กรดแกลลิกเป็นสารละลายมาตรฐาน ตามวิธีของ Singleton และ Rossi (1965) พบว่า น้ำบลูเบอร์รี่ที่ค่าพีเอช 1.0, 4.0 และ 7.0 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 1,064.0, 756.0 และ 816.0 ไมโครกรัมกรดแกลลิกต่อมิลลิลิตรของน้ำบลูเบอร์รี่ ตามลำดับ และเมื่อวิเคราะห์สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี Oxygen radical absorbing capacity (ORAC) และใช้โทรลอกซ์เป็นสารละลายมาตรฐาน ตามวิธีของ Cao และคณะ (1995) พบว่า น้ำบลูเบอร์รี่ ที่ค่าพีเอช 1.0, 4.0 และ 7.0 มีสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ (ORAC) เท่ากับ 20.4, 20.4 และ 14.9 ไมโครโมลโทรลอกซ์ต่อมิลลิลิตรของน้ำบลูเบอร์รี่ ตามลำดับ จึงสรุปได้ว่า น้ำบลูเบอร์รี่ ที่ผ่านการปรับด้วยกรดให้มีค่าพีเอชเท่ากับ 1.0 มีปริมาณมัลวิดิน 3-กลูโคไซด์สูงกว่าน้ำบลูเบอร์รี่ ที่มีค่าพีเอช เท่ากับ 4.0 และ 7.0 ตามลำดับ ซึ่ง น้ำบลูเบอร์รี่ ที่มีค่าพีเอช เท่ากับ 4.0 และ 7.0 จะไม่คงตัวในระหว่างการวิเคราะห์ด้วยวิธี pH differential method (ในสารละลายบัฟเฟอร์ค่าพีเอช 1.0 และ 4.5) ส่งผลให้แอนโทไซยานิน

มีปริมาณลดลง และพบว่าน้ำบลูเบอร์รี่ที่ค่าพีเอช 7.0 โครงสร้างแอนโทไซยานินเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของชาลโคน ทำให้แอนโทไซยานินมีปริมาณลดลง (Francis, 1989 อ้างโดย Kalt *et al.*, 2000)

Wrolstad (2000 อ้างโดย Skrede and Wrolstad, 2002) รายงานว่า แอนโทไซยานินจะแสดงค่าสีปกติตามธรรมชาติเมื่ออยู่ในสถานะที่มีค่าพีเอชต่ำ (ค่าพีเอช 1.0-4.0) ซึ่งโมเลกุลอยู่ในรูปของออกโซเนียม (Oxonium form) และหากอยู่ในสถานะที่มีความเป็นกรดโมเลกุลของออกโซเนียมจะมีความเสถียรมากขึ้น ทำให้แอนโทไซยานินมีความคงตัวเพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน แต่หากค่าพีเอชสูงขึ้นมากกว่า 4.5 แอนโทไซยานินจะไม่เสถียร เนื่องจากโครงสร้างโมเลกุลของแอนโทไซยานินมีความซับซ้อน เช่น เอซิลเลชัน (Acylation) และตำแหน่งการแทนที่ของไกลโคซิดิก (Glycosidic substitution) จึงมีผลต่อสีของแอนโทไซยานิน เมื่อค่าพีเอชเกิดการเปลี่ยนแปลง

Aina และ Shodipe (2006) ศึกษาผลของค่าพีเอชต่อความคงตัวของสีแอนโทไซยานินในน้ำกระเจี๊ยบแดง โดยการสกัดกระเจี๊ยบแดงสดด้วยน้ำ แล้วแยกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 น้ำกระเจี๊ยบแดงสดเติมน้ำตาลซูโครส (10.0 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด เท่ากับ 8.35 องศาบริกซ์) กลุ่มที่ 2 น้ำกระเจี๊ยบแดงสดที่เจือจางด้วยน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1 ต่อ 2 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ก่อนเติมด้วยกรดฟอสฟอริก (Phosphoric acid) 4.0% และกรดซิตริก 4.0% และกลุ่มที่ 3 กลุ่มควบคุม (Untreated) จากนั้นจึงให้ความร้อนจนกระทั่งอุณหภูมิของน้ำกระเจี๊ยบแดง เท่ากับ 80.0 องศาเซลเซียส แล้วบรรจุลงในขวดแก้ว และขวด PET (Polyethylene terephthalate) ปิดฝาให้สนิทแล้วทำให้เย็นทันที นำมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5.0 ± 1.0 และ 28.0 ± 1.0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 สัปดาห์ แล้ววิเคราะห์ค่าการคงเหลือของ pigment (Pigment retention) ด้วย UV spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร วิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด ด้วยวิธี pH differential method รายงานค่าในรูปไซยานิดิน 3-กาแลคโตไซด์ ตามวิธีของ Fuleki และ Francis (1968) พบว่า ค่าการคงเหลือของ pigment ในตัวอย่างที่ผ่านการปรับด้วยกรด (Food acidulant) มีค่าสูงกว่าตัวอย่างที่ไม่มีการปรับด้วยกรด แต่พบว่า ความเข้มของสีแดงจะลดลงในทุกๆ ตัวอย่าง แสดงให้เห็นว่าปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดลดลงด้วยเช่นกัน นอกจากนี้ยังพบว่า กลุ่มของน้ำกระเจี๊ยบแดงที่ผ่านการเติมกรดฟอสฟอริก และกรดซิตริก กับกลุ่มควบคุม มีค่าการคงเหลือของ pigment เท่ากับ 82.0%, 79.0% และ 62.0% ของปริมาณแอนโทไซยานินเริ่มต้น ตามลำดับ ซึ่งน้ำกระเจี๊ยบแดงที่เติมด้วยกรดฟอสฟอริกมีค่าการคงเหลือของ pigment สูงกว่าน้ำกระเจี๊ยบแดงที่เติมด้วยกรดซิตริก อาจจะอธิบายได้ในความสัมพันธ์ของกรดฟอสฟอริกที่เป็นกรดอนินทรีย์ (Inorganic acid) ซึ่งมีศักยภาพในการไอออไนซ์ (Ionisation) ในระดับสูง นอกจากนี้ Skrede (1985 อ้างโดย Aina and Shodipe, 2006) ยังรายงานว่า การใช้สารละลายกรดจะทำให้มีความคงตัวของสีแอนโทไซยานินเพิ่มขึ้น และหาก

แอนโทไซยานินอยู่ในสถานะที่มีค่าพีเอชต่ำ โครงสร้างของแอนโทไซยานินอยู่ในรูปของ ฟลาเวียม แทไอออน จึงทำให้แอนโทไซยานินมีความคงตัวของสีแดงเพิ่มขึ้น

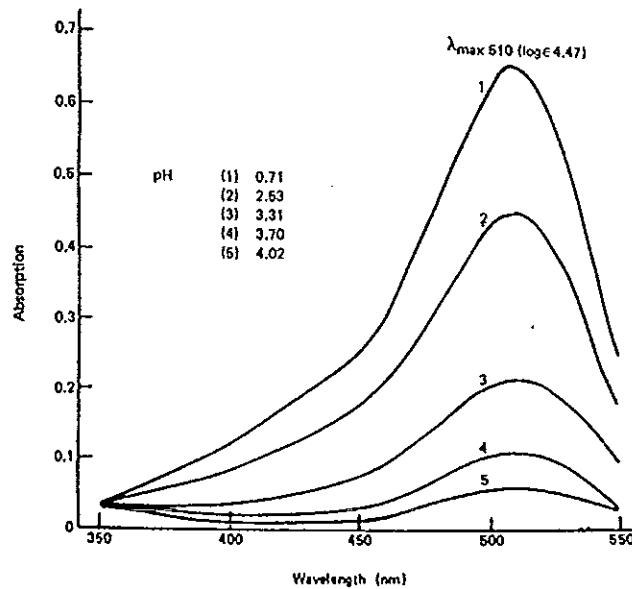


Figure 7. Absorption spectra of cyanidin 3-rhamnoglucoside in buffer solutions at pH 0.71 to 4.02. The concentration of pigment is 1.6×10^2 g/L.

ที่มา : Fennema (1985)

นอกจากนี้ ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดยังผันแปรตามค่าพีเอชด้วยเช่นกัน กล่าวคือ ค่าความยาวคลื่นสูงสุดจะเพิ่มขึ้นเมื่อค่าพีเอชสูงขึ้น (จงรักษ์ แก้วประสิทธิ์ และคณะ, 2545) ดังแสดงใน Table 3 ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงของแอนโทไซยานินลดลง เห็นได้จากค่าการดูดกลืนแสงของไซยานิดิน 3-แรมโนกลูโคไซด์ ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ระดับของค่าพีเอชต่างกัน (ค่าพีเอช 0.71-4.02) ดังแสดงใน Figure 7 และยังให้ค่า ϵ ผันแปรตามอนุพันธ์ของแอนโทไซยานิน ดังแสดงใน Table 4

Table 3. Absorption maximum and shade of color changes of anthocyanins at different pH levels

pH	Absorption maximum (nm)	Shade color of anthocyanins
4.00	520	Red
4.00-6.00	525-550	Violet red to Violet blue
6.50	570-575	Blue
9.00	590-600	Blue

ที่มา : จงรักษ์ แก้วประสิทธิ์ และคณะ (2545)

Table 4. Maximum absorption wavelength and molar extinction coefficient of anthocyanins derivative

Pigment	Solvent system	λ_{\max} (nm)	ค่า ϵ	
Cyanidin	0.1% HCl in EtOH	510	24600	
cyanidin 3-glucoside	Buffer solutions (pH 1.0)	510	26900	
	0.1% HCl in MeOH	530	34300	
cyanidin 3,5-glucoside	0.1 N HCl	520	30175	
	0.1% HCl in EtOH	522	34700	
Delphinidin	0.1% HCl in EtOH	522	34700	
delphinidin 3-glucoside	0.1% HCl in MeOH	543	29000	
Malvidin	0.1% HCl in EtOH	520	37200	
	malvidin 3-glucoside	0.1% HCl in MeOH	546	13900
	malvidin 3,5-glucoside	0.1% HCl in EtOH	519	10700
Pelargonidin	0.1% HCl in EtOH	504	17800	
	pelargonidin 3-glucoside	0.1% HCl in EtOH	516	31620
Peonidin	0.1% HCl in EtOH	511	37200	
	peonidin 3-glucoside	0.1% HCl in EtOH	536	11300
Petunidin	0.1 N HCl	520	33040	

ที่มา : คัดแปลงจาก Giusti และ Wrolstad (2001)

2.3.3 อุณหภูมิ และความร้อนของกระบวนการแปรรูป

ประทีน หยดย่อย และ ปราณีย์ อานเป็รื่อง (2546) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของเครื่องคั่วถั่วแดงหงสำเร็จรูป โดยพบว่าเมื่ออุณหภูมิและระยะเวลาการคั่วถั่วแดงเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ปริมาณแอนโทไซยานินลดลง เนื่องจากเกิดการสลายตัวของแอนโทไซยานินเมื่อได้รับความร้อน ทำให้สีของแอนโทไซยานินเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ขณะเดียวกันก็ยังพบว่า อุณหภูมิและระยะเวลาการคั่วถั่วแดงไม่มีผลต่อสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งอาจเกิดจากเมล็ดถั่วแดงยังคงมีสารประกอบฟีนอลิกชนิดอื่นอยู่ ถึงแม้สารต้านอนุมูลอิสระบางส่วนจะสูญเสียไปขณะให้ความร้อนก็ตาม ซึ่งสมบัติการต้านอนุมูลอิสระโดยรวมยังคงมีอยู่ หรืออาจเกิดขึ้นในกรณีที่การให้ความร้อนทำให้เกิดปฏิกิริยาการaramelization และปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Maillard browning) ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาทั้ง 2 นี้ อาจลดหรือเสริมฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

Zajac และคณะ (1992 อ้างโดย Skrede and Wrolstad, 2002) ศึกษาค่าครึ่งชีวิตของ แอนโทไซยานินในน้ำสตรอเบอร์รี่ เมื่อใช้อุณหภูมิในการสกัดแตกต่างกัน ได้แก่ 20.0, 38.0 และ 100.0 องศาเซลเซียส พบว่า การสกัดสตรอเบอร์รี่ ที่อุณหภูมิ 100.0 องศาเซลเซียส มีค่าครึ่งชีวิตของ แอนโทไซยานิน เท่ากับ 1 ชั่วโมง และการสกัดที่อุณหภูมิ 38.0 และ 20.0 องศาเซลเซียส มีค่า ครึ่งชีวิตของแอนโทไซยานิน เท่ากับ 240 และ 1,300 ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าเมื่ออุณหภูมิ ในการสกัดแอนโทไซยานินสูงขึ้น จะทำให้เกิดการสลายตัวและสูญเสียปริมาณแอนโทไซยานิน เร็วยิ่งขึ้นเช่นกัน

Kim และ Padilla-Zakour (2004) ศึกษาผลของกระบวนการแปรรูปต่อคุณภาพทาง เคมีของแยมเชอร์รี่ โดยใช้เชอร์รี่เปรี้ยว พันธุ์ Balaton แล้ววิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ทั้งหมด ด้วยวิธี Colorimetric analysis โดยใช้ Folin-Ciocalteu's reagent เป็นตัวทำละลาย รายงาน ค่าในรูปแบบลิตรกรัมกรดแกลลิกต่อตัวอย่าง 100 กรัม ตามวิธีของ Singleton และ Rossi (1965) วิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในรูปแบบไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ ด้วยวิธี pH differential method วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 และ 700 นาโนเมตร รายงานค่าในรูปแบบลิตรกรัม ต่อผลไม้หรือแยม 100 กรัม ใช้ค่า ϵ เท่ากับ $26,900 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ และน้ำหนักโมเลกุล (Molecular weight) เท่ากับ 449.2 กรัมต่อโมล ตามวิธีของ Giusti และ Wrolstad (2001) และวิเคราะห์สมบัติการ จับอนุมูล ABTS รายงานค่าในรูปแบบลิตรกรัม Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) ต่อตัวอย่าง 100 กรัม ตามวิธีของ Kim และคณะ (2002) พบว่า ผลเชอร์รี่สด มีปริมาณสารประกอบ ฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 254.10 ± 6.00 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อเชอร์รี่สด 100 กรัม มีปริมาณ แอนโทไซยานินทั้งหมดในรูปแบบไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ เท่ากับ 45.0 ± 2.30 มิลลิกรัมต่อเชอร์รี่สด 100 กรัม และมีสมบัติการจับอนุมูล ABTS เท่ากับ 354.8 ± 12.20 มิลลิกรัม VCEAC ต่อเชอร์รี่สด 100 กรัม และเมื่อนำผลเชอร์รี่สดมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์แยมเชอร์รี่ ให้ความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 65.0-68.0 องศาบริกซ์ (อุณหภูมิของน้ำที่ใช้ประมาณ 104.0-105.0 องศาเซลเซียส) แล้วบรรจุขณะ ร้อนที่อุณหภูมิ 90.0 องศาเซลเซียส ลงในขวดแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว พบว่า ผลิตภัณฑ์แยมเชอร์รี่ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดลดลงเหลือ เท่ากับ 132.90 ± 5.60 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อ แยมเชอร์รี่ 100 กรัม มีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในรูปแบบไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ ลดลงเหลือ เท่ากับ 5.4 ± 0.20 มิลลิกรัมต่อแยมเชอร์รี่ 100 กรัม และมีสมบัติการจับอนุมูล ABTS ลดลงเหลือ เท่ากับ 205.60 ± 8.50 มิลลิกรัม VCEAC ต่อแยมเชอร์รี่ 100 กรัม ซึ่งพบว่า ความร้อนที่ใช้มีผลทำให้ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในรูปแบบไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ และสมบัติการต้านอนุมูลอิสระมีปริมาณลดลง โดยปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด ในรูปแบบไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ มีปริมาณลดลงสูงสุด มีปริมาณที่ยังคงเหลืออยู่ต้นแปรตั้งแต่ 89.0%

จนถึง 21.0% และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานิน จากผลเซอร์สคัพพันธุ์ Balaton และผลิตภัณฑ์แอมเซอร์รี่ ด้วยระบบ HPLC พบว่า การแปรรูปด้วยความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 90.0 องศาเซลเซียส เป็นสาเหตุทำให้ปริมาณแอนโทไซยานินลดลง 90.0% นอกจากนี้ยังบ่งชี้ว่า มากกว่า 73.0% ของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และมากกว่า 65.0% ของสมบัติการต้านอนุมูลอิสระยังคงเหลืออยู่ภายหลังจากการแปรรูปผลเซอร์สคัพเป็นผลิตภัณฑ์แอมเซอร์รี่

Laleh และคณะ (2006) ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการสลายตัวของแอนโทไซยานินจากผลเบอร์รี่ สายพันธุ์ *B. integerrima* จากการทดลองได้กำหนดค่าที่เอชของสารสกัดจากผลเบอร์รี่ เท่ากับ 2.0 แล้วศึกษาความแตกต่างของอุณหภูมิการสกัดต่อปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด โดยการสกัดที่อุณหภูมิ 5.0, 15.0, 25.0 และ 35.0 องศาเซลเซียส เก็บรักษาเป็นระยะเวลา 84 วัน พบว่า ร้อยละของการสูญเสียปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด ที่อุณหภูมิการสกัด 5.0, 15.0, 25.0 และ 35.0 องศาเซลเซียส เท่ากับ 41.05%, 51.09%, 62.33% และ 89.42% ซึ่งอุณหภูมิในการแปรรูปเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิดการสลายตัวของโครงสร้างโมเลกุลของแอนโทไซยานิน เมื่ออุณหภูมิการสกัดเพิ่มขึ้นจะทำให้แอนโทไซยานินเกิดการสลายตัวได้มากขึ้น ทั้งนี้อาจเกิดจากกระบวนการไฮโดรไลเซชัน (Hydrolyzation) ของโครงสร้าง 3-ไกลโคไซด์ และวงแหวนไพริเลียม (Pyrilium ring) ที่อาจมีผลต่อการเกิดชาลโคน ซึ่งจะเกิดเป็นสีน้ำตาลในผลิตภัณฑ์อาหารที่มีแอนโทไซยานินเป็นองค์ประกอบ

Kirca และคณะ (2007) ศึกษาผลของความร้อนต่อความคงตัวของแอนโทไซยานินในน้ำแบลคแครอทเข้มข้น โดยนำแบลคแครอท (*Daucus carota* L. ssp. *Sativus* var. *atrorubens* Alef.) มาคั้นน้ำ มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด เท่ากับ 11.0 องศาบริกซ์ แล้วปรับค่าที่เอชของน้ำแบลคแครอทให้ได้เท่ากับ 4.3 ด้วย 20.0% กรดซิตริก แล้วกำจัดส่วนของเพคตินออกด้วยการใช้เอนไซม์ Panzym P5 (Begerow, Langenlonsheim, Germany) ป่มที่อุณหภูมิ 50.0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ผ่านการกรอง และทำให้เข้มข้นด้วยเครื่องระเหยแบบหมุนเหวี่ยงความดันต่ำ (Rotary low-pressure evaporator) จนกระทั่งน้ำแบลคแครอทที่มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด เท่ากับ 30.0 องศาบริกซ์ แล้วให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70.0, 80.0 และ 90.0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 2, 3,...จนถึง 9 ชั่วโมง แล้ววิเคราะห์ปริมาณโมโนเมอร์ิกแอนโทไซยานิน (ไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์) ด้วยวิธี pH differential method วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 และ 700 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-VIS double-beam spectrophotometer รายงานค่าในรูปไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ ใช้ค่า ϵ เท่ากับ 26,900 $\text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ และน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 449.2 กรัมต่อโมล ตามวิธีของ Giusti และ Wrolstad (2001) พบว่า โมโนเมอร์ิกแอนโทไซยานินมีอัตราการสลายตัวเป็นแบบปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง ซึ่งอัตราการสลายตัวจะเพิ่มขึ้น

เมื่ออุณหภูมิในการให้ความร้อนเพิ่มขึ้น ซึ่งน้ำแบลคแครอตเข้มข้น ที่มีค่าพีเอช 4.3 และปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด เท่ากับ 30.0 องศาบริกซ์ ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70.0, 80.0 และ 90.0 องศาเซลเซียส พบว่าค่าครึ่งชีวิตของแอนโทไซยานิน เท่ากับ 17.0, 8.4 และ 4.5 ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่ง Kirca และคณะ (2007) อธิบายว่า แอนโทไซยานินในน้ำแบลคแครอต ส่วนใหญ่จะอยู่ในรูป Acylated เช่น Cyanin 3-sinapoly-xylosyl-glucosyl-galactoside และ Cyanin 3-feruloyl-xylosyl-glucosyl-galactoside และในรูป Diacylated ซึ่ง Giusti และ Wrolstad (1996) รายงานว่า แอนโทไซยานินในรูป Acylated จะไม่เสถียรเมื่ออยู่ในสถานะที่มีค่าพีเอชเป็นกลางหรือกรดอ่อน

2.3.4 ออกซิเจน

ปริมาณออกซิเจนที่มีอยู่ในสารละลายแอนโทไซยานิน มีแนวโน้มในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันเพิ่มขึ้น โดยที่โมเลกุลของออกซิเจนจะทำปฏิกิริยากับแอนโทไซยานินในคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 หรือที่หมู่ไฮดรอกซิลของวงแหวน B ได้เป็นคาร์บินอล เบส หรือซาลิโคน หรือควินอยดอล เบส ซึ่งมีผลทำให้ฟลาโวนอยด์ แคทไอออน ลดลง ทำให้สีแดงของสารละลายลดลงเช่นกัน ทั้งนี้อัตราการเกิดออกซิเดชันยังขึ้นอยู่กับค่าพีเอชของสารละลาย อุณหภูมิ และความเข้มข้นของแอนโทไซยานินด้วย (ยูพาพร ผลาจรศักดิ์, 2547)

2.3.5 แสงสว่าง

ยูพาพร ผลาจรศักดิ์ (2547) รายงานว่า แอนโทไซยานินที่มีหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 จะสามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบเนื่องจากแสงสว่างได้มากกว่าแอนโทไซยานินที่ไม่มีหมู่ไฮดรอกซิล ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 นอกจากนี้แสงสว่างยังเป็นตัวเร่งให้เกิดการสลายตัวของแอนโทไซยานินจากความร้อน และเปลี่ยนโครงสร้างไปอยู่ในรูปของซาลิโคน ซึ่งไม่มีสี

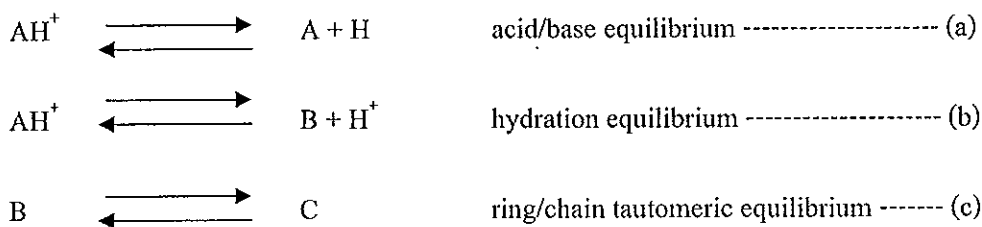
Sweeny (1981 อ้างโดย ยูพาพร ผลาจรศักดิ์, 2547) รายงานว่า อัตราการสลายตัวของแอนโทไซยานิน เกิดจากสารจำพวก Polyhydroxylate flavone, Isoflavone และ Aurone sulfonates (เป็น Copigment ที่เป็นสาเหตุในการเกิดบาโทโครมิกชิฟท์) ซึ่งมีส่วนในการทำให้แอนโทไซยานินมีความคงตัวลดลงเมื่อโดนแสงสว่าง เนื่องจากการเกิดการก่อตัวของโมเลกุลซึ่งเกิดจาก π - π ring interaction, H-bonding และ Ionic bonding ระหว่าง Sulfonate ซึ่งมีประจุลบกับฟลาโวนอยด์ ซึ่งขาดอิเล็กตรอน

Morais และคณะ (2002) ศึกษาอิทธิพลของสถานะการเก็บรักษาต่อความคงตัวของแอนโทไซยานิน โดยเก็บรักษาในสถานะที่มีและไม่มีแสงสว่าง ที่อุณหภูมิ 3 ระดับ คือ 24.0, 32.0 และ 40.0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน จากการทดลองพบว่า เมื่อเปรียบเทียบที่อุณหภูมิการเก็บรักษาเดียวกัน อัตราการสลายตัวของแอนโทไซยานินจะเพิ่มขึ้นเมื่ออยู่ในสถานะที่มีแสงสว่าง

2.3.6 Intermolecular copigmentation

การรวมตัวกับสารอื่นๆ เป็นปรากฏการณ์การเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนโทไซยานินกับสารประกอบชนิดอื่นๆ เช่น สารประกอบฟลาโวนอยด์ อัลคาลอยด์ กรดอะมิโน กรดอินทรีย์ นิวคลีโอไทด์ โพลีแซคคาไรด์ เหล็ก และแอนโทไซยานิน เป็นต้น ซึ่งสารประกอบเหล่านี้จะทำหน้าที่เป็น โคพิกเมนต์ ทำให้สีของแอนโทไซยานินเปลี่ยนแปลง ในขณะเดียวกัน แอนโทไซยานินก็ยังทำหน้าที่เป็น โคพิกเมนต์ได้เช่นเดียวกัน ทั้งนี้สีของแอนโทไซยานินที่เปลี่ยนแปลงไปยังขึ้นอยู่กับชนิด และความเข้มข้นของแอนโทไซยานิน และ โคพิกเมนต์ด้วย (Mazza and Miniati, 1993) ปฏิกิริยาของโคพิกเมนต์ที่เกิดขึ้นนั้นจะสัมพันธ์กับสารประกอบอื่นที่ไม่มีสี, metallic ions, โครงสร้างโมเลกุล หรือคอมเพล็กซ์ (Complex) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงหรือความเข้มของสีเพิ่มขึ้น ซึ่งการรวมตัวกับสารอื่นๆ ของแอนโทไซยานินกับโคพิกเมนต์ประเภทอื่น เป็นกลไกหลักที่มีผลต่อความคงตัวของสีในพืช ทั้งนี้โคพิกเมนต์โดยทั่วไปจะไม่มีสี แต่เมื่อรวมตัวกับสารละลายแอนโทไซยานิน จะเกิดเป็นปฏิกิริยาที่นำไปสู่การเกิดปรากฏการณ์ไฮเปอร์โครมิก (Hyperchromic effect) ซึ่งเป็นปรากฏการณ์ที่สารเกิดการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้น โดยไม่ได้เปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของตัวมันเอง และปรากฏการณ์บาร์โทโครมิกซัพท์ ซึ่งทำให้แถบการดูดกลืนแสง (Absorption spectrum) เปลี่ยนไปในทางความยาวคลื่นมากขึ้น (λ_{max} เพิ่มขึ้น) (Castaneda-Ovando *et al.*, 2009)

Fennema (1985 อ้างโดย บุศรารัตน์ สายเชื้อ, 2545) รายงานว่า ในสถานะที่แอนโทไซยานินอยู่ในสารละลายที่เป็นกรด แอนโทไซยานินจะมีโครงสร้าง 4 รูป คือ ควินอยดอล เบส (Quinoidal base: A) ฟลาวิลียมแคทไอออน (Flavylium cation: AH^+) คาร์บินอล ซูโดเบส (Carbinol pseudobase: B) และชาลโคน (Chalcone: C) ซึ่งกลไกการสลายตัวของแอนโทไซยานินเกิดได้ดังนี้



ในสารละลายที่มีค่าพีเอชต่ำ แอนโทไซยานินจะอยู่ในรูปของฟลาวิลียมแคทไอออน (AH^+) ที่ทำให้สารละลายมีสีแดง และเมื่อพีเอชเพิ่ม (b) พบว่า สามารถใช้ป้องกันการสลายตัวของแอนโทไซยานินได้ โดยการกำจัดน้ำออกเพื่อช่วยลดปฏิกิริยาไฮเดรชัน (Hydration) ทำให้แอนโทไซยานินเสถียรขึ้น และอีกปัจจัยหนึ่ง คือ น้ำตาลเป็นโคพิกเมนต์

ชนิดหนึ่ง ซึ่งสามารถเกิด Copigmentation กับแอนโทไซยานินได้ โดยส่วนของ Aromatic residues ของโคพิกเมนต์จะจับกับ Porphyrin ring ของฟลาโวลีออล แคทไอออน จึงทำให้แอนโทไซยานินมีเสถียรภาพดีขึ้น

3. อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ

3.1 อนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ เป็นสารที่มีอิเล็กตรอนอิสระ (Unpaired electron) อยู่ในวงนอกของอะตอม หรือโมเลกุล จึงมีความว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยา โดยรับอิเล็กตรอนจากสารอื่นๆ ที่ใกล้เคียงแล้วส่งผลให้ตัวเองเสถียรขึ้น ในขณะที่เดียวกันก็ชักนำให้สารที่ให้อิเล็กตรอนไปนั้นมีอิเล็กตรอนไม่ครบคู่จนกลายเป็นสารที่มีความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยา ซึ่งหากเกิดในระบบสิ่งมีชีวิต อาจทำอันตรายกับส่วนประกอบสำคัญของเซลล์รอบๆ บริเวณนั้น เช่น โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต หรือดีเอ็นเอ ทำให้สารชีวโมเลกุลเหล่านี้เกิดการเปลี่ยนแปลง โครงสร้าง และสูญเสียหน้าที่การทำงาน ดังนั้นในสภาวะที่มีการสร้างอนุมูลอิสระเป็นจำนวนมากจะก่อให้เกิดการบาดเจ็บของเซลล์ ซึ่งเป็นกลไกสำคัญที่ก่อให้เกิดโรคต่างๆ เช่น โรค มะเร็ง โรคหลอดเลือดหัวใจ โรคพาร์คินสัน เป็นต้น (Ames *et al.*, 1993 อ้างโดย ปณัฐรา ไชยมุติ, 2547)

อนุมูลอิสระที่สร้างขึ้นจากปฏิกิริยาชีวเคมีต่างๆ ภายในร่างกาย ได้แก่ อนุมูลเปอร์ออกไซด์ (Peroxyl radical; ROO^\bullet) อนุมูลไนตริกออกไซด์ (Nitric oxide; NO^\bullet) อนุมูลเปอร์ออกซิไนไตรท์ (Peroxynitrite; ONOO^-) อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ (Superoxide anion radical; $\text{O}_2^{\bullet -}$) อนุมูลไฮดรอกซิล (Hydroxyl radical; OH^\bullet) อนุมูลไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (Hydroperoxyl radical; HOO^\bullet) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide; H_2O_2) เป็นต้น (Halliwell and Gutteridge, 1999 อ้างโดย วิกาวดี ประสาททอง และคณะ, 2543)

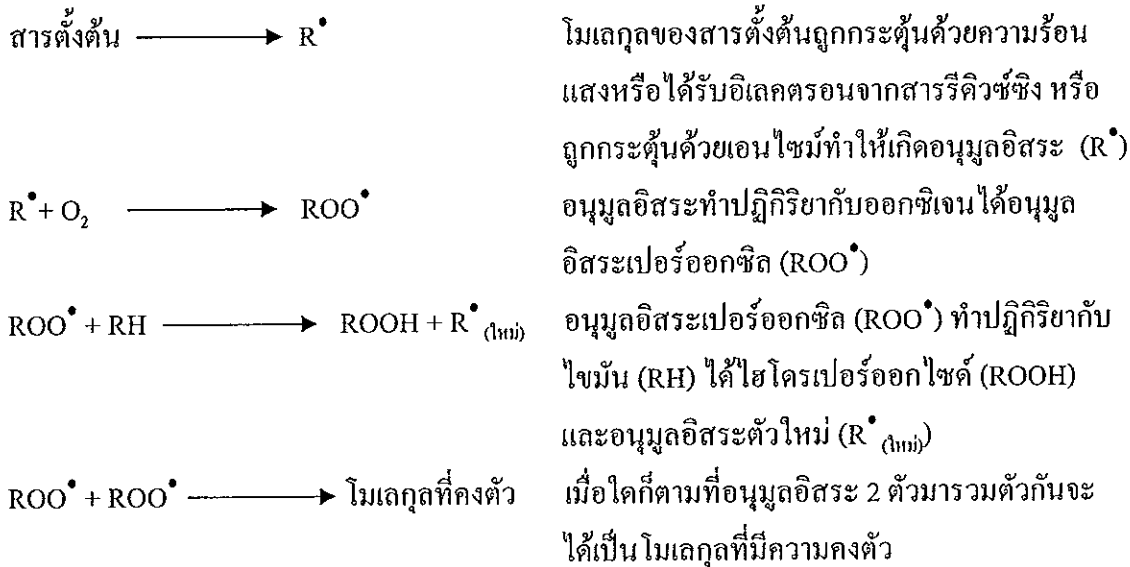
3.1.1 ปัจจัยที่เป็นสาเหตุของการเกิดอนุมูลอิสระ (ปณัฐรา ไชยมุติ, 2547)

3.1.1.1 ปัจจัยภายในร่างกาย เป็นผลมาจากกระบวนการเผาผลาญพลังงานของร่างกาย เป็นปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้นเอง หรือมีเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

3.1.1.2 ปัจจัยภายนอก เช่น รังสีอัลตราไวโอเล็ต รังสีเอ็กซ์ รังสีแกมมา โลหะหนัก สารปรุงแต่งอาหาร อาหารที่มีไขมันมาก ขาดวิตามินซี โปรตีนสูง การดื่มแอลกอฮอล์มากเกินไป ควันบุหรี่ ควันจากท่อไอเสียรถยนต์ ไอโซน และการออกกำลังกายอย่างหักโหม เป็นต้น

3.1.2 กลไกการสร้างอนุมูลอิสระ (นวลศรี รักษิยะธรรม และอัญญา เจนวิถีสุข, 2545)

แสดงได้ ดังนี้



3.2 สารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระ หรือสารแอนติออกซิแดนท์ (Antioxidants) หมายถึง สารที่ยับยั้งปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระ และป้องกันไม่ให้เกิดการตั้งอิเล็กตรอนตั้งแต่ตำแหน่งแรก โดยทำหน้าที่จับกับอนุมูลอิสระแล้วทำให้อนุมูลอิสระหมดความสามารถที่จะไปทำลายหรือเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบของเซลล์

สารต้านอนุมูลอิสระมีกลไกการทำงานต้านอนุมูลอิสระด้วยกันหลายแบบ เช่น คักจับ (Scavenge) อนุมูลอิสระโดยตรง ยับยั้งการสร้างอนุมูลอิสระ หรือเข้าจับ (Chelate) กับเหล็ก (เฟอร์รัสไอออน, Fe^{2+}) หรือป้องกันการสร้างอนุมูลอิสระ ซึ่งปกติร่างกายของคนเราจะมีสารต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติหลากหลายชนิด ทั้งที่เป็นเอนไซม์ เช่น ซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมูเทส (Superoxide dismutase) กลูตาไทโอน เพอร์ออกซิเดส (Glutathione peroxidase) และเคทาเลส (Catalase) และสารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่ใช่เอนไซม์ เช่น ยูเรท (Urate) อัลบูมิน (Albumin) บิลิรูบิน (Bilirubin) และทรานเฟอร์ริน (Transferrin) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีวิตามินบางชนิด เช่น บีตาแคโรทีน (β -carotene) วิตามินซี (Vitamin C) วิตามินอี (Vitamin E) รวมทั้งสารประกอบกลุ่มโพลีฟีนอล (Polyphenols) ต่างๆ ซึ่งพบมากในพืช ผัก และผลไม้ทั่วไป (Sies, 1991 อ้างโดย ปณัฐรา ไชยบุติ, 2547)

3.2.1 แหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระ (Yanishlieva-Maslarova, 2001) ได้แก่

3.2.1.1 สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ เช่น บิวทิลเฮเตด ไฮดรอกซีโทลูอิน (Butylated hydroxytoluene, BHT) และบิวทิลเฮเตด ไฮดรอกซีอะนิโซล (Butylated hydroxyanisole, BHA) เป็นต้น

3.2.1.2 สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ สารต้านอนุมูลอิสระชนิดนี้ พบได้ทั้งใน จุลชีพ สัตว์ และพืช ทั้งที่เป็นวิตามิน เช่น วิตามินซี วิตามินอี บีตาแคโรทีน และสารประกอบ ฟีนอลิก โดยเฉพาะสารโพลีฟีนอล เช่น ฟลาโวนอยด์ โทโคเฟอร์รอล (Tocopherol) และกรดฟีนอลิก เป็นต้น

3.2.2 วิธีการวิเคราะห์สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ

การวิเคราะห์สมบัติการต้านอนุมูลอิสระมีหลายวิธีด้วยกัน ซึ่งแต่ละวิธีมีหลักการที่ แตกต่างกันไป เช่น วัดความสามารถในการดักจับอนุมูลเปอร์ออกซิล ได้แก่ วิธี ORAC และ TRAP วัดความสามารถในการให้อิเล็กตรอน ได้แก่ การวัดความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกไอออน (FRAP) วัดความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ได้แก่ วิธีการวัดสมบัติการจับอนุมูล DPPH และ สมบัติการจับอนุมูล ABTS นอกจากนี้ยังมีวิธีการวัดการออกซิเดชันของไขมัน ได้แก่ วิธี Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) เป็นต้น (Perez-Jimenez and Saura-Calixto, 2006)

งานวิจัยนี้ ใช้วิธีการวิเคราะห์สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ วิธีการวัดสมบัติ การจับอนุมูล DPPH สมบัติการจับอนุมูล ABTS และความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกไอออน (FRAP) ซึ่งการวิเคราะห์ดังกล่าวใช้หลักการเดียวกันของการให้อิเล็กตรอน หรืออะตอมของ ไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระ (Stratil *et al.*, 2006) งานวิจัยนี้จึงเลือกวิเคราะห์สมบัติการต้านอนุมูล อิสระ 3 วิธี ดังนี้

3.2.2.1 สมบัติการจับอนุมูล DPPH (DPPH radical scavenging assay) วัดสมบัติการ จับอนุมูล DPPH ของสารที่มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ทำให้อนุมูล DPPH เปลี่ยนแปลงเป็น อนุมูลที่มีความเสถียร ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตรจึงลดลง (Perez-Jimenez and Saura-Calixto, 2006) โดยการเกิดปฏิกิริยาระหว่างอนุมูล DPPH กับสารที่มีสมบัติในการต้าน อนุมูลอิสระไม่มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับความเข้มข้นของสารตัวอย่าง โดยรายงานค่า ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่วัดได้ในรูปค่า EC_{50} ซึ่งหมายถึง ความเข้มข้นของสารสกัด กระเจียบแดงที่ไปลดปริมาณอนุมูล DPPH ลง 50% (Huang *et al.*, 2005)

3.2.2.2 สมบัติการจับอนุมูล ABTS (ABTS radical cation scavenging assay) วัดสมบัติการจับอนุมูล ABTS ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของ ABTS กับโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต (Potassium persulfate) วิธีนี้เป็นการวัดการลดลงของสีที่เกิดจากอนุมูล ABTS ในระบบที่มีสารต้านอนุมูลอิสระ โดยอนุมูล ABTS จะถูกรีดิวซ์และเปลี่ยนเป็นอนุมูล ABTS ที่มีความเสถียร ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ลดลง คำนวณสมบัติการจับอนุมูล ABTS โดยการเปรียบเทียบกับกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร กับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Trolox (Trolox standard) รายงานค่าในรูปแบบ TEAC (Trolox equivalents antioxidant capacity; ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่าง เมื่อเทียบเคียงกับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของ Trolox) ในหน่วยไมโครโมลสมมูลย์ของ Trolox ต่อกรัมตัวอย่าง (Re *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2005)

3.2.2.3 ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกไอออน (Ferric reducing ability power; FRAP) วัดความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกไอออน (FRAP) โดยการวัดความสามารถในการรีดิวซ์โลหะในระบบที่มีค่าพีเอชต่ำ (ค่าพีเอชประมาณ 3.6) สารประกอบเชิงซ้อนของ Fe^{3+} -TPTZ จะถูกรีดิวซ์ด้วยสารที่มีสมบัติต้านอนุมูลอิสระให้อยู่ในรูปเฟอร์รัสไอออน (Fe^{2+}) ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร เพิ่มขึ้น (Benzie and Strain, 1996) เปรียบเทียบค่าที่ได้กับกราฟมาตรฐานของ Trolox รายงานค่าในรูปแบบ TEAC ในหน่วยไมโครโมลสมมูลย์ของ Trolox ต่อกรัมตัวอย่าง

3.3 สมบัติการต้านอนุมูลอิสระของแอนโทไซยานิน

แอนโทไซยานินมีสมบัติในการดักจับอนุมูลต่างๆ ได้แก่ อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ อนุมูลไฮดรอกซิล อนุมูลเปอร์ออกซิล และอนุมูลไนตริกออกไซด์ ตลอดจนยับยั้งการออกซิเดชันของไขมันที่เหนียวทำให้เกิดโดยอนุมูลคิวปริกไอออน (Cu^{2+}) กรดแอสคอร์บิกร่วมกับอนุมูลเฟอร์รัสไอออน และรังสีอัลตราไวโอเล็ต นอกจากนี้ แอนโทไซยานินยังป้องกันการเหนียวทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันอันเนื่องมาจากอนุมูลคอปเปอร์ หรือเปอร์ออกซิล (Peroxy) ของไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำ (LDL) ในร่างกายมนุษย์ (Cao *et al.*, 2001)

เหียงใจ คาริเย๊ะ (2550) ได้ศึกษาปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกระเจียบแดงผงแห้ง โดยนำกระเจียบแดงแห้ง ที่มีปริมาณความชื้น เท่ากับ 10.0% ผ่านการปั่นลดขนาดด้วยเครื่องปั่นแห้ง นาน 3 วินาที แล้วทำการสกัดด้วยน้ำ ในอัตราส่วนระหว่างกระเจียบแดงแห้งต่อน้ำ เท่ากับ 1 ต่อ 10 ที่อุณหภูมิ 60.0 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที และทำให้เข้มข้น โดยใช้เครื่องทำให้เข้มข้นแบบใช้ไอน้ำในสถานะสูญญากาศ ที่อุณหภูมิ 70.0 องศาเซลเซียส ความดัน 44.0 เซนติเมตรปรอท

จนกระทั่งสารสกัดกระเจียบแดงเข้มข้นมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด เท่ากับ 40.0 องศาบริกซ์ นำสารสกัดกระเจียบแดงเข้มข้นที่ได้ทำแห้งด้วยวิธีการทำแห้งแบบสูญญากาศ (Vacuum dryer) ที่อุณหภูมิ 70.0 องศาเซลเซียส ความดัน 25.0 เซนติเมตรปรอท จนกระทั่งสารสกัดกระเจียบแดงมีปริมาณความชื้น เท่ากับ 9.0-11.0% จากการศึกษาลักษณะสมบัติทางเคมี พบว่า สารสกัดกระเจียบแดงผงแห้งที่ได้มีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด เท่ากับ 183.57 ± 0.84 มิลลิกรัมต่อสารสกัดกระเจียบแดงผงแห้ง 100 กรัม และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 31.08 ± 0.38 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัดกระเจียบแดงผงแห้ง และเมื่อวิเคราะห์สมบัติการจับอนุมูล DPPH รายงานในรูปแบบค่า EC_{50} พบว่า สารสกัดกระเจียบแดงผงแห้ง มีค่า EC_{50} เท่ากับ 25.98 ± 1.41 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

อนุพงศ์ ศิริเมืองมูล และคณะ (2549) ศึกษาหาปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณกรดแอสคอร์บิก และสมบัติการต้านอนุมูลอิสระในน้ำมะเขี๋ยง โดยการสกัดผลมะเขี๋ยงด้วยน้ำในอัตราส่วน เท่ากับ 1 ต่อ 1 และต้มเดือด 1 นาที แล้วคั้นน้ำ ปรับให้มีความหวาน เท่ากับ 12.0 องศาบริกซ์ เติมน้ำเกลือ 0.075% และกรอง หลังจากนั้นจึงบรรจุขวดร้อนลงในขวดแก้ว แล้วนำเชื้อจุลินทรีย์แบบพาสเจอร์ไรซ์ด้วยระบบฆ่าอุณหภูมิต่ำ (Low Temperature Long Time, LTLT) ที่อุณหภูมิ 65.0, 70.0 และ 75.0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 และ 657 นาโนเมตร ตามวิธีของ Padmavati และคณะ (1997) วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ด้วย Folin-Ciocalteu's reagent วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ตามวิธีของ Slinkard และ Singlaton (1977) และวิเคราะห์ปริมาณกรดแอสคอร์บิก โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน กรดแอสคอร์บิก ตามวิธีของ Ranganna (1974) พบว่า ปริมาณสารที่มีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระทั้งหมดมีแนวโน้มลดลงเมื่อความร้อนในการพาสเจอร์ไรซ์สูงมากขึ้น ทั้งนี้ความร้อนจะทำให้สารแอนโทไซยานิน สารประกอบฟีนอลิก และกรดแอสคอร์บิกเกิดการสลายตัว และเมื่อวิเคราะห์สมบัติการจับอนุมูล ABTS ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ตามวิธีของ Miller และ Rice-Evans (1997) นำค่าที่อ่านได้มาหา %Inhibition เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของโทรลอคซ์ พบว่า เมื่อให้ความร้อนในการพาสเจอร์ไรซ์สูงขึ้น ทำให้สมบัติการจับอนุมูล ABTS มีแนวโน้มลดลง ทำนองเดียวกับสารที่มีสมบัติต้านอนุมูลอิสระในน้ำมะเขี๋ยง ได้แก่ แอนโทไซยานิน สารประกอบฟีนอลิก และกรดแอสคอร์บิกที่มีปริมาณลดลงเช่นกัน

Pantelidis และคณะ (2007) ศึกษาหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด ปริมาณกรดแอสคอร์บิก และความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในผลราสเบอร์รี่ (Raspberries) แบลคเบอร์รี่ (Blackberries) เรดเคอร์แรนต์ (Red currants) กูสเบอร์รี่ (Gooseberries) และเชอร์รี่ (Cornelian cherries) โดยวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดยใช้สาร Folin-Ciocalteu's reagent วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร รายงานค่าในรูปแบบมิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง วิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด ด้วย วิธี pH differential method วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 และ 700 นาโนเมตร รายงานค่าในรูปแบบมิลลิกรัมไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด วิเคราะห์ปริมาณกรดแอสคอร์บิก และวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริก ไอออน (FRAP) ตามวิธีของ Benzie and Strain (1996) จากการทดลองพบว่า ผลไม้จำพวกเบอร์รี่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด อยู่ในช่วง 657.0-2,611.0 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง มีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด อยู่ในช่วง 1.3-223.0 มิลลิกรัมไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด มีปริมาณกรดแอสคอร์บิก อยู่ในช่วง 14.0-103.0 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด และความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริก ไอออน (FRAP) มีค่าอยู่ในช่วง 41.0-149.0 ไมโครโมลของกรดแอสคอร์บิกต่อกรัม น้ำหนักแห้ง จึงสรุปได้ว่า ผลไม้จำพวกเบอร์รี่ที่นำมาทดสอบเป็นแหล่งสำคัญของสารประกอบฟีนอลิก แอนโทไซยานิน และกรดแอสคอร์บิกที่มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้

3.4 สมบัติการต้านอนุมูลอิสระของกระเจี๊ยบแดง

นวลศรี รักษาริยะธรรม และอัญชญา เจนวิถีสุข (2545) ได้ศึกษาถึงดัชนีแอนติออกซิแดนซ์ (Antioxidant index) ในผัก-สมุนไพรพื้นบ้าน พบว่าในกระเจี๊ยบแดงแห้งมีองค์ประกอบของสารต้านอนุมูลอิสระ ดังแสดงใน Table 5

Table 5. Antioxidant properties of dried roselle 100 gram

Antioxidant	Contents (mg)
Beta-carotene	1.91
Zanthophill	1.06
Tannin	24.28
Phenolic compounds	131.47

ที่มา : นวลศรี รักษาริยะธรรม และอัญชญา เจนวิถีสุข (2545)

Tsai และคณะ (2002) ศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง สายพันธุ์ F141 ที่ผ่านการทำแห้งที่อุณหภูมิ 50.0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง แล้วนำมาสกัดด้วยน้ำร้อน จากนั้นจึงวิเคราะห์สมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการวัดความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกไอออน (FRAP), ORAC และ Total Antioxidant Status (TAS) พบว่า ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงเพิ่มขึ้น เมื่อระยะเวลาการสกัดหรือน้ำหนักของกระเจี๊ยบแดงที่ใช้สกัดเพิ่มขึ้น โดยเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีการวัดความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกไอออน (FRAP) ให้กราฟแสดงความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด มีค่า R^2 เท่ากับ 0.8375 และเมื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างการวิเคราะห์ด้วยวิธีการวัดความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกไอออน (FRAP) กับวิธี ORAC พบว่า ค่า R^2 เท่ากับ 0.9288 และความสัมพันธ์ระหว่างวิธีการวัดความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกไอออน (FRAP) กับวิธี TAS พบว่า ค่า R^2 เท่ากับ 0.9411 ได้กราฟความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ด้วยระบบ HPLC โดยกรองสารผ่านคอลัมน์ Amberlite XAD-2 ที่มี Polymeric resin บรรจุอยู่ในคอลัมน์ล้างคอลัมน์ด้วยน้ำ และชะสารที่ถูกยึดจับออกด้วยสารละลายเมทานอล นำสารที่ชะได้มาทำให้เข้มข้นด้วยเครื่องระเหยแบบหมุนเหวี่ยงภายใต้ความดันต่ำ ที่อุณหภูมิ 45.0 องศาเซลเซียส แล้วนำมาฉีดเข้าคอลัมน์เพื่อแยกส่วนของแอนโทไซยานิน และสารประกอบฟีนอลิกอื่นๆ ออกจากกัน โดยใช้สารละลายตัวชะ (Eluted) ที่ประกอบด้วยสารละลายผสมของ 5.0% กรดอะซิติก และอะซิโตรไนโตร จึงแยกเก็บสารละลายที่แยกได้ (Fraction) จากคอลัมน์ แล้ววิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินโดยใช้ Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร พบว่า เมื่อจำแนกอนุพันธ์แอนโทไซยานินจากสารสกัดกระเจี๊ยบแดง พบว่า ประกอบด้วยสารสำคัญ 2 ชนิด คือ เคลฟิโนดิน 3-แซมบูไบโอไซด์ เทียบได้กับ 85.0% ของแอนโทไซยานิน และไซยานิดิน 3-แซมบูไบโอไซด์ ซึ่งอนุพันธ์แอนโทไซยานินทั้ง 2 ชนิดนี้ ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกไอออน (FRAP) เท่ากับ 51.0%

Sukhapat และคณะ (2004) ศึกษากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกระเจี๊ยบแดง โดยการสกัดกระเจี๊ยบแดงสดด้วยน้ำแล้วทำแห้งด้วยวิธีการทำแห้งแบบสุญญากาศ วิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการวัดสมบัติการจับอนุมูล DPPH รายงานค่าในรูปแบบค่า EC_{50} และวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด รายงานค่าในรูปแบบลิตรกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัดกระเจี๊ยบแดง พบว่า สมบัติการจับอนุมูล DPPH ของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในช่วงค่าพีเอช 2.0-7.0 มีค่า EC_{50} เท่ากับ 18.54 ± 1.53 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 4.13 ± 0.52 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัดกระเจี๊ยบแดง และพบว่าค่าความสัมพันธ์ระหว่างสมบัติการจับอนุมูล DPPH กับ

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดกระเจียบแดง มีค่า R' เท่ากับ 0.9246 จึงสรุปได้ว่า สารสกัดกระเจียบแดงมีสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดี ทั้งนี้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกระเจียบแดงยังสัมพันธ์กับค่าพีเอช โดยพบว่า ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกระเจียบแดงจะลดลงเมื่อค่าพีเอชเพิ่มขึ้น ซึ่ง Cao และคณะ (2001) รายงานว่า แอนโทไซยานินเมื่ออยู่ในรูปอนุมูลฟลาโวลีเลียมจะมีสมบัติการจับอนุมูลอิสระได้ดี ทั้งนี้เมื่อแอนโทไซยานินอยู่ในสภาวะที่มีค่าพีเอชเพิ่มขึ้น (มากกว่าพีเอช 4.0) จะทำให้โมเลกุลของแอนโทไซยานินสามารถเกิดการรวมตัวระดับโมเลกุลกับ โมเลกุลของแอนโทไซยานินเอง สอดคล้องกับ Jackman และคณะ (1987) ที่รายงานว่า สารประกอบจำพวกแทนนิน หรือสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ได้แก่ รุทีน และเคอร์เซทิน สามารถเกิดการรวมตัวระดับโมเลกุลกับ โมเลกุลของแอนโทไซยานิน เป็นผลให้สมบัติการต้านอนุมูลอิสระของแอนโทไซยานินลดลง

Chirunthorn และคณะ (2004) ศึกษากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของกระเจียบแดง ด้วยวิธีการสกัดแตกต่างกัน 3 วิธี ได้แก่ การสกัดด้วยเมทานอล การสกัดด้วยน้ำแล้วทำแห้งด้วยวิธีการทำแห้งแบบสุญญากาศ และการสกัดด้วยน้ำแล้วทำแห้งด้วยวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอย นำสารสกัดกระเจียบแดงที่ได้จากการสกัดทั้ง 3 วิธี มาวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการวัดสมบัติการจับอนุมูล DPPH รายงานค่าในรูปแบบค่า EC_{50} พบว่า กระเจียบแดงที่สกัดด้วยน้ำแล้วทำแห้งด้วยวิธีการทำแห้งแบบสุญญากาศ และการสกัดด้วยน้ำแล้วทำแห้งด้วยวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอย สามารถจับอนุมูล DPPH ได้ดี มีค่า EC_{50} เท่ากับ 15.1 และ 11.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่การสกัดด้วยเมทานอล มีสมบัติการจับอนุมูล DPPH เพียงเล็กน้อย มีค่า EC_{50} เท่ากับ 73.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จึงสรุปได้ว่า สารสกัดกระเจียบแดงมีสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ และพบว่าวิธีการสกัดกระเจียบแดงก็มีผลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกระเจียบแดงด้วยเช่นกัน

4. กรรมวิธีการเตรียมสารสกัดกระเจียบแดง

4.1 การทำแห้งวัตถุดิบกระเจียบแดง

4.1.1 วิธีการทำแห้ง

การทำแห้ง หรือการคั่งน้ำออกจากอาหาร ทำให้อาหารมีปริมาณของน้ำ หรือความชื้นลดลง ซึ่งในกระบวนการทำแห้งนั้น ไม่ว่าจะวัตถุดิบจะอยู่ในรูปของของเหลว (อาหารเหลว) หรือของแข็ง จะต้องผ่านกระบวนการเตรียมวัตถุดิบก่อนเสมอ เพื่อให้วัตถุดิบมีคุณภาพเหมาะสมต่อการนำไปใช้ โดยทั่วไปแล้วการทำแห้งต้องอาศัยกระบวนการหลายอย่าง เช่น การทำให้วัตถุดิบมีอุณหภูมิสูงขึ้น การระเหยน้ำออกเพื่อทำให้เข้มข้นขึ้น และการตัดแต่งวัตถุดิบให้อยู่ในลักษณะที่

เหมาะสม เป็นต้น (สมบัติ ขอทวีวัฒนา, 2529) นอกจากนี้ยังมีวัตถุประสงค์เพื่อลดความชื้นของอาหารจนถึงระดับที่สามารถระงับการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ ทำให้อาหารมีคุณภาพดีขึ้น รวมทั้งการเก็บรักษาอาหารให้อยู่ในสภาพที่ดีได้นานขึ้น ซึ่งกระเจียบแดงแห้ง จัดอยู่ในจำพวกอาหารแห้งที่มีค่าวอเตอร์แอกทิวิตี (Water activity, a_w) ต่ำกว่า 0.6 โดยจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ในอาหารแห้ง คือ เชื้อราชนิดทนแห้งได้ดีมีค่าวอเตอร์แอกทิวิตี (a_w) เท่ากับ 0.61 (ไพโรจน์ วิริยจารี, 2539; ปรียา วิบูลย์เศรษฐ์, 2543)

4.1.2 ผลของการทำแห้งต่อคุณภาพผลิตภัณฑ์

ปีทมาพร โสภินท์ (2549) ศึกษาคุณภาพทางกายภาพและเคมีของเนื้อมะเกี๋ยงผง ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการแปรรูปเครื่องดื่มน้ำมะเกี๋ยงผง โดยเนื้อมะเกี๋ยงผงดังกล่าวได้มาจากการนำมะเกี๋ยงสดแช่เยือกแข็งมาละลายน้ำแข็งด้วยการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5.0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาสกัดด้วยน้ำ ในอัตราส่วนมะเกี๋ยงสดต่อน้ำ เท่ากับ 2 ต่อ 1 แล้วสกัดที่อุณหภูมิ 65.0-75.0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที หลังจากนั้นจึงแยกน้ำออกจากเนื้อมะเกี๋ยง แล้วจึงนำเนื้อมะเกี๋ยงมาทำแห้งโดยใช้ตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60.0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำมาบดเป็นผงละเอียดด้วยเครื่องบด ก่อนร่อนผ่านตะแกรงขนาด 0.5 มิลลิเมตร แล้ววิเคราะห์ปริมาณความชื้น ค่าสี (ในระบบ CIE $L^*a^*b^*$) ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการวัดสมบัติการจับอนุมูล ABTS และวัดความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริกไอออน (FRAP) จากผลการวิเคราะห์พบว่า เนื้อมะเกี๋ยงผงมีลักษณะเป็นผงละเอียดสีแดงเข้ม มีปริมาณความชื้น เท่ากับ 3.34 ± 0.04 มีค่าสี L^*a^* และ b^* เท่ากับ 40.54 ± 3.28 , 30.35 ± 1.47 และ 3.52 ± 0.59 ตามลำดับ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดลดลงจาก 12.96 ± 0.14 เป็น 2.55 ± 0.10 มิลลิกรัมต่อกรัมของเนื้อมะเกี๋ยงแห้ง เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก การที่ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของเนื้อมะเกี๋ยงผงลดลง อาจเนื่องมาจากสารประกอบฟีนอลิกบางตัว ได้สูญเสียไปในระหว่างการให้ความร้อนของการสกัด และเมื่อวิเคราะห์สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธีการวัดสมบัติการจับอนุมูล ABTS พบว่า เนื้อมะเกี๋ยงผงมีสมบัติในการจับอนุมูล ABTS น้อยกว่าเนื้อมะเกี๋ยงสด โดยมีค่าลดลงจาก 11.78 ± 0.33 เป็น 5.76 ± 0.09 มิลลิกรัมต่อกรัมของเนื้อมะเกี๋ยงแห้ง เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานโทรลอคซ์ และเมื่อวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริกไอออน (FRAP) พบว่า เนื้อมะเกี๋ยงผงมีความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริกไอออน (FRAP) สูงกว่าเนื้อมะเกี๋ยงสด โดยมีค่าเพิ่มขึ้นจาก 2.27 ± 0.25 เป็น 9.38 ± 0.54 มิลลิกรัมต่อกรัมของเนื้อมะเกี๋ยงแห้ง เมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟต

Lohachoompol และคณะ (2004) ศึกษาผลของการทำแห้งต่อปริมาณแอนโทไซยานินและกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของผลบลูเบอร์รี่ เมื่อใช้ผลบลูเบอร์รี่สดที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5.0

องศาเซลเซียส นาน 2 สัปดาห์ และผลบลูเบอร์รี่แช่เยือกแข็งที่เก็บไว้ที่ -20.0 องศาเซลเซียส นาน 3 เดือน นำมาทำแห้ง โดยใช้การทำแห้ง 2 วิธีที่เริ่มต้น คือ (1) การทำแห้งโดยการใช้น้ำออกแบบออสโมติก (Osmotic pretreatment) ร่วมกับการทำแห้งแบบลมร้อน (Cabinet drying) และ (2) การทำแห้งแบบลมร้อนเพียงอย่างเดียว จากการทดลองพบว่า ผลบลูเบอร์รี่สดมีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในรูปไซยานิดิน 3-รูทีโนไซด์ เท่ากับ 7.2 ± 0.5 มิลลิกรัมต่อกรัมของบลูเบอร์รี่แห้ง กล่าวคือทั้งผลบลูเบอร์รี่สดที่ไม่ผ่านการทำแห้ง และผ่านการทำแห้ง มีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในรูปไซยานิดิน 3-รูทีโนไซด์ ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยพบว่าผลบลูเบอร์รี่สดที่ไม่ผ่านการทำแห้งมีปริมาณของแข็ง (Solids content) เท่ากับ 4.3 ± 0.1 มิลลิกรัมต่อกรัม มีปริมาณการสูญเสีย (%Loss) เท่ากับ 41.0% ขณะที่ผลบลูเบอร์รี่สดที่ผ่านการทำแห้งมีปริมาณของแข็ง เท่ากับ 3.7 ± 0.2 มิลลิกรัมต่อกรัม มีปริมาณการสูญเสีย เท่ากับ 49.0% และพบว่า การใช้น้ำออกแบบออสโมติกร่วมกับการทำแห้งแบบลมร้อน มีผลต่อการสูญเสียปริมาณแอนโทไซยานินมากกว่า การทำแห้งแบบลมร้อนเพียงอย่างเดียว เมื่อวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดแอนโทไซยานินจากผลบลูเบอร์รี่ พบว่า กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระระหว่างผลบลูเบอร์รี่สด และผลบลูเบอร์รี่แห้ง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

Mohammadi และคณะ (2008) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสีในระหว่างการทำแห้งในผลิตภัณฑ์กีวีแผ่น ภายหลังจากการทำแห้งภายใต้อุณหภูมิอากาศที่ 40.0, 50.0, 60.0, 70.0 และ 80.0 องศาเซลเซียส ใช้ความเร็วลม (Air velocity) เท่ากับ 1.0 เมตรต่อวินาที และแผ่นกีวี มีความหนาเท่ากับ 4.0 มิลลิเมตร วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของสีในผลิตภัณฑ์กีวีแผ่น ด้วยการวัดค่าสีในระบบ CIE LAB Colorimeter แสดงเป็นค่า L^* (ความสว่าง) a^* (ความเป็นสีแดงและความเป็นสีเขียว) และ b^* (ความเป็นสีเหลืองและความเป็นสีน้ำเงิน) และค่าดัชนีการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาล (Browning index) จากการทดลองพบว่า ค่า L^* และ b^* มีค่าลดลง ในขณะที่ค่า a^* มีค่าเพิ่มขึ้นในระหว่างการทำแห้งด้วยลมร้อน โดยพบว่า การเปลี่ยนแปลงของค่า L^* และ b^* รวมทั้งดัชนีการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลเป็นไปเช่นเดียวกับการเกิดปฏิกิริยาอันดับที่หนึ่ง ซึ่งอัตราการเกิดปฏิกิริยาขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารตั้งต้น (First-order reaction) ในขณะที่ค่า a^* เป็นไปเช่นเดียวกับการเกิดปฏิกิริยาอันดับที่ศูนย์ ซึ่งอัตราการเกิดปฏิกิริยาไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของสารตั้งต้น (Zero-order reaction)

งานวิจัยนี้ ทำการอบแห้งกระเจี๊ยบแดงสด โดยทำการอบแห้งในตู้อบแห้งลมร้อน ชนิดอากาศหมุน ที่อุณหภูมิ 50.0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง จนกระทั่งกระเจี๊ยบแดงแห้งมีปริมาณความชื้น เท่ากับ 10.0% แล้วนำมาบรรจุในถุงไนลอน ปิดปากถุงให้สนิทด้วยเครื่องปิดผนึก เพื่อเก็บรักษากระเจี๊ยบแดงแห้งและสามารถนำมาใช้ในการสกัด และการทำให้เข้มข้นในขั้นตอนต่อไป

4.2 การสกัด

4.2.1 วิธีการสกัด

แอนโทไซยานินเป็นสารสำคัญในกระเจี๊ยบแดง (Tsai *et al*, 2002) และเป็นรงควัตถุที่ละลายได้ในน้ำ จึงสามารถสกัดด้วยการใช้ตัวทำละลายพวกไฮโดรซิลิก (Hydroxylic solvents) เช่น น้ำ หรือ เมททานอล ดังนั้นการสกัดแอนโทไซยานินจากกระเจี๊ยบแดงจึงนิยมสกัดด้วยน้ำ (Shrikhande, 1976 อ้างโดย ปารมี ชุมศรี, 2550)

4.2.2 ผลของการสกัดต่อคุณภาพผลิตภัณฑ์

ปารมี ชุมศรี และคณะ (2550) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารสกัดกระเจี๊ยบแดงสด และกระเจี๊ยบแดงแห้งด้วยน้ำ ซึ่งสภาวะที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ อัตราส่วนกระเจี๊ยบแดงต่อน้ำ อุณหภูมิ และเวลาในการสกัด พบว่า การสกัดกระเจี๊ยบแดงสด โดยใช้อัตราส่วนกระเจี๊ยบแดงสดต่อน้ำ เท่ากับ 1 ต่อ 2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 50.0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุด โดยให้สารสกัดกระเจี๊ยบแดงสดที่มีค่าสี L^* a^* และ b^* เท่ากับ 14.08 ± 0.16 , 47.69 ± 0.29 และ 24.25 ± 0.25 ตามลำดับ ค่าที่เอชปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดมาลิก และปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด เท่ากับ 2.33 ± 0.01 , $1.58 \pm 0.08\%$ และ 1.40 ± 0.00 องศาบริกซ์ ตามลำดับ ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 45.13 ± 0.08 มิลลิกรัมต่อกระเจี๊ยบแดงสด 100.0 กรัม และ 22.25 ± 0.31 มิลลิกรัมต่อกรัมกรดแกลลิก ตามลำดับ และมีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งรายงานในรูปค่า EC_{50} พบว่า มีค่า EC_{50} เท่ากับ 27.87 ± 1.27 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนการสกัดกระเจี๊ยบแดงแห้ง โดยใช้อัตราส่วนกระเจี๊ยบแดงแห้งต่อน้ำ เท่ากับ 1 ต่อ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 50.0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุด โดยให้สารสกัดกระเจี๊ยบแดงแห้งที่มีค่าสี L^* a^* และ b^* เท่ากับ 0.75 ± 0.10 , 5.14 ± 0.69 และ 1.23 ± 0.13 ตามลำดับ ค่าที่เอชปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดมาลิก และปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด เท่ากับ 2.95 ± 0.01 , $1.71 \pm 0.02\%$ และ 5.97 ± 0.08 องศาบริกซ์ ตามลำดับ ส่วนปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด มีค่าเท่ากับ 502.33 ± 0.52 มิลลิกรัมต่อกระเจี๊ยบแดงแห้ง 100 กรัม และ 43.00 ± 0.97 มิลลิกรัมต่อกรัมกรดแกลลิก ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งมีค่า EC_{50} เท่ากับ 44.78 ± 0.49 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

นัยวิท เกลิมนนท์ (2538) ศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิต และการใช้สีแดงธรรมชาติจากกระเจี๊ยบแดง โดยการสกัดกระเจี๊ยบแดงแห้งด้วยน้ำ แล้ววิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานิน รายงานค่าในรูปไซยานิดิน 3-กาแลคโตไซด์ ตามวิธีของ Lees และ Francis (1972) พบว่า การสกัดกระเจี๊ยบแดงแห้ง ในอัตราส่วนของกระเจี๊ยบแดงแห้งต่อน้ำ เท่ากับ 1 ต่อ 10 (น้ำหนักต่อ

ปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 60.0 องศาเซลเซียส นาน 80 นาที เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุด เนื่องจากสามารถสกัดกระเจียบแดงแห้งให้มีปริมาณแอนโทไซยานินมากที่สุด เท่ากับ 277.67 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของกระเจียบแดงแห้ง

Fasoyiro และคณะ (2005) ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดกระเจียบแดงที่ได้จากการนำกลีบกระเจียบแดงสดที่ผ่านการล้างทำความสะอาด แยกเมล็ดออก แล้วนำมาแช่ในน้ำกลั่น โดยใช้อัตราส่วนของกระเจียบแดงสดต่อน้ำ เท่ากับ 1 ต่อ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ทิ้งไว้ข้ามคืน แล้วจึงนำมาสกัดที่อุณหภูมิ 100.0 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที หลังจากนั้นจึงกรอง นำมาวัดค่าพีเอช ด้วย Glass electrode pH meter, วัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด ด้วย Abbe' refractometer, วัดปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ (Titratable acidity, %) และปริมาณกรดแอสคอร์บิก (AOAC, 1984) ซึ่งพบว่า น้ำกระเจียบแดงสด มีค่าพีเอช เท่ากับ 3.10 ± 0.14 มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด และปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ เท่ากับ 3.20 ± 0.63 องศาบริกซ์ และ $2.40 \pm 0.38\%$ ตามลำดับ และมีปริมาณกรดแอสคอร์บิก เท่ากับ 31.33 กรัม ต่อ 100 กรัม

Ruenroengklin และคณะ (2008) ศึกษาผลของอุณหภูมิการสกัดต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเนื้อเยื่อผลลิ้นจี่ (*Litchi chinensis* Sonn.) หรือ Litchi fruit pericarp ซึ่งเนื้อเยื่อผลลิ้นจี่เป็นแหล่งสำคัญของ Dietary phenolics โดยการศึกษาในครั้งนี้ประกอบด้วย 2 การทดลอง คือ (1) ทดสอบผลของอุณหภูมิการสกัดที่ระดับต่างกัน (30.0, 40.0, 50.0, 60.0, 70.0 และ 80.0 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 30 นาที ต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด จากการทดลองพบว่า การสกัดที่อุณหภูมิ 60.0 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิการสกัดที่ดีที่สุดที่สามารถสกัดสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดได้ในปริมาณสูงสุด มีค่าเท่ากับ 115.0 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับอุณหภูมิการสกัดอื่นๆ ($p < 0.05$) และ (2) ทดสอบผลของอุณหภูมิการสกัดที่ระดับต่างกัน (25.0, 35.0, 45.0, 55.0 และ 65.0 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 30 นาที ต่อสมบัติการจับอนุมูล DPPH จากการทดลองพบว่า การสกัดโดยใช้อุณหภูมิ 45.0 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที มีผลทำให้สารสกัดจากเนื้อเยื่อผลลิ้นจี่ แสดงสมบัติการต้านอนุมูลอิสระที่ค่อนข้างสูง มีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ เท่ากับ 24.0% ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับอุณหภูมิการสกัดอื่นๆ ($p < 0.05$)

Akowuah และคณะ (2009) ศึกษาผลของอุณหภูมิการสกัดต่อคุณภาพทางเคมีของสารสกัดจากใบแป๊ะดำปึงหรือจักรนารายณ์ (*Gynura procumbens* Leaf.) โดยนำใบจักรนารายณ์ที่ผ่านการอบแห้งด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 35.0 องศาเซลเซียส มาบดละเอียดแล้วสกัดด้วย 80.0% aqueous methanol แล้วนำใบจักรนารายณ์ที่ลอยตัวมาบดสกัดที่อุณหภูมิต่างกัน คือ 40.0, 50.0, 60.0, 80.0 และ 100.0 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง เขย่าเบาๆ แล้วจึงกรองสารสกัดผ่านระบบสุญญากาศ

ด้วยกระดาษกรอง (Whatman No.1) นำแต่ละตัวอย่างที่กรองได้มาปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยเมทานอล แล้วจึงวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu's reagent วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก รายงานค่าในรูปมิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และวิเคราะห์สมบัติการจับอนุมูล DPPH โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร และใช้สารละลายมาตรฐาน BHT เป็น Positive control จากผลการทดลองพบว่า เมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการสกัดจะทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และสมบัติการจับอนุมูล DPPH ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยการสกัดที่อุณหภูมิ 40.0, 50.0, 60.0, 80.0 และ 100.0 องศาเซลเซียส ทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดลดลง เท่ากับ 21.74 ± 0.25 , 21.40 ± 0.28 , 20.15 ± 0.19 , 12.22 ± 0.12 และ 8.54 ± 0.08 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า สมบัติการจับอนุมูล DPPH ลดลง เท่ากับ $58.21 \pm 1.37\%$, $58.08 \pm 1.22\%$, $47.94 \pm 1.15\%$, $34.17 \pm 1.13\%$ และ $26.68 \pm 0.76\%$ ตามลำดับ จากการทดลองสรุปได้ว่า การสกัดที่อุณหภูมิ 40.0-50.0 องศาเซลเซียส เป็นสภาวะการสกัดที่ดีที่สุดที่ทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และสมบัติการต้านอนุมูลอิสระมีค่าสูงสุด ซึ่ง Larrauri และคณะ (1997) รายงานว่า สารประกอบฟีนอลิกจะเกิดการสลายตัวที่อุณหภูมิสูงกว่า 60.0 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังพบว่า การมีเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส อาจส่งผลให้กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดลดลง ซึ่งการสกัดที่อุณหภูมิสูงกว่า 60.0 องศาเซลเซียส จะไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส ซึ่งมีผลต่อการสลายตัวของสารประกอบฟีนอลิก

งานวิจัยนี้ ทำการสกัดกระเจียบแดงแห้ง โดยใช้อัตราส่วนกระเจียบแดงแห้งต่อน้ำ เท่ากับ 1 ต่อ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 50.0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เนื่องจากเป็นวิธีการสกัดที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดกระเจียบแดงด้วยน้ำ ซึ่งทำให้สมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากกระเจียบแดงแห้งมีค่าสูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดอื่นๆ (ปารมี ชุมศรี, 2550) จากนั้นจึงนำสารสกัดจากกระเจียบแดงแห้งมาทำเป็นสารสกัดกระเจียบแดงเข้มข้นในขั้นตอนต่อไป

4.3 การทำให้เข้มข้น

4.3.1 การระเหยน้ำ (Evaporation)

การระเหยน้ำ เป็นการทำให้น้ำในอาหารเหลว หรือสารละลายร้อนขึ้น และระเหยกลายเป็นไอแยกออกจากอาหารเหลว หรือสารละลาย ทำให้ได้สารละลายเข้มข้น ซึ่งการระเหยน้ำถือเป็นกระบวนการผลิตอย่างหนึ่งที่มีความสำคัญ เกี่ยวข้องกับกรรมวิธีการแปรรูปผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมเกษตร โดยเฉพาะอย่างยิ่งอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากวัตถุดิบ และ

ผลิตภัณฑ์ต่างๆ ที่อยู่ในรูปของของเหลว (Liquid foods) มีเป็นจำนวนมาก วัตถุดิบจำพวกอาหารเหลวเหล่านั้นส่วนใหญ่จะมีน้ำในปริมาณสูง ทำให้มีปริมาณเนื้อสารอาหารที่จำเป็นต่ำ และมีปริมาณสูง เช่น น้ำผลไม้ต่างๆ ทำให้ไม่เหมาะสมต่อการเก็บรักษา การขนส่ง หรือการนำไปใช้ประโยชน์ในบางกรณี การทำให้อาหารเหลวเหล่านั้นมีความเข้มข้นมากขึ้น โดยใช้กระบวนการระเหยน้ำจะทำให้อาหารเหลวมีปริมาณเนื้อสารอาหารมากขึ้น ได้เป็นผลิตภัณฑ์อาหารเหลวเข้มข้น (Concentrated liquid foods) ซึ่งทำให้สะดวกต่อการนำไปใช้ประโยชน์ หรือเหมาะสมต่อการแปรรูปในขั้นตอนต่อไป ในกระบวนการผลิตอาหารเหลวเข้มข้นโดยกระบวนการระเหยน้ำต้องมีการควบคุมไม่ให้มีการสูญเสียองค์ประกอบอื่นๆ ในอาหารเหลว ต้องควบคุมให้น้ำเท่านั้นที่ระเหยออกไป โดยกลั่นรสเฉพาะของอาหารเหลวจะต้องคงอยู่หรือสูญเสียน้อยที่สุด การทำให้อาหารเหลวเข้มข้นโดยการระเหยน้ำอิสระ (Free water) ที่มีอยู่ในอาหารเหลวจะถูกแยกออกไป ส่วนสารอาหารหรือองค์ประกอบอื่นๆ ที่ละลายน้ำได้ยังคงอยู่ในผลิตภัณฑ์อาหารเหลวเข้มข้นและมีปริมาณมากขึ้น

หลักการของการระเหยน้ำ คือ การทำให้อุณหภูมิของอาหารเหลวสูงขึ้นจนถึงจุดเดือด จากนั้นรักษาอุณหภูมินั้นไว้ในช่วงเวลาที่จะทำให้อุณหภูมิจึงของอาหารเหลวสูงขึ้นจนถึงจุดเดือด และรักษาอุณหภูมิในช่วงเวลาที่ให้น้ำระเหยออกไปจนได้ความเข้มข้นที่ต้องการ โดยทั่วไปนิยมทำการระเหยน้ำภายใต้สภาวะสุญญากาศโดยเครื่องระเหยน้ำแบบสุญญากาศ (Vacuum evaporator) ซึ่งจะทำให้จุดเดือดของน้ำต่ำลง ทำให้การระเหยน้ำมีประสิทธิภาพมากขึ้น และได้ผลิตภัณฑ์อาหารเหลวเข้มข้นที่มีคุณภาพ และมีกลิ่นรสที่ดีมากขึ้น (สมบัติ ขอทวีวัฒนา, 2535)

4.3.2 การทำให้เข้มข้นแบบสุญญากาศ

ปกติการเดือดของน้ำจะเกิดขึ้นเมื่อความดันไอของน้ำมีค่าเท่ากับความดันทั้งหมดบนพื้นผิวของน้ำ ที่ความดันบรรยากาศปกติ เท่ากับ 76 เซนติเมตรปรอท น้ำจะเดือดที่อุณหภูมิ 100.0 องศาเซลเซียส แต่เมื่อความดันต่ำกว่าความดันบรรยากาศปกติ ซึ่งเรียกว่า ความดันสุญญากาศ น้ำจะเดือดที่อุณหภูมิต่ำกว่า 100.0 องศาเซลเซียส (เกษม ปราบริบูรณ์, 2521)

การระเหยน้ำผลไม้ นิยมระเหยน้ำภายใต้สภาวะสุญญากาศ เนื่องจากสามารถทำให้อุณหภูมิจึงที่ใช้ในการระเหยน้ำต่ำกว่าอุณหภูมิจึงที่ความดันบรรยากาศปกติ จึงไม่ทำให้คุณภาพของน้ำผลไม้สูญเสียไปเนื่องจากความร้อน วิธีการนี้ช่วยป้องกันการเกิดสีน้ำตาล รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงของสี และรสชาติ เพราะน้ำผลไม้เกิดปฏิกิริยากับออกซิเจนได้น้อยมาก (ทนง ภัทรชพันธุ์, 2543ก)

การทำงานของเครื่องระเหยน้ำสุญญากาศ มีองค์ประกอบพื้นฐานของเครื่องที่จำเป็น 4 ส่วน ได้แก่ (1) ถังหรือหม้อระเหย (Evaporation vessel) เป็นส่วนที่ใส่อาหารเหลวที่ต้องการทำให้เข้มข้น และเป็นส่วนที่เกิดการระเหยน้ำ ส่วนใหญ่ทำด้วยสแตนเลส อาจมีระบบ

การกวน (Agitation) หรือมีใบพัดสำหรับกวน เพื่อช่วยในการกระจายความร้อน ทำให้อัตราการระเหยน้ำเกิดได้เร็วขึ้น (2) แหล่งกำเนิดความร้อน (Heat source) เป็นแหล่งให้ความร้อนแก่อาหารเหลว อาจใช้ไอน้ำ หรือขดลวดไฟฟ้า โดยมีตัวควบคุมอุณหภูมิ (Thermostat) ควบคุมอุณหภูมิของอาหารเหลวให้อยู่ที่อุณหภูมิที่กำหนด (3) เครื่องควบแน่น (Condenser) ทำหน้าที่ควบแน่นไอน้ำที่ระเหยออกมาจากอาหารเหลว และ (4) เครื่องสูบลูญากาศ (Vacuum pump) ทำหน้าที่ลดความดันภายในถังระเหย ทำให้เกิดสุญญากาศภายใน (สมบัติ ขอทวิวัฒนา, 2535)

4.3.3 การแปรรูปกระเจียบแดงที่เกี่ยวข้องกับการทำให้เข้มข้น

นัยวิท เฉลิมนนท์ (2538) ศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตและการใช้สีแดงธรรมชาติจากกระเจียบแดง โดยการสกัดกระเจียบแดงแห้งด้วยน้ำแล้วทำให้เข้มข้นด้วยการระเหยน้ำภายใต้สภาวะสุญญากาศ ที่อุณหภูมิไม่เกิน 60.0 องศาเซลเซียส จนกระทั่งสารสกัดกระเจียบแดงเข้มข้นมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด เท่ากับ 18.0 องศาบริกซ์ เดิมมอลโตเดกซ์ตรินในปริมาณ 35.0% ของปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดของสารสกัดกระเจียบแดงเข้มข้น ได้เป็นสารสกัดกระเจียบแดงที่มีสีแดงเข้ม มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด 20.0-25.0 องศาบริกซ์ แล้วทำให้เป็นผงด้วยวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอย ใช้อุณหภูมิของลมร้อนขาเข้า เท่ากับ 200.0 องศาเซลเซียส อุณหภูมิลมร้อนขาออก เท่ากับ 100.0 องศาเซลเซียส แล้วนำกระเจียบแดงผงมาวิเคราะห์ปริมาณความชื้น ค่าพีเอช และความเป็นกรด พบว่ามีค่าดังกล่าว เท่ากับ 3.14%, 2.87 และ 0.19% ตามลำดับ เมื่อวัดค่าสี ด้วยระบบ CIE $L^* a^* b^*$ พบว่า มีค่าสี $L^* a^*$ และ b^* เท่ากับ 31.46, 21.30 และ 7.77 ตามลำดับ และเมื่อศึกษาสมบัติและการใช้ประโยชน์ของผงสีแดงในผลิตภัณฑ์อาหาร โดยเติมผงสีแดงจากกระเจียบแดงลงในเยลลี่แอปเปิ้ล ในปริมาณร้อยละ 0.25 ของน้ำหนักของเยลลี่แอปเปิ้ลทั้งหมดในสูตร พบว่า เยลลี่แอปเปิ้ลที่เติมผงสีแดงจากกระเจียบแดง มีค่าสี $L^* a^*$ และ b^* เท่ากับ 37.97, 10.73 และ 19.57 ตามลำดับ และเมื่อทดสอบคุณภาพทางด้านประสาทสัมผัสของเยลลี่แอปเปิ้ล ด้วยวิธีการทดสอบตามความชอบแบบ 9 ระดับคะแนนความชอบ (9-Point hedonic scale) ใช้ผู้ทดสอบชิมจำนวน 30 คน พิจารณาคุณลักษณะด้านสี กลิ่นรส รสชาติ และความชอบโดยรวม พบว่าผู้บริโภคให้ระดับคะแนนความชอบ โดยเฉลี่ยในระดับชอบปานกลาง ซึ่งมีระดับคะแนนความชอบด้านสี เท่ากับ 7.20 กลิ่นรส เท่ากับ 7.06 รสชาติ เท่ากับ 7.27 และความชอบโดยรวม เท่ากับ 7.03

สิรินาด ดัฒเพเกษม (2545) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของผลิตภัณฑ์เยลลี่กระเจียบแดง โดยการสกัดกระเจียบแดงด้วยน้ำ ในอัตราส่วน เท่ากับ 1 ต่อ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80.0 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วทำให้เข้มข้นด้วยเครื่อง Rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 70.0-80.0 องศาเซลเซียส จนมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด เท่ากับ

20.0 องศาบริกซ์ นำกระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น มาศึกษาการเติมเป็นส่วนผสมของผลิตภัณฑ์เยลลี่กระเจี๊ยบแดง เปรียบเทียบกับการใช้สีสังเคราะห์ ได้แก่ ปองโซ 4 อาร์, คาร์โมอิซิน และทาร์ทราซีน แล้ววัดค่าสี โดยระบบ CIE $L^* a^* b^*$ พบว่า ค่าสี $L^* a^*$ และ b^* ของผลิตภัณฑ์เยลลี่กระเจี๊ยบแดง เมื่อเก็บรักษาวันที่ 0 มีค่าสี $L^* a^*$ และ b^* เท่ากับ 8.12, 18.38 และ 6.56 ตามลำดับ ผลิตภัณฑ์เยลลี่สีสังเคราะห์ มีค่าสี $L^* a^*$ และ b^* เท่ากับ 7.82, 18.68 และ 6.34 ตามลำดับ และเมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4.0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ผลิตภัณฑ์เยลลี่กระเจี๊ยบแดง มีค่าสี $L^* a^*$ และ b^* เท่ากับ 4.90, 14.37 และ 2.71 ตามลำดับ ขณะที่ผลิตภัณฑ์เยลลี่สีสังเคราะห์ มีค่าสี $L^* a^*$ และ b^* เท่ากับ 3.61, 5.97 และ 0.79 ตามลำดับ นอกจากนี้เมื่อประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสด้วยวิธีการทดสอบตามความชอบแบบ 9 ระดับคะแนนความชอบ ใช้ผู้ทดสอบชิมจำนวน 12 คน พิจารณาคุณลักษณะด้านสี กลิ่น ลักษณะปรากฏ เนื้อสัมผัส รสชาติ และคุณลักษณะโดยรวม พบว่าคุณภาพทางประสาทสัมผัสโดยรวมของผลิตภัณฑ์เยลลี่กระเจี๊ยบแดงมีคะแนนความชอบสูงกว่าผลิตภัณฑ์เยลลี่สีสังเคราะห์อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

Al-kahtani และ Hassan (1990) ได้ทำการศึกษาการผลิตสารสกัดกระเจี๊ยบแดงผงดด้วยวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอย โดยการสกัดกระเจี๊ยบแดงแห้งด้วยน้ำ ในอัตราส่วนกระเจี๊ยบแดงแห้งต่อน้ำ เท่ากับ 1 ต่อ 10 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ที่อุณหภูมิ 60.0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แยกกากกระเจี๊ยบแดงออก แล้วทำให้เข้มข้นด้วยเครื่องระเหยแบบฟิล์มบาง (Thin film evaporator) โดยสภาวะการทำให้เข้มข้นประกอบด้วย การป้อนสารสกัดกระเจี๊ยบแดงที่มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด เท่ากับ 2.2-5.0% ด้วยอุณหภูมิขาเข้าของการป้อน เท่ากับ 20.0-40.0 องศาเซลเซียส อัตราการป้อน เท่ากับ 618.0-751.0 มิลลิลิตรต่อนาที ค่าสุญญากาศ เท่ากับ 10.0-17.5 กิโลปาสกาล อุณหภูมิของไอน้ำ (Saturated steam) ที่ให้ความร้อน เท่ากับ 145.0-150.0 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิขาออกของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงเข้มข้น เท่ากับ 46.0-57.0 องศาเซลเซียส จนกระทั่งสารสกัดกระเจี๊ยบแดงเข้มข้นมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด มากกว่า 24.5 องศาบริกซ์ ก่อนนำไปทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย

งานวิจัยนี้ ใช้วิธีการทำให้สารสกัดกระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นภายใต้สภาวะสุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 70.0 องศาเซลเซียส ความดัน 44.0 เซนติเมตรปรอท จนกระทั่งสารสกัดกระเจี๊ยบแดงเข้มข้นมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด เท่ากับ 25.0 องศาบริกซ์ ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมที่ทำให้สารสกัดกระเจี๊ยบแดงเข้มข้นมีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด (ปารมี ชุมศรี, 2550) เนื่องจากสารกระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นที่ได้มีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่าการทำให้เข้มข้นโดยใช้บรรยากาศปกติ ที่อุณหภูมิ 90.0 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ทั้งนี้การทำให้สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงแห้งมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นนั้น มีวัตถุประสงค์เพื่อทำให้สารสกัดจาก

กระเจี๊ยบแดงแห้งมีปริมาณเนื้อสารอาหารต่อปริมาณเพิ่มมากขึ้น ซึ่งทำให้สะดวกต่อการนำไปใช้ประโยชน์หรือเหมาะสมต่อการแปรรูปในขั้นตอนต่อไป ตลอดจนสามารถเก็บรักษาสารสกัดกระเจี๊ยบแดงเข้มข้นให้มีอายุการเก็บรักษาเป็นระยะเวลานานเพิ่มขึ้น โดยการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20.0 องศาเซลเซียส

5. ผลิตกัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น

ผลิตกัณฑ์เบอร์รี่สกัดเข้มข้นทางการค้า มีส่วนประกอบโดยประมาณ ดังนี้ เบอร์รี่สกัดเข้มข้น 73.00% วิตามินซี 0.10% วิตามินอี 0.03% และวิตามินเอ 0.01% โดยมีคุณค่าทางอาหารที่แสดงเป็นร้อยละของปริมาณสารอาหารที่แนะนำต่อวัน แสดงเป็นวิตามินเอ 20.00% วิตามินอี 20.00% และวิตามินซี 45.00% ในขณะที่ผลิตกัณฑ์พรุณสกัดเข้มข้นทางการค้า มีส่วนประกอบโดยประมาณ ดังนี้ พรุณสกัดเข้มข้น 93.90% โอลิโกฟรุคโทสและอินูลิน 6.00% และวิตามินซี 0.10% มีคุณค่าทางอาหารที่แสดงเป็นร้อยละของปริมาณสารอาหารที่แนะนำต่อวัน แสดงเป็นฟอสฟอรัส แคลเซียม วิตามินซี และแมกนีเซียม เท่ากับ 2.00%, 2.00%, 40.00% และ 4.00% ตามลำดับ

ส่วนผสมของผลิตกัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น ประกอบด้วย สารสกัดกระเจี๊ยบแดง 50.0% ฟรุคโทส 31.98% น้ำผึ้ง 10.0% โอลิโกฟรุคโทส 8.0% วิตามินเอ 0.0035% และวิตามินอี 0.0013% ซึ่งเป็นสูตรของผลิตกัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นที่ได้จากการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส

5.1 ส่วนผสมของผลิตกัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น

5.1.1 ฟรุคโทส

น้ำตาลฟรุคโทส เป็นน้ำตาลโมโนแซ็กคาไรด์ ซึ่งในธรรมชาติพบน้ำตาลฟรุคโทสได้ในผัก ผลไม้ ธัญพืช และน้ำผึ้ง (นิธิยา รัตนาปนนท์, 2549) น้ำตาลฟรุคโทส เป็นน้ำตาลที่มีความหวานเป็น 1.8 เท่าของน้ำตาลซูโครส และให้ค่าพลังงาน เท่ากับ 4.0 กิโลแคลอรีต่อน้ำตาลฟรุคโทส 1.0 กรัม (มลศิริ วีโรทัย, 2545) นอกจากนี้ Bayer และคณะ (2005 อ้างโดย ปารมี ชุมศรี, 2550) รายงานว่า องค์การอาหารโลก (FAO) ได้กำหนดปริมาณน้ำตาลฟรุคโทสที่แนะนำให้บริโภคต่อวันของเด็กทารก เท่ากับ 15.0 กรัม ส่วนผู้สูงอายุตั้งแต่ 15-18 ปี ควรบริโภคเท่ากับ 54.0 กรัม โดยเฉลี่ยแล้วผู้บริโภคควรบริโภคน้ำตาลฟรุคโทสในปริมาณที่แนะนำต่อวัน เท่ากับ 37.0 กรัม

งานวิจัยนี้ มีการเติมฟรุคโทส 31.98% ของส่วนผสมทั้งหมดของผลิตกัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น ซึ่งเป็นปริมาณฟรุคโทสที่ได้จากการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส

5.1.2 น้ำผึ้ง

น้ำผึ้ง เป็นของเหลวรสหวาน ซึ่งผึ้งผลิตขึ้นจากน้ำหวานของดอกไม้ หรือจากส่วนใดส่วนหนึ่งของต้นไม้ แล้วสะสมไว้ในรังผึ้ง น้ำผึ้งมีลักษณะเป็นของเหลวข้น เนื้อเดียวกัน ปราศจากสิ่งแปลกปลอม มีสีตามธรรมชาติตั้งแต่สีเหลืองอ่อนจนถึงสีน้ำตาล มีกลิ่นรสตามธรรมชาติ คือ กลิ่นต้องไม่บูดเปรี้ยวหรือมีฟอง

น้ำผึ้ง ประกอบด้วย น้ำตาลฟรุคโทส และกลูโคสเป็นส่วนประกอบหลัก ขณะที่พบน้ำตาลซูโครส มอลโตส และเค็ลตรินในปริมาณน้อย นอกจากนี้ น้ำผึ้งยังมีองค์ประกอบอื่นๆ ได้แก่ ปริมาณความชื้น 17.20% ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 79.57% โปรตีน 0.26% ปริมาณกรด 0.57% วิตามินและแร่ธาตุอื่นๆ เช่น วิตามินบี (บี 1, บี 2, บี 5 และ บี 6) แคลเซียม แมกนีเซียม โพแทสเซียม และเหล็ก ประมาณ 2.40% เป็นต้น โดยน้ำผึ้ง 1.0 กรัม ให้พลังงานเท่ากับ 3.03 แคลอรี (สุขสันต์ สุทธิผล ไพบูลย์, 2546)

งานวิจัยนี้ มีการเติมน้ำผึ้ง 10.00% ของส่วนผสมทั้งหมดของผลิตภัณฑ์กระเจียบแดงสกัดเข้มข้น เนื่องจากหากเติมน้ำผึ้งในปริมาณที่มากกว่า 10.00% ของส่วนผสมทั้งหมด จะทำให้ผลิตภัณฑ์กระเจียบแดงสกัดเข้มข้นมีกลิ่นรสของน้ำผึ้งเด่นชัดมากกว่ากลิ่นรสของกระเจียบแดง

5.1.3 โอลิโกฟรุคโทส

โอลิโกฟรุคโทส เป็นใยอาหารจากธรรมชาติที่ไม่ถูกย่อยสลายและดูดซึมในลำไส้เล็กแต่จะผ่านไปที่ลำไส้ใหญ่ และช่วยเสริมให้มีการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์สุขภาพ โพรไบโอติกส์ ให้เกิดภาวะสมดุลในระบบทางเดินอาหาร ช่วยให้ระบบขับถ่ายดี ไม่สะสมสารพิษไว้ตามผนังลำไส้ จึงช่วยให้ร่างกายมีภูมิคุ้มกันที่ดี โดยโอลิโกฟรุคโทสเป็นอาหารแบบพรีไบโอติก (Prebiotic) คือ อาหารที่ไม่ถูกย่อย และดูดซึมในระบบทางเดินอาหารตอนบน สามารถผ่านไปยังลำไส้ใหญ่ มีผลส่งเสริมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่ ซึ่งการบริโภคโอลิโกฟรุคโทสในปริมาณที่มากกว่า 30.0 กรัมต่อวัน อาจจะมีอาการท้องอืด มีแก๊สในกระเพาะอาหาร ซึ่งจะส่งผลแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสถานะของร่างกายของแต่ละบุคคล แต่การบริโภคโอลิโกฟรุคโทสจะไม่ส่งผลกระทบต่อระดับน้ำตาลในเลือด ผู้ที่ป่วยเป็นโรคเบาหวานสามารถบริโภคโอลิโกฟรุคโทสได้ (สุจิตตา เรืองรัมย์, 2546)

งานวิจัยนี้ มีการเติมโอลิโกฟรุคโทส 8.00% ของส่วนผสมทั้งหมดของผลิตภัณฑ์กระเจียบแดงสกัดเข้มข้น ซึ่งเป็นปริมาณโอลิโกฟรุคโทสที่ได้จากการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส โดยใช้โอลิโกฟรุคโทสทางการค้า Frutafit® CLR มีความยาวพันธะ 7-9 โมโนเมอร์ โอลิโกฟรุคโทส ประกอบด้วย น้ำตาลฟรุคโทส กลูโคส และซูโครส เป็นองค์ประกอบประมาณ 10.0-15.0% ให้ค่าพลังงานเท่ากับ 1.8 กิโลแคลอรีต่อกรัม

5.1.4 วิตามินเอ

วิตามินเอ หรือเรตินอล มีสีเหลืองอ่อน ทนกรด และค้าง แต่ถูกออกซิไดส์ได้ง่ายเมื่อสัมผัสกับอากาศ และออกซิเจนที่อุณหภูมิสูง ถูกทำลายได้ด้วยแสงอุลตราไวโอเลต หรือแสงอาทิตย์ วิตามินเอ พบมากในตับของสัตว์ ไช้แดง น้ำมัน ผลัดกัณฑ์นม และอาหารที่ได้จากพืชที่มีแคโรทีนอยด์เป็นองค์ประกอบ โดยแคโรทีนอยด์เป็น โปรวิตามินเอ ที่พบมากในพืชผักสีเขียวและสีเหลือง รวมทั้งผลไม้สีเหลือง หรือสีส้มแดง เช่น แครอท ฟักทอง มะละกอสุก มะเขือเทศ ใบคะน้า และใบตำลึง เป็นต้น แคโรทีนอยด์ที่พบในธรรมชาติมีหลายชนิด ได้แก่ แอลฟา-, บีตา- และแกมมา-แคโรทีน โดยวิตามินเอมีสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระให้แก่ร่างกาย (นิธิยารัตนาปนนท์, 2549) และเนื่องจากวิตามินเอสามารถทนความร้อนได้ดีพอสมควร ดังนั้นในการแปรรูปอาหารที่ใช้การพาสเจอร์ไรซ์, การสเตอริไลซ์ (Sterilization) หรือการคังน้ำออก (Dehydration) จึงทำให้เกิดการสูญเสียวิตามินเอไปในปริมาณเพียงเล็กน้อยเท่านั้น แต่จะสูญเสียง่ายเมื่อถูกแสงอุลตราไวโอเลตหรือถูกออกซิไดซ์ ดังนั้นในการเก็บรักษาวิตามินเอ จึงควรเก็บในขวดสีชา และใส่สารช่วยป้องกันการออกซิเดชัน เช่น วิตามินอี ลงไปด้วย (สมทรง เลขะกุล, 2543ก)

งานวิจัยนี้ มีการเติมวิตามินเอ 0.0035% ของส่วนผสมทั้งหมดของผลิตภัณฑ์กระเจียบแดงสกัดเข้มข้น โดยใช้วิตามินเอในรูปวิตามินเอ อะซิเตต (Dry vitamin A acetate) สูตรโครงสร้าง $C_{22}H_{32}O_2$ น้ำหนักโมเลกุล 328.54 กรัมต่อโมล ลักษณะเป็นผงสีเหลือง สามารถละลายได้ในน้ำ ซึ่งวิตามินเอ อะซิเตต 1.0 กรัม มีปริมาณวิตามินเอ เท่ากับ 325,000 IU

5.1.5 วิตามินอี

วิตามินอี พบในอาหาร ทั้งที่ได้จากพืช และสัตว์ วิตามินอีมีอยู่ 4 ชนิด ได้แก่ แอลฟา-, บีตา-, แกมมา- และเดลตา-โทโคเฟอรอล ซึ่งมีความคงตัวดีต่อกรดและสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน แต่พบว่าวิตามินอีไม่ทนต่อค่าง แสงอุลตราไวโอเลต และจะสลายตัวมากขึ้นเมื่อมีออกซิเจน หน้าที่สำคัญของวิตามินอี คือ เป็นสารต้านอนุมูลอิสระให้แก่ร่างกาย (นิธิยารัตนาปนนท์, 2549) โดยช่วยปกป้องเซลล์ในร่างกายจากอนุมูลอิสระ โดยไปขัดขวางปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลอิสระในร่างกาย อาศัยสมบัติของวิตามินอีที่ไวต่อการถูกออกซิไดซ์ จึงเป็นตัวที่ถูกออกซิไดซ์แทนสารอื่นๆในร่างกายที่ไวต่อการถูกออกซิไดซ์ได้น้อยกว่า นอกจากนี้ยังป้องกันไขมันไม่อิ่มตัวไปรวมตัวกับออกซิเจนซึ่งจะก่อให้เกิดอนุมูลอิสระ เป็นสารต้านไม่ให้หลอดเลือดแข็งตัว และยังขยายหลอดเลือดฝอยเล็กๆ ทำให้การไหลเวียนของเลือดดีขึ้น ป้องกันการเกาะตัวของเกล็ดเลือดที่ผนังหลอดเลือด จึงช่วยลดการอุดตันของคอเลสเตอรอล ทำให้ร่างกายมีการนำพาออกซิเจนไปใช้ได้อย่างสะดวก ส่งผลให้ร่างกายใช้ออกซิเจนได้ดีขึ้น อีกทั้งยังช่วยให้มีการผลัดเปลี่ยนผิวหนังขึ้นมาใหม่ ช่วยเพิ่มการทำงานของอินซูลิน ทำให้ระบบประสาทดีขึ้นสามารถ

ทำงานได้ตามปกติ ช่วยทำให้ระบบสืบพันธุ์เป็นปกติ รักษาอาการเป็นหมัน ช่วยป้องกันการเกิดต่อกระดูก และยังเชื่อว่าสามารถทำลายฤทธิ์ของสารก่อมะเร็งได้ด้วย (สมทรง เลขะกุล, 2543ข)

งานวิจัยนี้ มีการเติมวิตามินอี 0.0013% ของส่วนผสมทั้งหมดของผลิตภัณฑ์ กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น โดยใช้วิตามินอีชนิดแอลฟา-โทโคเฟอรอล อะซิเตต (α -tocopherol acetate) สูตร โครงสร้าง $C_{31}H_{52}O_3$ น้ำหนักโมเลกุล 472.73 กรัมต่อโมล มีลักษณะเป็นผงสีขาว สามารถละลายน้ำได้ ซึ่งแอลฟา-โทโคเฟอรอล อะซิเตต 1.0 กรัม มีปริมาณวิตามินอี เท่ากับ 500 IU

5.2 สมบัติของส่วนผสมต่อคุณภาพผลิตภัณฑ์

เพชรรัตน์ เห็งเจริญ และอิสราภรณ์ พาณิชย์เจริญรัตน์ (2549) ศึกษาผลของปริมาณน้ำตาลที่ระดับ 10.0, 20.0, 30.0, 40.0 และ 50.0 องศาบริกซ์ และกรดซิตริก ที่ระดับ 0.25%, 0.50%, 1.00% และ 1.5% ที่มีผลต่อความคงตัวของปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในเครื่องดื่มกระเจี๊ยบแดง จากการทดลองพบว่า เมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4.0 ± 2.0 และ 27.0 ± 2.0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 สัปดาห์ การเพิ่มขึ้นของปริมาณน้ำตาล ทำให้ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในเครื่องดื่มกระเจี๊ยบแดงลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในขณะที่การเติมกรดซิตริกในเครื่องดื่มกระเจี๊ยบแดงไม่มีผลต่อปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดอย่างมีนัยสำคัญ ($p \geq 0.05$) โดยเครื่องดื่มกระเจี๊ยบแดงที่เติมน้ำตาลในระดับที่เพิ่มขึ้น เท่ากับ 10.0, 20.0, 30.0, 40.0 และ 50.0 องศาบริกซ์ ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดลดลง เท่ากับ 1.35, 1.31, 1.19, 1.04 และ 0.93 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ตามลำดับ และเมื่อเก็บรักษาเครื่องดื่มกระเจี๊ยบแดงที่อุณหภูมิ 27.0 ± 2.0 องศาเซลเซียส พบว่า เครื่องดื่มกระเจี๊ยบแดงที่มีปริมาณน้ำตาล 50.0 องศาบริกซ์ มีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดลดลงเพียงเล็กน้อย ในขณะที่ตัวอย่างอื่นๆ มีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ขณะที่การเก็บรักษาเครื่องดื่มกระเจี๊ยบแดงที่อุณหภูมิ 4.0 ± 2.0 องศาเซลเซียส ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดมีปริมาณลดลงเพียงเล็กน้อย นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด พบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมีแนวโน้มลดลงเช่นกัน โดยเครื่องดื่มกระเจี๊ยบแดงที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4.0 ± 2.0 องศาเซลเซียส มีการเปลี่ยนแปลงน้อยกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 27.0 ± 2.0 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

Tsai และคณะ (2004) ศึกษาผลของปริมาณน้ำผึ้งต่อความคงตัวของแอนโทไซยานินในสารสกัดกระเจี๊ยบแดงผงแห้ง เมื่อนำสารสกัดกระเจี๊ยบแดงผงแห้งที่ผ่านการทำแห้งแบบระเหิดแห้ง (Freeze dry) ละลายในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1.5 โมลต่อลิตร จากนั้นนำไปทำแห้งแบบระเหิดแห้ง แล้วจึงนำสารสกัดกระเจี๊ยบแดงผงแห้งที่ได้มาปรับค่าพีเอชให้ได้เท่ากับ 3.2 ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ของกรดซิตริก ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร และโซเดียม-

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 0.2 โมลต่อลิตร แล้วจึงศึกษาผลของปริมาณน้ำผึ้งต่อความคงตัวของแอนโทไซยานิน โดยเติมน้ำผึ้งที่ระดับความเข้มข้น 20.0%, 40.0% และ 60.0% ของสารสกัดกระเจี๊ยบแดง วิเคราะห์ค่าดัชนีการถูกทำลายของแอนโทไซยานิน โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 และ 520 นาโนเมตร จากการทดลองพบว่า ค่าดัชนีการถูกทำลายของแอนโทไซยานินที่ระดับความเข้มข้นของน้ำผึ้ง 20.0%, 40.0% และ 60.0% เท่ากับ 0.77, 1.39 และ 1.53 ตามลำดับ กล่าวคือ สารสกัดกระเจี๊ยบแดงผงแห้งเติมน้ำผึ้งที่ระดับความเข้มข้น 20.0% มีค่าดัชนีการถูกทำลายของแอนโทไซยานินน้อยที่สุด ทั้งนี้เนื่องจากน้ำผึ้งที่ระดับความเข้มข้นน้อยกว่า 20.0% มีสมบัติในการเป็นสารป้องกันการเกิดสีน้ำตาล โดยทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส (Polyphenol oxidase, PPO) การเติมน้ำผึ้งในปริมาณความเข้มข้นไม่เกิน 20.0% จึงช่วยให้สารสกัดกระเจี๊ยบแดงผงแห้งมีความคงตัวมากที่สุด โดยสารสกัดกระเจี๊ยบแดงยังคงมีสีแดงและไม่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล

6. ภาชนะบรรจุของผลิตภัณฑ์

การเก็บรักษาอาหารไว้ในภาชนะบรรจุ มีวัตถุประสงค์เพื่อการขนย้ายอาหารจากแหล่งผลิตไปยังผู้บริโภคเป็นไปโดยสะดวก ไม่ทำให้อาหารเสื่อมเสียคุณภาพได้ง่าย และเพื่อลดการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ แมลง และสัตว์ต่างๆ เพื่อให้สามารถเก็บรักษาอาหารไว้บริโภคได้นานขึ้น การเก็บรักษาในภาชนะบรรจุที่ดี ส่งผลให้สี กลิ่น รส และรูปร่างของอาหารเป็นไปตามที่กำหนด วัสดุที่นำมาทำเป็นภาชนะบรรจุมีหลายประเภท ได้แก่ โลหะ แก้ว พลาสติก แผ่นกระดาษ แผ่นกระดาษเคลือบพลาสติก หรือเคลือบอะลูมิเนียม เป็นต้น (อนุกุล วัฒนสุข และ โชคชัย ชีรกุลเกียรติ, 2542)

ภาชนะบรรจุสำหรับเครื่องดื่มจากสารสกัด ส่วนใหญ่ คือ แก้ว เนื่องจากแก้วเป็นภาชนะบรรจุที่มีข้อเด่น คือ เป็นวัสดุที่เฉื่อยต่อการทำปฏิกิริยามากที่สุด และทนต่อการกัดกร่อนหรือปราศจากปฏิกิริยาเคมีของอาหาร ทำให้อาหารไม่เปลี่ยนแปลง ป้องกันการซึมผ่านของไอน้ำ ก๊าซ และกลิ่นได้ดี ความใส และเป็นประกายของแก้วยังช่วยให้มองเห็นผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้ขวดแก้วยังสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ สามารถบรรจุอาหารขณะร้อน หรือผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิสูงได้ จึงเป็นวัสดุที่มีสมบัติเหมาะสมกับผลิตภัณฑ์อาหาร แต่อาจมีข้อด้อยของแก้ว คือ น้ำหนักต่อหน่วยของแก้วมีค่ามากกว่าภาชนะบรรจุอื่นๆ และแตกได้ง่าย (ปุ่น คงเจริญเกียรติ และสมพร คงเจริญเกียรติ, 2541) งานวิจัยนี้ จึงเลือกใช้ขวดแก้วฝาเกลียวล็อก (ชนิดขวดใส) ขนาดความจุ 80 มิลลิลิตร เป็นภาชนะบรรจุผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น

7. กรรมวิธีการผลิตผลิตภัณฑ์กระเจียบแดงสกัดเข้มข้นในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท

ทำการหาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (ปารมี ชุมศรี, 2550) โดยการติดตั้งส่วน Stuffing box เข้ากับฝาขวดแก้ว จำนวน 12 ฝา โดยให้ส่วนปลายของเทอร์โมคัปเปิล อยู่ที่จุดร้อนซ้ำที่สุดของขวดแก้ว ประมาณ 1/2 และ 1/3 เท่าของความสูงของขวดแก้ววัดจากก้นขวด จำนวนตัวอย่างละ 3 ขวด ทำการผลิตผลิตภัณฑ์กระเจียบแดงสกัดเข้มข้น โดยนำสารสกัดกระเจียบแดงเข้มข้น มาปรับร้อยละของปริมาณของแข็งทั้งหมด จากเดิมเท่ากับ 26.79 ± 0.04 ปรับให้เท่ากับร้อยละของปริมาณของแข็งทั้งหมดของน้ำคั้นจากกระเจียบแดงสด ซึ่งเท่ากับ 7.44 ± 0.07 แล้วนำมาเติมส่วนผสมต่างๆ ตามสูตรในข้อ 5 ซึ่งมีการให้ความร้อนแก่ผลิตภัณฑ์โดยการต้ม โดยมีการควบคุมส่วนผสมต่างๆตลอดระยะเวลาผสมและต้ม โดยเริ่มจากการเติมสารสกัดกระเจียบแดงลงในหม้อผสม จากนั้นจึงละลายฟรุคโทสลงไป ตามด้วยการละลายน้ำผึ้ง และ โอลิโกฟรุคโทส ควบคุมผสมให้เข้ากัน แล้วให้ความร้อนแก่ผลิตภัณฑ์จนได้อุณหภูมิเท่ากับ 85.0 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงละลายวิตามินเอและวิตามินอีด้วยสารสกัดกระเจียบแดงเช่นกัน แล้วจึงเติมลงในหม้อผสมทั้งหมด นำส่วนผสมมาบรรจุที่อุณหภูมิ 85.0 องศาเซลเซียส ลงขวดแก้วฝาเกลียวล็อก ขนาดความจุ 80 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วยการลวกขวดในน้ำต้มเดือด บรรจุผลิตภัณฑ์ปริมาตร 70 มิลลิลิตร จำนวน 6 ใบ ปิดฝาที่ติดตั้ง Stuffing box เรียบร้อยแล้วให้แน่นสนิท เสียบปลายเทอร์โมคัปเปิล จำนวน 6 สาย เข้ากับ Stuffing box ที่ส่วนฝาขวด ส่วนอีก 1 สาย ใช้วัดอุณหภูมิของเครื่องฆ่าเชื้ออาหาร ทำการจัดเรียงขวดแก้ว 6 ขวด บนตะแกรงของเครื่อง ฆ่าเชื้อ เรียงกระป๋องจำลอง (Dummy cans) ให้เต็มช่องว่างแต่ละชั้นและใช้แผ่นกั้น (Divider plate) วางสลับระหว่างชั้นของกระป๋องจำลองจนเต็มตะแกรง (50 x 54 x 54 เซนติเมตร) จำนวน 9 ชั้น ส่วนปลายอีกด้านหนึ่งของเทอร์โมคัปเปิลต่อเข้ากับเครื่อง Potentiometer และบันทึกอุณหภูมิติดตั้งอุปกรณ์คอมพิวเตอร์และใช้โปรแกรมการทำงาน (LOG-TEC FMC Food Tech, ประเทศเบลเยียม) ของเครื่องฆ่าเชื้อสำหรับฆ่าเชื้อจุลินทรีย์แบบพาสเจอร์ไรซ์ แล้วจึงปิดฝาเครื่องฆ่าเชื้อและเริ่มโปรแกรมการทำงาน บันทึกอุณหภูมิทุกๆ 1 นาที จนกระทั่งผลิตภัณฑ์กระเจียบแดงสกัดเข้มข้นทั้ง 6 ขวด มีอุณหภูมิไม่ต่ำกว่า 85.0 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วทำให้เย็นจนกระทั่งอุณหภูมิของเครื่องฆ่าเชื้อมีอุณหภูมิประมาณ 40.0 องศาเซลเซียส

7.1 การพาสเจอร์ไรซ์

การพาสเจอร์ไรซ์ เป็นวิธีการถนอมอาหาร โดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิไม่สูงมาก โดยทั่วไปมักใช้อุณหภูมิต่ำกว่า 100.0 องศาเซลเซียส (วรารุฒ ครุตัง, 2539) โดยมุ่งทำลายเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มที่ไม่สร้างสปอร์ และแบคทีเรียก่อโรค (Pathogenic bacteria) ส่วนจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ที่ทนความร้อนของการพาสเจอร์ไรซ์ก็จะทำให้อาหารเสื่อมเสียได้ ดังนั้นอาหารที่ผ่านการ

พาสเจอร์ไรซ์ต้องอาศัยความเย็นในการเก็บรักษา ซึ่งน้ำผลไม้จัดอยู่ในกลุ่มของอาหารประเภทกรด (Acid food) อาหารประเภทนี้มีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 3.7-4.5 และสามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้ความร้อนระดับการพาสเจอร์ไรซ์ได้ ซึ่งการพาสเจอร์ไรซ์ สามารถแบ่งออกเป็น 2 ระบบ คือ (1) ระบบช้า อุณหภูมิต่ำเวลานาน เป็นการพาสเจอร์ไรซ์ที่ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60.0 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วทำให้เย็นทันที และ (2) ระบบเร็วอุณหภูมิสูงเวลาสั้น เป็นการพาสเจอร์ไรซ์ที่ให้ความร้อนในระดับสูงตั้งแต่ใช้เวลาสั้นลง คือ ที่อุณหภูมิ 72.0 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วทำให้เย็นลงโดยเร็ว (ทง กักรัชพันธุ์, 2543ข) นอกจากนี้ ในอาหารประเภทที่ปรับความเป็นกรด (Acidified food) มีการกำหนดให้การพาสเจอร์ไรซ์ ที่อุณหภูมิ ณ จุดร้อนช้าที่สุด เท่ากับ 85.0 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 5 นาที (USFDA, 2006)

7.2 ผลของการพาสเจอร์ไรซ์ต่อคุณภาพผลิตภัณฑ์

อรุษา ชาวณลิจิต และอรัญญา มิ่งเมือง (2550) ศึกษาคุณภาพทางเคมีและสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมัจจุค โดยนำเนื้อมัจจุคที่ผ่านการบีบอัด แยกกาก และฆ่าเชื้อจุลินทรีย์แบบพาสเจอร์ไรซ์ที่อุณหภูมิ 90.0 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที บรรจุขณะร้อนลงขวดแล้ววิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu's reagent วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 755 นาโนเมตร รายงานค่าในรูปแบบลิกรัมสมมูลย์ของกรดแกลลิกต่อ 100 มิลลิลิตรของน้ำมัจจุค วิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด ในรูปไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ ด้วยวิธี pH-differential method วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 และ 700 นาโนเมตร ใช้ค่า ϵ เท่ากับ $26,900 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ น้ำหนักโมเลกุลของอนุพันธ์ไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ เท่ากับ 449.2 กรัมต่อโมล แสดงค่าในรูปแบบลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตรของน้ำมัจจุค และวิเคราะห์สมบัติการจับอนุมูล DPPH โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร รายงานค่าในรูปแบบค่า EC_{50} (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ใช้สารละลายมาตรฐาน BHT เป็น Positive control จากการทดลองพบว่า การพาสเจอร์ไรซ์ที่อุณหภูมิ 90.0 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที ทำให้ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในน้ำมัจจุคมีปริมาณลดลง ในขณะที่ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และสมบัติการจับอนุมูล DPPH เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ซึ่งน้ำมัจจุคก่อนและหลังกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 20.17 ± 0.03 และ 35.56 ± 3.55 มิลลิกรัมสมมูลย์ของกรดแกลลิกต่อ 100 มิลลิลิตรของน้ำมัจจุค ตามลำดับ และมีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในรูปไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ เท่ากับ 0.023 ± 0.001 และ 0.018 ± 0.001 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตรของน้ำมัจจุค ตามลำดับ และสมบัติการจับอนุมูล DPPH แสดงค่าในรูปแบบค่า EC_{50} เท่ากับ 217.5 ± 74.24 และ 84.0 ± 28.28 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดที่วิเคราะห์ได้อาจเกิดจากการปะปนของเปลือกมัจจุคใน

ระหว่างการผลิต ซึ่งการให้ความร้อนแก่น้ำมังคุดนอกจากจะเป็นการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาแล้ว ยังสามารถทำให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้นด้วย ทั้งนี้อาจเกิดจากความร้อนทำลายสารแอนโทไซยานินแล้วทำให้เกิดสารประกอบฟีนอลิก และสารประกอบชนิดอื่นที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น

Fasoyiro และคณะ (2005) ศึกษาคุณภาพทางเคมีของเครื่องคั้นน้ำกระเจี๊ยบแดงผสมน้ำผลไม้ชนิดอื่นหลังการให้ความร้อนแบบพาสเจอร์ไรซ์ ซึ่งผลไม้ที่นำมาผลิตประกอบด้วยกระเจี๊ยบแดง สับปะรด ส้ม และแอปเปิ้ล ขั้นตอนการศึกษาประกอบด้วยการนำกลีบกระเจี๊ยบแดงที่ผ่านการล้างทำความสะอาด แยกเมล็ดออก จากนั้นจึงนำมาแช่ในน้ำกลั่น ใช้อัตราส่วนของกระเจี๊ยบแดงต่อน้ำ เท่ากับ 1 ต่อ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ทิ้งไว้ข้ามคืน แล้วจึงนำมาสกัดที่อุณหภูมิ 100.0 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นกรองน้ำกระเจี๊ยบแดงในขณะร้อน แล้วจึงนำสับปะรด ส้ม และแอปเปิ้ลที่ผ่านการล้างทำความสะอาด แยกเมล็ดออก ตัดแต่ง มากั้นน้ำ เติมน้ำในน้ำกระเจี๊ยบแดงในอัตราส่วนดังนี้ น้ำกระเจี๊ยบแดงต่อน้ำแอปเปิ้ล (RAD: 1 ต่อ 1) น้ำกระเจี๊ยบแดงต่อน้ำส้ม (ROD: 1 ต่อ 1) และน้ำกระเจี๊ยบแดงต่อน้ำสับปะรด (RPD: 1 ต่อ 1) น้ำผลไม้ทั้ง 3 สูตร เติมน้ำตาลในอัตราส่วน 1 ต่อ 2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) แล้วพาสเจอร์ไรซ์ที่อุณหภูมิ 95.0 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ทำให้เย็น และบรรจุลงขวดพลาสติก จากการทดลองพบว่า ค่าพีเอชของ RAD, ROD และ RPD เท่ากับ 3.38 ± 0.14 , 3.52 ± 0.10 และ 3.14 ± 0.05 ตามลำดับ ปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ (Titratable acidity, %) เท่ากับ $2.00 \pm 0.33\%$, $2.30 \pm 0.05\%$ และ $2.11 \pm 0.10\%$ ตามลำดับ ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด เท่ากับ 8.20 ± 0.14 , 11.21 ± 0.73 และ 9.22 ± 0.55 องศาบริกซ์ ตามลำดับ และเมื่อวิเคราะห์หาปริมาณกรดแอสคอร์บิกที่เหลืออยู่ของ RAD กับ RPD พบว่า ปริมาณกรดแอสคอร์บิกไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \geq 0.05$) มีปริมาณกรดแอสคอร์บิก เท่ากับ 35.63 และ 35.21 กรัมต่อ 100 กรัม แต่พบว่า RAD มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับ ROD ซึ่ง ROD มีปริมาณกรดแอสคอร์บิก เท่ากับ 46.21 กรัมต่อ 100 กรัม จึงกล่าวได้ว่า การผสมผลไม้ชนิดอื่นกับเครื่องคั้นกระเจี๊ยบแดง ทำให้ปริมาณกรดแอสคอร์บิกของเครื่องคั้นมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น

งานวิจัยนี้ เป็นการพาสเจอร์ไรซ์แบบบรรจุฝาปิดสนิท โดยทำให้จุดร้อนซ้ำที่สุดของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นบรรจุขวดแก้วฝาเกลียวล็อก บรรจุในปริมาตร 70 มิลลิลิตรต่อขวด เท่ากับ 85.0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที โดยใช้เครื่องฆ่าเชื้อ Steam water spray automated batch อุณหภูมิของเครื่องฆ่าเชื้อ (Processing temperature) เท่ากับ 101.0 องศาเซลเซียส เวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ (Processing time) นาน 5 นาที

7.3 มาตรฐานผลิตภัณฑ์อาหาร

7.3.1 มาตรฐานอาหารในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท

ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง มาตรฐานอาหารในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท (ฉบับ 301) พ.ศ. 2549 ซึ่งเป็นอาหารควบคุมเฉพาะ ต้องมีคุณภาพหรือมาตรฐานดังต่อไปนี้ (ประกาศกระทรวงสาธารณสุข, 2549)

- (1) ไม่มีสี กลิ่น และรส ที่ผิดจากสภาพอาหารนั้น
- (2) ไม่มีจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค
- (3) ไม่มีสารพิษจากจุลินทรีย์ในปริมาณที่อาจเป็นอันตรายต่อสุขภาพ
- (4) ไม่มีสารปนเปื้อน เว้นแต่อาหารในภาชนะบรรจุที่ไม่เป็นโลหะ
 - ตะกั่ว ไม่เกิน 1.0 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1.0 กิโลกรัม
 - สารหนู ไม่เกิน 2.0 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1.0 กิโลกรัม
 - พรอท ไม่เกิน 0.5 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1.0 กิโลกรัม
- (5) ไม่มีวัตถุกันเสีย เว้นแต่ที่ติดมากับวัตถุดิบที่เป็นส่วนประกอบของอาหาร
- (6) อาหารที่มีค่าพีเอช ตั้งแต่ 4.6 ลงมา ต้องมีคุณภาพหรือมาตรฐานเฉพาะ ดังนี้
 - ตรวจพบจุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 37.0 องศาเซลเซียส หรือ 55.0 องศาเซลเซียส ไม่เกิน 10,000 โคโลนีต่ออาหาร 1.0 กรัม
 - ตรวจพบยีสต์และรา ไม่เกิน 100 โคโลนีต่ออาหาร 1.0 กรัม
 - ตรวจไม่พบแบคทีเรียชนิดโคลิฟอร์ม (Coliform bacteria) หรือตรวจพบแบคทีเรียชนิดโคลิฟอร์ม น้อยกว่า 3 โคโลนีต่ออาหาร 1.0 กรัม ในกรณีที่ตรวจโดยวิธีเอ็มพีเอ็น (Most Probable Number, MPN)

7.3.2 มาตรฐานเครื่องดื่มน้ำในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท

ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขของเครื่องดื่มน้ำในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท ซึ่งเป็นอาหารควบคุมเฉพาะ ต้องมีคุณภาพหรือมาตรฐานดังต่อไปนี้ (ประกาศกระทรวงสาธารณสุข, 2543)

- (1) มีกลิ่นและรสตามลักษณะเฉพาะของเครื่องดื่มนั้น
- (2) ไม่มีตะกอน เว้นแต่ตะกอนอันมีตามธรรมชาติของส่วนประกอบ
- (3) น้ำที่ใช้ผลิตต้องเป็นน้ำที่มีคุณภาพหรือมาตรฐานตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขว่าด้วยเรื่อง น้ำบริโภคในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท
- (4) ตรวจพบแบคทีเรียชนิดโคลิฟอร์ม น้อยกว่า 2.2 ต่อเครื่องดื่มน้ำ 100 มิลลิลิตร โดยวิธีเอ็มพีเอ็น (MPN)
- (5) ตรวจไม่พบแบคทีเรียชนิด *Escherichia coli*

- (6) ไม่มีจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค
 (7) ไม่มีสารเป็นพิษจากจุลินทรีย์ หรือสารเป็นพิษอื่นในปริมาณที่อาจเป็นอันตราย

ต่อสุขภาพ

- (8) ไม่มียีสต์ และเชื้อรา
 (9) ไม่มีสารปนเปื้อน เว้นแต่ดังต่อไปนี้
 - ตะกั่ว ไม่เกิน 0.5 มิลลิกรัม ต่อเครื่องดื่ม 1.0 กิโลกรัม
 - เหล็ก ไม่เกิน 15.0 มิลลิกรัม ต่อเครื่องดื่ม 1.0 กิโลกรัม
 - ดีบุก ไม่เกิน 250.0 มิลลิกรัม ต่อเครื่องดื่ม 1.0 กิโลกรัม
 (10) ใช้วัตถุที่ทำให้ความหวานแทนน้ำตาล หรือใช้ร่วมกับน้ำตาล

(11) มีแอลกอฮอล์อันเกิดขึ้นจากธรรมชาติของส่วนประกอบ และแอลกอฮอล์ที่ใช้ในกรรมวิธีการผลิต รวมกันได้ไม่เกินร้อยละ 0.5 ของน้ำหนัก ถ้าจำเป็นต้องมีแอลกอฮอล์ในปริมาณสูงกว่าที่กำหนดไว้ ต้องได้รับความเห็นชอบจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ก่อนงานวิจัยนี้ ได้ทำการผลิตผลิตภัณฑ์กระเจียบแดงสกัดเข้มข้นบรรจุขวดแก้วฝาเกลียวล็อก บรรจุผลิตภัณฑ์ปริมาตร 70 มิลลิลิตรต่อขวด ซึ่งคุณภาพของผลิตภัณฑ์จะต้องเป็นไปตามมาตรฐานทั้งทางกายภาพ เคมี และจุลินทรีย์ ครอบคลุมทั้งมาตรฐานเครื่องดื่มในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท (ประกาศกระทรวงสาธารณสุข, 2543) และอาหารในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท (ประกาศกระทรวงสาธารณสุข, 2549)

8. การเปลี่ยนแปลงคุณภาพของผลิตภัณฑ์ในระหว่างการเก็บรักษา

การเก็บรักษาอาหาร เป็นการยืดอายุของอาหารให้ยาวนานมากขึ้น ทุกครั้งที่เก็บรักษาอาหาร สิ่งที่ควรคำนึงถึงเป็นอย่างแรก คือ อุณหภูมิที่ปลอดภัยในการเก็บรักษาอาหาร โดยปกติเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษจะเจริญเติบโตได้ดี ที่อุณหภูมิ 5.0-60.0 องศาเซลเซียส การเก็บรักษาอาหารที่เหมาะสมจึงควรเก็บในตู้เย็น ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 5.0 องศาเซลเซียส เพราะทำให้เชื้อจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในอาหารเจริญเติบโตได้ช้าลง (สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2547)

อายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์อาหาร เป็นช่วงระยะเวลาระหว่างการบรรจุ และการใช้ผลิตภัณฑ์ โดยคุณภาพของผลิตภัณฑ์ยังคงเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค ซึ่งระหว่างการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหารไว้นั้น คุณภาพของผลิตภัณฑ์อาจลดลงหรือเกิดการเสื่อมคุณภาพ โดยมีสาเหตุมาจาก (1) ปัจจัยภายใน (Intrinsic factors) ได้แก่ คุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ เช่น ค่าวอเตอร์แอกทิวิตี (a_w) ค่าพีเอช สารอาหาร และจุลินทรีย์ที่มีอยู่เริ่มต้น (2) ปัจจัยภายนอก (Extrinsic factors)

ได้แก่ ภาชนะบรรจุ เช่น ชนิดของบรรจุภัณฑ์ หรือวิธีการบรรจุ รวมทั้งสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ และแสงสว่าง เป็นต้น (ปุ่น คงเจริญเกียรติ และสมพร คงเจริญเกียรติ, 2541)

8.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของผลิตภัณฑ์ในระหว่างการเก็บรักษา

8.1.1 อุณหภูมิและระยะเวลาการเก็บรักษา

Carbrita และคณะ (2000) ศึกษาผลของอุณหภูมิการเก็บรักษาต่อความคงตัวของอนุพันธ์มัลวิดิน 3-กลูโคไซด์ โดยการคั้นน้ำบลูเบอร์รี่ พันธุ์ *Vaccinium* spp. ที่มีค่าพีเอชที่เอชด้วยบัฟเฟอร์ (0.2M KCl 25 มิลลิลิตร+0.02M HCl 67 มิลลิลิตร) ให้มีค่าพีเอชเท่ากับ 1.0 เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10.0 และ 23.0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วัน จากการทดลองพบว่า การเก็บรักษาน้ำบลูเบอร์รี่ ที่อุณหภูมิ 10.0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 และ 60 วัน ค่าการดูดกลืนแสงของมัลวิดิน 3-กลูโคไซด์ ลดลงจาก 2.42 เป็น 2.39 และเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 23.0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 และ 60 วัน พบว่า ค่าการดูดกลืนแสงของมัลวิดิน 3-กลูโคไซด์ ลดลงจาก 2.42 เป็น 2.20 จึงสรุปว่า ในสถานะที่มีความเป็นกรดสูง (ค่าพีเอชเท่ากับ 1.0) อนุพันธ์มัลวิดิน 3-กลูโคไซด์ มักอยู่ในรูปฟลาโวลียม แคทไอออน ซึ่งมีความเข้มของสีแดงสูง และการเก็บรักษาน้ำบลูเบอร์รี่ ที่อุณหภูมิ 10.0 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 60 วัน อนุพันธ์มัลวิดิน 3-กลูโคไซด์ ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ใกล้เคียงกับเมื่อวันที่ 0 ของการเก็บรักษา ดังนั้นการเก็บรักษาน้ำบลูเบอร์รี่ ที่อุณหภูมิ 10.0 องศาเซลเซียส จึงเป็นสถานะการเก็บรักษาที่ดีที่สุด

Wicklund (2005) ศึกษาผลของอุณหภูมิการเก็บรักษาต่อความคงตัวของแอนโทไซยานินในผลิตภัณฑ์แยมสตอเบอรี่ โดยนำผลสตอเบอรี่ที่ผ่านการแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20.0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 เดือน มาผลิตเป็นแยมสตอเบอรี่ที่มีส่วนผสมสตอเบอรี่ 4.0 กิโลกรัม น้ำ 400 มิลลิลิตร น้ำตาล 4.7 กิโลกรัม สารละลายเพคติน (LM 101) โดยใช้อัตราส่วนของเพคตินต่อน้ำ 60 กรัมต่อ 700 มิลลิลิตร โซเดียมเบนโซเอท 3.0 กรัม โพแทสเซียมซอร์เบท 4.0 กรัม และกรดซิตริก 140.0 กรัม ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90.0 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที บรรจุนั้นลงในขวดแก้วแล้วทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 60.0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4.0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ก่อนทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4.0 และ 20.0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 เดือน จากนั้นจึงวิเคราะห์หาปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด ด้วยวิธี pH differential method วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 และ 700 นาโนเมตร ใช้ค่า ϵ เท่ากับ $22,400 \text{ Lmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ และมวลโมเลกุลของฟีลาร์โกนิดิน 3-กลูโคไซด์ (Pelargonidin 3-glucoside) เท่ากับ 433.2 กรัมต่อโมล แสดงปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในรูปฟีลาร์โกนิดิน 3-กลูโคไซด์ต่อสตอเบอรี่ 100 กรัม จากการทดลองพบว่า เมื่อเก็บรักษาผลิตภัณฑ์แยมสตอเบอรี่ที่อุณหภูมิ 4.0 องศาเซลเซียส มีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด เท่ากับ 29.40

มิลลิกรัมฟิลาไรโกนิน 3-กลูโคไซด์ต่อสตรอบเบอรี 100 กรัม ซึ่งมีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดสูงกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 20.0 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ซึ่งมีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด เท่ากับ 11.20 มิลลิกรัมฟิลาไรโกนิน 3-กลูโคไซด์ต่อสตรอบเบอรี 100 กรัม

Bakhshayeahi และคณะ (2006) ศึกษาผลของระยะเวลาการเก็บรักษาต่อการสูญเสียปริมาณแอนโทไซยานินของแอปเปิ้ล สายพันธุ์ *Malus domestica* cv. jonathan ที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 2.0 โดยการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30.0 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 21, 42 และ 63 วัน จากการทดลองพบว่า ที่ระยะเวลา 21, 42 และ 63 วัน มีปริมาณการสูญเสียแอนโทไซยานิน เท่ากับ 8.17%, 26.90% และ 47.04% ตามลำดับ ซึ่ง Giusti และ Wrolstad (2001) รายงานว่า การสูญเสียแอนโทไซยานินอย่างรวดเร็วเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปฏิกิริยาไฮโดรไลเซชันของ 3-ไกลโคไซด์ ซึ่งจะมีผลต่อความไม่คงตัวของแอนโทไซยานิน หรืออาจเกิดจากปฏิกิริยาไฮโดรไลเซชันที่วงแหวนไพริเดียม เป็นผลให้เกิดโครงสร้างแบบซาลิโคน นำไปสู่การเกิดสีน้ำตาลในผลิตภัณฑ์อาหารที่มีแอนโทไซยานินเป็นองค์ประกอบ

Yuksel และ Koca (2008) พบว่า น้ำแบลคเบอรี (Blackberry nectars) ที่ผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 20.0 องศาเซลเซียส นาน 7 เดือน มีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดลดลง 95.0% จากปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดเริ่มต้น ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ 135.63 มิลลิกรัมต่อลิตร และลดลงเหลือ เท่ากับ 7.39 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเก็บรักษานาน 7 เดือน ซึ่งอัตราการสลายตัวของแอนโทไซยานินจะเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิในการเก็บรักษาเพิ่มสูงขึ้น และปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดจะมีปริมาณลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้นเช่นกัน

8.1.2 แสงสว่าง

ยูพาพร ผลาจรศักดิ์ (2547) รายงานว่า แอนโทไซยานินที่มีหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 จะสามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบเนื่องจากแสงสว่างได้มากกว่าแอนโทไซยานินที่ไม่มีหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ซึ่งแสงสว่างจะเป็นตัวเร่งให้เกิดการสลายตัวของแอนโทไซยานินจากความร้อน และเกิด Photo-oxidation ของแอนโทไซยานินให้ผลเช่นเดียวกับแอนโทไซยานินที่สลายตัวด้วยความร้อนได้เป็นแอนโทไซยานินในรูปของซาลิโคน ซึ่งเป็นโครงสร้างของแอนโทไซยานินที่ไม่มีสี

Sankat และคณะ (2000) ศึกษาผลของแสงสว่างต่อปริมาณแอนโทไซยานินของชมพู่มะเหมี่ยว (*Syzygium malaccense* Linn.) โดยแบ่งชมพู่มะเหมี่ยวออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่เก็บรักษาในที่มืด และอีกกลุ่มเก็บรักษาภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ ทั้ง 2 กลุ่มเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5.0 องศาเซลเซียส นาน 30 วัน แล้วแยกเฉพาะผิวชมพู่มะเหมี่ยวมาสกัดด้วย 1.0% ไฮโดรคลอริก เข้มข้นในเมทานอล กรองเฉพาะส่วนใส แล้ววิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินด้วยการวัดค่าการ

ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer คัดแปลงตามวิธีของ Paull และคณะ (1985) เปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากผิวชมพู่มะเหมี่ยวสดหลังการเก็บเกี่ยวทันที พบว่า ผิวชมพู่มะเหมี่ยวสด มีค่าการดูดกลืนแสง เท่ากับ 0.642 ส่วนการเก็บรักษาภายใต้แสงฟลูออเรสเซนซ์ พบว่า ค่าการดูดกลืนแสงของแอนโทไซยานินลดลงอย่างรวดเร็ว คงเหลือเท่ากับ 0.181 หลังเก็บรักษาเพียง 10 วัน และลดลงคงเหลือ เท่ากับ 0.019 เมื่อเก็บรักษานาน 30 วัน เช่นเดียวกับการเก็บรักษาในที่มืด ที่วัดค่าการดูดกลืนแสงได้เท่ากับ 0.166 หลังเก็บรักษานาน 30 วัน จึงสรุปได้ว่า ระยะเวลา และแสงสว่างจะมีผลต่อปริมาณแอนโทไซยานินอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) แสดงให้เห็นว่า แสงสว่างมีผลต่อของสีผิวของชมพู่มะเหมี่ยว และพบว่าการเก็บรักษาในที่มืด ที่อุณหภูมิ 5.0 องศาเซลเซียส จะลดการสูญเสียสีแดงของผิวชมพู่มะเหมี่ยวหลังเก็บรักษานาน 30 วัน ได้ ซึ่ง Palamidis และ Markakis (1975); Attoe และ Von Elbe (1981) อ้างโดย Sankat *et al.*, 2000) รายงานว่า แอนโทไซยานินที่เป็นองค์ประกอบในอาหารจะง่ายต่อการเสื่อมสลายของสีแดงหรือสีม่วงธรรมชาติจนเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ซึ่งเกิดจากหลายปัจจัย เช่น อุณหภูมิ ออกซิเจน ค่าพีเอช แสงสว่าง และเอนไซม์ ที่มีผลต่อความคงตัวของสีแอนโทไซยานิน นอกจากนี้ Tsai และ Ou (1996) อ้างโดย Sankat *et al.*, 2000) ยังรายงานว่าการเก็บรักษากระเจี๊ยบแดงแห้งในที่มืด จะมีปริมาณแอนโทไซยานินสูงกว่าการเก็บรักษาภายใต้แสงฟลูออเรสเซนซ์ และเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลจากปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลแบบไม่ใช้เอนไซม์ (Nonenzymatic browning) จึงสันนิษฐานได้ว่า แสงสว่างจะเร่งการสลายตัวของแอนโทไซยานิน โดยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส (Peroxidase) และโพลีฟีนอลออกซิเดส ที่เป็นสาเหตุให้เกิดสีน้ำตาลเพิ่มขึ้นจึงทำให้ปริมาณแอนโทไซยานินในกระเจี๊ยบแดงมีปริมาณลดลง นอกจากนี้ แสงสว่างยังมีผลเหนี่ยวนำให้เกิดการสลายตัวของแอนโทไซยานินไปอยู่ในรูปของสารเฟอฟูรอล ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดสีน้ำตาล ทั้งนี้ Jackman และ Smith (1996) รายงานว่า แสงสว่างเป็นสาเหตุให้อัตราการสลายตัวของแอนโทไซยานินอันเนื่องมาจากความร้อนมีอัตราเพิ่มขึ้น โดยแสงสว่างมีส่วนกระตุ้นให้เกิดสถานะที่ไม่เสถียร (Excited state) แอนโทไซยานินที่เกิดการออกซิเดชันอันเนื่องมาจากแสงสว่างให้ผลเช่นเดียวกับการสลายตัวของแอนโทไซยานินด้วยสาเหตุจากความร้อน นอกจากนี้การเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ในวงแหวน C ของแอนโทไซยานิน เป็นผลให้วงแหวนเปิดออกได้เป็นแอนโทไซยานินในรูปของซาลโคน ส่วนของซาลโคนสามารถเกิดการสลายตัวต่อไป จนกระทั่งได้เป็นสารพื้นฐานของการสลายตัวของแอนโทไซยานิน ได้แก่ 2,4,6-trihydroxy benzaldehyde และแอนโทไซยานินที่ถูกแทนที่ด้วยกรดเบนโซอิก เป็นต้น

งานวิจัยนี้ ศึกษาผลของแสงสว่างในการเก็บรักษาต่อคุณภาพทางกายภาพ เคมี และสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น เมื่อเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ และสภาวะที่ไม่มีแสงสว่าง ที่อุณหภูมิ 27.0 ± 1.0 องศาเซลเซียส สุ่มเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์ทุกๆ 2 เดือน เป็นระยะเวลา 12 เดือน

8.2 การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ

ปีทมาพร โสภินท์ (2549) ศึกษาผลของระยะเวลาการเก็บรักษาต่อคุณภาพทางกายภาพของเนื้อมะเขี๋ยงซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการแปรรูปเครื่องดื่มมะเขี๋ยงผง โดยเนื้อมะเขี๋ยงผงดังกล่าวได้มาจากการนำมะเขี๋ยงสดแช่เยือกแข็ง มาละลายโดยการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5.0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาสกัดด้วยน้ำ ในอัตราส่วนมะเขี๋ยงสดต่อน้ำ เท่ากับ 2 ต่อ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) สกัดที่อุณหภูมิ $65.0-75.0$ องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที หลังจากนั้นจึงแยกเนื้อมะเขี๋ยงออกจากน้ำ นำเนื้อมะเขี๋ยงที่ผ่านการสกัดมาทำแห้งโดยใช้ตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60.0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำมาบดเป็นผงละเอียดด้วยเครื่องบดก่อนร้อนผ่านตะแกรง ขนาด 0.5 มิลลิเมตร บรรจุลงถุงไนลอน เก็บรักษาที่อุณหภูมิบรรยากาศปกติ ในสภาวะที่มีและไม่มีแสงสว่าง เป็นระยะเวลา 12 เดือน แล้ววัดค่าสี ในระบบ $CIE L^* a^* b^*$ พบว่าเนื้อมะเขี๋ยงมีค่าความเป็นสีแดง (a^*) คงตัวในช่วง 3 เดือนแรกของการเก็บรักษา หลังจากนั้นจึงมีค่าลดลง ซึ่งค่าสีแดง (a^*) ดังกล่าวมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) จาก 30.35 เป็น 25.30 ในขณะที่การเก็บรักษาทั้งสองสภาวะ คือ ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีแสงสว่างไม่มีผลต่อค่าสีแดง (a^*) ของเนื้อมะเขี๋ยงตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา ($p \geq 0.05$) และสำหรับค่าความสว่างของสี (L^*) และความเป็นสีเหลือง (b^*) มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยค่า L^* เพิ่มขึ้นจาก 40.54 เป็น 48.10 และค่า b^* เพิ่มขึ้นจาก 3.52 เป็น 6.98 ($p < 0.05$) จากการเพิ่มขึ้นของค่าความสว่างของสีและความเป็นสีเหลือง และการลดลงของค่าความเป็นสีแดง ทำให้เนื้อมะเขี๋ยงนั้นมีสีซีดจางลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้น

บุภาพร ผลาขจรศักดิ์ และคณะ (2547) ศึกษาคุณภาพทางกายภาพของสารสกัดจากเปลือกมังคุด โดยการสกัดจากเปลือกมังคุดคั้นนอกด้วย 1.0% ไฮโดรคลอริก ใน 95.0% เอทานอล ในอัตราส่วนเปลือกมังคุดต่อตัวทำละลาย เท่ากับ 1 ต่อ 25 นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นระเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary vacuum evaporator ที่อุณหภูมิ 35.0 องศาเซลเซียส ความดัน 70 มิลลิบาร์ หมุนด้วยความเร็ว 80 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที หรือจนกว่าสารละลายจะแห้ง แล้วละลายสารสกัดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ $0.2 M HCl$ 22.3 มิลลิลิตร และ $0.2 M KHC_8H_4(COO)_2$ 50.0 มิลลิลิตร ให้มีค่าพีเอช เท่ากับ 3.0 แล้วนำไปเก็บรักษาในสภาวะที่มีและไม่มีแสงสว่าง ที่อุณหภูมิ 30.0 ± 3.0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 1, 2, 5, 8, 15 และ 60 วัน วิเคราะห์ค่าสี ในระบบ CIE

L^* a^* b^* ตามวิธีของ Garcia และ Bridle (1999) ซึ่งค่าสี L^* a^* และ b^* ของสารสกัดจากเปลือกมังคุดเริ่มต้น เท่ากับ 91.12 ± 2.26 , 6.80 ± 0.47 และ 1.30 ± 1.28 ตามลำดับ และเมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 60 วัน พบว่า ค่าสี L^* เพิ่มขึ้น ส่วนค่า a^* และ b^* มีค่าลดลง ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีแสงสว่าง เห็นได้จากค่าสี L^* a^* และ b^* ในสภาวะที่มีแสงสว่าง เปลี่ยนแปลงเป็น 93.95 ± 0.66 , 3.70 ± 0.41 และ 1.18 ± 0.74 ตามลำดับ แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการเก็บรักษาในสภาวะที่ไม่มีแสงสว่าง ซึ่งมีค่าสี L^* a^* และ b^* มีค่าเท่ากับ 94.22 ± 0.31 , 4.16 ± 0.41 และ 0.79 ± 0.62 ตามลำดับ จึงสรุปว่า การเก็บรักษาที่อุณหภูมิสูง (30.0 องศาเซลเซียส) แอนโทไซยานินจะเกิดการเปลี่ยนแปลงทำให้โครงสร้างแอนโทไซยานินเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของชาลโคเนมากขึ้น ปริมาณแอนโทไซยานินในรูปฟลาโวนิลิยม แคาโทออน จึงมีปริมาณลดลง ดังนั้นความคงตัวของสีแดงของแอนโทไซยานินจึงลดลงเช่นกัน นอกจากนี้ยังพบว่า การเปลี่ยนแปลงของแอนโทไซยานินจะเกิดได้มากที่สุด เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงและมีแสงสว่าง เนื่องจากการเก็บรักษาในสภาวะที่อุณหภูมิสูง นอกจากจะก่อให้เกิดโครงสร้างในรูปของชาลโคเน แล้วยังพบว่าแสงสว่างจะเป็นตัวเร่งให้แอนโทไซยานินในรูปของคาร์บินอล เบส เปลี่ยนไปอยู่ในรูปของชาลโคเนได้เร็วขึ้น ซึ่งเป็นผลมาจาก Photo-oxidation ดังนั้น การเก็บรักษาที่อุณหภูมิสูงและมีแสงสว่างจึงเป็นปัจจัยที่ส่งเสริมให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของแอนโทไซยานินไปอยู่ในรูปของชาลโคเนเพิ่มขึ้น

8.3 การเปลี่ยนแปลงทางเคมี

ปัทมาพร โสภณัท (2549) ศึกษาผลของระยะเวลาการเก็บรักษาต่อคุณภาพทางเคมีของเครื่องดื่มมะเขือขิงผง โดยนำมะเขือขิงสดมาสกัดด้วยน้ำ ในอัตราส่วนมะเขือขิงสดต่อน้ำ เท่ากับ 2 ต่อ 1 ที่อุณหภูมิ 65.0-75.0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที เก็บรักษาในสภาวะที่มีและไม่มีแสงสว่าง ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 0-12 เดือน เป็นระยะเวลา 12 เดือน วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และสมบัติการจับอนุมูล ABTS เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน โทรลอคซ์ จากการทดลองพบว่า ระยะเวลาการเก็บรักษาเป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มมะเขือขิง ซึ่งการเก็บรักษาในสภาวะที่มีและไม่มีแสงสว่าง นาน 12 เดือน ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มมะเขือขิง มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเพิ่มสูงขึ้นจาก 1.18 ± 0.10 เป็น 2.14 ± 0.06 และ 2.45 ± 0.11 มิลลิกรัมต่อกรัมของเนื้อมะเขือขิงแห้ง ตามลำดับ และพบว่าสมบัติการจับอนุมูล ABTS ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) สมบัติการจับอนุมูล ABTS ของเดือนที่ 0 เท่ากับ 20.78 ± 0.17 มิลลิกรัมต่อกรัมของเนื้อมะเขือขิงแห้ง และลดลงเหลือ เท่ากับ 19.91 ± 0.39 และ 19.65 ± 0.40 มิลลิกรัมต่อกรัมของเนื้อมะเขือขิงแห้ง เมื่อเก็บรักษาในที่มีและไม่มีแสงสว่าง ตามลำดับ ซึ่งการลดลงของสมบัติการจับอนุมูล ABTS และในขณะที่ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเพิ่มสูงขึ้น อาจเกิดจากสารประกอบฟีนอลิกเกิดการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้าง จึงส่งผลให้เกิดการสูญเสีย

สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งความคงตัวของสารประกอบฟีนอลิกในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น ค่าพีเอช แสงสว่าง เอนไซม์ และการรวมตัวกับ โมเลกุลอื่น เป็นต้น (วิวัฒน์ หวังเจริญ, 2545) เช่นเดียวกับ Chang และคณะ (2005 อ้างโดย ปัทมาพร โสภิณท์, 2549) ที่รายงานไว้ว่า สารประกอบฟีนอลิกจะมีความคงตัวเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4.0 องศาเซลเซียส แต่จะมีความคงตัวลดลงเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 23.0 และ 40.0 องศาเซลเซียส ดังนั้นการเก็บรักษา เครื่องดื่มมะเขือเทศที่อุณหภูมิบรรยากาศปกติ อาจมีผลต่อความคงตัวของสารประกอบฟีนอลิก ในผลิตภัณฑ์

Klimczak และคณะ (2007) ศึกษาผลของสภาวะการเก็บรักษาต่อปริมาณ สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณกรดแอสคอร์บิก และสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของน้ำส้ม โดยใช้ น้ำส้ม 100% จำนวน 30 กล่อง กล่องละ 1.0 ลิตร แล้วแบ่งสำหรับการวิเคราะห์คุณภาพ เริ่มต้นก่อนการเก็บรักษา จำนวน 3 กล่อง และอีก 27 กล่อง ใช้วิเคราะห์คุณภาพในระหว่างการเก็บ รักษาที่อุณหภูมิ 28.0 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2, 4 และ 6 เดือน โดยวิเคราะห์หาปริมาณ สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu's method เมื่อใช้กรดคาเฟอิก (Caffeic acid) เป็นสารละลายมาตรฐาน รายงานค่าในรูปมิลลิกรัมกรดคาเฟอิกต่อน้ำส้ม 1.0 ลิตร และปริมาณกรด แอสคอร์บิก วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC ตามวิธีของ Ross (1994) ส่วนการวิเคราะห์สมบัติการจับอนุมูล DPPH วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer รายงานค่าในรูป % การยับยั้งอนุมูล DPPH และวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกไอออน (FRAP) ตามวิธีของ Benzie and Strain (1996) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร รายงานค่าในรูปมิลลิโมลไอออน (II) ซัลเฟต (mM FeSO₄) จากการทดลองพบว่า น้ำส้ม 100% มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเริ่มต้น เท่ากับ 684.2 มิลลิกรัมกรดคาเฟอิกต่อลิตร มีปริมาณกรดแอสคอร์บิกเริ่มต้น เท่ากับ 408.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิและ ระยะเวลาเพิ่มขึ้น พบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของเดือนที่ 6 ลดลงเหลือเท่ากับ 622.8 มิลลิกรัมกรด คาเฟอิกต่อลิตร และปริมาณกรดแอสคอร์บิกลดลงเหลือ เท่ากับ 283.60 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้ เมื่อวิเคราะห์สมบัติการจับอนุมูล DPPH และความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกไอออน (FRAP) พบว่า เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น ทำให้กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระลดลงอย่างมี นัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยค่าการยับยั้งอนุมูล DPPH ลดลงจาก 49.20% คงเหลือเท่ากับ 27.40% ส่วนค่าความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกไอออน (FRAP) ลดลงจาก 7.50% คงเหลือเท่ากับ 5.10% เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการเก็บรักษา 6 เดือน

สำหรับงานวิจัยนี้ ศึกษาผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อคุณภาพทางกายภาพ เคมี และสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น โดยเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิ 27.0 ± 1.0 องศาเซลเซียส สุ่มเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์ทุก 2 เดือน เป็นระยะเวลา 12 เดือน

8.4 การเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์

ปีทมาพร โสภณช์ (2549) ศึกษาอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มมะเขິงผง โดยการสกัดมะเขິงผงสดด้วยน้ำ ในอัตราส่วนมะเขິงผงสดต่อน้ำ เท่ากับ 2 ต่อ 1 ที่อุณหภูมิ $65.0-75.0$ องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที หลังจากนั้นจึงแยกเนื้อมะเขິงผงออกจากรน้ำ นำไปเก็บรักษาในสภาวะที่มีและไม่มีแสงสว่าง ที่อุณหภูมิบรรยากาศปกติ เป็นระยะเวลา 12 เดือน แล้ววิเคราะห์ค่าพีเอช และปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด พบว่า ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มมะเขິงผงมีค่าพีเอชไม่แตกต่างกันในช่วงเดือนแรก และเดือนที่ 12 ($p \geq 0.05$) โดยมีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 3.28-3.48 และสำหรับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มมะเขິงผง พบว่า ตลอดระยะเวลาที่ศึกษา 12 เดือน ตรวจพบปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดน้อยกว่า 30 โคลโลนีต่อกรัม ทั้งนี้เนื่องจากผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มมะเขິงผงเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีค่าพีเอชต่ำ (ค่าพีเอช 3.45 ± 0.06) จึงสามารถป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ได้

สำหรับงานวิจัยนี้ ศึกษาผลของอุณหภูมิในช่วงระหว่างการเก็บรักษาต่อคุณภาพทางจุลินทรีย์ของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นหลังกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ (เดือนที่ 0) และเมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 12 เดือน โดยการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิ 4.0 ± 1.0 และ 27.0 ± 1.0 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0 และ 12 เดือน

9. การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส

การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส โดยวิธีการทดสอบความยอมรับ (Acceptance test) ซึ่งมีหลากหลายวิธีการทดสอบ แต่วิธีการทดสอบที่ได้รับความนิยมอีกวิธีหนึ่งคือ วิธีการทดสอบตามความชอบแบบ Hedonic scaling test ซึ่งวัดจากความรู้สึกส่วนตัวของผู้ทดสอบชิมที่ตอบสนองต่อผลิตภัณฑ์ตัวอย่างที่กำลังทดสอบ ผู้ทดสอบชิมที่ใช้เป็นผู้ทดสอบชิมในระดับห้องปฏิบัติการ (Laboratory panel) มีจำนวนตั้งแต่ 10-20 คน โดยผู้ทดสอบชิมมีความสามารถในการแยกความแตกต่างของผลิตภัณฑ์ได้เป็นอย่างดี หรืออาจเป็นผู้ทดสอบชิมที่มีความชำนาญ จึงใช้ผู้ทดสอบชิมในจำนวน 8-12 คนได้ โดยทั่วไปแล้วผู้ทดสอบชิมที่ได้รับการฝึกฝนแม้จะมีจำนวนน้อยแต่จะให้ผลการทดสอบที่ดีกว่าการใช้ผู้ทดสอบชิมที่ไม่ได้รับการฝึกฝนมาเลย แม้จะใช้จำนวนผู้ทดสอบชิมมากกว่าก็ตาม (ไพโรจน์ วิริยจารี, 2545)

งานวิจัยนี้ ประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสในช่วงระหว่างการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น ด้วยวิธีการทดสอบตามความชอบแบบ 9 ระดับคะแนน ความชอบ ใช้ผู้ทดสอบชิม จำนวน 12 คน โดยประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นหลังกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ (เดือนที่ 0) และเมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 12 เดือน ที่อุณหภูมิ 4.0 ± 1.0 และ 27.0 ± 1.0 องศาเซลเซียส

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาผลของการทำแห้งต่อสมบัติทางกายภาพ เคมี และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของกระเจี๊ยบแดง
2. ศึกษาผลของกระบวนการแปรรูปต่อสมบัติทางกายภาพ เคมี และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงและผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น
 - 2.1 ศึกษาผลของการสกัดและการทำให้เข้มข้นต่อสมบัติทางกายภาพ เคมี และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงและสารสกัดกระเจี๊ยบแดงเข้มข้น
 - 2.2 ศึกษาผลของกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ต่อสมบัติทางกายภาพ เคมี และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น
3. ศึกษาผลของสภาวะการเก็บรักษาต่อสมบัติทางกายภาพ เคมี และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น

บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

วัตถุดิบ

ดอกกระเจี๊ยบแดงสด (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) พันธุ์ชูดาน ระยะการเก็บเกี่ยวประมาณ 120 วัน จากแหล่งปลูกตำบลควนมืด อำเภอนาหม่อม จังหวัดสงขลา

วัสดุ และสารเคมี

1. ขวดล็กซ์ฝาเกลียวล็อก (ชนิดขวดใส) ขนาดความจุ 80 มิลลิลิตร สำหรับบรรจุผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น
2. สำหรับเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น
 - 2.1 ฟรุคโทส (น้ำเชื่อมไฮฟรุคโทส 42.0%)
 - 2.2 น้ำผึ้ง (ผลิตภัณฑ์จากโครงการส่วนพระองค์ สวนจิตรลดา)
 - 2.3 โอลิโกฟรุคโทส (ชื่อทางการค้า Frutafit[®] CLR, บริษัท เฮล์มมทานูญ จำกัด กรุงเทพฯ)
 - 2.4 วิตามินอี (50% *dl*-alpha-tocopheryl acetate, DSM Switzerland)
 - 2.5 วิตามินเอ (Dry vitamin A acetate type 325 CWS/F, DSM Switzerland)
3. สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

Table 6. List of chemicals

Chemicals	Grade	Company	Country
1. Sodium hydroxide	Analytical	Merck	Germany
2. Potassium chloride	Analytical	Merck	Germany
3. <i>Meta</i> -Phosphoric acid	Analytical	Panreac	E.U.
4. 1,2 Phenylenediamine dihydrochloride	Analytical	Fluka	Switzerland
5. Sodium acetate trihydrate	Analytical	Merck	Germany
6. Boric acid, crystalline	Analytical	Merck	Germany
7. Ascorbic acid standard	Analytical	Ajax Finechem	Australia
8. Acetic acid	Analytical	Merck	Germany
9. Charcoal activated decolourising PDR	Analytical	Ajax Finechem	Australia

Table 6. List of chemicals (Cont.)

List of chemical	Grade	Company	Country
10. DPPH (2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)	Analytical	Sigma	Germany
11. BHT (Butylhydroxytoluene)	Analytical	Fluka	Germany
12. Absolute ethanol	Analytical	Merck	Germany
13. ABTS [2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzo thiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt]	Analytical	Sigma	Germany
14. Potassium persulfate	Analytical	Fluka	Germany
15. TPTZ (2, 4, 6-tripyridyl-s-triazine)	Analytical	Fluka	Switzerland
16. Sodium acetate trihydrate	Analytical	Ajax Finechem	Australia
17. Iron (III) Chloride hexahydrate	Analytical	Ajax Finechem	Australia
18. Trolox (6-hydroxy-2, 5, 7, 8- tetramethylchroman-2-carboxylic acid)	Analytical	Sigma	Germany
19. Folin-Ciocalteu phenol reagent	Analytical	Merck	Germany
20. Gallic acid	Analytical	Sigma	Germany
21. Sodium carbonate anhydrous	Analytical	Ajax Finechem	Australia
22. Plate Count Agar	Analytical	Himedia	India
23. Potato Dextrose Agar	Analytical	Himedia	India
24. Potato Dextrose Broth	Analytical	Himedia	India
25. Acid Broth	Analytical	Himedia	India
26. Malt Extract Broth	Analytical	Himedia	India
27. Nutrient Agar	Analytical	Himedia	India
28. Brilliant-Green Lactose Bile Broth	Analytical	Himedia	India
29. Lauryl Sulphate Tryptose Broth	Analytical	Himedia	India
30. EC Broth	Analytical	Himedia	India
31. Eosin Methylene Blue Agar	Analytical	Himedia	India
32. Baird Parker Agar	Analytical	Himedia	India
33. Brain Heart Infusion Broth	Analytical	Himedia	India

อุปกรณ์ และเครื่องมือ

1. สำหรับการเตรียมกระเจี๊ยบแดงแห้งและการสกัดกระเจี๊ยบแดงสดและกระเจี๊ยบแดงแห้งด้วยน้ำ
 - 1.1 ตู้อบลมร้อนชนิดถาดหมุน (Rotary air dryer) ประเทศไทย
 - 1.2 เครื่องบด ยี่ห้อ National ประเทศญี่ปุ่น
 - 1.3 เครื่องสกัดน้ำผลไม้ ยี่ห้อ Moulinex ประเทศฝรั่งเศส
 - 1.4 เครื่องปิดผนึก ยี่ห้อ Brother ประเทศไทย
2. สำหรับการผลิตกระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น
 - 2.1 เครื่องทำให้เข้มข้นแบบใช้ไอน้ำในสภาวะสุญญากาศ ประเทศไทย
3. สำหรับกระบวนการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์
 - 3.1 เครื่อง Potentiometer และบันทึกอุณหภูมิ ยี่ห้อ Ellab ประเทศเดนมาร์ก
 - 3.2 สายเทอร์โมคัปเปิล จำนวน 6 สาย
 - 3.3 อุปกรณ์สำหรับประกอบ Stuffing box ต่อเข้ากับฝาขวดแก้วชนิดฝาเกลียวล็อก และหัวเข็มเสียบเทอร์โมคัปเปิล เบอร์ 401
 - 3.4 เครื่องฆ่าเชื้อแบบ Steam water spray automated batch ยี่ห้อ FMC Food Tech ประเทศเบลเยียม
4. สำหรับการวิเคราะห์ทางกายภาพ และทางเคมี
 - 4.1 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Ohaus รุ่น TP2KS ประเทศสหรัฐอเมริกา
 - 4.2 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น AB204 ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
 - 4.3 เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (Hand refractometer) ยี่ห้อ Atago รุ่น NI Brix 0~32% ประเทศญี่ปุ่น
 - 4.4 เครื่องวัดค่าสี ยี่ห้อ Hunter Lab รุ่น Color Quest XT ประเทศสหรัฐอเมริกา
 - 4.5 เครื่องวัดพีเอช ยี่ห้อ Sartorius รุ่น PB-20 ประเทศเยอรมัน
 - 4.6 เครื่อง Spectrofluorophotometer ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น RF-1501 ประเทศญี่ปุ่น สถานที่ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
5. สำหรับการวิเคราะห์สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ
 - 5.1 เครื่องทำแห้งแบบระเหิดแห้ง (Freeze dryer) ยี่ห้อ Eyela ประเทศญี่ปุ่น
 - 5.2 เครื่อง Microplate Reader ยี่ห้อ Power Wave X ประเทศสหรัฐอเมริกา
 - 5.3 เครื่อง UV-Visible Spectrophotometer ยี่ห้อ Thermo Spectronic รุ่น GENESYS 10 series ประเทศสหรัฐอเมริกา

5.4 เครื่องหมุนเหวี่ยง ยี่ห้อ Sorvall รุ่น RC-5B Plus ประเทศสหรัฐอเมริกา

5.5 ตู้อบสูญญากาศ ยี่ห้อ Eylea รุ่น VOS-300VD ประเทศญี่ปุ่น

6. สำหรับการวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์

6.1 ตู้บ่มปรับอุณหภูมิได้ ยี่ห้อ Memmert รุ่น BE 500 ประเทศเยอรมันนี

6.2 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ ยี่ห้อ SANYO รุ่น Labo Autoclave ประเทศญี่ปุ่น

7. สำหรับทดสอบคุณภาพทางด้านประสาทสัมผัส

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. ศึกษาผลของการทำแห้งต่อสมบัติทางกายภาพ เคมี และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของกระเจียบแดง ทำการเตรียมกระเจียบแดงสด โดยการล้างทำความสะอาดกระเจียบแดงสดด้วยน้ำ 3 ครั้ง แล้วแยกเมล็ดออก นำกลีบกระเจียบแดงสดที่แยกเมล็ดออกซึ่งน้ำหนักแล้วคำนวณผลได้ของกระเจียบแดงสด ดังนี้

$$\text{ผลได้ของกระเจียบแดงสด} = \frac{\text{น้ำหนักกระเจียบแดงสดหลังเอาเมล็ดออก}}{\text{น้ำหนักกระเจียบแดงสดก่อนเอาเมล็ดออก}} \times 100$$

ทำการอบแห้งกลีบกระเจียบแดงสดที่เตรียมได้ข้างต้นในตู้อบแห้งลมร้อนชนิด ถาดหมุน ที่อุณหภูมิ 50.0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง จนกระทั่งกระเจียบแดงแห้งมีปริมาณ ความชื้น เท่ากับ 10.0% ซึ่งนำน้ำหนักกระเจียบแดงแห้ง แล้วนำมาบรรจุในถุงไนลอน ปิดปากถุงให้สนิทด้วยเครื่องปิดผนึก เก็บไว้ในกล่องโฟม (EPS) ทำการคำนวณผลได้ของกระเจียบแดงแห้ง ดังนี้

$$\text{ผลได้ของกระเจียบแดงแห้ง} = \frac{\text{น้ำหนักกระเจียบแดงแห้งหลังการทำแห้ง}}{\text{น้ำหนักกระเจียบแดงสดก่อนการทำแห้ง}} \times 100$$

ทำการตรวจวิเคราะห์และเปรียบเทียบคุณภาพกระเจียบแดงสดและกระเจียบแดงแห้งที่ได้ทั้งทางกายภาพ เคมี และสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ โดยการสกัดกลีบกระเจียบแดงสดที่ หั่นเป็นชิ้นขนาดเล็ก แล้วแช่กระเจียบแดงสดด้วยน้ำ ในอัตราส่วนกระเจียบแดงสดต่อน้ำ เท่ากับ 1 ต่อ 2 ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด นาน 30 นาที จากนั้นจึงปั่นแยกน้ำกระเจียบแดงสดด้วยเครื่องปั่นน้ำผลไม้ แยกกาก Moulinex ได้เป็นน้ำกระเจียบแดงสด ส่วนกระเจียบแดงแห้งก็ผ่านการสกัด โดยการปั่นลด ขนาดกระเจียบแดงแห้งด้วยเครื่องปั่นแห้ง นาน 3 วินาที แล้วแช่กระเจียบแดงแห้งด้วยน้ำ ในอัตราส่วนกระเจียบแดงแห้งต่อน้ำ เท่ากับ 1 ต่อ 2 ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด นาน 30 นาที จากนั้นจึงปั่น แยกน้ำกระเจียบแดงแห้งด้วยเครื่องปั่นน้ำผลไม้แยกกาก Moulinex ได้เป็นน้ำกระเจียบแดงแห้ง

แล้วนำน้ำกระเจี๊ยบแดงสดและกระเจี๊ยบแดงแห้งที่ได้ไปวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ โดยการวัดค่าสี ตามข้อ 1.1 และวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี โดยการวัดค่าพีเอช ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดมาลิก ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในรูปไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ และปริมาณกรดแอสคอร์บิก ตามข้อ 1.2.1-1.2.5 ตามลำดับ และนำตัวอย่างน้ำกระเจี๊ยบแดงสดและกระเจี๊ยบแดงแห้งที่ได้ไปทำเป็นผงแห้ง ด้วยวิธีการทำแห้งแบบระเหิดแห้ง (Freeze dry) ที่อุณหภูมิ -40.0 องศาเซลเซียส ความดัน 0.002 เซนติเมตรปรอท เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ได้เป็นตัวอย่างสารสกัดกระเจี๊ยบแดงผงแห้งจากกระเจี๊ยบแดงสดและกระเจี๊ยบแดงแห้ง แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ตามข้อ 1.2.6 และสมบัติการจับอนุมูล DPPH สมบัติการจับอนุมูล ABTS และความสามารถในการรีดิวซ์เฟอรัลไอออน (FRAP) ตามข้อ 1.3.1-1.3.3 ตามลำดับ

1.1 การวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ

ทำการวัดค่าสีของน้ำกระเจี๊ยบแดงสดและกระเจี๊ยบแดงแห้ง ด้วยระบบ CIE $L^* a^* b^*$ โดยเครื่อง Hunter Lab Colorimeter ตามรายละเอียดในภาคผนวก ก-1 ข้อ 1

1.2 การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี

1.2.1 ค่าพีเอช (AOAC, 2000) ตามรายละเอียดในภาคผนวก ก-2 ข้อ 1

1.2.2 ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (AOAC, 2000) ตามรายละเอียดในภาคผนวก ก-2 ข้อ 2

1.2.3 ปริมาณกรดทั้งหมด (AOAC, 2000) ในรูปร้อยละของกรดมาลิก ตามรายละเอียดในภาคผนวก ก-2 ข้อ 3

1.2.4 ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (Wrolstad, 1976) ด้วยวิธี pH-differential method โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 และ 700 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer ในสารละลายบัฟเฟอร์ KCl-HCl (ค่าพีเอช 1.0) และ $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ -HCl (ค่าพีเอช 4.5) คำนวณปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในรูปไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ รายงานค่าในรูปมิลลิกรัมต่อลิตรตัวอย่าง ตามรายละเอียดในภาคผนวก ก-2 ข้อ 4

1.2.5 ปริมาณกรดแอสคอร์บิก โดยวิธี Microfluorometric Method (AOAC, 2000) อาศัยหลักการของการดูดกลืนและปลดปล่อยแสงฟลูออเรสเซนซ์ เมื่อได้รับการกระตุ้นจากแสงฟลูออเรสเซนซ์ ใช้ค่า Excitation wavelength เท่ากับ 350 นาโนเมตร และ Emission wavelength เท่ากับ 430 นาโนเมตร แล้วคำนวณปริมาณกรดแอสคอร์บิกของตัวอย่าง ในหน่วยมิลลิกรัมต่อกรัมจาก

กราฟมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก รายงานค่าในรูปแบบลิตรกรัมต่อกรัมตัวอย่าง ตามรายละเอียดในภาคผนวก ก-2 ข้อ 5

1.2.6 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Miliauskas *et al.*, 2004) ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu's reagent ที่ความเข้มข้นของ Folin-Ciocalteu's reagent เท่ากับ 0-8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยนำสารสกัดกระเจียบแดงผงแห้งมาเตรียมให้มีความเข้มข้นที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader โดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารละลายมาตรฐาน รายงานค่าในรูปแบบลิตรกรัมต่อกรัมของกรดแกลลิกต่อกรัมตัวอย่าง ตามรายละเอียดในภาคผนวก ก-2 ข้อ 6

1.3 การวิเคราะห์สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ

1.3.1 สมบัติการจับอนุมูล DPPH (DPPH radical scavenging activity; Yamasaki *et al.*, 1994) โดยนำสารสกัดกระเจียบแดงผงแห้งมาเตรียมให้มีความเข้มข้นที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 200, 100, 50, 10 และ 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เติมสารละลาย DPPH ที่มีความเข้มข้น 6×10^{-5} โมลาร์ ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader โดยใช้ BHT เป็นสารละลายมาตรฐาน รายงานค่าที่วัดได้ในรูปค่า EC_{50} ซึ่งหมายถึง ความเข้มข้นของสารสกัดกระเจียบแดงที่ไปลดปริมาณอนุมูล DPPH ลง 50% รายงานค่าในรูปแบบไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามรายละเอียดในภาคผนวก ก-2 ข้อ 7

1.3.2 สมบัติการจับอนุมูล ABTS (ABTS radical scavenging activity; Re *et al.*, 1999) โดยนำสารสกัดกระเจียบแดงผงแห้งมาเตรียมให้มีความเข้มข้นที่ระดับความเข้มข้น 8,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วปีเปิดตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร เติมสารละลายของ ABTS 2 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 6 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer คำนวณสมบัติการจับอนุมูล ABTS เปรียบเทียบค่าที่ได้กับกราฟมาตรฐานโทรลอคซ์ รายงานค่าในรูปแบบ TEAC (Trolox equivalents antioxidant capacity; ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างเมื่อเทียบเคียงกับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของโทรลอคซ์) ในหน่วยไมโครโมลสมมูลของโทรลอคซ์ต่อกรัมตัวอย่าง ตามรายละเอียดในภาคผนวก ก-2 ข้อ 8

1.3.3 ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกไอออน (Ferric reducing antioxidant power, FRAP; Benzie and Strain, 1996) อาศัยหลักการของการรีดิวซ์เฟอร์ริกไอออนให้อยู่ในรูปแบบเฟอร์รัสไอออน โดยนำสารสกัดกระเจียบแดงผงแห้ง มาเตรียมให้มีความเข้มข้นที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วปีเปิดตัวอย่าง 60 ไมโครลิตร น้ำกลั่น 180 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย FRAP reagent 1,800 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้ววัดค่าการ

ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer คำนวณความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกไอออน (FRAP) เปรียบเทียบค่าที่ได้กับกราฟมาตรฐานของโทรลอคซ์ รายงานค่าในรูปแบบ TEAC ในหน่วยไมโครโมลสมมูลย์ของโทรลอคซ์ต่อกรัมตัวอย่าง ตามรายละเอียดในภาคผนวก ก-2 ข้อ 9

นำผลการตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ เคมี และสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของกระเจี๊ยบแดงสดและกระเจี๊ยบแดงแห้ง มาเปรียบเทียบผลของการทำแห้งที่มีต่อคุณภาพของกระเจี๊ยบแดงสดและกระเจี๊ยบแดงแห้ง โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) ทำการทดลอง 2 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ T-test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ด้วย SPSS for Window Version 11.0

2. ศึกษาผลของกระบวนการแปรรูปต่อสมบัติทางกายภาพ เคมี และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงแห้งและผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น

2.1 ผลของการสกัดและการทำให้เข้มข้นต่อสมบัติทางกายภาพ เคมี และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงแห้งและสารสกัดกระเจี๊ยบแดงเข้มข้น

ทำการสกัดกระเจี๊ยบแดงแห้ง โดยการบดกระเจี๊ยบแดงแห้งด้วยเครื่องปั่นแห้งเป็นเวลา 3 วินาที แล้วนำมาสกัดด้วยน้ำในอัตราส่วนกระเจี๊ยบแดงแห้งต่อน้ำ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เท่ากับ 1 ต่อ 10 ใส่ในถังสแตนเลส ขนาดความจุ 50 ลิตร แล้วทำการสกัด ที่อุณหภูมิ 50.0 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที โดยให้ความร้อนด้วยเครื่องทำความร้อนแบบแห้งที่มีเทอร์โมคัปเปิลเป็นตัววัดอุณหภูมิ จึงกรองด้วยผ้ากรอง แล้วตรวจวิเคราะห์คุณภาพสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงแห้งทั้งทางกายภาพ เคมี และสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ โดยนำสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงแห้งไปวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ ตามข้อ 1.1 และวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี ตามข้อ 1.2.1-1.2.5 ตามลำดับ และนำสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงแห้งที่ได้ไปทำแห้งด้วยวิธีการทำแห้งแบบระเหิดแห้งเช่นเดียวกับการทำแห้งน้ำกระเจี๊ยบแดงสดและน้ำกระเจี๊ยบแดงแห้ง ได้เป็นตัวอย่างสารสกัดกระเจี๊ยบแดงผงแห้งจากสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงแห้ง เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ตามข้อ 1.2.6 และสมบัติการจับอนุมูล DPPH สมบัติการจับอนุมูล ABTS และความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกไอออน (FRAP) ตามข้อ 1.3.1-1.3.3 ตามลำดับ

นำสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงแห้งที่ได้มาทำให้เข้มข้น โดยใช้เครื่องทำให้เข้มข้นแบบใช้ไอน้ำในสถานะสูญญากาศ ที่อุณหภูมิ 70.0 องศาเซลเซียส ความดัน 44.0 เซนติเมตรปรอท จนกระทั่งสารสกัดกระเจี๊ยบแดงเข้มข้นมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด เท่ากับ 25.0 องศาบริกซ์ แล้วตรวจวิเคราะห์คุณภาพสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงเข้มข้น ทั้งทางกายภาพ เคมี และ

สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ โดยนำสารสกัดกระเจี๊ยบแดงเข้มข้นไปวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพตามข้อ 1.1 และวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี ตามข้อ 1.2.1-1.2.5 ตามลำดับ และนำสารสกัดกระเจี๊ยบแดงเข้มข้นที่ได้ไปทำแห้งด้วยวิธีการทำแห้งแบบระเหิดแห้งเช่นเดียวกับการทำแห้งน้ำกระเจี๊ยบแดงสดและน้ำกระเจี๊ยบแดงแห้ง ได้เป็นตัวอย่างสารสกัดกระเจี๊ยบแดงผงแห้งจากสารสกัดกระเจี๊ยบแดงเข้มข้น เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ตามข้อ 1.2.6 และสมบัติการจับอนุมูล DPPH สมบัติการจับอนุมูล ABTS และความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกไอออน (FRAP) ตามข้อ 1.3.1-1.3.3 ตามลำดับ

นำผลการตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ เคมี และสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงแห้งที่ผ่านการสกัดด้วยน้ำ และสารสกัดกระเจี๊ยบแดงเข้มข้นที่ผ่านการทำให้เข้มข้นโดยใช้เครื่องทำให้เข้มข้นแบบใช้ไอน้ำในสถานะสูญญากาศ มาเปรียบเทียบกับผลการสกัดและการทำให้เข้มข้นที่มีต่อคุณภาพของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงแห้ง โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD) ทำการทดลอง 2 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ T-test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ด้วย SPSS for Window Version 11.0

2.2 ศึกษาผลของกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ต่อสมบัติทางกายภาพ เคมี และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น

ทำการเตรียมผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น โดยการนำสารสกัดกระเจี๊ยบแดงเข้มข้นที่เตรียมในข้อ 2.1 มาปรับร้อยละของปริมาณของแข็งทั้งหมดจากเดิมเท่ากับ 26.79 ± 0.04 ปรับให้เท่ากับร้อยละของปริมาณของแข็งทั้งหมดของน้ำคั้นจากกระเจี๊ยบแดงสด ซึ่งเท่ากับ 7.44 ± 0.07 แล้วนำมาเติมส่วนผสมต่างๆ ซึ่งประกอบด้วยสารสกัดกระเจี๊ยบแดง 50.0% ฟรุคโทส 31.98% น้ำผึ้ง 10.0% โอลิโกฟรุคโทส 8.0% วิตามินเอ 0.0035% และวิตามินอี 0.0013% แล้วให้ความร้อนแก่ผลิตภัณฑ์ด้วยวิธีการต้ม โดยมีการกวนผสมส่วนผสมต่างๆตลอดระยะเวลาผสมและต้ม โดยเริ่มจากการเติมสารสกัดกระเจี๊ยบแดงลงในหม้อผสม จากนั้นจึงละลายฟรุคโทสลงไป ตามด้วยการละลายน้ำผึ้ง และ โอลิโกฟรุคโทส กวนผสมให้เข้ากัน แล้วให้ความร้อนแก่ผลิตภัณฑ์จนได้อุณหภูมิ เท่ากับ 85.0 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงละลายวิตามินเอและวิตามินอีด้วยสารสกัดกระเจี๊ยบแดงเช่นกัน แล้วจึงเติมลงในหม้อผสมทั้งหมด นำส่วนผสมมาบรรจุที่อุณหภูมิ 85.0 องศาเซลเซียส ลงขวดแก้วฝาเกลียวล็อก ขนาดความจุ 80 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วยการลวกขวดในน้ำต้มเดือด บรรจุผลิตภัณฑ์ปริมาตร 70 มิลลิลิตร จึงปิดฝาให้สนิททันที ซึ่งเป็นวิธีการหนึ่งในการไล่อากาศ (ออกซิเจน) บริเวณช่องว่างเหนืออาหารของผลิตภัณฑ์ แล้วตรวจวิเคราะห์คุณภาพผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นก่อนกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ โดยนำไปวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ ตามข้อ 1.1 และวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี ตามข้อ 1.2.1-1.2.5 ตามลำดับ และนำผลิตภัณฑ์

กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นก่อนกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ที่ได้ไปทำแห้งด้วยวิธีการทำแห้งแบบระเหิดแห้งเช่นเดียวกับการทำแห้งน้ำกระเจี๊ยบแดงสดและ น้ำกระเจี๊ยบแดงแห้ง ได้เป็นตัวอย่างสารสกัดกระเจี๊ยบแดงผงแห้งจากผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นก่อนกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ตามข้อ 1.2.6 และสมบัติการจับอนุมูล DPPH สมบัติการจับอนุมูล ABTS และความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริกไอออน (FRAP) ตามข้อ 1.3.1-1.3.3 ตามลำดับ

ทำการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นแบบพาสเจอร์ไรซ์ ด้วยเครื่องฆ่าเชื้อ Steam water spray automated batch โดยใช้อุณหภูมิของเครื่องฆ่าเชื้อในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ เท่ากับ 101.0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทำให้ผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นมีอุณหภูมิ ณ จุดร้อนช้าที่สุด (ตามรายละเอียดในภาคผนวกข้อ ง) เท่ากับ 85.0 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วทำให้เย็นจนกระทั่งอุณหภูมิของเครื่องฆ่าเชื้อมีอุณหภูมิประมาณ 40.0 องศาเซลเซียส และตรวจวิเคราะห์คุณภาพผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นหลังกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ โดยการตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์ โดยการตรวจ Aciduric flat sour types (USFDA, 2001a) ตรวจจุลินทรีย์ที่เป็นดัชนีบ่งชี้ความปลอดภัย และการสุขาภิบาลอาหาร โดยการตรวจ Coliform bacteria (USFDA, 2002) และ *Staphylococcus aureus* (USFDA, 2001b) และตรวจจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสีย โดยการตรวจปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด โดยวิธี Standard plate count ด้วยการ Pour plate (USFDA, 2001c) และปริมาณยีสต์และรา โดยการ Spread plate (USFDA, 2001d) ตามรายละเอียดในภาคผนวก ก-3 ข้อ 1-5 ตามลำดับ, การตรวจคุณค่าทางอาหาร โดยการส่งตรวจวิเคราะห์ที่สถานวิจัยโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล ต. ศาลายา อ. พุทธมณฑล จ. นครปฐม, การตรวจปริมาณโลหะหนัก โดยการตรวจหาปริมาณตะกั่ว เหล็ก และดีบุก (AOAC, 2000) ด้วยวิธี Inductively Coupled Plasma: Mass Spectrometry (ICP-MS) โดยการส่งตรวจวิเคราะห์ที่บริษัท ห้องปฏิบัติการกลางตรวจสอบผลิตภัณฑ์เกษตรและอาหาร จำกัด ต. กอหงส์ อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา, ทำการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส ด้วยวิธีการให้คะแนนความชอบแบบ 9 ระดับคะแนนความชอบ (9-Point hedonic scales) ใช้ผู้ทดสอบชิมที่ผ่านการทดสอบชิมผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นมาแล้ว จำนวน 12 คน โดยการพิจารณาคูณลักษณะด้านสี ความหวาน ความเปรี้ยว ความรู้สึกรูสในปาก และการยอมรับโดยรวมของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น เปรียบเทียบกับคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ทางการค้าเบอร์สกัดเข้มข้น ตามรายละเอียดแบบการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสในภาคผนวก ข แล้วทำการตรวจวิเคราะห์และเปรียบเทียบคุณภาพผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นก่อนและหลังกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ทั้งทางกายภาพ เคมี และสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ โดยนำผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นหลัง

กระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ไปวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ ตามข้อ 1.1 และวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี ตามข้อ 1.2.1-1.2.5 ตามลำดับ และนำผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นหลังกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ที่ได้ไปทำแห้งด้วยวิธีการทำแห้งแบบระเหิดแห้งเช่นเดียวกับการทำแห้งน้ำกระเจี๊ยบแดงสดและน้ำกระเจี๊ยบแดงแห้ง ได้เป็นตัวอย่างสารสกัดกระเจี๊ยบแดงผงแห้งจากผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นหลังกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด เช่นเดียวกับข้อ 1.2.6 และสมบัติการจับอนุมูล DPPH สมบัติการจับอนุมูล ABTS และความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกไอออน (FRAP) ตามข้อ 1.3.1-1.3.3 ตามลำดับ

นำผลการตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ เคมี และสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นก่อนและหลังกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ มาเปรียบเทียบผลของกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ที่มีต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD) ทำการทดลอง 2 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ T-test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ด้วย SPSS for Window Version 11.0

3. ศึกษาผลของสภาวะการเก็บรักษาต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น

3.1 ผลของสภาวะการเก็บรักษาต่อคุณภาพทางกายภาพ เคมี และสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น

ทำการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นในสภาวะที่มีแสงสว่าง ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ กำลังไฟฟ้า 18 วัตต์ ระยะห่างระหว่างผลิตภัณฑ์กับหลอดไฟ เท่ากับ 30 เซนติเมตร เปรียบเทียบกับการเก็บรักษาในสภาวะที่ไม่มีแสงสว่าง โดยบรรจุในกล่องกระดาษเทา Duplex board ขนาด 5.5 x 5.5 x 7.5 เซนติเมตร (กว้าง x ยาว x สูง) ความหนา 0.37 เซนติเมตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 27.0 ± 1.0 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 เดือน แล้วทำการตรวจวิเคราะห์และเปรียบเทียบคุณภาพผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น เมื่อเก็บรักษาในสภาวะที่มีและไม่มีแสงสว่าง ที่อุณหภูมิ 27.0 ± 1.0 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 เดือน ทั้งทางกายภาพ เคมี และสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ โดยการนำผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นไปวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ ตามข้อ 1.1 และวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี ตามข้อ 1.2.1-1.2.5 ตามลำดับ และนำผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นที่ได้ไปทำแห้งด้วยวิธีการทำแห้งแบบระเหิดแห้งเช่นเดียวกับการทำแห้งน้ำกระเจี๊ยบแดงสดและน้ำกระเจี๊ยบแดงแห้ง ได้เป็นตัวอย่างสารสกัดกระเจี๊ยบแดงผงแห้งจากผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณ

สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด เช่นเดียวกับข้อ 1.2.6 และสมบัติการจับอนุมูล DPPH สมบัติการจับอนุมูล ABTS และความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกไอออน (FRAP) ตามข้อ 1.3.1-1.3.3 ตามลำดับ

นำผลการตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ เคมี และสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น มาเปรียบเทียบกับผลของสภาวะการเก็บรักษาที่มีต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น โดยการวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD) ทำการทดลอง 2 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ด้วย SPSS for Window Version 11.0

3.2 ผลของสภาวะการเก็บรักษาต่อคุณภาพทางจุลินทรีย์ และทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น

ทำการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น ในสภาวะที่ไม่มีแสงสว่าง โดยบรรจุในกล่องกระดาษขาวเทา Duplex board ที่อุณหภูมิ 4.0 ± 1.0 และ 27.0 ± 1.0 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 เดือน แล้วทำการวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์และประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส โดยการตรวจปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดโดยวิธี Standard plate count ด้วยการ Pour plate (USFDA, 2001c) และปริมาณยีสต์และรา โดยการ Spread plate (USFDA, 2001d) ตามรายละเอียดในภาคผนวก ก-3 ข้อ 4 และ 5 ตามลำดับ และประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส ด้วยวิธีการให้คะแนนความชอบแบบ 9 ระดับคะแนนความชอบ ใช้ผู้ทดสอบชิมที่ผ่านการทดสอบชิมผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นมาแล้ว จำนวน 12 คน โดยการพิจารณาคูณลักษณะด้านสี ความหวาน ความเปรี้ยว ความรู้สึกภายในปาก และการยอมรับ โดยรวมของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น เปรียบเทียบกับคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ทางการค้าเบอร์สกัดเข้มข้น (ตามรายละเอียดในภาคผนวก ข) โดยการวางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design, RCBD) พิจารณาคูณลักษณะด้านสี ความหวาน ความเปรี้ยว ความรู้สึกภายในปาก และการยอมรับ โดยรวมของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT ด้วย SPSS for Window Version 11.0

บทที่ 3

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ผลของการทำแห้งต่อสมบัติทางกายภาพ เคมี และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของกระเจี๊ยบแดง

1.1 ผลได้ของกระเจี๊ยบแดงสด และกระเจี๊ยบแดงแห้ง

จากการนำดอกกระเจี๊ยบแดงสดมาล้างและแยกเมล็ดออก แล้วนำกลีบกระเจี๊ยบแดงไปอบแห้ง ที่อุณหภูมิ 50.0 องศาเซลเซียส พบว่า ผลได้ของกระเจี๊ยบแดงสดและกระเจี๊ยบแดงแห้ง เท่ากับ $50.07 \pm 0.37\%$ และ $10.98 \pm 0.41\%$ ตามลำดับ ดังแสดงใน Table 7 ซึ่งใกล้เคียงกับผลได้ของกระเจี๊ยบแดงสดและกระเจี๊ยบแดงแห้งที่รายงานโดยปารมี ชุมศรี (2550) ที่มีค่าเท่ากับ $47.45 \pm 0.71\%$ และ $9.58 \pm 0.77\%$ ตามลำดับ

Table 7. %Yields of fresh^b and dried roselle calyces^c

Fresh and dried roselle calyces	% Yields ^a
Fresh ^b	50.07 ± 0.37
Dried ^c	10.98 ± 0.41

^aDetermination was done in triplicate

^bYields, % = Means weight of fresh roselle calyces after remove the seeds / Weight of fresh roselle fruits) x 100

^cYields, % = Weight of dried roselle calyces after drying in a rotary air dryer / Means weight of fresh roselle calyces before drying) x 100

1.2 สมบัติทางกายภาพ เคมี และสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของน้ำกระเจี๊ยบแดงสดและน้ำกระเจี๊ยบแดงแห้ง

เมื่อนำน้ำกระเจี๊ยบแดงที่สกัดจากกระเจี๊ยบแดงสดและกระเจี๊ยบแดงแห้งมาวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพโดยการวัดค่าสี ด้วยระบบ CIE ซึ่งรายงานเป็นค่า $L^* a^* b^*$ โดยที่ค่า L^* คือ ค่าความสว่างของตัวอย่าง มีค่าจาก 0 คือ สีดำ ถึง 100 คือ สีขาว ค่า a^* คือ ค่าที่บ่งบอกความเป็นสีแดง และความเป็นสีเขียวของตัวอย่าง โดยค่า $+a^*$ แสดงความเป็นสีแดง ค่า $-a^*$ แสดงความเป็นสีเขียว และค่า b^* คือ ค่าที่บ่งบอกความเป็นสีเหลือง และความเป็นสีน้ำเงินของตัวอย่าง เมื่อค่า $+b^*$ แสดงความเป็นสีเหลือง ค่า $-b^*$ แสดงความเป็นสีน้ำเงิน (Yukseil and Koca, 2008) พบว่า น้ำกระเจี๊ยบแดงสด มีค่าสี $L^* a^*$ และ b^* เท่ากับ 11.65 ± 0.87 , 5.40 ± 0.56 และ 0.84 ± 0.45 ตามลำดับ

ขณะที่น้ำกระเจี๊ยบแดงแห้ง มีค่าสี L^* a^* และ b^* เท่ากับ 3.83 ± 0.80 , 6.29 ± 0.52 และ 0.54 ± 0.27 ตามลำดับ ดังแสดงใน Table 8 น้ำกระเจี๊ยบแดงแห้ง มีค่าความเป็นสีแดง (a^*) สูงกว่าน้ำกระเจี๊ยบแดงสดอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อนำน้ำกระเจี๊ยบแดงมาวิเคราะห์สมบัติทางเคมี และสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ พบว่า น้ำกระเจี๊ยบแดงสด มีค่าพีเอช และปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด เท่ากับ 2.44 ± 0.02 และ 1.30 ± 0.11 องศาบริกซ์ ตามลำดับ ขณะที่น้ำกระเจี๊ยบแดงแห้ง มีค่าพีเอช และปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด เท่ากับ 2.42 ± 0.01 และ 7.93 ± 0.10 องศาบริกซ์ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า น้ำกระเจี๊ยบแดงสด มีปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดมาลิก เท่ากับ $0.78 \pm 0.03\%$ มีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในรูปไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณกรดแอสคอร์บิก เท่ากับ 842.63 ± 14.66 มิลลิกรัมต่อลิตรน้ำกระเจี๊ยบแดงสด, 39.69 ± 0.49 มิลลิกรัมสมมูลย์กรดแกลลิกต่อกรัมกระเจี๊ยบแดงสด และ 2.89 ± 0.11 มิลลิกรัมต่อกรัมกระเจี๊ยบแดงสด ตามลำดับ ขณะที่น้ำกระเจี๊ยบแดงแห้ง มีปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดมาลิก ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในรูปไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณกรดแอสคอร์บิก เท่ากับ $2.98 \pm 0.05\%$, 727.91 ± 5.14 มิลลิกรัมต่อลิตรน้ำกระเจี๊ยบแดงแห้ง, 38.12 ± 0.89 มิลลิกรัมสมมูลย์กรดแกลลิกต่อกรัมกระเจี๊ยบแดงแห้ง และ 1.13 ± 0.22 มิลลิกรัมต่อกรัมกระเจี๊ยบแดงแห้ง ตามลำดับ จากการทดลองนี้เมื่อพิจารณาปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในรูปไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณกรดแอสคอร์บิกของน้ำกระเจี๊ยบแดงสด และน้ำกระเจี๊ยบแดงแห้ง พบว่าน้ำกระเจี๊ยบแดงสดมีปริมาณสารดังกล่าวสูงกว่าน้ำกระเจี๊ยบแดงแห้งอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ทั้งนี้ Laleh และคณะ (2006) รายงานว่า เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นการสลายตัวของแอนโทไซยานินจะเพิ่มมากขึ้นเนื่องจากความร้อนจะทำให้แอนโทไซยานินเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและเกิดการสลายตัว ซึ่ง Fasoyiro และคณะ (2005) ได้ศึกษาคุณภาพทางเคมีของน้ำกระเจี๊ยบแดงสด โดยใช้อัตราส่วนของกระเจี๊ยบแดงสดต่อน้ำ เท่ากับ 1 ต่อ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) นำมาสกัดที่อุณหภูมิ 100.0 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากผลการทดลองพบว่า น้ำกระเจี๊ยบแดงสด มีค่าพีเอช เท่ากับ 3.10 ± 0.14 ปริมาณกรดทั้งหมด เท่ากับ $2.40 \pm 0.38\%$ ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด เท่ากับ 3.20 ± 0.63 องศาบริกซ์ และปริมาณกรดแอสคอร์บิก เท่ากับ 31.33 กรัมต่อ 100 กรัม เช่นเดียวกับ Fullerton และคณะ (2008) ได้รายงานไว้ว่า กระเจี๊ยบแดงสดและกระเจี๊ยบแดงแห้ง มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 433.70 ± 1.40 และ 408.20 ± 1.30 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อ 100 กรัม ตามลำดับ และมีสมบัติการต้านอนุมูลอิสระทั้งหมด เท่ากับ 293.40 ± 2.20 และ 256.80 ± 1.00 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมสมมูลย์วิตามินซี ตามลำดับ นอกจากนี้ Adanlawo และ Ajibade (2006) ยังรายงานไว้ว่า กระเจี๊ยบแดงแห้ง มีปริมาณกรดแอสคอร์บิก เท่ากับ 16.67 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม

กระเจี๊ยบแดงแห้ง จากงานวิจัยนี้จะเห็นได้ว่า กระเจี๊ยบแดงแห้งที่ผ่านการอบแห้งในตู้อบแห้งลมร้อนชนิดถาดหมุน ที่อุณหภูมิ 50.0 องศาเซลเซียส นาน 36 ชั่วโมง พบว่า กระเจี๊ยบแดงแห้งยังคงมีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในรูปแบบไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในปริมาณก่อนข้างสูง เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในรูปแบบไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเริ่มต้น กระเจี๊ยบแดงแห้งจึงยังคงมีศักยภาพสูงในการนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อาหารต่อไป

Table 8. Physical and chemical properties of fresh and dried roselle juice (dry weight basis)

Physical and chemical properties	Fresh roselle juice	Dried roselle juice
<i>L</i> *	11.65±0.87 ^a	3.83±0.80 ^b
<i>a</i> *	5.40±0.56 ^b	6.29±0.52 ^a
<i>b</i> *	0.84±0.45 ^a	0.54±0.27 ^a
pH	2.44±0.02 ^a	2.42±0.01 ^b
Total soluble solids (°Brix)	1.30±0.11 ^b	7.93±0.10 ^a
Total acidity, as malic acid (%)	0.78±0.03 ^b	2.98±0.05 ^a
Total anthocyanin content (mg/l roselle extract)	842.63±14.66 ^a	727.91±5.14 ^b
Total phenolic content (mg GAE/g roselle calyxes)	39.69±0.49 ^a	38.12±0.89 ^b
Ascorbic acid (mg/g roselle calyxes)	2.89±0.11 ^a	1.13±0.22 ^b

Means±standard deviation within the same row with different letters are significantly different ($p < 0.05$)

GAE, Gallic acid equivalents

Total phenolic contents, expressed as milligrams of gallic acid equivalents per gram of roselle calyxes using gallic acid standard curve (based on dry weight basis)

Total anthocyanin contents expressed as cyanidin 3-glucoside milligrams per liter of roselle extract

เมื่อวิเคราะห์สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธีการวิเคราะห์สมบัติการจับอนุมูล DPPH สมบัติการจับอนุมูล ABTS รวมทั้งการวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกไอออน (FRAP) โดยสมบัติการจับอนุมูล DPPH รายงานค่าในรูปแบบ EC_{50} ซึ่งหมายถึง ความเข้มข้นของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงที่ไปลดปริมาณอนุมูล DPPH ลง 50% (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ค่า EC_{50} แสดงค่าที่มีความสัมพันธ์กันแปรแบบผกผันกับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ และสำหรับการวิเคราะห์สมบัติการจับอนุมูล ABTS และความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกไอออน (FRAP)

จะรายงานค่าในรูป Trolox equivalents antioxidant capacity (TEAC) ซึ่งหมายถึง ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่าง เมื่อเทียบเคียงกับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของ Trolox ซึ่งค่า TEAC จะแสดงความสัมพันธ์โดยตรงกับสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ

การเปลี่ยนแปลงสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของน้ำกระเจี๊ยบแดงสด และน้ำกระเจี๊ยบแดงแห้ง ด้วยวิธีการวิเคราะห์สมบัติการจับอนุมูล DPPH สมบัติการจับอนุมูล ABTS และความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกไอออน (FRAP) ดังแสดงใน Table 9 เมื่อวิเคราะห์สมบัติการจับอนุมูล DPPH รายงานค่าในรูปค่า EC_{50} พบว่า สมบัติการจับอนุมูล DPPH ของน้ำกระเจี๊ยบแดงสด และน้ำกระเจี๊ยบแดงแห้ง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \geq 0.05$) น้ำกระเจี๊ยบแดงสด และน้ำกระเจี๊ยบแดงแห้ง มีค่า EC_{50} เท่ากับ 37.20 ± 3.07 และ 37.48 ± 1.98 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์สมบัติการจับอนุมูล ABTS รายงานค่าในรูปไมโครโมลสมมูลย์ของ Trolox ต่อกรัมกระเจี๊ยบแดง พบว่า น้ำกระเจี๊ยบแดงแห้ง มีสมบัติการจับอนุมูล ABTS สูงกว่าน้ำกระเจี๊ยบแดงสดอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยมีสมบัติการจับอนุมูล ABTS ที่มีค่า TEAC เท่ากับ 187.63 ± 1.32 และ 154.55 ± 1.73 ไมโครโมลสมมูลย์ของ Trolox ต่อกรัมกระเจี๊ยบแดง ตามลำดับ ขณะที่ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกไอออน (FRAP) ของน้ำกระเจี๊ยบแดงสด และน้ำกระเจี๊ยบแดงแห้ง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \geq 0.05$) โดยมีค่า TEAC เท่ากับ 425.21 ± 8.97 และ 427.03 ± 3.80 ไมโครโมลสมมูลย์ของ Trolox ต่อกรัมกระเจี๊ยบแดง ตามลำดับ ซึ่ง Hirunpanich และคณะ (2006) รายงานว่า กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงจะไม่ขึ้นอยู่กับปริมาณแอนโทไซยานินและสารประกอบฟีนอลิกเพียงเท่านั้น แต่ยังมีสารสำคัญชนิดอื่นๆ ที่มีสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้เช่นเดียวกัน ได้แก่ เกลอร์เซทิน และกรดแอสคอร์บิก เป็นต้น สอดคล้องกับ อรุณพร อีฐรัตน์ และคณะ (2548) ที่รายงานว่า สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงแห้งที่ได้จากการสกัดกระเจี๊ยบแดงแห้งด้วยน้ำ ในอัตราส่วนระหว่างกระเจี๊ยบแดงแห้งต่อน้ำ เท่ากับ 1 ต่อ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 60.0 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วทำให้เข้มข้นโดยเครื่องทำให้เข้มข้นแบบใช้ไอน้ำในสภาวะสุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 70.0 องศาเซลเซียส ความดัน 44.0 เซนติเมตรปรอท จนกระทั่งสารสกัดกระเจี๊ยบแดงเข้มข้นมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด เท่ากับ 40.0 องศาบริกซ์ แล้วทำแห้งด้วยวิธีการทำแห้งแบบสุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 70.0 องศาเซลเซียส ความดัน 25.0 เซนติเมตรปรอท มีสมบัติการจับอนุมูล DPPH ที่มีค่า EC_{50} เท่ากับ 15.10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ Wong และคณะ (2002) ยังรายงานว่า ในกระเจี๊ยบแดง 100 กรัม มีปริมาณกรดแอสคอร์บิก เท่ากับ 141.09 มิลลิกรัม ซึ่ง นิธิชา รัตนปนนท์ (2549) รายงานว่า วิตามินซีหรือกรดแอสคอร์บิก มีสมบัติในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน โดยกรดแอสคอร์บิกเป็นสารรีดิวซ์เชิงเอเจนต์อย่างรุนแรง (Strong reducing agent) มีความคงตัวต่ำ และ

สามารถสลายตัวได้ง่ายเมื่อโดนแสงสว่าง อากาศ และความร้อน เมื่อกรดแอสคอร์บิกอยู่ในรูป L-ascorbic acid จะมีคุณค่าทางชีวภาพ แต่เมื่อ L-ascorbic acid ถูกออกซิไดซ์จะเปลี่ยนเป็น dehydro-L-ascorbic acid ปฏิกิริยานี้สามารถเปลี่ยนกลับ ไปมาได้ แต่หาก dehydro-L-ascorbic acid ถูกออกซิไดซ์ต่อไปเป็น diketo-L-gulonic acid จะไม่มีคุณค่าทางชีวภาพ ซึ่งจะส่งผลต่อการเป็น สารต้านออกซิเดชันลดลงได้เช่นกัน นอกจากนี้ Larrauri และคณะ (1997 อ้างโดย เพียงใจ คาร์เฝ้า, 2550) ได้รายงานว่าการลดลงของสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดอาจเกิดจากความร้อนที่ทำให้ สารประกอบโพลีฟีนอลเกิดการสลายตัว (Thermal degradation) ซึ่งเป็นกลไกหลักที่ทำให้ สารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดเกิดการเปลี่ยนแปลง และเนื่องจากสารดังกล่าวไม่คงตัวต่อความร้อน จึงทำให้สมบัติการต้านอนุมูลอิสระลดลงเช่นกัน ซึ่งเห็นได้จากเมื่ออบแห้งเปลือกองุ่นที่ อุณหภูมิ 60.0, 100.0 และ 140.0 องศาเซลเซียส นาน 9 ชั่วโมง มีปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอล ทั้งหมด เท่ากับ 4.1%, 3.5% และ 2.9% ตามลำดับ และมีสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ เท่ากับ 70.0%, 50.0% และ 38.0% ตามลำดับ

Table 9. Changes in antioxidant properties (by DPPH, ABTS and FRAP assay) of fresh and dried roselle calyxes

Sample	DPPH, EC ₅₀ (µg/ml)	TEAC (µmol TE/g)	
		ABTS	FRAP
Fresh roselle calyxes	37.20±3.07 ^a	154.55±1.73 ^b	425.21±8.97 ^a
Dried roselle calyxes	37.48±1.98 ^a	187.63±1.32 ^a	427.03±3.80 ^a

Mean±standard deviation within the same column with different letters are significantly different ($p<0.05$)

DPPH and ABTS radical scavenging activity; FRAP, Ferric reducing antioxidant power

DPPH assay, expressed as EC₅₀ and BHT as positive standard

EC₅₀, Efficient concentration, the amount of fresh roselle extract (µg) needed for 50% decreasing in the initial DPPH concentration per 1.0 ml of initial solution

The EC₅₀ of BHT standard = 13.82±0.38 µg/ml

ABTS and FRAP assays, expressed as millimoles Trolox equivalents per gram extract using Trolox standard curve

TEAC, Trolox equivalents antioxidant capacity

TE, Trolox equivalents, millimolar of Trolox solution having an antioxidant capacity equivalent to 1.0 gram of the substance under investigation

2. ผลของกระบวนการแปรรูปต่อสมบัติทางกายภาพ เคมี และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงแห้งและผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น

2.1 ผลของการทำให้เข้มข้นต่อคุณภาพทางกายภาพ เคมี และสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงแห้ง

สมบัติทางกายภาพและเคมีของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงแห้งและสารสกัดกระเจี๊ยบแดงเข้มข้น ดังแสดงใน Table 10 จากการทดลองพบว่า สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงแห้งและสารสกัดกระเจี๊ยบแดงเข้มข้น มีค่าสี L^* a^* และ b^* ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \geq 0.05$) ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะสีของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงแห้ง และสารสกัดกระเจี๊ยบแดงเข้มข้นมีลักษณะปรากฏเป็นสีแดงเข้มจนถึงสีแดงดำ ซึ่งค่าความสว่างของตัวอย่าง (L^*) ค่าความเป็นสีแดง (a^*) และค่าความเป็นสีเหลือง (b^*) ที่วัดได้มีค่าเข้าใกล้ศูนย์

เมื่อวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงแห้ง และสารสกัดกระเจี๊ยบแดงเข้มข้น พบว่า สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงแห้งมีค่าพีเอชสูงกว่าสารสกัดกระเจี๊ยบแดงเข้มข้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) มีค่าพีเอชโดยเฉลี่ย เท่ากับ 2.75 ± 0.03 และ 2.69 ± 0.02 ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากสารสกัดกระเจี๊ยบแดงเข้มข้น มีการระเหยน้ำบางส่วนออกไปในขั้นตอนของการทำให้เข้มข้น และเมื่อพิจารณาปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในรูปไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ พบว่า สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงแห้ง มีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในรูปไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ สูงกว่าสารสกัดกระเจี๊ยบแดงเข้มข้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ 457.63 ± 17.40 มิลลิกรัมต่อลิตรกระเจี๊ยบแดงสกัด และ 417.81 ± 2.37 มิลลิกรัมต่อลิตรกระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น ตามลำดับ โดย Yong-Ju และ Howard (2003) รายงานว่า อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด และการทำให้เข้มข้นที่เพิ่มสูงขึ้นนั้น อาจจะทำให้เกิดการสูญเสียปริมาณแอนโทไซยานินเพิ่มขึ้น ซึ่งโดยทั่วไปแล้วนิยมทำการสกัดและทำให้เข้มข้นสารแอนโทไซยานินในช่วงอุณหภูมิ 20.0-50.0 องศาเซลเซียส เพราะหากอุณหภูมิสูงกว่า 70.0 องศาเซลเซียส จะเป็นสาเหตุทำให้เกิดการสูญเสียปริมาณแอนโทไซยานินรวดเร็วขึ้น ทั้งนี้อัตราการสูญเสียปริมาณแอนโทไซยานินจะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและระยะเวลาในการให้ความร้อน โดยสภาวะการสกัดที่อุณหภูมิสูงระยะเวลาสั้น (HTST) จะช่วยให้อัตราการสูญเสียปริมาณแอนโทไซยานินในผลไม้เกิดขึ้นได้ช้าลง สอดคล้องกับ อนุพงศ์ศิริเมืองมูล (2549) ที่รายงานว่าการให้ความร้อนแก่น้ำมะเข็ญที่อุณหภูมิสูงระยะเวลาสั้น (HTST, 85.0 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที) ทำให้เกิดการสูญเสียปริมาณแอนโทไซยานินน้อยกว่าการให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่ำระยะเวลาสั้น (LTLT, 75.0 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที) ซึ่งการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 85.0 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ทำให้น้ำมะเข็ญมีปริมาณแอนโทไซยานิน เท่ากับ

11.62±0.01 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร สูงกว่าการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 75.0 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ที่มีปริมาณแอนโทไซยานิน เท่ากับ 11.24±0.02 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้ บุศรารัตน์ สายเชื้อ (2545) รายงานว่า กลไกการสลายตัวของแอนโทไซยานินเนื่องจากอุณหภูมิที่สูงขึ้นนั้นยังไม่เป็นที่แน่ชัด แต่มี 2 กลไกที่เกี่ยวข้อง คือ เมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้น จะทำให้ Heterocycle เปิดออกเป็นโครงสร้างในรูปของซาลิโคน ซึ่งไม่มีสี (Chandra *et al.*, 1993 อ้างโดย บุศรารัตน์ สายเชื้อ, 2545) หรืออาจเกิดจากการสลายตัวของสี โดยใช้สารตั้งต้นคือ 3,5-di-(O-β-D-glucosyl)-7-hydroxycoumarin ซึ่งพบว่ากลไกการสลายตัวเกิดจาก Flavylium form จะถูกเปลี่ยนรูปไปเป็น Anhydrobase และ Intermediate structures จากนั้นจึงเกิดการแตกพันธะเป็น Coumarin derivative และ B-ring ของแอนโทไซยานิน โดยการสลายตัวของกลไกนี้มีความร้อนเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Hrazdina, 1971 อ้างโดย บุศรารัตน์ สายเชื้อ, 2545)

Table 10. Physical and chemical properties of dried roselle extract and concentrated roselle extract

Sample	Dried roselle extract	Concentrated roselle extract
<i>L</i> *	0.09±0.00 ^a	0.09±0.00 ^a
<i>a</i> *	0.02±0.01 ^a	0.02±0.01 ^a
<i>b</i> *	0.01±0.01 ^a	0.01±0.01 ^a
pH	2.75±0.03 ^a	2.69±0.02 ^b
Total soluble solids (° Brix)	4.67±0.14 ^b	25.27±0.41 ^a
Total acidity, as malic acid (%)	4.22±0.08 ^b	10.28±0.09 ^a
Total anthocyanin contents (mg/l sample)	457.63±17.40 ^a	417.81±2.37 ^b
Total phenolic content (mg GAE/g sample)	54.74±0.56 ^a	19.83±0.24 ^c
Ascorbic acid (mg/g sample)	51.98±8.74 ^b	81.44±4.03 ^a

Means±standard deviation within the same row with different letters are significantly different ($p<0.05$)

GAE, Gallic acid equivalents

Total phenolic contents, expressed as milligrams of gallic acid equivalents per gram of sample using gallic acid standard curve (based on dry weight basis)

Total anthocyanin contents expressed as cyanidin 3-glucoside milligrams per liter of sample

นอกจากนี้ยังพบว่า สารสกัดกระเจี๊ยบแดงเข้มข้นมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดมาลิก และปริมาณกรดแอสคอร์บิก สูงกว่าสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงแห้งอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงแห้ง และสารสกัดกระเจี๊ยบแดงเข้มข้น มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด มีค่าเท่ากับ 4.67 ± 0.14 และ 25.27 ± 0.41 องศาบริกซ์ ตามลำดับ มีปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดมาลิก เท่ากับ $4.22 \pm 0.08\%$ และ $10.28 \pm 0.09\%$ ตามลำดับ และมีปริมาณกรดแอสคอร์บิก เท่ากับ 51.98 ± 8.74 มิลลิกรัมต่อกรัมกระเจี๊ยบแดงสกัด และ 81.44 ± 4.03 มิลลิกรัมต่อกรัมกระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเกิดจากสารสกัดกระเจี๊ยบแดงเข้มข้นมีการระเหยน้ำออกไปบางส่วน ความเข้มข้นของสารสกัดจึงเพิ่มขึ้น ปริมาณของเนื้อสารต่อน้ำหนักจึงมีปริมาณสูงกว่าสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงแห้ง ทำให้ค่าการวิเคราะห์ดังกล่าวแตกต่างกัน แต่ขณะเดียวกันก็พบว่า สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงแห้ง มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงกว่าสารสกัดกระเจี๊ยบแดงเข้มข้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงแห้ง และ สารสกัดกระเจี๊ยบแดงเข้มข้น มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 54.74 ± 0.56 มิลลิกรัมสมมูลย์ของกรดแกลลิกต่อกรัมกระเจี๊ยบแดงสกัด และ 19.83 ± 0.24 มิลลิกรัมสมมูลย์ของกรดแกลลิกต่อกรัมกระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น ตามลำดับ ซึ่ง Klopotek และคณะ (2005) ได้รายงานไว้ว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจะมีปริมาณลดลงเมื่อผ่านกระบวนการแปรรูป เช่น การสกัดหรือกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ โดยเกิดจากผลของจำนวนหมู่ไฮดรอกซิลที่มีผลต่อปริมาณการฟอร์มตัวของสารที่ให้สี หรือการเกิด โครมิกเม็นท์ ร่วมกับการรวมตัวกันของโมเลกุลของสารประกอบฟีนอลิก ทำให้จำนวนหมู่ไฮดรอกซิลลดลง นอกจากนี้ สารที่ไม่เสถียรจำพวกกรดแอสคอร์บิกที่มีองค์ประกอบของโมเลกุลเป็นหมู่ไฮดรอกซิลสามารถทำปฏิกิริยากับสาร Folin-Ciocalteu reagent ได้เช่นกัน (Vinson, *et al.*, 2001; Ikawa, *et al.*, 2003) จากการทดลองจะเห็นได้ว่า สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงแห้ง มีค่าพีเอชโดยเฉลี่ย เท่ากับ 2.75 ซึ่งสูงกว่าค่าพีเอชของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงเข้มข้น ที่มีค่าพีเอชโดยเฉลี่ย เท่ากับ 2.69 ซึ่งในสภาวะที่สารละลายมีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 2.0-3.0 แอนโทไซยานินจะอยู่ในรูปของฟลาเวียม แคทไอออน (AH^+) ทำให้สารละลายมีสีแดง (Mazza and Miniati, 1993) แอนโทไซยานินอยู่ในรูปที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร (แอนโทไซยานินอยู่ในรูปไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์) แต่เมื่อค่าพีเอชของสารละลายเพิ่มขึ้นหรือลดลง จะเกิดการเลื่อนของสมดุล และเกิดการเปลี่ยนรูปของฟลาเวียม แคทไอออน (AH^+) ไปอยู่ในรูปที่ไม่ให้สีแดง ความเข้มข้นของฟลาเวียม แคทไอออน (AH^+) ในสารละลายลดลง ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ลดลง ขณะเดียวกันก็พบว่า สารสกัดกระเจี๊ยบแดงเข้มข้น มีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในรูปไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์น้อยกว่าสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงแห้ง ทั้งนี้อาจเป็นผลมา

จากอุณหภูมิและระยะเวลาในสัปดาห์และการทำให้เข้มข้นที่เพิ่มมากขึ้น จึงส่งผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างแอนโทไซยานิน และทำให้ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดลดลงเช่นกัน ซึ่ง Henry และ Badrie (2007 อ้างโดย ปารมี ชุมศรี, 2550) รายงานว่า อุณหภูมิเป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดการสลายตัวของโครงสร้างโมเลกุลของแอนโทไซยานิน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปอยู่ในรูปของชาลโคน ซึ่งไม่มีสี และจะเกิดการสลายตัวต่อไปได้เป็นสารประกอบที่มีสีน้ำตาล (Brown products) สอดคล้องกับ Tsai และ Huang (2004) ที่รายงานว่ แอนโทไซยานินสามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับสารประกอบฟีนอลิกชนิดอื่นๆ ในสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง เช่น คาร์เทชิน ทำให้สีของแอนโทไซยานินเปลี่ยนแปลงไป นอกจากนี้ Francis (1985) ยังรายงานว่า กรดแอสคอร์บิก สามารถเร่งอัตราการสลายตัวของแอนโทไซยานินให้เกิดเร็วขึ้นและทำให้แอนโทไซยานินมีสีจางลง เนื่องจากเกิดปฏิกิริยาcondensation ของแอนโทไซยานินกับกรดแอสคอร์บิก ทำให้ปริมาณแอนโทไซยานินลดลงอย่างช้าๆ และเป็นไปอย่างต่อเนื่องในระหว่างกระบวนการแปรรูปอาหารด้วยความร้อน ดังนั้นเมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลของแอนโทไซยานิน จึงทำให้ค่าการดูดกลืนแสงของแอนโทไซยานิน ที่ความยาวคลื่น 510 และ 700 นาโนเมตร ลดลง ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในรูปไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ ที่คำนวณได้จึงมีปริมาณลดลง

จากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงแห้ง ที่ได้จากการสกัดกระเจี๊ยบแดงแห้งด้วยน้ำ ในอัตราส่วนกระเจี๊ยบแดงแห้งต่อน้ำ เท่ากับ 1 ต่อ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) สกัดที่อุณหภูมิ 50.0 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงกว่าสารสกัดกระเจี๊ยบแดงเข้มข้น และพบว่า การให้ความร้อน โดยการสกัดกระเจี๊ยบแดงแห้งที่อุณหภูมิ 50.0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วทำให้เข้มข้น โดยใช้เครื่องทำให้เข้มข้นแบบใช้ไอน้ำในสถานะสูญญากาศ ที่อุณหภูมิ 70.0 องศาเซลเซียส ความดัน 44.0 เซนติเมตรปรอท ใช้เวลา 2 ชั่วโมง จนกระทั่งสารสกัดกระเจี๊ยบแดงเข้มข้นมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเท่ากับ 25.0 องศาบริกซ์ ทำให้สารสำคัญในกระเจี๊ยบแดงจำพวกกรดแอสคอร์บิก สารประกอบฟีนอลิก รวมทั้งแอนโทไซยานินถูกทำลายด้วยความร้อนในระหว่างกระบวนการสกัดและการทำให้เข้มข้นจึงส่งผลทำให้ปริมาณกรดแอสคอร์บิก ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในรูปไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ มีปริมาณลดลงเมื่ออุณหภูมิในขั้นตอนการสกัดและการทำให้เข้มข้นเพิ่มสูงขึ้น

การเปลี่ยนแปลงสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงแห้ง และสารสกัดกระเจี๊ยบแดงเข้มข้น ด้วยวิธีการวิเคราะห์สมบัติการจับอนุมูล DPPH สมบัติการจับอนุมูล ABTS และความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกไอออน (FRAP) ดังแสดงใน Table 11 เมื่อวิเคราะห์สมบัติการจับอนุมูล DPPH รายงานค่าในรูปค่า EC_{50} พบว่า สมบัติการจับอนุมูล DPPH ของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงแห้งและสารสกัดกระเจี๊ยบแดงเข้มข้น ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \geq 0.05$) สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงแห้ง และสารสกัดกระเจี๊ยบแดงเข้มข้น มีสมบัติการจับอนุมูล DPPH โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 31.78 ± 1.50 และ 40.83 ± 2.31 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์สมบัติการจับอนุมูล ABTS และความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกไอออน (FRAP) รายงานค่าในรูปไมโครโมลสมมูลของโทรลอกซ์ต่อกรัมตัวอย่าง จากการทดลองพบว่า สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงแห้ง มีสมบัติการจับอนุมูล ABTS และความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกไอออน (FRAP) สูงกว่าสารสกัดกระเจี๊ยบแดงเข้มข้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยมีสมบัติการจับอนุมูล ABTS ที่มีค่า TEAC เท่ากับ 254.56 ± 6.12 และ 38.77 ± 0.97 ไมโครโมลสมมูลของโทรลอกซ์ต่อกรัมตัวอย่าง ตามลำดับ และมีความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกไอออน (FRAP) โดยมีค่า TEAC เท่ากับ 494.08 ± 7.87 และ 55.46 ± 0.19 ไมโครโมลสมมูลของโทรลอกซ์ต่อกรัมตัวอย่าง ตามลำดับ ซึ่ง Tsai และคณะ (2002 อ้างโดย เที่ยงใจ คาริเข้าะ, 2550) รายงานว่า แอนโทไซยานินมีสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระ ด้วยการให้ไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระ ทำให้ปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระเหล่านั้นสิ้นสุดลง ซึ่งพบว่าหมู่ไฮดรอกซิลที่ C3', C4' และ C5' ของวงแหวน B ในโมเลกุลของแอนโทไซยานิน เป็นตำแหน่งหลักที่ใช้ในการจับอนุมูลอิสระ ทำให้อนุมูลอิสระหมดความสามารถที่จะไปทำลายหรือเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบของเซลล์ ทั้งนี้ความคงตัวของแอนโทไซยานินจะลดลง เมื่อโครงสร้างของแอนโทไซยานินถูกทำลายด้วยความร้อนในระหว่างกระบวนการแปรรูป ซึ่ง Jurd (1972 อ้างโดย ยุพาพร ผลิตจรรศักดิ์, 2547) รายงานว่า อัตราการสลายตัวของแอนโทไซยานินเป็นแบบปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง (First order kinetic) เนื่องจากการขาดอิเล็กตรอนของฟลาโวลีน แคทไอออน จึงทำให้แอนโทไซยานินมีความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาได้สูงภายใต้กระบวนการแปรรูป เป็นผลให้ได้สารประกอบซึ่งมีโครงสร้างและสีที่ไม่พึงประสงค์ อาจทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีสีน้ำตาล สอดคล้องกับ Sukhapat และคณะ (2004) ที่ศึกษากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกระเจี๊ยบแดง โดยการสกัดกระเจี๊ยบแดงสดด้วยน้ำแล้วทำแห้งด้วยวิธีการทำแห้งแบบสุญญากาศ แล้ววิเคราะห์สมบัติการจับอนุมูล DPPH รายงานค่าในรูปค่า EC_{50} (ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม) และวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด รายงานค่าในรูปมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัดกระเจี๊ยบแดง จากการทดลองพบว่า สมบัติ

การจับอนุมูล DPPH ของสารสกัดกระเจี๊ยบแดง มีค่า EC_{50} เท่ากับ 18.54 ± 1.53 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 4.13 ± 0.52 มิลลิกรัมสมมูลย์ของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัดกระเจี๊ยบแดง และพบว่าค่าความสัมพันธ์ระหว่างสมบัติการจับอนุมูล DPPH กับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง มีค่า R^2 (Regression) เท่ากับ 0.9246 จึงสรุปได้ว่า สารสกัดกระเจี๊ยบแดงมีสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดี ทั้งนี้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงยังสัมพันธ์กับค่าพีเอช โดยพบว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงจะลดลงเมื่อค่าพีเอชเพิ่มขึ้น สอดคล้องกับ Jackman และ Smith (1996 อ้างโดย วิวัฒน์ หวังเจริญ, 2545) รายงานว่า เนื่องจากหมู่ไฮดรอกซิลในแต่ละตำแหน่งของสารประกอบฟีนอลิกมีบทบาทต่อสมบัติของการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้นเมื่อมีปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลของสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งได้แก่ ค่าพีเอช อุณหภูมิ แสงสว่าง เอนไซม์ และการรวมตัวกับโมเลกุลอื่น จึงทำให้ความคงตัวและความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิกเกิดการเปลี่ยนแปลงด้วยเช่นกัน

Table 11. Changes in antioxidant properties (by DPPH, ABTS and FRAP assay) of dried roselle extract and concentrated roselle extract

Sample	DPPH, EC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	TEAC ($\mu\text{mol TE/g}$)	
		ABTS	FRAP
Dried roselle extract	31.78 ± 1.50^a	254.56 ± 6.12^a	494.08 ± 7.87^a
Concentrated roselle extract	40.83 ± 2.31^a	38.77 ± 0.97^b	55.46 ± 0.19^b

Mean \pm standard deviation within the same column with different letters are significantly different ($p < 0.05$)

DPPH and ABTS radical scavenging activity; FRAP, Ferric reducing antioxidant power

DPPH assay, expressed as EC_{50} and BHT as positive standard

EC_{50} , Efficient concentration, the amount of fresh roselle extract (μg) needed for 50% decreasing in the initial DPPH concentration per 1.0 ml of initial solution

The EC_{50} of BHT standard = 13.82 ± 0.38 $\mu\text{g/ml}$

ABTS and FRAP assays, expressed as millimoles Trolox equivalents per gram extract using Trolox standard curve

TEAC, Trolox equivalents antioxidant capacity

TE, Trolox equivalents, millimolar of Trolox solution having an antioxidant capacity equivalent to 1.0 gram of the substance under investigation

2.2 ผลของกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ต่อสมบัติทางกายภาพ เคมี และสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น

สถานะต่างๆ ที่ใช้ในกระบวนการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์แบบพาสเจอร์ไรซ์ในผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น ดังแสดงใน Table 12 ซึ่งเป็นสถานะที่ทำให้ผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นบรรจุขวดแก้วฝาเกลียวล็อก ขนาด 70 มิลลิลิตร มีอุณหภูมิ ณ จุดร้อนซ้ำที่สุด เท่ากับ 85.0 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที (USFDA, 2001) ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหารที่มีค่าพีเอชน้อยกว่าหรือเท่ากับ 4.0

Table 12. Pasteurization conditions of concentrated roselle extract product

Pasteurized condition	Values
Bottle size	70 BG.
Maximum filling weight	70 ml.
Net weight	70 ml.
Initial temperature	32.4 °C
Come up time	10 min.
Processing temperature (retort)	101.0 °C
Processing time (retort)	5 min.
Coldest point processing temperature & time	85.0 °C & 5 min.
Cooling temperature (retort)	40.0 °C

เมื่อวิเคราะห์คุณค่าทางอาหารของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น ภายหลังจากกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ ที่อุณหภูมิ 101.0 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที พบว่าผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นมีคุณค่าทางอาหาร ดังแสดงใน Table 13 ปริมาณวิตามินเอและวิตามินอีของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นก่อนและหลังกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ ดังแสดงใน Table 14 ซึ่งพบว่าภายหลังจากกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ ทำให้ผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นมีปริมาณวิตามินเอและวิตามินอีลดลงลงเหลือเท่ากับ 105.00 ไมโครกรัมต่อ 70 มิลลิลิตร และ 4.90 มิลลิกรัมต่อ 70 มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่ง Tannenbaum และคณะ (1985 อ้าง โดย ปารมี ชุมศรี, 2550) รายงานว่า ภายหลังจากกระบวนการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์จะทำให้ปริมาณวิตามินเอลดลง 5.0-50.0% ของปริมาณวิตามินเอก่อนกระบวนการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ แต่ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและระยะเวลาของกระบวนการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วย

Table 13. Nutrition Facts of concentrated roselle extract product

	Value per 1 serving size	Percent Thai RDI [*]
Energy (kilocalories)	140	-
Carbohydrate (add Dietary fiber) (g)	34	11
Sugar (g)	30	-
Sodium (mg)	10	-
Vitamin A (μg RE ^{**})	105	15
Vitamin B1 (mg)	0.21	15
Vitamin B2 (mg)	0.01	-
Calcium (mg)	33	4
Iron (mg)	0.8	6
Vitamin E (mg α -TE ^{***})	4.9	50

* Thai RDI (Percent Thai Recommended Daily Intakes for population over 6 years of age are based on a 2,000 kilocalories diet.)

** RE = Retinol equivalent, 1 RE = 1 μg retinol

*** α -TE = α -Tocopherol equivalent, 1 α -TE = 1 mg D- α -Tocopherol

Table 14. Vitamin A and E contents of concentrated roselle extract products before and after pasteurization

Pasteurization	Vitamin	Value per 1 serving size	% Retention	Percent Thai RDI [*]
Before	Vitamin A (μg RE ^{**})	182.00	-	23
	Vitamin E (mg α -TE ^{***})	5.14	-	51
After	Vitamin A (μg RE ^{**})	105.00	57.69	15
	Vitamin E (mg α -TE ^{***})	4.90	95.33	50

* Thai RDI (Percent Thai Recommended Daily Intakes for population over 6 years of age are based on a 2,000 kilocalories diet.)

** RE = Retinol equivalent, 1 RE = 1 μg retinol

*** α -TE = α -Tocopherol equivalent, 1 α -TE = 1 mg D- α -Tocopherol

จากงานวิจัยนี้พบว่า ผลผลิตภัณฑักระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นภายหลังกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ มีปริมาณวิตามินเอคงเหลือ เท่ากับ 57.69% นอกจากนี้ นิธิยา รัตนาปนนท์ (2549) ยังรายงานว่า วิตามินอีที่ใช้ในทางการค้า จะอยู่ในรูปของอะซิเตต เอสเทอร์ (Acetate ester) ซึ่งจะทำให้วิตามินอีมีความคงตัวเพิ่มขึ้น เมื่อสัมผัสกับแสงสว่าง อากาศ และความชื้น คังจะเห็นได้จากปริมาณวิตามินอีก่อนและหลังกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ที่มีปริมาณลดลงเพียงเล็กน้อย มีปริมาณวิตามินอีคงเหลือ เท่ากับ 95.33% หลังจากผ่านกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ที่อุณหภูมิ ๗๕ องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

การวิเคราะห์จุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น ดังแสดงใน Table 15 โดยการทดสอบ Aciduric flat sour types, Coliform bacteria, *Staphylococcus aureus*, ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด และปริมาณยีสต์และรา ของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นภายหลังกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ พบว่า ผลการตรวจวิเคราะห์ไม่พบการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ดังกล่าว ซึ่งเป็นไปตามข้อกำหนดของประกาศกระทรวงสาธารณสุขเรื่องมาตรฐานเครื่องดื่มน้ำในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท ที่กำหนดว่าเครื่องดื่มน้ำในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท ต้องตรวจพบแบคทีเรียชนิด โคลิฟอร์ม น้อยกว่า 2.2 ต่อเครื่องดื่มน้ำ 100 มิลลิลิตร โดยวิธีเอ็มทีเอ็น ตรวจไม่พบแบคทีเรียชนิด *Escherichia coli* และไม่มีจุลินทรีย์ก่อโรค รวมทั้งไม่มีปริมาณยีสต์และรา (ประกาศกระทรวงสาธารณสุข, 2543)

Table 15. Microbiological qualities of concentrated roselle extract product after pasteurization

Microbiology	Values (CFU/ml)
Aciduric flat sour types	None
Coliform bacteria	None
<i>Staphylococcus aureus</i>	None
Total viable count	None
Yeasts and Molds	None

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นหลังกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ ดังแสดงใน Table 16 โดยการวิเคราะห์ปริมาณตะกั่ว เหล็ก และดีบุก จากผลการตรวจวิเคราะห์ พบว่า ตรวจไม่พบปริมาณตะกั่วในผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น หลังกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ ในขณะที่ตรวจพบเหล็ก และดีบุก ในปริมาณ 10.58 และ 0.92 มิลลิกรัมต่อกระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น 1.0 กิโลกรัม ตามลำดับ ซึ่งเป็นไปตามข้อกำหนดของ

ประกาศกระทรวงสาธารณสุขเรื่องมาตรฐานเครื่องดื่มในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท ซึ่งกำหนดมาตรฐานของเครื่องดื่มในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท ว่าต้องตรวจพบการปนเปื้อนของปริมาณตะกั่วได้ไม่เกิน 0.5 มิลลิกรัมต่อเครื่องดื่ม 1.0 กิโลกรัม เหล็ก ไม่เกิน 15.0 มิลลิกรัมต่อเครื่องดื่ม 1.0 กิโลกรัม และดีบุก ไม่เกิน 250.0 มิลลิกรัมต่อเครื่องดื่ม 1.0 กิโลกรัม (ประกาศกระทรวงสาธารณสุข, 2543)

Table 16. Heavy metal content of concentrated roselle extract product after pasteurization

Heavy metal content	Values (mg/concentrated roselle extract 1.0 kg)
Lead (< 0.5 mg/ sample 1.0 kg)	Not detected
Iron (< 15.0 mg/ sample 1.0 kg)	10.58
Tin (< 250.0 mg/ sample 1.0 kg)	0.92

*Based on limited of detection (LOD) = 0.025 mg/1.0 kg

การวิเคราะห์สมบัติทางด้านกายภาพ และเคมีของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น ทั้งก่อนและหลังกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ ดังแสดงใน Table 17 จากการทดลองพบว่าค่า L^* , a^* และ b^* ของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นก่อนและหลังกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \geq 0.05$) และเมื่อวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นทั้งก่อนและหลังกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) จากการทดลองพบว่า ผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นก่อนและหลังกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ มีค่าพีเอช เท่ากับ 2.70 ± 0.02 และ 2.80 ± 0.01 ตามลำดับ ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด เท่ากับ 45.93 ± 1.35 และ 43.77 ± 0.23 องศาบริกซ์ ตามลำดับ ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดมาลิก เท่ากับ $2.10 \pm 0.06\%$ และ $1.98 \pm 0.08\%$ ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในรูปไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ พบว่า ผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นก่อนกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ มีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในรูปไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ มากกว่าผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นภายหลังกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยมีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในรูปไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ เท่ากับ 407.95 ± 2.90 และ 279.54 ± 5.82 มิลลิกรัมต่อลิตรกระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น ตามลำดับ

Table 17. Effect of pasteurization on physical and chemical properties of concentrated roselle extract product before and after pasteurization

Sample	before pasteurization	after pasteurization
<i>L</i> *	0.09±0.00 ^a	0.09±0.00 ^a
<i>a</i> *	0.02±0.02 ^a	0.01±0.01 ^a
<i>b</i> *	0.01±0.01 ^a	0.00±0.00 ^a
pH	2.70±0.02 ^b	2.80±0.01 ^a
Total soluble solids (°Brix)	45.93±1.35 ^a	43.77±0.23 ^b
Total acidity, as malic acid (%)	2.10±0.06 ^a	1.98±0.08 ^b
Total anthocyanin contents (mg/l sample)	407.95±2.90 ^a	279.54±5.82 ^b
Total phenolic content (mg GAE/g sample)	18.65±0.28 ^b	21.54±0.21 ^a
Ascorbic acid (mg/g sample)	29.10±4.79 ^a	22.70±2.65 ^b

Means±standard deviation within the same row with different letters are significantly different ($p < 0.05$)

GAE, Gallic acid equivalents

Total phenolic contents, expressed as milligrams of gallic acid equivalents per gram of sample using gallic acid standard curve (based on dry weight basis)

Total anthocyanin contents expressed as cyanidin 3-glucoside milligrams per liter of sample

ซึ่ง Clifford (2000) อ้างโดย Kim and Padilla-Zakour, (2004) รายงานว่า การพาสเจอร์ไรซ์เป็นกระบวนการสำคัญที่ทำให้เกิดการสูญเสียปริมาณสารประกอบทางชีวภาพ ซึ่งในระหว่างกระบวนการผลิตอาหารจะทำให้สารประกอบฟีนอลิก จำพวกแอนโทไซยานินเกิดการเปลี่ยนแปลง โครงสร้างที่สามารถเกิดคอมเพล็กซ์ (Complex) กับสารประกอบอื่นๆ ได้นอกจากนี้ Maccarone และคณะ (1985) ยังรายงานว่ แอนโทไซยานินสามารถเกิดคอมเพล็กซ์กับกรดคาเฟอิกได้เป็นแอนโทไซยานิน-คาเฟอิก เอซิด คอมเพล็กซ์ (Anthocyanin-Caffeic acid complex) ทำให้เกิดสีเหลืองหรือสีน้ำตาลในผลิตภัณฑ์ ทั้งนี้ Tsai และคณะ (2004) รายงานว่า ระยะเวลาในการให้ความร้อน มีผลทำให้แอนโทไซยานินเกิดการเปลี่ยนสี โดยการให้ความร้อนที่ระยะเวลานานขึ้น มีผลทำให้โครงสร้างแอนโทไซยานินเกิดการเปลี่ยนรูปไปอยู่ในรูปโพลีเมอร์ที่มีสีน้ำตาล (Brown polymer forms) ซึ่ง Mazza และ Miati (1993) รายงานว่า โพลีเมอร์สีน้ำตาลที่เกิดจากรังควัตถุแอนโทไซยานินสามารถรวมตัวกับสารประกอบอื่นๆ ได้แก่ ฟลาโวนอยด์

โพลีฟีนอล กรดอินทรีย์ และ โมเลกุลของแอนโทไซยานิน เป็นต้น เรียกว่า การเกิด โคลิควิกันท์ นอกจากนี้ยังพบว่า ผลึกภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นก่อนกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ ยังมีปริมาณกรดแอสคอร์บิกมากกว่าผลึกภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นหลังกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ผลึกภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นก่อนและหลังกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ มีปริมาณกรดแอสคอร์บิก เท่ากับ 29.10 ± 4.79 และ 22.70 ± 2.65 มิลลิกรัมต่อกรัมกระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากกรดแอสคอร์บิกเป็นสารรีดิวซิงเอเจนต์อย่างรุนแรง และมีความคงตัวต่ำ จึงสามารถเกิดการสลายตัวได้ง่ายเมื่อผ่านกระบวนการให้ความร้อน (นิริยา รัตนาปพนท์, 2549) ซึ่ง Jackman และ Smith (1996 อ้างโดย วิวัฒน์ หวังเจริญ, 2545) กล่าวว่า อุณหภูมิสูงในระหว่างกระบวนการแปรรูป จะมีผลทำให้สารประกอบฟีนอลิกโมเลกุลเล็กๆ ทยอยกลายเป็นไอได้ ซึ่งจะเกิดการแตกออกของวงแหวน C และสลายตัวไป โดยวงแหวน B จะเปลี่ยนเป็นกรดคาร์บอกซิลิก และวงแหวน A จะเปลี่ยนเป็นคาร์บอกซีอัลดีไฮด์ ตามลำดับ และจะระเหยไปพร้อมกับไอน้ำ สอดคล้องกับ Kim และ Padilla-Zakour (2004 อ้างโดย เพียงใจ คาริเยาะ, 2550) รายงานว่า ระยะเวลาในการให้ความร้อนที่นานขึ้น จะส่งผลให้แอนโทไซยานินเกิดการเปลี่ยนรูป โดยขั้นแรกจะมีการสลายของพันธะไกลโคซิดิก (Glycosidic linkage) และเมื่อมีการให้ความร้อนที่นานขึ้นจะส่งผลให้แอนโทไซยานินเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของซาลิโคน ซึ่งไม่มีสีแอนโทไซยานินในรูปนี้จะไม่มีความคงตัว นอกจากนี้แอนโทไซยานินในรูปของซาลิโคนอาจทำปฏิกิริยากับออกซิเจน (Oxidation reaction) ในระหว่างการให้ความร้อน ซึ่งจะเปลี่ยนไปเป็นสารประกอบที่มีสีน้ำตาลที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง จึงอาจกล่าวได้ว่า การแปรรูปอาหารโดยการให้ความร้อนจะเป็นตัวเร่งให้แอนโทไซยานินสามารถเกิดคอมเพล็กซ์กับสารประกอบอื่นๆ ได้เร็วยิ่งขึ้น และอาจทำให้สมบัติเชิงหน้าที่ของแอนโทไซยานิน และสารประกอบฟีนอลิกอื่นที่มีปริมาณลดลง ซึ่งจากงานวิจัยนี้ จะเห็นได้ว่า การฆ่าเชื้อจุลินทรีย์แบบพาสเจอร์ไรซ์ ที่อุณหภูมิของเครื่องฆ่าเชื้อ เท่ากับ 101.0 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ทำให้ผลึกภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น มีอุณหภูมิ ณ จุดร้อนซ้าที่สุด เท่ากับ 85.0 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ส่งผลให้ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในรูปไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณกรดแอสคอร์บิกของผลึกภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นมีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็วเช่นกัน

การเปลี่ยนแปลงสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของผลึกภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นก่อนและหลังกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ ด้วยวิธีการวิเคราะห์สมบัติการจับอนุมูล DPPH สมบัติการจับอนุมูล ABTS และความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกไอออน (FRAP) ดังแสดงใน Table 18 เมื่อวิเคราะห์สมบัติการจับอนุมูล DPPH รายงานค่าในรูปค่า EC_{50} พบว่า สมบัติการจับอนุมูล DPPH ของผลึกภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นก่อนและหลังกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ไม่มี

ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \geq 0.05$) มีค่า EC_{50} เท่ากับ 336.81 ± 21.88 และ 350.86 ± 42.37 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์สมบัตินิการจับอนุมูล ABTS และความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริกไอออน (FRAP) รายงานค่าในรูปแบบไมโครโมลสมมูลย์ของโทรลอกซ์ต่อกรัม กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น พบว่า ผลิตกัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นก่อนและหลังกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ มีสมบัตินิการจับอนุมูล ABTS แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยมีค่า TEAC เท่ากับ 27.31 ± 0.68 และ 32.65 ± 0.85 ไมโครโมลสมมูลย์ของโทรลอกซ์ต่อกรัมกระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น ตามลำดับ เช่นเดียวกับความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริกไอออน (FRAP) ของผลิตกัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นก่อนและหลังกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ ซึ่งพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \geq 0.05$) โดยมีค่า TEAC เท่ากับ 55.77 ± 0.15 และ 56.31 ± 0.84 ไมโครโมลสมมูลย์ของโทรลอกซ์ต่อกรัมกระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น ตามลำดับ ซึ่ง ยูพาพร ผลาขจรศักดิ์ (2547) รายงานว่า ปัจจัยที่มีผลต่อความคงตัวของแอนโทไซยานิน คือ การเกิดโคพิกเมนต์กับสารประกอบต่างๆ เช่น Flavone, Flavonol, Aurone, Flavonone, Flavan-3-ols, Alkaloids และ Amino acids เป็นต้น ทั้งนี้อัตราการเกิดโคพิกเมนต์จะขึ้นอยู่กับชนิดของโคพิกเมนต์ ชนิดของแอนโทไซยานิน รวมทั้งความเข้มข้นของโคพิกเมนต์และแอนโทไซยานินด้วย สอดคล้องกับ Cao และคณะ (2001) ที่รายงานว่า เมื่อแอนโทไซยานินอยู่ในสภาวะที่มีค่าพีเอชเพิ่มขึ้น (มากกว่าพีเอช 4.0) จะทำให้แอนโทไซยานินสามารถเกิดการรวมตัวระดับโมเลกุลกับ โมเลกุลของแอนโทไซยานินเอง ซึ่ง Jackman และคณะ (1987) รายงานว่า สารประกอบจำพวกแทนนิน หรือสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ได้แก่ รุติน และเคอร์เซทิน สามารถเกิดการรวมตัวระดับโมเลกุลกับ โมเลกุลของแอนโทไซยานิน เป็นผลให้สมบัตินิการต้านอนุมูลอิสระของแอนโทไซยานินลดลง

งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า กระบวนการแปรรูปกระเจี๊ยบแดงสดด้วยการทำแห้ง การทำให้เข้มข้น และกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ ทำให้สารประกอบฟีนอลิก แอนโทไซยานิน รวมทั้งปริมาณกรดแอสคอร์บิก ซึ่งเป็นสารสำคัญในกระเจี๊ยบแดงมีปริมาณลดลงหลังจากผ่านการให้ความร้อนในระดับอุณหภูมิต่างๆ ตลอดกระบวนการผลิตผลิตกัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น ทำให้อันตรกิริยาของสารสำคัญในผลิตกัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นกับอนุมูลอิสระเกิดการเปลี่ยนแปลงหรือมีฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระได้น้อยลง ส่งผลให้ผลิตกัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น มีสมบัตินิการจับอนุมูล DPPH สมบัตินิการจับอนุมูล ABTS รวมทั้งความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริกไอออน (FRAP) ลดลง เมื่อผ่านการให้ความร้อนที่ระดับอุณหภูมิสูงขึ้นเช่นกัน

Table 18. Changes in antioxidant properties (by DPPH, ABTS and FRAP assay) of products before and after pasteurization

Sample	DPPH, EC ₅₀ ^a (µg/ml)	TEAC (µmol TE/g)	
		ABTS	FRAP
Product before pasteurization	336.81±21.88 ^a	27.31±0.68 ^b	55.77±0.15 ^a
Product after pasteurization	350.86±42.37 ^a	32.65±0.85 ^a	56.31±0.84 ^a

Mean±standard deviation within the same column with different letters are significantly different ($p<0.05$)

DPPH and ABTS radical scavenging activity; FRAP, Ferric reducing antioxidant power

DPPH assay, expressed as EC₅₀ and BHT as positive standard

EC₅₀, Efficient concentration, the amount of fresh roselle extract (µg) needed for 50% decreasing in the initial DPPH concentration per 1.0 ml of initial solution

The EC₅₀ of BHT standard = 13.82±0.38 µg/ml

ABTS and FRAP assays, expressed as millimoles Trolox equivalents per gram extract using Trolox standard curve

TEAC, Trolox equivalents antioxidant capacity

TE, Trolox equivalents, millimolar of Trolox solution having an antioxidant capacity equivalent to 1.0 gram of the substance under investigation

3. ผลของสภาวะการเก็บรักษาต่อสมบัติทางกายภาพ เคมี่ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น

3.1 สมบัติทางด้านกายภาพ และเคมี

ค่าเฉลี่ยของค่าสี L^* , a^* และ b^* ของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นในระหว่างการเก็บรักษาในสภาวะที่มีและไม่มีแสงสว่าง ที่อุณหภูมิ 27.0±1.0 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 เดือน ดังแสดงใน Table 19 เมื่อศึกษาผลของระยะเวลาการเก็บรักษาต่อค่าสี L^* , a^* และ b^* ของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น พบว่า การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นในสภาวะที่มี แสงสว่าง เป็นระยะเวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 เดือน ค่าสี L^* , a^* และ b^* มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) โดยค่า L^* , a^* และ b^* ของเดือนที่ 0 เท่ากับ 0.09±0.00, 0.01±0.01 และ 0.00±0.00 ตามลำดับ

Table 19. Changes in color (L^* a^* b^*) of concentrated roselle extract products during storage in the presence and absence of light at 27.0 °C for 0, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 months

Storage time (months)	L^* values		a^* values		b^* values	
	Presence of light	Absence of light	Presence of light	Absence of light	Presence of light	Absence of light
0	0.09±0.00 ^{dNS}	0.09±0.00 ^{eNS}	0.01±0.01 ^{fNS}	0.01±0.01 ^{fNS}	0.00±0.00 ^{eNS}	0.00±0.00 ^{fNS}
2	9.38±0.08 ^{bA}	9.28±0.09 ^{dB}	0.59±0.07 ^{cA}	0.46±0.06 ^{eB}	1.39±0.08 ^{dA}	1.29±0.05 ^{eB}
4	9.43±0.07 ^{cA}	9.33±0.05 ^{EB}	0.65±0.05 ^{cA}	0.51±0.07 ^{eB}	1.44±0.05 ^{dA}	1.34±0.06 ^{dB}
6	9.49±0.11 ^{bA}	9.40±0.08 ^{BB}	0.83±0.07 ^{dA}	0.60±0.10 ^{dB}	1.55±0.08 ^{cA}	1.41±0.07 ^{dB}
8	9.57±0.17 ^{bA}	9.47±0.09 ^{BB}	0.96±0.07 ^{cA}	0.80±0.08 ^{eB}	1.60±0.10 ^{cA}	1.50±0.08 ^{CB}
10	9.76±0.07 ^{bA}	9.57±0.09 ^{BB}	1.10±0.06 ^{bA}	0.98±0.07 ^{BB}	1.72±0.07 ^{bA}	1.61±0.07 ^{BB}
12	9.85±0.08 ^{bA}	9.65±0.10 ^{BB}	1.28±0.07 ^{bA}	1.17±0.08 ^{BB}	1.91±0.09 ^{bA}	1.76±0.10 ^{BB}

*storage temperature of 27.0±1.0 °C

Means±standard deviation within the same row with different letters are significantly different ($p<0.05$)

a, b... with the same superscripts in different storage times in the same column are not significantly different ($p\geq 0.05$)

A, B... with the same superscripts as compared between the presence and absence of light in the same row are not significantly different ($p\geq 0.05$)

NS...not significant difference among presence and absence of light at the same storage times ($p\geq 0.05$)

เมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 12 เดือน พบว่า ค่า L^* a^* และ b^* มีค่าเพิ่มขึ้น โดยมีค่าเท่ากับ 9.85 ± 0.08 , 1.28 ± 0.07 และ 1.91 ± 0.09 ตามลำดับ เช่นเดียวกับการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นในสถานะที่ไม่มีแสงสว่าง ที่พบว่า ค่าสี L^* a^* และ b^* มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เช่นกัน โดยค่า L^* a^* และ b^* เมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 12 เดือน มีค่าเพิ่มขึ้น โดยมีค่าเท่ากับ 9.65 ± 0.10 , 1.17 ± 0.08 และ 1.76 ± 0.10 ตามลำดับ และเมื่อศึกษาผลของแสงสว่างต่อค่าสี L^* a^* และ b^* พบว่า การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น ในสถานะที่มีแสงสว่าง ทำให้ค่าสี L^* a^* และ b^* มีปริมาณเพิ่มขึ้นสูงกว่าการเก็บรักษาในสถานะที่ไม่มีแสงสว่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา 12 เดือน จากการทดลองจะเห็นได้ว่า เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้นจะส่งผลให้ค่าสี L^* a^* และ b^* ของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นเพิ่มขึ้นเช่นกัน ขณะที่การเก็บรักษาในสถานะที่ไม่มีแสงสว่างจะทำให้ค่าสี L^* a^* และ b^* ของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นมีค่าสูงกว่าการเก็บรักษาในสถานะที่มีแสงสว่าง ซึ่ง อรวินท์ เลาหรัชदनันท์ (2539) รายงานว่า แอนโทไซยานินเป็นสารประกอบฟีนอลิก และสามารถถูกทำลายได้ด้วยความร้อน แสงสว่าง การเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอช หรือการถูกออกซิไดซ์ด้วยออกซิเจนในระหว่างกระบวนการแปรรูป และการเก็บรักษา ซึ่งทำให้สีของผลิตภัณฑ์อาหารเกิดการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม โดยสีของผลิตภัณฑ์อาหารอาจมีสีจางลง หรือมีสีเข้มขึ้น หรือเกิดเป็นสีที่ไม่พึงปรารถนา (Off-color) เช่นเดียวกับ Yuksel และ Koca (2008) ที่รายงานไว้ว่า ค่า L^* จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิบรรยากาศปกติ ค่าความสว่างของสีจะมีค่าเพิ่มมากขึ้น เกิดจากการสูญเสียปริมาณแอนโทไซยานินเพิ่มขึ้น สำหรับการเพิ่มขึ้นของค่า a^* อาจเป็นผลมาจากปฏิกิริยาโพลีเมอร์ไรเซชัน และปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาล ส่วนค่า b^* เมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิบรรยากาศปกติ พบว่า ค่า b^* จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเช่นกัน ทั้งนี้ Tsai และคณะ (2004) รายงานว่าการเกิดปฏิกิริยาโพลีเมอร์ไรเซชัน เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของสี และสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของแอนโทไซยานินในกระเจี๊ยบแดง ความร้อนจากกระบวนการแปรรูปเป็นสาเหตุทำให้โมเลกุลของแอนโทไซยานินเกิดปฏิกิริยาโพลีเมอร์ไรเซชันกับสารประกอบฟีนอลิกเป็นผลให้โครงสร้างของแอนโทไซยานินเกิดการเปลี่ยนแปลงไปอยู่ในรูปโพลีเมอร์ (Polymer form) ที่มีน้ำหนักโมเลกุลใหญ่กว่าแอนโทไซยานิน และทำให้สีแดงของแอนโทไซยานินจางลงโดยโพลีเมอร์ที่ได้มีสีน้ำตาล (Brown polymer)

ค่าเฉลี่ยของค่าพีเอช ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดมาลิก และปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น ในระหว่างการเก็บรักษาในสถานะที่มีและไม่มีแสงสว่าง ที่อุณหภูมิ 27.0 ± 1.0 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 เดือน ดังแสดงใน Table 20 เมื่อศึกษาผลของระยะเวลาการเก็บรักษาต่อค่าพีเอชของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบ

แดงสกัดเข้มข้น พบว่า การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นในสถานะที่มีแสงสว่าง เป็นระยะเวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 เดือน ค่าพีเอชมีแนวโน้มลดลงเล็กน้อย ($p < 0.05$) ซึ่งค่าพีเอชของผลิตภัณฑ์หลังจากการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 6, 8, 10 และ 12 เดือน ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \geq 0.05$) โดยค่าพีเอชของเดือนที่ 0 มีค่าเท่ากับ 2.80 ± 0.01 และเมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 12 เดือน มีค่าพีเอช เท่ากับ 2.78 ± 0.02 เช่นเดียวกับการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นในสถานะที่ไม่มีแสงสว่าง เป็นระยะเวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 เดือน ที่พบว่า ค่าพีเอชของผลิตภัณฑ์มีแนวโน้มลดลงเล็กน้อย ($p < 0.05$) เช่นกัน ซึ่งค่าพีเอชของผลิตภัณฑ์หลังจากการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 8, 10 และ 12 เดือน ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \geq 0.05$) เช่นกัน ซึ่งค่าพีเอชของผลิตภัณฑ์ที่เก็บรักษาเป็นระยะเวลา 12 เดือน มีค่าเท่ากับ 2.76 ± 0.02 และเมื่อศึกษาผลของแสงสว่างต่อค่าพีเอช พบว่า เมื่อเปรียบเทียบที่ระยะเวลาการเก็บรักษาเดียวกัน การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น ในสถานะที่มีและไม่มีแสงสว่างทำให้ค่าพีเอชของผลิตภัณฑ์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \geq 0.05$) เช่นเดียวกับ Omemu และคณะ (2006) ที่รายงานว่า เครื่องดื่มจากสารสกัดกระเจี๊ยบแดงแห้ง ที่ได้จากการสกัดกระเจี๊ยบแดงแห้ง 20 กรัม ด้วยน้ำ 1 ลิตร ต้มเดือดที่อุณหภูมิ 100.0 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที หลังจากนั้นจึงแยกกาก และเติมน้ำตาลทราย 50 กรัม บรรจุใส่ขวดแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (sterile bottle) แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 29.0 ± 1.0 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน พบว่า ค่าพีเอชของเครื่องดื่มจากสารสกัดกระเจี๊ยบแดงแห้ง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \geq 0.05$) โดยค่าพีเอชของวันที่ 1 มีค่าเท่ากับ 2.67 และเมื่อเก็บรักษานาน 14 วัน ค่าพีเอช มีค่าเท่ากับ 2.71 มีปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดซิตริก เท่ากับ 0.06% และ 0.08% ตามลำดับ

เมื่อศึกษาผลของระยะเวลาการเก็บรักษาต่อปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดมาลิกของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น พบว่า การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น ในสถานะที่มีแสงสว่าง เป็นระยะเวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 เดือน ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดมาลิกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในเดือนที่ 2 ของการเก็บรักษา หลังจากนั้นปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดมาลิกไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \geq 0.05$) ซึ่งปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดมาลิก ในเดือนที่ 0 มีค่าเท่ากับ $1.90 \pm 0.08\%$ และเมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 12 เดือน มีปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดมาลิก เท่ากับ $1.93 \pm 0.03\%$

Table 20. Changes in pH values, total acidity (% as malic acid) and total soluble solids (° Brix) of concentrated roselle extract products during storage in the presence and absence of light at 27.0 °C for 0, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 months

Storage time (months)	pH values		Total acidity, as malic acid (%)		Total soluble solids (° Brix)	
	Presence of light ^{NS}	Absence of light ^{NS}	Presence of light ^{NS}	Absence of light ^{NS}	Presence of light ^{NS}	Absence of light ^{NS}
0	2.80±0.01 ^a	2.80±0.01 ^a	1.90±0.08 ^b	1.90±0.08 ^b	43.77±0.23 ^a	43.77±0.23 ^a
2	2.72±0.02 ^d	2.75±0.02 ^d	1.93±0.03 ^a	1.91±0.06 ^b	43.95±0.12 ^a	43.07±0.10 ^c
4	2.75±0.01 ^c	2.76±0.01 ^c	1.99±0.03 ^a	1.94±0.06 ^a	43.73±0.67 ^a	43.73±0.16 ^a
6	2.78±0.01 ^b	2.77±0.01 ^b	1.96±0.05 ^a	1.91±0.04 ^b	43.67±0.05 ^a	43.20±0.13 ^c
8	2.78±0.01 ^b	2.78±0.01 ^b	1.94±0.06 ^a	1.99±0.03 ^a	43.07±0.10 ^b	43.03±0.15 ^c
10	2.78±0.01 ^b	2.78±0.01 ^b	1.99±0.03 ^a	1.99±0.03 ^a	43.13±0.10 ^b	43.47±0.10 ^b
12	2.78±0.02 ^b	2.76±0.02 ^c	1.93±0.03 ^a	1.92±0.05 ^a	43.07±0.24 ^b	43.53±0.21 ^b

*storage temperature of 27.0±1.0 °C

Means±standard deviation within the same row with different letters are significantly different ($p<0.05$)

a, b... with the same superscripts in different storage times in the same column are not significantly different ($p\geq 0.05$)

NS...not significant difference among presence and absence of light at the same storage times ($p\geq 0.05$)

การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นในสภาวะที่ไม่มีแสงสว่าง เป็นระยะเวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 เดือน พบว่ามีปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดมาลิกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในเดือนที่ 6 ของการเก็บรักษา หลังจากนั้นค่าปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดมาลิก ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \geq 0.05$) ซึ่งปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดมาลิก เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 12 เดือนมีค่าเท่ากับ $1.92 \pm 0.05\%$ และเมื่อศึกษาผลของแสงสว่างต่อปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดมาลิก พบว่า เมื่อเปรียบเทียบที่ระยะเวลาการเก็บรักษาเดียวกัน การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีแสงสว่าง ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดมาลิกไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \geq 0.05$) จากงานวิจัยนี้จะเห็นได้ว่า เมื่อเก็บรักษาผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นเป็นระยะเวลา 12 เดือน ค่าพีเอชของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น มีค่าอยู่ในช่วง 2.72-2.80 มีปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดมาลิก มีค่าอยู่ในช่วง 1.90-1.99% ซึ่ง Francis (1985) รายงานว่า ถึงแม้ว่าการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชเกิดขึ้นในช่วงแคบ ก็จะสามารถส่งผลกระทบต่อเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของแอนโทไซยานินได้เช่นกัน ซึ่งในธรรมชาติ แอนโทไซยานินจะมีโครงสร้าง 4 รูป คือ ควินอยคอลล เบส (A) ฟลาโวลีเทียม แคทไอออน (AH^+) คาร์บินอล ชูโดเบส (B) และซาลิโคน (C) ซึ่งจะเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช กล่าวคือ เมื่อค่าพีเอชอยู่ในช่วงต่ำกว่า 2.0 แอนโทไซยานินจะอยู่ในรูปของฟลาโวลีเทียม แคทไอออน ซึ่งมีสีแดง แต่เมื่อค่าพีเอชสูงขึ้น (ค่าพีเอช อยู่ในช่วง 6.0-8.0) ฟลาโวลีเทียม แคทไอออนจะเกิดการสูญเสียโปรตอน แอนโทไซยานินจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของควินอยคอลล เบส ซึ่งมีสีฟ้า และเมื่อเกิดการไฮโดรไลซิส แอนโทไซยานินจะเปลี่ยนแปลงโครงสร้างจากคาร์บินอล ชูโดเบส ไม่มีสี เปลี่ยนมาอยู่ในรูปซาลิโคน ซึ่งไม่มีสีเช่นกัน

เมื่อศึกษาผลของระยะเวลาการเก็บรักษาต่อปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด พบว่า การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นในสภาวะที่มีแสงสว่าง เป็นระยะเวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 เดือน ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \geq 0.05$) ในเดือนที่ 6 ของการเก็บรักษา หลังจากนั้นปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดจะมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดในเดือนที่ 0 เท่ากับ 43.77 ± 0.23 องศาบริกซ์ และเมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการเก็บรักษา 12 เดือน ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดลดลง เท่ากับ 43.07 ± 0.24 องศาบริกซ์ และเมื่อเก็บรักษาในสภาวะที่ไม่มีแสงสว่าง เป็นระยะเวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 เดือน พบว่า ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เช่นกัน ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดในเดือนที่ 12 มีปริมาณ เท่ากับ 43.53 ± 0.21 องศาบริกซ์ และเมื่อศึกษาผลของแสงสว่างต่อปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด พบว่า เมื่อเปรียบเทียบที่ระยะเวลาการเก็บรักษาเดียวกัน การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบ

แดงสกัดเข้มข้น ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีแสงสว่าง ปริมาณของแฉิ่งที่ละลายได้ทั้งหมดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \geq 0.05$) ขณะที่ Rapisarda และคณะ (2008) รายงานว่า ผลึกภัณฑ์น้ำส้มทางการค้าที่ผลิตจากส้ม [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] สายพันธุ์ Meli โดยผลึกภัณฑ์น้ำส้มทางการค้าผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 6.00 ± 1.0 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 60 วัน พบว่า ปริมาณของแฉิ่งที่ละลายได้ทั้งหมดของน้ำส้มในวันที่ 0 และเมื่อเก็บรักษานาน 60 วัน มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยปริมาณของแฉิ่งที่ละลายได้ทั้งหมดมีค่าเพิ่มขึ้น จาก 8.62 เป็น 10.62 องศาบริกซ์ ส่วนงานวิจัยนี้สรุปได้ว่า เมื่อเก็บรักษาผลึกภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นเป็นระยะเวลา 12 เดือน ในสภาวะที่มีและไม่มีแสงสว่างในระหว่างการเก็บรักษาไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณของแฉิ่งที่ละลายได้ทั้งหมดในผลึกภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น ขณะที่ระยะเวลาการเก็บรักษาจะมีผลต่อปริมาณของแฉิ่งที่ละลายได้ทั้งหมด โดยทำให้ปริมาณของแฉิ่งที่ละลายได้ทั้งหมดลดลงเมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลานานขึ้น ทั้งนี้เมื่อพิจารณาถึงค่าเฉลี่ยโดยรวมของปริมาณของแฉิ่งที่ละลายได้ทั้งหมดในผลึกภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษานาน 12 เดือน ปริมาณของค่าเฉลี่ยเกิดการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วง 43.00-43.90 องศาบริกซ์ สอดคล้องกับ ปารมี ชุมศรี (2550) ที่รายงานว่า เมื่อเก็บรักษาผลึกภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นในสภาวะที่ไม่มีแสงสว่าง ที่อุณหภูมิ 4.0 ± 1.0 และ 27.0 ± 1.0 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 60 วัน ปริมาณของแฉิ่งที่ละลายได้ทั้งหมดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \geq 0.05$) มีปริมาณของแฉิ่งที่ละลายได้ทั้งหมดโดยเฉลี่ย เท่ากับ 44.56 ± 0.01 องศาบริกซ์

ค่าเฉลี่ยของปริมาณกรดแอสคอร์บิกของผลึกภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นในระหว่างการเก็บรักษาในสภาวะที่มีและไม่มีแสงสว่าง ที่อุณหภูมิ 27.0 ± 1.0 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 เดือน ดังแสดงใน Table 21 จากการทดลองพบว่า เมื่อศึกษาผลของระยะเวลาการเก็บรักษาต่อปริมาณกรดแอสคอร์บิกของผลึกภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น พบว่า การเก็บรักษาผลึกภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นในสภาวะที่มีแสงสว่าง เป็นระยะเวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 เดือน ปริมาณกรดแอสคอร์บิกลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ปริมาณกรดแอสคอร์บิก ในเดือนที่ 0 เท่ากับ 22.70 ± 2.65 มิลลิกรัมต่อกรัมกระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น และเมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 12 เดือน มีปริมาณลดลงเหลือ เท่ากับ 2.92 ± 0.50 มิลลิกรัมต่อกรัมกระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น เช่นเดียวกับการเก็บรักษาในสภาวะที่ไม่มีแสงสว่าง เป็นระยะเวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 เดือน พบว่า ปริมาณกรดแอสคอร์บิกลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เช่นกัน ซึ่งเมื่อเก็บรักษาไว้นาน 12 เดือน ปริมาณกรดแอสคอร์บิกลดลงเหลือ เท่ากับ 8.99 ± 2.28 มิลลิกรัมต่อกรัมกระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น

Table 21. Changes in ascorbic acid (mg/g sample), total phenolic contents and total anthocyanin contents of concentrated roselle extract products during storage in the presence and absence of light at 27.0±1.0 °C for 0, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 months

Storage time (months)	Ascorbic acid contents (mg/g sample)		Total phenolic contents (mg GAE/g sample)		Total anthocyanin contents (mg/l sample)	
	Presence of light	Absence of light	Presence of light	Absence of light	Presence of light	Absence of light
0	22.70±2.65 ^{aNS}	22.70±2.65 ^{aNS}	21.54±0.21 ^{aNS}	21.54±0.21 ^{aNS}	279.54±5.82 ^{aNS}	279.54±5.82 ^{aNS}
2	18.69±2.62 ^{bb}	20.59±1.66 ^{aa}	7.13±0.19 ^{bb}	9.98±0.16 ^{ba}	132.17±8.70 ^{bb}	152.38±8.87 ^{ba}
4	15.64±0.95 ^{eb}	18.22±4.19 ^{ba}	6.68±0.12 ^{ens}	6.87±0.11 ^{ens}	82.33±4.10 ^{eb}	88.59±2.89 ^{ea}
6	13.08±1.39 ^{db}	17.14±3.35 ^{ca}	6.65±0.21 ^{ens}	6.78±0.13 ^{ens}	38.49±3.14 ^{db}	44.84±3.61 ^{da}
8	11.08±1.46 ^{db}	15.75±1.10 ^{ca}	6.36±0.46 ^{ens}	6.56±0.26 ^{ens}	20.71±2.86 ^{eb}	35.15±8.42 ^{ca}
10	6.23±2.36 ^{eb}	12.85±1.07 ^{da}	6.30±0.21 ^{ens}	6.44±0.39 ^{ens}	19.87±1.95 ^{eb}	24.30±7.72 ^{fa}
12	2.92±0.50 ^{fb}	8.99±2.28 ^{ca}	6.22±0.22 ^{ens}	6.26±0.07 ^{ens}	19.46±0.86 ^{eb}	22.04±4.38 ^{fa}

*Means±standard deviation within the same row with different letters are significantly different ($p<0.05$)

a, b... with the same superscripts in different storage times in the same column are not significantly different ($p\geq 0.05$)

A, B... with the same superscripts as compared between the presence and absence of light in the same row are not significantly different ($p\geq 0.05$)

NS...not significant difference among presence and absence of light at the same storage times ($p\geq 0.05$)

GAE, Gallic acid equivalents; Total phenolic contents, expressed as milligrams of gallic acid equivalents per gram of sample using gallic acid standard curve

Total anthocyanin contents, expressed as cyanidin 3-glucoside milligrams per liter of sample

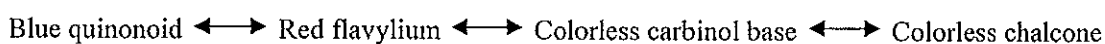
เมื่อศึกษาผลของแสงสว่างต่อปริมาณกรดแอสคอร์บิก พบว่า เมื่อเปรียบเทียบที่ระยะเวลาการเก็บรักษาเดียวกัน การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นในสภาวะที่มีและไม่มีแสงสว่าง ปริมาณกรดแอสคอร์บิกทั้งหมดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แสดงให้เห็นว่า การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดแอสคอร์บิกจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น ซึ่งการสลายตัวของกรดแอสคอร์บิกเป็นผลมาจากกระบวนการใช้และไม่ใช้ออกซิเจน โดยสภาวะบรรยากาศที่มีออกซิเจนในภาชนะบรรจุจะมีผลต่อการสูญเสียของกรดแอสคอร์บิกเมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลานานขึ้น โดยปัจจัยที่มีผลต่อการสูญเสียของกรดแอสคอร์บิกในผลิตภัณฑ์ที่ผ่านกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ ได้แก่ ระยะเวลา และอุณหภูมิในการเก็บรักษา หรือคุณสมบัติการซึมผ่านของออกซิเจนของภาชนะบรรจุ เป็นต้น ทั้งนี้ Fennema (1985) รายงานว่าการออกซิเดชันของกรดแอสคอร์บิกเกิดขึ้นโดยกรดแอสคอร์บิก (L-ascorbic acid) ถูกออกซิไดส์เป็นกรดดีไฮโดรแอสคอร์บิก (Dehydro-L-ascorbic acid) หลังจากนั้นเมื่อเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสจะเปลี่ยนมาเป็นสาร 2, 3-diketogulonic acid สอดคล้องกับ Belitz และ Grosch (1999 อ้างโดย บุศรารัตน์ สายเชื้อ, 2545) ที่รายงานว่าเป็นกรด (ค่าพีเอช 2.0-4.0) สาร 2,3-diketogulonic acid สามารถสลายตัวต่อไปเป็นสารประกอบเฟอฟูรอล จากนั้นจะสามารถเกิดปฏิกิริยากับหมู่แอลดีไฮด์ (Aldehyde) และคีโต ซึ่งพบในน้ำตาลรีดิวซ์ซิง และหมู่อะมิโน กลายเป็นสารประกอบสีน้ำตาล จากงานวิจัยนี้จะเห็นได้ว่า เมื่อเปรียบเทียบที่ระยะเวลาการเก็บรักษาเดียวกัน สภาวะการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นในสภาวะที่ไม่มีแสงสว่างจะมีปริมาณกรดแอสคอร์บิกที่คงเหลือสูงกว่าการเก็บรักษาในสภาวะที่มีแสงสว่าง และเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาที่นานเพิ่มขึ้น จะส่งผลให้ปริมาณกรดแอสคอร์บิกมีปริมาณลดลงเช่นกัน

ค่าเฉลี่ยของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นในระหว่างการเก็บรักษาในสภาวะที่มีและไม่มีแสงสว่าง ที่อุณหภูมิ 27.0 ± 1.0 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 เดือน ดังแสดงใน Table 21 จากการทดลองพบว่า เมื่อศึกษาผลของระยะเวลาการเก็บรักษาต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น พบว่า การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นในสภาวะที่มีแสงสว่างเป็นระยะเวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 เดือน ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในเดือนที่ 0 มีค่าเท่ากับ 21.54 ± 0.21 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมตัวอย่าง (ผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น) และมีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็ว เมื่อผ่านการเก็บรักษานาน 2 เดือน และเมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการเก็บรักษา 12 เดือน พบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดลดลงเหลือ เท่ากับ 6.22 ± 0.22 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมตัวอย่าง เช่นเดียวกับการเก็บรักษาในสภาวะที่ไม่มี

แสงสว่าง เป็นระยะเวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 เดือน พบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด มีปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เช่นกัน และเมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการเก็บรักษา 12 เดือน ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดลดลงคงเหลือ เท่ากับ 6.26 ± 0.07 มิลลิกรัมสมมูลย์ของกรด แกลลิกต่อกรัมตัวอย่าง และเมื่อศึกษาผลของแสงสว่างต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด พบว่า เมื่อเปรียบเทียบที่ระยะเวลาการเก็บรักษาเดียวกัน การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นทั้งในสถานะที่มีและไม่มีแสงสว่าง ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด มีปริมาณลดลง ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \geq 0.05$) ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษานาน 12 เดือน สอดคล้องกับ สุขมณฑา วัฒนสินธุ์ (2550) ซึ่งรายงานไว้ว่า เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้นจะทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดลดลง อาจมีสาเหตุมาจากสารประกอบฟีนอลิก สามารถสร้างพันธะ กับสารประกอบฟีนอลิกด้วยกัน ได้เป็นสารประกอบฟีนอลิกเชิงซ้อน และสารประกอบฟีนอลิก เชื่อมกับน้ำตาล โดยขั้นตอนเอสเทอร์ริฟิเคชัน (Esterification) ได้เป็นสารประกอบฟีนอลิกเชิงซ้อน เช่นกัน จากงานวิจัยนี้จะเห็นได้ว่า เมื่อเปรียบเทียบที่ระยะเวลาการเก็บรักษาเดียวกัน การเก็บรักษา ผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นในสถานะที่ไม่มีแสงสว่าง จะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ทั้งหมดสูงกว่าการเก็บรักษาในสถานะที่มีแสงสว่าง ขณะเดียวกันเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษา นานขึ้น จะส่งผลให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมีปริมาณลดลงเช่นกัน

ค่าเฉลี่ยของปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในรูปไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ ของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น ในระหว่างระยะเวลาการเก็บรักษาในสถานะที่มีและไม่มีแสงสว่าง ที่อุณหภูมิ 27.0 ± 1.0 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 เดือน ดังแสดงใน Table 21 จากการทดลองพบว่า เมื่อศึกษาผลของระยะเวลาการเก็บรักษาต่อปริมาณแอนโทไซยานิน ทั้งหมดในรูปไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ พบว่า การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น ในสถานะที่มีแสงสว่าง เป็นระยะเวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 เดือน ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด ในรูปไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ มีปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยพบว่าปริมาณ แอนโทไซยานินทั้งหมดในรูปไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ ในเดือนที่ 0 มีค่าเท่ากับ 279.54 ± 5.82 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ไว้นาน 12 เดือน พบว่ามีปริมาณลดลง คงเหลือเท่ากับ 19.46 ± 0.86 มิลลิกรัมต่อลิตร เช่นเดียวกับการเก็บรักษาในสถานะที่ไม่มีแสงสว่าง เป็นระยะเวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 เดือน พบว่า ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในรูปไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ มีปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เช่นกัน โดยพบว่าเมื่อเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ไว้นาน 12 เดือน ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในรูปไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ ลดลงคงเหลือเท่ากับ 22.04 ± 4.38 มิลลิกรัมต่อลิตร กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น และเมื่อศึกษาผลของแสงสว่างต่อปริมาณ แอนโทไซยานินทั้งหมดในรูปไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ พบว่า เมื่อเปรียบเทียบที่ระยะเวลาการเก็บ

รักษาเดียวกัน การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น ในสภาวะที่มีและไม่มีแสงสว่าง ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในรูปไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์มีปริมาณลดลงแตกต่างกันอย่าง มีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษานาน 12 เดือน ซึ่งการลดลงของปริมาณ แอนโทไซยานินทั้งหมดในรูปไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ อาจเนื่องมาจากอุณหภูมิในการเก็บรักษา มีผลทำให้แอนโทไซยานินในรูปไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ ถูกทำลายหรือเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง ไปอยู่ในรูปอนุพันธ์อื่นของแอนโทไซยานิน ซึ่งการที่ความเข้มของสีแอนโทไซยานินลดลงไม่ได้ เกิดจากปฏิกิริยาสีน้ำตาล แต่เกิดเนื่องจากกรดตัวแอนโทไซยานินเกิดการสลายตัวอันเนื่องมาจาก ความร้อน ตามด้วยการเกิดสารประกอบที่มีสีน้ำตาล (Tsai and Huang, 2004) สอดคล้องกับ Aina และ Shodipe (2006) ที่รายงานว่าการเก็บรักษาน้ำกระเจี๊ยบแดงแห้ง เมื่อผ่านการสกัดด้วยน้ำ โดยการใส่กระเจี๊ยบแดงแห้ง 20 มิลลิกรัมต่อน้ำ 1 ลิตร แล้วเติมด้วยน้ำตาลซูโครส 10 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด เท่ากับ 8.35 องศาบริกซ์ และให้ความร้อน จนกระทั่งอุณหภูมิของน้ำกระเจี๊ยบแดงแห้ง เท่ากับ 80.0 องศาเซลเซียส แล้วจึงบรรจุขณะร้อนลง ขวดแก้ว ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว ปิดฝาให้สนิทแล้วทำให้เย็นทันที หลังจากนั้นนำมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 28.0 ± 1.0 องศาเซลเซียส นาน 8 สัปดาห์ พบว่าปริมาณ แอนโทไซยานินทั้งหมดในรูปไซยานิดิน 3-กาแลคโตไซด์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) จากปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดเริ่มต้น เท่ากับ 9.09 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตรของน้ำกระเจี๊ยบ แดง คงเหลือเท่ากับ 4.13 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตรของน้ำกระเจี๊ยบแดง เมื่อเก็บรักษานาน 8 สัปดาห์ ซึ่ง Francis (1989) อ้างโดย Aina and Shodipe, (2006) รายงานว่า การมีน้ำตาลเป็น องค์ประกอบในผลิตภัณฑ์แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิสูง จะมีผลในการเร่งอัตราการสลายตัวของ แอนโทไซยานินให้เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ บุศรารัตน์ สายเชื้อ (2545) ยังรายงานว่าการลดลงของ ปริมาณแอนโทไซยานิน อาจเกิดจาก 2 กลไก คือ เกิดจากการสลายตัวของแอนโทไซยานินเอง หรือ เกิดจากปฏิกิริยาโพลีเมอร์ไรซ์เซชันของแอนโทไซยานินเกิดเป็น Polymeric pigments สอดคล้อง กับ ยูหาพร ผลาจรศักดิ์ (2547) ที่รายงานว่า ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง (30.0 องศาเซลเซียส) แอนโทไซยานินจะเกิดการเปลี่ยนแปลงได้มากกว่าสภาวะที่มีอุณหภูมิต่ำ (4.0 องศาเซลเซียส) เนื่องจากในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงจะทำให้สมดุลของแอนโทไซยานินเลื่อนจากซ้ายไปขวา ดังนี้



การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวทำให้เกิดชาลโคินมากขึ้น ขณะที่ปริมาณฟลาโวลีเทียม แคนโทออน ลดลง ทำให้ความคงตัวของสีแดงของแอนโทไซยานินลดลงด้วยเช่นกัน จึงอาจกล่าว ได้ว่า การเปลี่ยนแปลงของแอนโทไซยานินจะเกิดได้มากที่สุด เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงและ

มีแสงสว่าง เนื่องจากสภาวะที่มีอนุมูลสูงจะก่อให้เกิดซาลโคน แล้วยังพบว่าแสงสว่างจะเป็นตัวเร่งให้คาร์บินอล เบส เปลี่ยนเป็นซาลโคนได้เร็วขึ้น ซึ่งเป็นผลมาจาก Photo-oxidation ดังนั้นอนุมูลสูงและแสงสว่างจึงเป็นปัจจัยส่งเสริมให้อัตราการเกิดซาลโคนเพิ่มขึ้น และยิ่งค่าพีเอชของสารละลายสูงขึ้น การเปลี่ยนแปลงจะเกิดได้มากขึ้นเช่นกัน นอกจากนี้ยังพบว่า ระยะเวลาการเก็บรักษายังมีผลต่อความคงตัวของแอนโทไซยานิน กล่าวคือ เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้นความคงตัวของแอนโทไซยานินจะลดลง การลดลงของแอนโทไซยานินจะเร็วหรือช้าขึ้นอยู่กับปัจจัยที่มากระตุ้น ได้แก่ อนุมูล และแสงสว่าง เห็นได้จากในสภาวะที่มีอนุมูลสูงและมีแสงสว่างจะเร่งให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของแอนโทไซยานินได้เร็วมากยิ่งขึ้น (ยูพาพร ผลาจรศักดิ์, 2547) จากงานวิจัยนี้จะเห็นได้ว่า เมื่อเปรียบเทียบที่ระยะเวลาการเก็บรักษาเดียวกัน การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นในสภาวะที่ไม่มีแสงสว่าง จะมีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในรูปไซยานินดิน 3-กลูโคไซด์ สูงกว่าการเก็บรักษาในสภาวะที่มีแสงสว่าง และเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้น จะส่งผลให้ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในรูปไซยานินดิน 3-กลูโคไซด์ มีปริมาณลดลงเช่นกัน

3.2 สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ

สมบัติการต้านอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น ในระหว่างการเก็บรักษา ในสภาวะที่มีและไม่มีแสงสว่าง ที่อุณหภูมิ 27.0 ± 1.0 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 เดือน ดังแสดงใน Table 22 โดยการวัดสมบัติการจับอนุมูล DPPH รายงานค่าที่วัดได้ในรูปค่า EC_{50} วัดสมบัติการจับอนุมูล ABTS และความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกไอออน (FRAP) รายงานค่าที่วัดได้ในรูปไมโครโมลสมมูลย์ของโทรลอคซ์ต่อกรัมตัวอย่าง จากการทดลองพบว่า เมื่อศึกษาผลของระยะเวลาการเก็บรักษาต่อสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น พบว่า การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น ในสภาวะที่มีแสงสว่าง เป็นระยะเวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 เดือนสมบัติการจับอนุมูล DPPH สมบัติการจับอนุมูล ABTS และความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกไอออน (FRAP) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยมีค่า EC_{50} เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่นานขึ้น เห็นได้จากค่า EC_{50} ในเดือนที่ 0 และเมื่อเก็บรักษาไว้นาน 12 เดือน มีค่าเท่ากับ 330.30 ± 35.94 และ 568.95 ± 23.53 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เช่นเดียวกับการเก็บรักษาในสภาวะที่ไม่มีแสงสว่าง เป็นระยะเวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 เดือน พบว่า สมบัติการจับอนุมูล DPPH ลดลง โดยมีค่า EC_{50} เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่นานขึ้น ($p < 0.05$) เช่นกัน ซึ่งเมื่อเก็บรักษาไว้นาน 12 เดือน มีค่า EC_{50} เท่ากับ 523.62 ± 29.61 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Table 22. Changes in antioxidant properties (by DPPH, ABTS and FRAP assay) of concentrated roselle extract products during storage in the presence and absence of light at 27.0±1.0 °C for 0, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 months

Storage time (months)	DPPH, EC ₅₀ (µg/ml)		ABTS, TEAC (µmol TE/g)		FRAP, TEAC (µmol TE/g)	
	Presence of light	Absence of light	Presence of light	Absence of light	Presence of light	Absence of light
0	330.30±35.94 ^{eNS}	330.30±35.94 ^{eNS}	32.65±0.85 ^{aNS}	32.65±0.85 ^{aNS}	56.31±0.84 ^{aNS}	56.31±0.84 ^{aNS}
2	423.36±29.49 ^{bA}	389.28±27.13 ^{eb}	23.72±0.63 ^{bNS}	25.95±2.76 ^{bNS}	44.45±0.39 ^{bb}	46.82±0.77 ^{bA}
4	474.94±27.74 ^{ca}	407.24±16.23 ^{eb}	23.03±0.43 ^{bb}	25.04±0.23 ^{ba}	44.12±0.46 ^{bb}	45.86±0.35 ^{ca}
6	530.94±36.17 ^{ba}	470.38±38.51 ^{bb}	20.80±0.94 ^{eb}	22.68±1.00 ^{ca}	42.40±0.46 ^{eb}	43.26±0.25 ^{da}
8	542.18±24.76 ^{ca}	507.58±16.64 ^{eb}	20.32±1.16 ^{eNS}	21.09±0.45 ^{dNS}	40.14±0.12 ^{db}	41.48±0.16 ^{ca}
10	549.96±16.28 ^{ca}	512.19±26.75 ^{eb}	20.11±0.77 ^{eNS}	20.74±0.72 ^{eNS}	39.98±0.87 ^{dNS}	40.46±0.20 ^{eNS}
12	568.95±23.53 ^{ca}	523.62±29.61 ^{eb}	18.45±0.86 ^{db}	19.63±0.57 ^{da}	38.79±0.23 ^{eb}	39.59±0.21 ^{ba}

*Means±standard deviation within the same row with different letters are significantly different ($p<0.05$)

a, b... with the same superscripts in different storage times in the same column are not significantly different ($p\geq0.05$)

A, B... with the same superscripts as compared between the presence and absence of light in the same row are not significantly different ($p\geq0.05$)

NS...not significant difference among presence and absence of light in the same storage times ($p\geq0.05$)

DPPH and ABTS radical scavenging activity; FRAP, Ferric reducing antioxidant power; DPPH assay, expressed as EC₅₀ and The EC₅₀ of BHT standard = 13.82±0.38 µg/ml

EC₅₀, Efficient concentration, the amount of fresh roselle extract (µg) needed for 50% decreasing in the initial DPPH concentration per 1.0 ml of initial solution

ABTS and FRAP assays, expressed as millimoles Trolox equivalents per gram extract using Trolox standard curve; TEAC, Trolox equivalents antioxidant capacity

TE, Trolox equivalents, millimolar of Trolox solution having an antioxidant capacity equivalent to 1.0 gram of the substance under investigation

เมื่อวิเคราะห์สมบัติการจับอนุมูล ABTS พบว่า สมบัติการจับอนุมูล ABTS มีแนวโน้มลดลง เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้น โดยพบว่าในเดือนที่ 0 และเมื่อเก็บรักษาในสภาวะที่มีแสงสว่างนาน 12 เดือน สมบัติการจับอนุมูล ABTS ที่แสดงในรูป TEAC มีค่าเท่ากับ 32.65 ± 0.85 และ 18.45 ± 0.86 ไมโคร โมลสมมูลย์ของโทรลอกซ์ต่อกรัมตัวอย่าง ตามลำดับ และเมื่อเก็บรักษาในสภาวะที่ไม่มีแสงสว่าง เป็นระยะเวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 เดือน พบว่า สมบัติการจับอนุมูล ABTS ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เช่นกัน โดยเมื่อเก็บรักษาไว้นาน 12 เดือน สมบัติการจับอนุมูล ABTS ที่แสดงในรูป TEAC มีค่าเท่ากับ 19.63 ± 0.57 ไมโคร โมลสมมูลย์ของโทรลอกซ์ต่อกรัมตัวอย่าง นอกจากนี้ เมื่อวัดความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกไอออน (FRAP) พบว่า การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นในสภาวะที่มีแสงสว่าง เป็นระยะเวลา 12 เดือน ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกไอออน (FRAP) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เห็นได้จากความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกไอออน (FRAP) ที่แสดงในรูป TEAC ในเดือนที่ 0 และเมื่อเก็บรักษาไว้นาน 12 เดือน ซึ่งมีค่าเท่ากับ 56.31 ± 0.84 และ 38.79 ± 0.23 ไมโคร โมลสมมูลย์ของโทรลอกซ์ต่อกรัมตัวอย่าง ตามลำดับ เช่นเดียวกับการเก็บรักษาในสภาวะที่ไม่มีแสงสว่าง เป็นระยะเวลา 12 เดือน ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกไอออน (FRAP) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เช่นกัน โดยมีค่า TEAC ลดลงเหลือ เท่ากับ 39.59 ± 0.21 ไมโคร โมลสมมูลย์ของโทรลอกซ์ต่อกรัมตัวอย่าง เมื่อศึกษาผลของแสงสว่างต่อสมบัติการจับอนุมูล DPPH สมบัติการจับอนุมูล ABTS และความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกไอออน (FRAP) พบว่า เมื่อเปรียบเทียบที่ระยะเวลาการเก็บรักษาเดียวกัน การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นในสภาวะที่มีแสงสว่าง สมบัติการจับอนุมูล DPPH สมบัติการจับอนุมูล ABTS และความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกไอออน (FRAP) ลดลงสูงกว่าการเก็บรักษาในสภาวะที่ไม่มีแสงสว่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ซึ่ง Wang และคณะ (1997 อ้างโดย Rapisada *et al.*, 2008) ได้รายงานไว้ว่า สารแอนโทไซยานินในรูปอนุพันธ์ไฮยานิดิน 3-กลูโคไซด์ มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าแอนโทไซยานินในรูปอนุพันธ์อื่น แต่สมบัติการต้านอนุมูลอิสระของแอนโทไซยานินอาจลดลงตามระยะเวลาในการเก็บรักษาที่นานขึ้น สอดคล้องกับ Jackman และ Smith (1996) ที่รายงานไว้ว่า แสงสว่างเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่เร่งการสลายตัวหรือการเปลี่ยนแปลง โครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิก เช่น หมู่ไฮดรอกซิล (OH-group) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ในโมเลกุลของแอนโทไซยานินจะสามารถเรืองแสงและไวต่อการสลายตัวเมื่อโดนแสงสว่าง นอกจากนี้แสงสว่างยังเป็นปัจจัยเร่งให้เกิดการสลายตัวเนื่องจากความร้อนให้เกิดเร็วขึ้นด้วย และยังรายงานไว้ว่า ความคงตัวของสารประกอบฟีนอลิกในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจะขึ้นอยู่กับปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง

แอนโทไซยานินในผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นมีปริมาณสารสำคัญดังกล่าวลดลง จึงส่งผลให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ทั้งสมบัติการจับอนุมูล DPPH สมบัติการจับอนุมูล ABTS รวมทั้งความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกไอออน (FRAP) ของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นลดลงเช่นกัน

3.3 คุณภาพทางจุลินทรีย์ และทางประสาทสัมผัส

เมื่อตรวจคุณภาพทางจุลินทรีย์โดยการตรวจปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด และปริมาณยีสต์และราของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น พบว่า เมื่อเก็บรักษาผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นในสถานะที่ไม่มีแสงสว่าง (บรรจุกล่องกระดาษขาวเทา Duplex board) ที่อุณหภูมิ 4.0 ± 1.0 และ 27.0 ± 1.0 องศาเซลเซียส นาน 12 เดือน พบว่า ผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นมีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (1-5 CFU/ml concentrated roselle extract) และปริมาณยีสต์และรา (1-5 CFU/ml concentrated roselle extract) ซึ่งคุณภาพของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นยังเป็นไปตามข้อกำหนดมาตรฐานเครื่องดื่มในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท (ประกาศกระทรวงสาธารณสุข, 2543) โดยผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น มีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 2.72-2.80 จึงจัดเป็นผลิตภัณฑ์อาหารประเภทกรด (ค่าพีเอช น้อยกว่า 4.6)

คุณภาพทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4.0 ± 1.0 และ 27.0 ± 1.0 องศาเซลเซียส นาน 0 และ 12 เดือน ดังแสดงใน Table 24 โดยการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นในเดือนที่ 0 และเมื่อเก็บรักษานาน 12 เดือน โดยใช้ผู้ทดสอบชิมที่ผ่านการทดสอบชิมผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นมาแล้ว จำนวน 12 คน จากการประเมินพบว่า เมื่อเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิ 4.0 ± 1.0 และ 27.0 ± 1.0 องศาเซลเซียส นาน 12 เดือน คะแนนความชอบโดยเฉลี่ยในคุณลักษณะด้านสี เท่ากับ 7.92 และ 6.00 ความหวาน เท่ากับ 7.50 และ 6.50 ความเปรี้ยว เท่ากับ 7.25 และ 6.67 ความรู้สึกภายในปาก เท่ากับ 7.17 และ 6.75 และการยอมรับโดยรวม เท่ากับ 7.42 และ 6.58 ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นว่าระดับคะแนนความชอบเฉลี่ยอยู่ในช่วง 6.0-7.0 (ชอบน้อยที่สุดถึงชอบปานกลาง) เช่นเดียวกับคะแนนความชอบโดยเฉลี่ยของผลิตภัณฑ์ทางการค้าเบอร์รี่สกัดเข้มข้น (ช็อคคววม) ที่อุณหภูมิ 27.0 ± 1.0 องศาเซลเซียส ซึ่งมีคะแนนความชอบโดยเฉลี่ยในคุณลักษณะด้านสี เท่ากับ 7.33 ความหวาน เท่ากับ 7.17 ความเปรี้ยว เท่ากับ 6.42 ความรู้สึกภายในปาก เท่ากับ 7.00 และการยอมรับโดยรวม เท่ากับ 6.83 ซึ่งระดับคะแนนความชอบอยู่ในช่วง 6.0-7.0 (ชอบน้อยที่สุดถึงชอบปานกลาง) เช่นกัน ทั้งนี้การเปลี่ยนแปลงทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นในระหว่างการเก็บรักษา อาจมีสาเหตุมาจากการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางกายภาพและเคมีของผลิตภัณฑ์ ซึ่งการเก็บรักษาที่อุณหภูมิบรรยากาศปกติ (27.0 ± 1.0 องศาเซลเซียส)

จะทำให้ผลิตภัณฑ์มีสีคล้ำขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4.0 ± 1.0 องศาเซลเซียส และเมื่อทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสซึ่งได้รับคะแนนการยอมรับ โดยเฉลี่ยลดลง เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิบรรยากาศปกติ จากงานวิจัยนี้จึงสรุปได้ว่า เมื่อพิจารณาคุณภาพทางด้าน จุลินทรีย์และทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นที่ผ่านการเก็บรักษา ที่อุณหภูมิ 4.0 ± 1.0 และ 27.0 ± 1.0 องศาเซลเซียส นาน 12 เดือน คุณภาพของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดง สกัดเข้มข้นยังอยู่ในระดับที่ยอมรับของผู้บริโภค เมื่อเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ทางการค้า เบอริสสกัดเข้มข้น

Table 23. The sensory evaluation of concentrated roselle extract product during storage at 4.0 °C and 27.0 °C for 0 and 12 months

Storage Time (months)	Mean scores of sensory evaluation/sensory attributes					
	Color		Sweetness		Sourness	
	4.0 °C	27.0 °C	4.0 °C	27.0 °C	4.0 °C	27.0 °C
0	8.08±0.67 ^{aNS}	8.08±0.67 ^{aNS}	7.58±0.51 ^{aNS}	7.58±0.51 ^{aNS}	7.83±0.72 ^{aNS}	7.83±0.72 ^{aNS}
12	7.92±0.51 ^{bA}	6.00±1.35 ^{bb}	7.50±0.90 ^{bA}	6.50±1.51 ^{bb}	7.25±0.97 ^{bA}	6.67±1.30 ^{bb}

*storage temperature of 4.0±1.0 °C and 27.0±1.0 °C

Means±standard deviation within the same row with different letters are significantly different ($p<0.05$)

a, b... with the same superscripts in different storage times in the same column are not significantly different ($p\geq 0.05$)

A, B... with the same superscripts as compared between the presence and absence of light in the same row are not significantly different ($p\geq 0.05$)

NS...not significant difference among presence and absence of light in the same storage times ($p\geq 0.05$)

Table 23. The sensory evaluation of concentrated roselle extract product during storage at 4.0 °C and 27.0 °C for 0 and 12 months (Cont.)

Storage Time (months)	Mean scores of sensory evaluation/sensory attributes			
	Mouthfeel		Overall acceptability	
	4.0 °C	27.0 °C	4.0 °C	27.0 °C
0	7.83±0.72 ^{ANS}	7.83±0.72 ^{ANS}	7.83±0.58 ^{ANS}	7.83±0.58 ^{ANS}
12	7.17±0.94 ^{bA}	6.75±1.22 ^{bB}	7.42±1.00 ^{bA}	6.58±1.08 ^{bB}

*storage temperature of 4.0±1.0 °C and 27.0±1.0 °C

Means±standard deviation within the same row with different letters are significantly different ($p < 0.05$)

a, b... with the same superscripts in different storage times in the same column are not significantly different ($p \geq 0.05$)

A, B... with the same superscripts as compared between the presence and absence of light in the same row are not significantly different ($p \geq 0.05$)

NS...not significant difference among presence and absence of light in the same storage times ($p \geq 0.05$)

บทที่ 4

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการทดลอง

1. การทำแห้งกระเจี๊ยบแดงมีผลทำให้ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในรูปไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณกรดแอสคอร์บิก และสมบัติการจับอนุมูล ABTS ของน้ำกระเจี๊ยบแดงสดสูงกว่าน้ำกระเจี๊ยบแดงแห้งอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ขณะที่สมบัติการจับอนุมูล DPPH และความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริกไอออน (FRAP) ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \geq 0.05$) กระเจี๊ยบแดงแห้งที่ได้ยังคงมีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในรูปไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณกรดแอสคอร์บิก และสมบัติการต้านอนุมูลอิสระในปริมาณค่อนข้างสูง เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณดังกล่าวของกระเจี๊ยบแดงสด จึงทำให้กระเจี๊ยบแดงแห้งยังคงมีศักยภาพสูงในการนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อาหารต่อไป

2. อุณหภูมิและระยะเวลาในขั้นตอนการสกัดและการทำให้เข้มข้นที่เพิ่มสูงขึ้นมีผลทำให้สารสำคัญในกระเจี๊ยบแดงจำพวกกรดแอสคอร์บิก สารประกอบฟีนอลิก รวมทั้งแอนโทไซยานินถูกทำลายด้วยความร้อนในระหว่างการสกัดและการทำให้เข้มข้น ส่งผลให้ปริมาณกรดแอสคอร์บิก ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในรูปไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ มีปริมาณดังกล่าวลดลง ตลอดจนทำให้สมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงลดลงด้วยเช่นกัน

3. การพาสเจอร์ไรซ์ผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น ที่อุณหภูมิ 85.0 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ทำให้ผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นที่ได้มีคุณภาพทางจุลินทรีย์และปริมาณโลหะหนัก (ตะกั่ว เหล็ก และดีบุก) เป็นไปตามข้อกำหนดเรื่องอาหารบรรจุในภาชนะบรรจุปิดสนิทของกระทรวงสาธารณสุข มีปริมาณวิตามินเอและวิตามินอีคงเหลือ เท่ากับ 57.69% และ 95.33% ตามลำดับ โดยเปรียบเทียบกับร้อยละของปริมาณสารอาหารที่แนะนำให้บริโภคต่อวันสำหรับคนไทยอายุตั้งแต่ 6 ปีขึ้นไป (%Thai RDI) นอกจากนี้การพาสเจอร์ไรซ์ยังมีผลทำให้ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในรูปไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณกรดแอสคอร์บิก และสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นมีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็ว เมื่อเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นก่อนกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์

4. เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้น ส่งผลให้ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในรูปไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณกรดแอสคอร์บิก และสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นในสถานะที่ไม่มีแสงสว่าง มีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในรูปไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณกรดแอสคอร์บิก และสมบัติการต้านอนุมูลอิสระคงเหลือสูงกว่าการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ในสถานะที่มีแสงสว่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และพบว่า การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นที่อุณหภูมิ 4.0 ± 1.0 และ 27.0 ± 1.0 องศาเซลเซียส นาน 12 เดือน ผลิตภัณฑ์ยังคงมีคุณภาพเป็นไปตามข้อกำหนดเรื่องอาหารบรรจุในภาชนะบรรจุปิดสนิทตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข และมีค่าเฉลี่ยของคะแนนความชอบในคุณลักษณะด้านสี ความหวาน ความเปรี้ยว ความรู้สึกละคายในปาก และการยอมรับโดยรวม มีระดับคะแนนความชอบอยู่ในช่วง 6.0-7.0 (ชอบน้อยที่สุดถึงชอบปานกลาง)

การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นในสถานะที่ไม่มีแสงสว่างที่อุณหภูมิ 4.0 ± 1.0 องศาเซลเซียส เป็นสถานะการเก็บรักษาที่เหมาะสมที่สุดในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น เนื่องจากเมื่อพิจารณาคุณภาพทางจุลินทรีย์และประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นยังอยู่ในระดับที่ยอมรับของผู้บริโภค เมื่อเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ทางการค้าเบอร์สกัดเข้มข้น

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการปรับปรุงรสชาติ ด้านความเปรี้ยว และความหวานของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น โดยอาจศึกษาชนิดของสารให้ความหวานชนิดอื่น นอกเหนือจากการเติมน้ำผึ้ง และฟรุคโตส เพื่อให้ผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นมีรสชาติกลมกล่อมมากยิ่งขึ้น

2. อาจมีการพัฒนาผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น ด้วยการเติมส่วนผสมของน้ำผลไม้เข้มข้นชนิดอื่นๆ เช่น น้ำองุ่น น้ำแอปเปิ้ล และน้ำส้ม ซึ่งเป็นน้ำผลไม้ที่มีสารสำคัญในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเป็นองค์ประกอบ จำพวกสารประกอบฟีนอลิก แอนโทไซยานิน และกรดแอสคอร์บิก เป็นต้น ทั้งนี้เพื่อปรับปรุงรสชาติของผลิตภัณฑ์ และเพิ่มศักยภาพของผลิตภัณฑ์ให้มีสมบัติการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น

3. งานวิจัยนี้ ศึกษาผลของกระบวนการแปรรูปและสถานะการเก็บรักษาต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น โดยการวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ เคมี และสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้นในการศึกษาขั้นต่อไป อาจมีการวิเคราะห์ปริมาณ และจำแนกชนิดของสารสำคัญแอนโทไซยานินในผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นในระหว่าง

กระบวนการแปรรูปและการเก็บรักษา โดยอาศัยหลักการทางโครมาโตกราฟี เช่น การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC เพื่อสามารถหาปริมาณ และจำแนกชนิดของอนุพันธ์แอนโทไซยานินภายหลังกระบวนการแปรรูปและการเก็บรักษาได้

4. งานวิจัยนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อทำการผลิตผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น โดยใช้วิธีการทำให้เข้มข้นภายใต้สภาวะสุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 70.0 องศาเซลเซียส ความดัน 44.0 เซนติเมตรปรอท เพื่อให้ได้สารสกัดกระเจี๊ยบแดงเข้มข้นมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเท่ากับ 25.0 องศาบริกซ์ ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมที่ทำให้สารสกัดกระเจี๊ยบแดงเข้มข้นมีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด (ปารมี ชุมศรี, 2550) และเพื่อเป็นไปตามมาตรฐานน้ำผลไม้เข้มข้น ซึ่งควรมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด ไม่ต่ำกว่า 20.0 องศาบริกซ์ นอกจากนี้วิธีการทำให้เข้มข้นเป็นวิธีการถนอมรักษาสารสกัดกระเจี๊ยบแดงจากกระเจี๊ยบแดงแห้งในรูปสารสกัดกระเจี๊ยบแดงเข้มข้น อย่างไรก็ตาม งานวิจัยนี้มีการนำสารสกัดกระเจี๊ยบแดงเข้มข้นมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเป็นผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น โดยผ่านการทำให้เจือจางของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงเข้มข้นด้วยน้ำ แล้วเมื่อวิเคราะห์คุณภาพผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น พบว่า ผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นมีการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางกายภาพ เคมี และสมบัติการต้านอนุมูลอิสระโดยรวมมีแนวโน้มลดลง เปรียบเทียบกับสารสกัดกระเจี๊ยบแดงเข้มข้นที่ผลิตได้ ดังนั้นในการศึกษาขั้นตอนต่อไป อาจมีการปรับสูตรส่วนผสมของผลิตภัณฑ์ โดยการเพิ่มปริมาณสารสกัดกระเจี๊ยบแดงเข้มข้นให้มีปริมาณเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสกัดเข้มข้นทางการค้า ได้แก่ เบอริสสกัดเข้มข้น 73.0%, พรุณสกัดเข้มข้น 93.9% และมัลต์เบอริสสกัดเข้มข้น 99.5% เป็นต้น โดยมีการปรับสูตรส่วนผสมของผลิตภัณฑ์ใหม่ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- เกษม ปราบริบูรณ์. 2521. การทำแห้ง. ใน การทำงานเป็นหน่วยในกระบวนการผลิตอาหาร. หน้า 155-185. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- จรงค์ แก้วประสิทธิ์, ธิตยาภรณ์ ประยูรมหิศร และ โสภิตา ภูมมาลา. 2545. ลูกหว่า ต้าน โรคภัย. ว. จารพ. 9: 59-62.
- ทงนง ภัครัชพันธุ์. 2543ก. อุตสาหกรรมเครื่องดื่ม. ใน วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 3 (คณาจารย์ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์). หน้า 405-418. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ทงนง ภัครัชพันธุ์. 2543ข. การถนอมอาหารโดยใช้ความร้อน. ใน วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 3 (คณาจารย์ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์). หน้า 115-130. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- นวลศรี รักษิธรรม และ อัญชญา เจนวิถีสุข. 2545. แอนติออกซิแดนซ์ สารต้านมะเร็งในผักสมุนไพรไทย. พิมพ์ครั้งที่ 2. นพบุรีการพิมพ์. เชียงใหม่.
- นันทวัน บุญยะประภัศร และอรนุช โชคชัยเจริญพร. 2541. กระเจี๊ยบแดง. ใน สมุนไพรไม้พื้นบ้าน. หน้า 14-16. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.
- นัยวิท เกลิมนนท์. 2538. การศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตและการใช้สีแดงธรรมชาติจากกลีบดอกกระเจี๊ยบแดง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- นิริยา รัตนาปนนท์. 2549. รงควัตถุ. ใน เคมีอาหาร. หน้า 421-428. โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ.
- บุศรารัตน์ สายเชื้อ. 2545. แอนโทไซยานินจากกระเจี๊ยบแดง *Hibiscus sabdariffa* L. เพื่อใช้เป็นสีผสมอาหาร. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ประกาศกระทรวงสาธารณสุข. 2543. มาตรฐานเครื่องดื่มในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท ฉบับที่ 214 (ออนไลน์). สืบค้นจาก : <http://www.fda.moph.go.th/fdanet/html> (21 พฤษภาคม 2550)

- ประกาศกระทรวงสาธารณสุข. 2549. อาหารในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท ฉบับ 301 (ออนไลน์).
สืบค้นจาก : <http://www.fda.moph.go.th/fdanet/html> (21 พฤษภาคม 2550)
- ประทีน หยกชัย และปราณี อำนวยเรือง. 2546. การผลิตเครื่องดื่มถั่วแดง *Phaseolus aureus* Roxb. ผงสำเร็จรูป. ว. อาหาร. 33: 134-145.
- ปณัฐชา ไชยมุติ. 2547. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพืชสมุนไพร 7 ชนิด. วิทยานิพนธ์
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ปัทมาพร โสภณัท. 2549. สมบัติทางกายภาพและสมบัติการต้านออกซิเดชันของผลมะกึ๋ยงใน
ระหว่างกระบวนการผลิตเครื่องดื่มผงและการเก็บรักษา. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร
มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยแม่โจ้.
- ปารมี ชุมศรี. 2550. การพัฒนาผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร
มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ปรียา วิบูลย์เศรษฐ์. 2543. การเฝ้าเสี่ยของอาหาร. ใน วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร. พิมพ์
ครั้งที่ 3 (คณาจารย์ภาควิชาวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรม
เกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์). หน้า 405-418. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ปุ่น คงเจริญเกียรติ และสมพร คงเจริญเกียรติ. 2541. บรรจุภัณฑ์อาหาร. ใน บรรจุภัณฑ์อาหาร. หน้า
19-68. ซีเอ็ดยูเคชั่น. กรุงเทพฯ.
- เพชรรัตน์ เฟ็งเจริญ และอิสราภรณ์ พาณิชย์เจริญรัตน์. 2549. ความเสถียรของแอนโทไซยานินของ
กระเจี๊ยบและอัญชันในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม. ภาควิชาคหกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัย
ศรีนครินทรวิโรฒ.
- เพียงใจ ดารีเข้าะ. 2550. การพัฒนากระบวนการผลิตซอสจากกระเจี๊ยบแดง. วิทยานิพนธ์วิทยา
ศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ไพโรจน์ วิริยจารี. 2539. อาหารกึ่งแห้ง. ภาควิชาเทคโนโลยีการพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรม
เกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

- ไพโรจน์ วิริยจารี. 2545. การทดสอบความชอบหรือการยอมรับรวมของผู้บริโภค. ใน การประเมินทางประสาทสัมผัส. พิมพ์ครั้งที่ 2. หน้า 208-242. ภาควิชาเทคโนโลยีการพัฒนาคัดภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- มลศิริ วีโรทัย. 2545. สารผสมอาหาร. ใน เทคโนโลยีของผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพ. หน้า 48-108. พัฒนาคุณภาพวิชาการ. กรุงเทพฯ.
- แม่น อมรสิทธิ์ และอมร เพชรสม. 2539. อัลตราไวโอเลตและวิธีเบิลสเปกโทรสโกปี. ใน หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ (Principle and Techniques of Instrumental Analysis). หน้า 33-98. กรุงเทพฯ.
- ยุพาพร ผลาขจรศักดิ์. 2547. การสกัดและความคงตัวของแอนโทไซยานินที่สกัดได้จากเปลือกมังคุด. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- วรารุณี ครุสง. 2539. การถนอมและแปรรูปอาหารด้วยความร้อน. ใน การถนอมและแปรรูปอาหาร. หน้า 87-142. มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมราช.
- วิภาวดี ประสาททอง, กุสุมาลย์ น้อยผา และอารุไร จิตต์สุรงค์. 2543. ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผักพื้นบ้านของไทย. คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- วิวัฒน์ หวังเจริญ. 2545. บทบาทของสารประกอบฟีนอลต่อสุขภาพ (Health benefits of phenolic compounds). ว. อาหาร 32: 245-253.
- สมทรง เลขะกุล. 2543ก. วิตามินเอ. ใน ชีวิตเคมีของวิตามิน. หน้า 14-42. ศูนย์วิชาการพิมพ์. กรุงเทพฯ.
- สมทรง เลขะกุล. 2543ข. วิตามินอี. ใน ชีวิตเคมีของวิตามิน. หน้า 90-103. ศูนย์วิชาการพิมพ์. กรุงเทพฯ.
- สมบัติ ขอทวีวัฒนา. 2529. กรรมวิธีการอบแห้ง. ภาควิชาพัฒนาคัดภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- สมบัติ ขอทวีวัฒนา. 2535. เทคโนโลยีการระเหยน้ำ. ภาควิชาพัฒนาคัดภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

สลักจิต ณะวงษ์. 2550. การพัฒนาน้ำลีนี่เสริมสารสกัดจากดอกอัญชัน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สิรินาด ตัณฑเกษม. 2545. การศึกษาสมบัติและความคงตัวของรงควัตถุแอนโทไซยานินจากดอกกระเจี๊ยบแดงในเซลล์. ว. อาหาร. 32: 124-130.

สุขสันต์ สุทธิผลไพบูลย์. 2546. น้ำผึ้งส่งออก. ข่าวสารเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 48: 1-13.

สุจิตตา เรืองรัมย์. 2546. Inulin และ Oligofructose เส้นใยอาหารที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย. ว. อาหาร. 33: 94-98.

สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2550. รู้จักสารเคมีจากพืชเพื่อนำมาพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพ. รายงานสัมมนาการสร้างมูลค่าเพิ่มของผลิตภัณฑ์จากพืชสมุนไพรไทย. ณ โรงแรมมิราเคิลแกรนด์ บางเขน. 23-24 มกราคม 2550. หน้า 1-40.

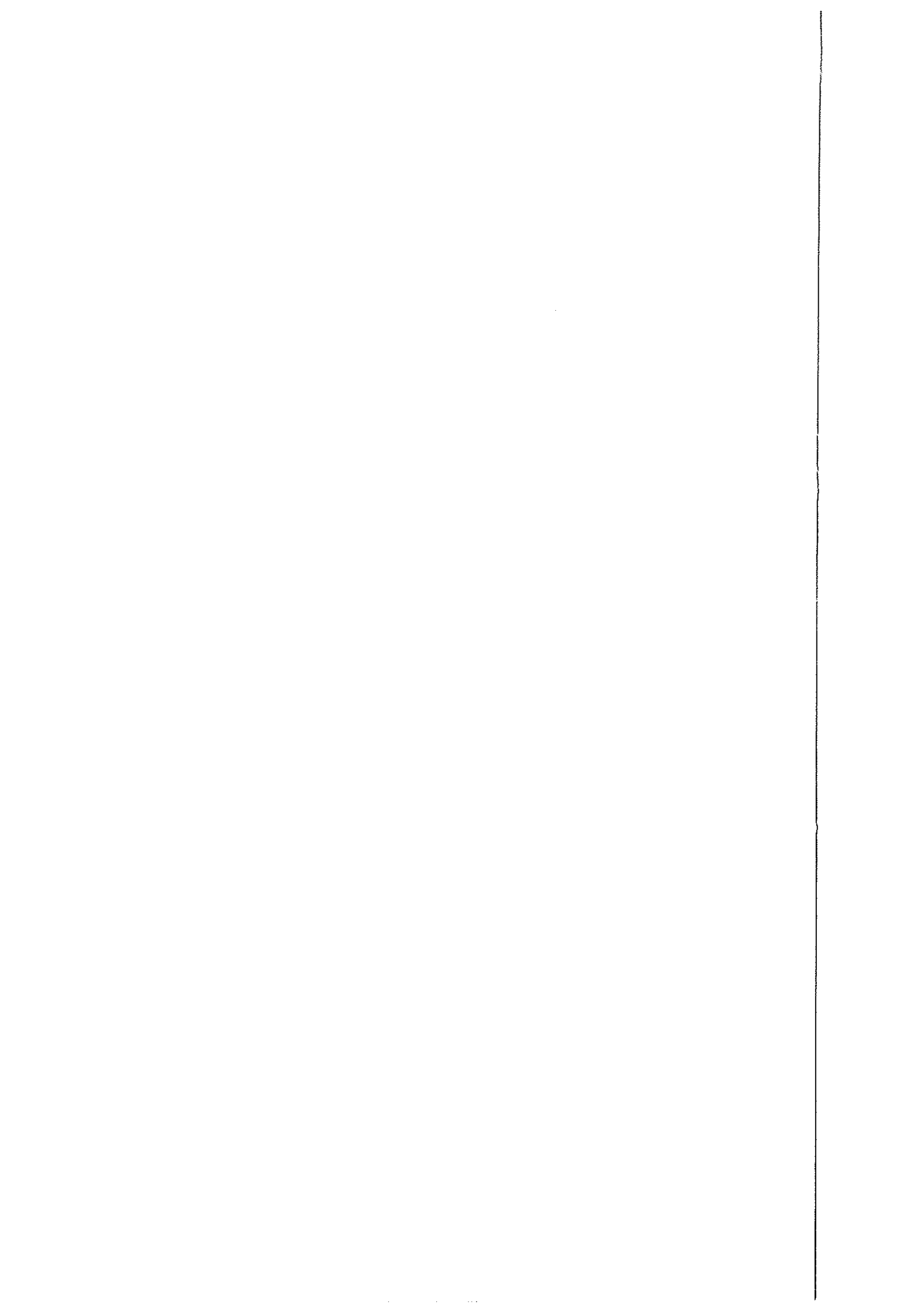
สุรพงษ์ เจริญรัต, ชัยรัตน์ ดุลยพัชร, แฉล้ม มาศวรรณ และปัญญา เอกมหาชัย. 2545. กระเจี๊ยบแดงพืชสมุนไพร. กสิกร. 75: 16-19.

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. 2547. อุณหภูมิที่ปลอดภัยในการเก็บรักษาอาหาร. (ออนไลน์). กระทรวงสาธารณสุข สถาบันวิจัยโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล.
สืบค้นจาก : <http://www.fda.moph.go.th/consumer/csma/csma.nsf/> (21 พฤษภาคม 2550)

อรวินท์ เลาหรัชตนันท์. 2539. ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับการถนอมและแปรรูปอาหาร. ใน การถนอมและแปรรูปอาหาร. หน้า 1-44. มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมราช.

อนุกุล วัฒนสุข และ โชคชัย ชีร์กุลเกียรติ. 2542. ปฏิบัติการเฉพาะหน่วยในอุตสาหกรรมอาหาร. ใน วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 2 (คณาจารย์ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์). หน้า 92-114. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

- อนุพงศ์ ศิริเมืองมูล, ฤดีวรรณ สุขใจ, นภาพร ศิระวัฒนาวงศ์ และวชิระ จิระรัตนรังษี. 2549. ผลของการแปรรูปโดยการใช้ความร้อนต่อคุณสมบัติของสารต้านอนุมูลอิสระในน้ำมะเข็ญ. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- อรุณพร อธิรัตน์, ถนอมจิต สุภาวิตา, สุทธิมาลย์ อิงคถาวรวงศ์, ศิริพันธุ์ หิรัญญะชาติธาดา, วันทนา เจริญมงคล, สิริรัศมี ปิ่นสุวรรณ, นิวัตติ แก้วประดับ, อัญชลี ศิริโชติ, จินดาพร ภูริพัฒนา วงษ์, สุวิภา อึ้งไพบูลย์, ฉัตรชัย วัฒนาภิรมสกุล, รัชฎ์เกียรติ จิรัญธร, ปราณี รัตนสุวรรณ, นีวรรณ อินทรักษา, โสภา คำมี และวีระวัฒน์ ศีลประชาวงศ์. 2548. การพัฒนาสารสกัดกระเจี๊ยบแดงเพื่อใช้ในเครื่องสำอาง และอาหารเสริมสุขภาพ. การเผยแพร่ผลงานวิจัยด้านการพัฒนาสมุนไพรเพื่ออุตสาหกรรม สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. หน้า 178-190.
- อรุษา เซาวนลิขิต และอรุณญา มิ่งเมือง. 2550. ปริมาณแอนโทไซยานินและปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของมังคุดและน้ำมังคุด. SWU Sci. 23: 68-78.
- Adanlawo, I.G. and Ajibade, V.A. 2006. Nutritive value of the two varieties of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) calyces soaked with wood ash. Pakistan J. Nutr. 5 : 555-557.
- Aina, J. O. and Shodipe, A. A. 2006. Colour stability and vitamin C retention of roselle juice (*Hibiscus sabdariffa* L.) in different packaging materials. Nutrition & Food Sci. 36 : 90-95.
- Akouwah, G. A., Mariam, A. and Chin, J. H. 2009. The effect of extraction temperature on total phenols and antioxidant activity of *Gynura procumbens* leaf. Phcog mag. 4 : 81-85.
- Al-kahtani, H. and Hassan, B. H. 1990. Spray drying of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract. J. Food Sci. 55 : 1073-1076.
- Alighourchi, H. and Barzegar, M. 2009. Some physiochemical characteristics and degradation kinetic of anthocyanin of reconstituted pomegranate juice during storage. J. Food En. 90 : 179-185.



- Cao, G., Verdon, C. P., Wu, A. H., Wang, H. and Prior, R. L. 1995. Automated oxygen radical absorbance capacity using the COBAS-FARA II. *Clin. Chem.* 41 : 1738-1744.
- Cao, G., Muccitelli, H. U., Sanchez-Moreno, C. and Prior, R. L. 2001. Anthocyanins are absorbed in glycosylated forms in elderly women: a pharmacokinetic study. *Am. J. Clin Nutr.* 73 : 920-926.
- Castaneda-Ovando, A., Pacheco-Hernandez, L., Paez-Hernandez, E., Rodriguez, J. A. and Galan-Vidal, C. A. 2009. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chem.* 113 : 859-871.
- Chirunthorn, R., Pinsuwan, S., Ungphaiboon, S., Sirichote, A., Ratanasuwan, P. and Itharat, A. 2004. Antioxidant and cytotoxicity activity against cancer cells of *Hibiscus sabdariffa*. In *Proceeding of the 10th World Congress on Clinical Nutrition*. Phuket Thailand. 30 November-3 December 2004. P. 188.
- Counsell, J. N. 1981. Natural colours for food and other uses. P. 167. Applied Science Publishers Ltd., London.
- Deman, J. M. 1990. Principle of Food Chemistry. Van Nostrand Reinhold. New York.
- Fasoyiro, S. B., Babalola, S. O. and Owosibo, T. 2005. Chemical composition and sensory quality of fruit-flavoured roselle (*Hibiscus sabdariffa*.) drinks. *World J. Agric. Sci.* 1 : 161-164.
- Fennema, O. R. 1985. Pigments and other colorants. In *Food Chemistry*. 2nd ed. (Francis, F. J., ed.). p. 545-584. Marcel Dekker. New York.
- Frank, T., Janben, M., Netzel, M., Strab, G., Kler, A., Kriesl, E. and Bitsch, I. 2005. Pharmacokinetics of anthocyanidin 3-glycosides following consumption of *Hibiscus sabdariffa* L. extract. *J. Clin Pharmacol.* 45 : 203-210.
- Fuleki, T. and Francis, F. J. 1968. Quantitative methods for anthocyanins and determination of total anthocyanin and degradation index for cranberry juice. *J. Food Sci.* 33 : 78-83.

- Fullerton, M. S.C., Verghese, M., Walker, L. T., Shackelford, L. A. and Cebert, E. 2008. Determination of antioxidant contents in red sorrel and its anticarcinogenic potential in azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci. *J. Phytochem.* 2 : 69-76.
- Garcia-Viguera, C. and Bridle, P. 1999. Influence of structure on colour stability of anthocyanins and flavylum salts with ascorbic acid. *Food Chem.* 64 : 21-26.
- Giusti, M. M. and Wrolstad, R. E. 1996. Characterization of red radish anthocyanins. *J. Food Sci.* 61 : 322-326.
- Giusti, M. M. and Wrolstad, R. E. 2001. Anthocyanins characterization and measurement with UV-visible spectroscopy. *In Current protocols in food analytical chemistry.* (Wrolstad, R. E. and Schwartz, S. J., ed.). p. 1-13. Wiley. New York.
- Gradinaru, G., Biliaderis, C. G., Kallithraka, S., Kefalás, P. and Garcia-Viguera, C. 2003. Thermal stability of *Hibiscus sabdariffa* L. anthocyanins in solution and in solid state: effects of copigmentation and glass transition. *Food Chem.* 83 : 423-436.
- Hirunpanich, N., Utaipat, A., Morales, N. P., Bunyapraphatsara, N., Sato, H., Herunsale, A. and Suthisisang, C. 2006. Hypocholesterolemic and antioxidant effects of aqueous extracts from the dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* L. in hypercholesterolemic rats. *J. Ethnopharma.* 103 : 252-260.
- Huang, D., Ou, B. and Prior, R. L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* 53 : 1841-1856.
- Jackman, R. L., Yada, R. Y., Yung, M. A. and Speers, R. A. 1987. Anthocyanins as food colorants. *J. Food Biochem.* 11 : 201-247.
- Jackman, R. L. and Smith, J. L. 1996. Anthocyanins and Betalains. *In Natural Food Colorant.* 2nd ed. (Hendry, G. A. F. and Houghton, J. D., ed.). p. 244-280. Blackie academic & professional. Glasglow. UK.

- Ju, Z. Y. and Howard, L. R. 2003. Effects of solvent and temperature on pressurized liquid extraction of anthocyanins and total phenolics from dried red grape skin. *J. Agric. Food Chem.* 51 : 5207-5213.
- Kalt, W., Madonald, J. E. and Donner, H. 2000. Anthocyanins, phenolics and antioxidant capacity of processed lowbush blueberry product. *J. Food Sci.* 65 : 390-393.
- Kim, D. O., Lee, K. W., Lee, H. J. and Lee, C. Y. 2002. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *J. Agric. Food Chem.* 50 : 3713-3717.
- Kim, D. O. and Padilla-Zakour, O. I. 2004. Jam processing effect on phenolics and antioxidant capacity in anthocyanin-rich fruits: cherry and raspberry. *J. Food Sci.* 69 : 395-400.
- Kirca, A., Ozkan, M. and Cemeroglu, B. 2007. Effects of temperature, solid content and pH on the stability of black carrot anthocyanins. *Food Chem.* 101 : 212-218.
- Klimczak, I., Malecka, M., Szlachta, M. and Gliszczynska-Swiglo, A. 2007. Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. *J. Food Comp and Anal.* 20 : 313-322.
- Klopotek, Y., Otto, K. and Bohm, V. 2005. Processing strawberries to different products alters contents of vitamin C, total phenolics, total anthocyanins and antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem.* 53 : 5640-5646.
- Ikawa, M., Schaper, T. D., Dollard, C. A. and Sasner, J. J. 2003. Utilization of Folin-Ciocalteu phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds. *J. Agric. Food Chem.* 51 : 1811-1815.
- Laleh, G.H., Frydoonfar, H., Heidary, R., Jameei, R. and Zare, S. 2006. The effect of light, temperature, pH and species on stability of anthocyanin pigments in four *berries* species. *Pakistan J. Nutr.* 5 : 90-92.

- Larrauri, J., Ruperez, P. and Saura-Calizto, F. 1997. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peel. *J. Agric. Food Chem.* 45 : 1390-1393.
- Lee, J. 2005. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants and wines by the pH differential method: collaborative study. *J. AOAC Int.* 88 : 1269-1278.
- Lees, D. H. and Francis, F. J. 1972. Standardization of pigment analyses in cranberries. *Hort Science.* 7 : 83-84.
- Lohachoompol, V., Srzednicki, G. and Craske, J. 2004. The change of total anthocyanins in blueberries and their antioxidant effect after drying and freezing. *J. Biomed. Biotech.* 5 : 248-252.
- Maccarone, E., Maccarrone, A. and Rapisarda, P. 1985. Stabilization of anthocyanins of blood orange fruit juice. 50 : 901-904.
- Mazza, G. and Miniati, E. 1993. *Anthocyanins in Fruits, Vegetables, and Grains.* CRC Press Inc. United States of America.
- Mazza, G. 2007. Bioactivity, absorption and metabolism of anthocyanins. *In Proceeding of Ist IS on Hum. Health Effects of F & V.* (Desjardins, Y., ed.), p. 117-125. Canada.
- Miliauskas, G., Venskutonis, P. R. and van Beek, T. A. 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chem.* 85 : 231-237.
- Miller, N. J. and Rice-Evans, C. A. 1997. Factors influencing the antioxidant activity determination by the ABTS^{•+} radical cation assay. *Free Radical Res.* 26 : 195-199.
- Mohammadi, A., Rafiee, S., Emam-Djomeh, Z. and Keyhani, A. 2008. Kinetic models for colour changes in kiwifruit slices during hot air drying. *World J. Agric. Sci.* 4 : 376-383.

- Montgomery, M. W., Reyes, F. G. R., Cornwell, C. and Beavers, D. V. 1982. Sugar and acid analysis and effect of heating on color stability of northwest concord grape juice. *J. Food Sci.* 47 : 1883-1891.
- Omemu, A. M., Edema, M. O., Atayese, A. O. and Obadina, A. O. 2006. A survey of the microflora of *Hibiscus sabdariffa* (roselle) and the resulting "Zobo" juice. *Afr. J. Biotechnol.* 5 : 254-259.
- Padmavati, M., Sakthivel, N., Thara, K. V. and Reddy, A. R. 1997. Differential sensitivity of rice pathogens to growth inhibition by flavonoids. *Phytochem.* 46 : 499-502.
- Pantelidis, G. E., Vasilakakis, M., Manganaris, G. A. and Diamantidis, G. 2007. Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and cornelian cherries. *Food Chem.* 102 : 777-783.
- Palamidis, N. and Markakis, P. 1975. Stability of grape anthocyanins in a carbonated beverage. *J. Food Sci.* 40 : 1047-1049.
- Paull, R. E., Chen, N. J. and Deputy, J. 1985. Physiological changes associated with senescence of cut anthurium flowers. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 110 : 156-162.
- Perez-Jimenez, J. and Saura-Calixto, F. 2006. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. *Food Res. Int.* 39 : 791-800.
- Ranganna, S. and Setty, L. 1974. Non-enzymatic discoloration in dried cabbage. III. Decomposition products of ascorbic acid and glycine. *J. Agric. Food Chem.* 22 : 1139-1142.
- Rapisarda, P., Bianco, M. L., Pannuzzo, P. and Timpanaro, N. 2008. Effect of cold storage on vitamin C, phenolics and antioxidant activity of five orange genotypes [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. *Postharvest Biol Technol.* 49 : 348-354.

- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio. Med.* 26 : 1231-1237.
- Rein, M. 2005. Copigmentation Reaction and Color Stability of Berry Anthocyanins. Helsinki. University of Helsinki.
- Ruenroengklin, N., Zhong, J., Duan, X., Yang, B., Li, J. and Jiang, Y. 2008. Effects of various temperatures and pH values on the extraction yield of phenolics from litchi fruit pericarp tissue and the antioxidant activity of the extracted anthocyanins. *Int. J. Mol. Sci.* 9 : 1333-1341.
- Sankat, C. K., Basanta, A. and Maharaj, V. 2000. Light mediated red color degradation of the pomarac (*Syzygium malaccense*) in refrigerated storage. *Postharvest Biol Technol.* 18 : 253-357.
- Sayago-Ayerdi, S. G., Arranz, S., Serrano, J. and Goni, I. 2007. Dietary fiber content and associated antioxidant compounds in roselle flower (*Hibicus sabdariffa* L.) beverage. *J. Agric. Food Chem.* 55 : 7886-7890.
- Singleton, V. L. and Rossi, J. A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol Vitic.* 16 : 144-158.
- Skrede, G. and Wrolstad, R. E. 2002. Flavonoids from berries and grapes. *In* Functional Foods: Biochemical and Processing Aspects. Vol. II. (Shi, J. and Mazza, G., ed.). p. 72-123. CRC Press. New York.
- Slinkard, K. and Singleton, V. L. 1977. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *Am. J. Enol. Vitic.* 28 : 49-55.
- Stintzing, F. C. and Carle, R. 2004. Functional properties of anthocyanin and betalains in plants, food and in human nutrition. *J. Trends Food Sci Technol.* 15 : 19-38.

- Stratil, P., Klejdus, B. and Kuban, V. 2006. Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables-evaluation of spectrophotometric methods. *J. Agric. Food Chem.* 54 : 607-616.
- Sukhapat, N., Ungphaboon, S., Itharat, A., Puripattanavong, J. and Pinsuwan, S. 2004. Influence of pH on antioxidant activity of roselle (*Hibiscus sabdariffa*) extract in aqueous solutions. *In* Proceeding of the 10th World Congress on Clinical Nutrition. Phuket Thailand. 30 November-3 December 2004. P. 184.
- Supavita, T., Pinsuwan, S., Ungphaiboon, S., Kummee, S., Sirichote, A., Ratanasuwan, P. and Itharat, A. 2004. Antimicrobial activity of *Hibiscus sabdariffa*. *In* Proceeding of the 10th World Congress on Clinical Nutrition. Phuket Thailand. 30 November-3 December 2004. P. 189.
- Tsai, P. J. McIntosh, J., Pearce, P., Camden, B. and Jordan, B. R. 2002. Anthocyanin and antioxidant capacity in roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract. *Food Res Int.* 35 : 351-356.
- Tsai, P. J., Hsieh, Y. Y. and Huang, T. C. 2004. Effect of sugar on anthocyanin degradation and water mobility in a roselle anthocyanin model system using ¹⁷O NMR. *J. Agric. Food Chem.* 52 : 3097-3099.
- Tsai, P. J. and Huang, H. P. 2004. Effect of polymerization on the antioxidant capacity of anthocyanins in roselle. *Food Res Int.* 37 : 313-318.
- Turker, N., Aksay, S. and Ibrahim-Ekis, H. 2004. Effect of storage temperature on the stability of anthocyanins of a fermented black carrot (*Daucus carota* var. L.) beverage: Shalgam. *J. Agric. Food Chem.* 52 : 3807-3813.
- USFDA. 2001a. Examination of canned food. *In* Bacteriological analytical manual (Online). Available <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-21a.html> (23 May 2007)
- USFDA. 2001b. *Staphylococcus aureus*. *In* Bacteriological analytical manual (Online). Available <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-12.html> (23 May 2007)

- USFDA. 2001c. Aerobic plate count. *In* Bacteriological analytical manual (Online). Available <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-3.html> (23 May 2007)
- USFDA. 2001d. Yeasts, Molds and Mycotoxins. *In* Bacteriological analytical manual (Online). Available <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-18.html> (23 May 2007)
- USFDA.2002. Enumeration of *Escherichia coli* and the coliform bacteria. *In* Bacteriological analytical manual (Online). Available <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-4.html> (23 May 2007)
- USFDA. 2006. Acidified food. Food and drug administration department of health and human service(Online). Available <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm> (23 May 2007)
- Vinson, J. A., Proch, J. and Bose, P. 2001. Determination of quantity and quality of polyphenol antioxidants in food and beverages. *Methods Enzymol.* 335 : 103-107.
- Von Elbe, J. H. and Schwartz, S. J. 1996. Colorants. *In* Food Chemistry. 3rd ed. p. 651-722. Marcel Dekker. New York.
- Walkowiak-Tomeczak, D. 2007. Changes in antioxidant activity of black chokeberry juice concentrate solution during storage. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 6 : 49-55.
- Werlein, H. D., Kutemeyer, C., Schatton, G., Hubermann, E. M. and Schwarz, K. 2005. Influence of elderberry and blackcurrant concentrates on the growth of microorganisms. *Food Control.* 16 : 729-733.
- Wicklund, T., Rosenfeld, H. J., Martinsen, B. K., Sundfor, M. W., Lea, P., Bruun, T., Blomhoff, R. and Haffner, K. 2005. Antioxidant capacity and colour of strawberry jam as influenced by cultivar and storage conditions. *Food Sci. Technol.* 38 : 387-391.
- Wong, P. K., Yusof, S., Ghazali, H. M. and Man, Y. B. C. 2002. Physico-chemical characteristics of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *J. Nutr Food Sci.* 32 : 68-73.

- Wrolstad, R. E. 1976. Color and Pigment Analysis in Fruit Products. Oregon Agric. United States of America.
- Wrolstad, R. E. 2004. Anthocyanin pigments-bioactivity and coloring properties. *J. Food Sci.* 69 : 419-421.
- Yamasaki, K., Hashimoto, A., Kokusenya, Y., Miyamoto, T. and Sato, T. 1994. Electrochemical method for estimating the antioxidative effects of methanol extracts of crude drugs. *Chem. Pharm. Bull.* 42 : 1663-1665.
- Yanishlieva-Maslarova, N. V. 2001. Inhibiting Oxidation. *In* Antioxidant in Food: Practical Applications. (Pokorny, J., Yanishlieva, N. and Gordon, M., ed.). p. 22-70. CRC Press. New York.
- Yuksel, S. and Koca, L. 2008. Color stability of blackberry nectars during storage. *J. Food Technol.* 6 : 166-169.

ภาคผนวก

ก-2 การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี

1. ค่าพีเอช (AOAC, 2000)

อุปกรณ์

1. พีเอชมิเตอร์ (pH-meter)
2. บีกเกอร์

วิธีการ

1. ปรับความเที่ยงตรงของพีเอชมิเตอร์
ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์มาตรฐาน (ค่าพีเอช 4.0 และ 7.0)
2. เทสารสกัดกระเจียบแดง ประมาณ 20 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์
3. จุ่ม Prob pH ลงในบีกเกอร์
4. อ่านค่าพีเอช
5. วิเคราะห์จำนวน 3 ซ้ำ

2. ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (AOAC, 2000)

อุปกรณ์

1. Hand refractometer

วิธีการ

1. ปรับความเที่ยงตรงของ Hand refractometer ด้วยน้ำกลั่น
(อ่านค่าได้เท่ากับ 0 องศาบริกซ์)
2. หยดสารสกัดกระเจียบแดง 1-2 หยด แล้ววัดด้วย Hand refractometer
3. อ่านปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด ในหน่วยองศาบริกซ์
4. วิเคราะห์จำนวน 3 ซ้ำ

3. ปริมาณกรดทั้งหมด ในรูปกรดมาลิก (AOAC, 2000)

อุปกรณ์

1. บิวเรต
2. พีเอชมิเตอร์
3. แท่งแม่เหล็กคน (Magnetic stirrer)
4. บีกเกอร์ ขนาด 50 มิลลิลิตร
5. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร

สารเคมี

1. สารละลายมาตรฐาน โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 0.1 นอร์มอล
2. ฟีนอล์ฟทาเลิน (Phenolphthalein)
3. โพแทสเซียมแอสซิดพาทาเลท ($\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$)

การหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายมาตรฐาน โซเดียมไฮดรอกไซด์

1. นำโพแทสเซียมแอสซิดพาทาเลท ใส่กระจกนาฬิกา อบที่อุณหภูมิ 110.0 องศาเซลเซียส นาน 1-2 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นในเคซิเคเตอร์
2. ชั่งน้ำหนักโพแทสเซียมแอสซิดพาทาเลท 0.8 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250

มิลลิลิตร

3. เติมน้ำกลั่นต้ม 25 มิลลิลิตร
4. ไตเตรทด้วย 0.1 N NaOH โดยใช้ฟีนอล์ฟทาเลินเป็นอินดิเคเตอร์ (ทำ 3 ซ้ำ)
5. อ่านปริมาณ NaOH ที่ใช้ในการไตเตรท และคำนวณ

วิธีการ

1. ปรับความเที่ยงตรงของพีเอชมิเตอร์
ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์มาตรฐาน (ค่าพีเอช 4.0 และ 7.0)
2. ปิเปตสารสกัดกระเจียบแดง 1.0 มิลลิลิตร ใส่ลงบีกเกอร์ และเติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร
3. ใส่แท่งแม่เหล็ก และวางบีกเกอร์ตัวอย่างบน Stirrer
4. หยดฟีนอล์ฟทาเลิน 5 หยด เป็นอินดิเคเตอร์
5. ไตเตรทด้วย 0.1 N NaOH จนกระทั่งค่าพีเอช เท่ากับ 8.1
6. อ่านปริมาณ NaOH ที่ใช้ในการไตเตรท
7. คำนวณปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดมาลิก

$$\text{ปริมาณกรดทั้งหมด ในรูปกรดมาลิก (ร้อยละ)} = \frac{(N) (V) (Mw)}{(X) (1000)} \times 100$$

เมื่อ N คือ ความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ (mEq/ml)

V คือ ปริมาตรของโซเดียมไฮดรอกไซด์ (ml)

Mw คือ น้ำหนักโมเลกุลของกรดมาลิก (Eq. Wt. of malic acid, mg/Eq) = 67.05

X คือ ปริมาตรตัวอย่าง (ml)

4. ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด ในรูปไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ (Wrolstad, 1976)

อุปกรณ์

1. เครื่อง UV-Visible Spectrophotometer
2. เครื่องเซนติฟิวส์

สารเคมี

1. สารละลาย KCl (Potassium chloride buffer)
2. สารละลาย $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Sodium acetate buffer)

วิธีการ

1. การเตรียมบัฟเฟอร์

1.1 สารละลาย KCl (Potassium chloride buffer) ความเข้มข้น 0.025 M, ค่าพีเอช เท่ากับ 1.0 โดยการชั่ง KCl 1.86 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 980 มิลลิลิตร ปรับค่าพีเอชด้วย conc.HCl จนกระทั่งค่าพีเอช เท่ากับ 1.0 แล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

1.2 สารละลาย $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Sodium acetate buffer) ความเข้มข้น 0.4 M, ค่าพีเอช เท่ากับ 4.5 โดยการชั่ง $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 54.43 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 960 มิลลิลิตร ปรับค่าพีเอชด้วย conc.HCl จนกระทั่งค่าพีเอช เท่ากับ 4.5 แล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

2. การวิเคราะห์

2.1 เซนติฟิวส์สารสกัดกระเจียบแดง ที่ความเร็วรอบ 4,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที

2.2 เก็บสารสกัดกระเจียบแดงเฉพาะส่วนใส (ไม่มีตะกอนของกระเจียบแดง)

2.3 นำส่วนใสของสารสกัดกระเจียบแดง 100 ไมโครลิตร (0.1 มิลลิลิตร) ผสมกับ สารละลาย KCl (ค่าพีเอช 1.0) 2,900 ไมโครลิตร (2.9 มิลลิลิตร)

2.4 นำส่วนใสของสารสกัดกระเจียบแดง 100 ไมโครลิตร (0.1 มิลลิลิตร) ผสมกับ สารละลาย $\text{CH}_3\text{CONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (ค่าพีเอช 4.5) 2,900 ไมโครลิตร (2.9 มิลลิลิตร)

2.5 วัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ค่าพีเอช 2 ระดับ คือ ค่าพีเอช 1.0 และ 4.5 โดยวัดการดูดกลืนแสง (A) ที่ความยาวคลื่น 520 และ 700 นาโนเมตร รายงานค่าในรูปไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์

2.6 หากตัวอย่างมีค่าการดูดกลืนแสง สูงกว่า 1.2 จะต้องทำการ Diluted ตัวอย่างให้อยู่ในช่วงค่าการดูดกลืนแสงที่กำหนด (0.2-1.2) โดยการละลายตัวอย่างกับตัวทำละลายที่ใช้ แล้วคำนวณกลับเป็นปริมาณตัวอย่างที่ใช้จริง

การคำนวณปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด

$$\text{การดูดกลืนแสง (A)} = [(A_{520} - A_{700})_{\text{pH}_{1.0}} - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH}_{4.5}}]$$

$$\text{ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อลิตร)} = \frac{(A \times Mw \times DF \times 1000)}{\epsilon \times l}$$

เมื่อ Molecular weight (Mw) ของไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ = 449.2 g/mol

$$\text{Molar extinction coefficient } (\epsilon) = 26,900 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$$

$$\text{Dilution factor (DF)} = \frac{\text{ปริมาตรรวมสุดท้าย (มิลลิลิตร)}}{\text{ปริมาตรตัวอย่างที่ใช้ (มิลลิลิตร)}} = 30$$

5. ปริมาณกรดแอสคอร์บิก ด้วยวิธี Microfluorometric method (AOAC, 2000)

อุปกรณ์

1. Spectrofluorophotometer model RF-1501
2. Vortex mixer
3. บีเปต ขนาด 2, 5 และ 10 มิลลิลิตร
4. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 และ 250 มิลลิลิตร
5. ขวดปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร
6. Glass filter funnel 15-20 เซนติเมตร
7. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 42
8. หลอดทดลองฝาเกลียว
9. อะลูมิเนียมฟอยล์

สารเคมี

1. Meta-phosphoric acid (40-44% (HPO₃), 56-60% (NaPO₃))
2. 1, 2 Phenylenediamine dihydrochloride (>99%)
3. Sodium acetate trihydrate, NaOAC.3H₂O (>99.5%)
4. Boric acid, crystalline, H₃BO₃
5. Acid-washed Norit หรือใช้ผงถ่าน (Charcoal activated decolourising PDR) แทนก็ได้
6. Acetic acid 100% (อย่างน้อย 99.8%)
7. Ascorbic acid standard –AR grade

วิธีการ

1. การเตรียมสารละลาย

1.1 สารละลาย A [Metaphosphoric acid, 3% (w/v)] โดยชั่ง *Meta*-phosphoric acid 30 กรัม ละลายน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร เติมกรดอะซิติก 80 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น (เก็บรักษาได้ 10 วัน ที่อุณหภูมิ 4.0 องศาเซลเซียส)

1.2 สารละลาย B (Sodium acetate solution) โดยชั่ง Sodium acetate trihydrate 500 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น (เก็บรักษาได้ 1 เดือน ที่อุณหภูมิ 4.0 องศาเซลเซียส)

1.3 สารละลาย C (Boric acid- Sodium acetate solution) โดยชั่ง Boric acid 3 กรัม ละลายด้วยสารละลาย B 100 มิลลิลิตร (เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้งาน)

1.4 สารละลาย D (*O*-Phenylenediamine solution) โดยชั่ง *O*-phenylenediamine 40 มิลลิกรัม (0.04 กรัม) ละลายด้วยน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร (เตรียมทันทีก่อนใช้งาน)

1.5 สารละลาย E (Ascorbic acid standard) โดยชั่งกรดแอสคอร์บิก 100 มิลลิกรัม (0.1 กรัม) ละลายด้วยสารละลาย A และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยสารละลาย A (เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้งาน)

2. การวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก

2.1 ปิเปตสารละลาย E จำนวน 0.5, 1.5, 30 และ 50 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยสารละลาย A (ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5, 15, 30 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

2.2 นำสารละลายมาตรฐานแต่ละความเข้มข้น ใส่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีผงถ่าน 1-2 กรัม หมุนขวดรูปชมพู่แรงๆ 2 นาที

2.3 กรองด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 42 ใส่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิลิตร ได้เป็นสารละลายใส

2.4 ปิเปตสารละลายมาตรฐานส่วนใสที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ความเข้มข้นละ 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เติมสารละลาย B จำนวน 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น (เขย่าบ้างเป็นครั้งคราว) ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที

2.5 ปิเปตสารละลายมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ใส่ในหลอดทดลอง ความเข้มข้นละ 3 หลอด หลอดละ 2 มิลลิลิตร เติมสารละลาย D ลงในหลอดทดลอง หลอดละ 5 มิลลิลิตร เขย่าด้วย Vortex mixer ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 35 นาที (เริ่มจับเวลาตั้งแต่เริ่มเขย่าหลอดทดลองครั้งแรก)

2.6 เปิด (Warm up) เครื่อง Spectrofluorophotometer ทิ้งไว้ 15 นาที ใช้ค่า Excitation wavelength (Ex) เท่ากับ 350 นาโนเมตร และค่า Emission wavelength (Em) เท่ากับ 430 นาโนเมตร และบันทึกค่า Fluorescence intensity

3. การทำ Blank ของสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก

3.1 ปิเปิดสารละลายมาตรฐานส่วนใสที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ความเข้มข้นละ 5 มิลลิตร ใส่ลงในขวดปรับปริมาตร ขนาด 100 มิลลิตร เติมสารละลาย C จำนวน 5 มิลลิตร (เขย่าบ้างเป็นครั้งคราว) ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที

3.2 ปรับปริมาตร เป็น 100 มิลลิตร ด้วยน้ำกลั่นและเขย่า

3.3 ปิเปิด Blank ของสารละลายมาตรฐานแต่ละความเข้มข้น ใส่ในหลอดทดลอง 3 หลอด หลอดละ 2 มิลลิตร เติมสารละลาย D ลงในหลอดทดลอง หลอดละ 5 มิลลิตร เขย่าด้วย Vortex mixer ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 35 นาที (เริ่มจับเวลาตั้งแต่เริ่มเขย่าหลอดทดลองครั้งแรก)

3.4 ใช้ค่า Ex เท่ากับ 350 นาโนเมตร และค่า Em เท่ากับ 430 นาโนเมตร และบันทึกค่า Fluorescence intensity

4. การวิเคราะห์ตัวอย่าง

4.1 กรองสารสกัดกระเจียบแดงผ่านสำลี จนได้ปริมาตร 20 มิลลิตร

4.2 ปิเปิดสารสกัดกระเจียบแดง 10 มิลลิตร แล้วสกัดด้วยสารละลาย A 30 มิลลิตร จำนวน 2 ครั้ง

4.3 ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิตร ด้วยสารละลาย A และเขย่านาน 15 นาที

4.4 เทสารสกัดกระเจียบแดงใส่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิตร ที่มีผงถ่าน 1-2 กรัม หมุนขวดรูปชมพู่แรงๆ 2 นาที และกรองด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 42 ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิตร

4.5 ปิเปิดสารละลายตัวอย่างส่วนใส จำนวน 5 มิลลิตร ใส่ลงในขวดปรับปริมาตร ขนาด 100 มิลลิตร เติมสารละลาย B จำนวน 5 มิลลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิตร ด้วยน้ำกลั่น และเขย่า ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที

4.6 ปิเปิดตัวอย่างใสในหลอดทดลอง 3 หลอด หลอดละ 2 มิลลิตร เติมสารละลาย D ลงในหลอดทดลอง หลอดละ 5 มิลลิตร เขย่าด้วย Vortex mixer ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 35 นาที (เริ่มจับเวลาตั้งแต่เริ่มเขย่าหลอดทดลองครั้งแรก)

4.7 ใช้ค่า Ex เท่ากับ 350 นาโนเมตร และค่า Em เท่ากับ 430 นาโนเมตร และบันทึกค่า Fluorescence intensity

5. การทำ Blank ของตัวอย่าง

5.1 ปิเปตสารละลายตัวอย่างส่วนใส จำนวน 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดปรับปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมสารละลาย C จำนวน 5 มิลลิลิตร (เขย่าบ้างเป็นครั้งคราว) ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที

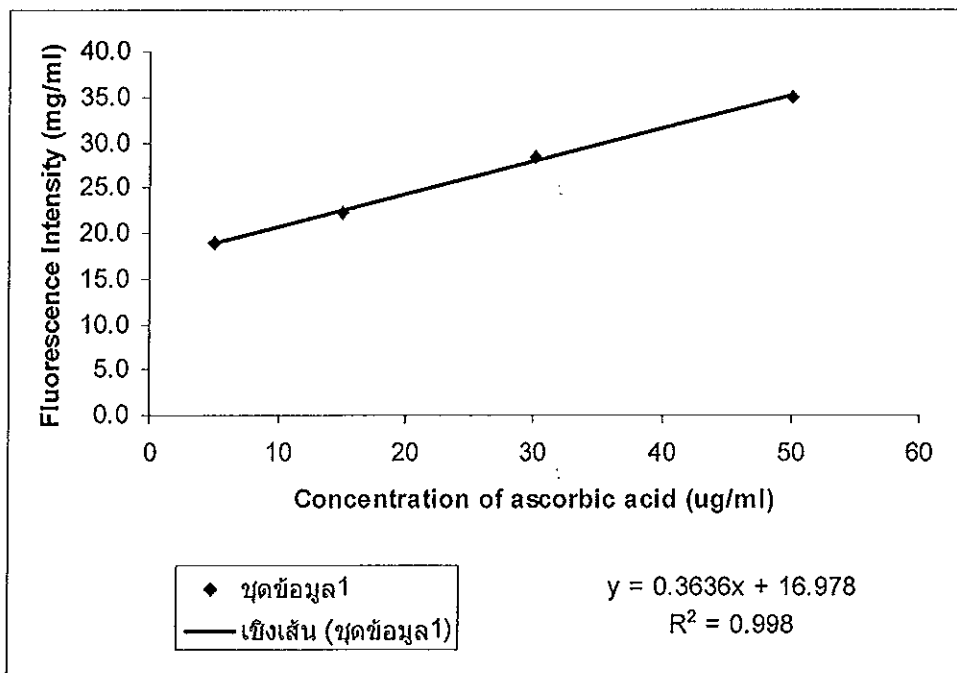
5.2 ปรับปริมาตร เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นและเขย่า

5.3 ปิเปต Blank ของตัวอย่างใสในหลอดทดลอง 3 หลอด หลอดละ 2 มิลลิลิตร เติมสารละลาย D ลงในหลอดทดลอง หลอดละ 5 มิลลิลิตร เขย่าด้วย Vortex mixer ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 35 นาที (เริ่มจับเวลาตั้งแต่เริ่มเขย่าหลอดทดลองครั้งแรก)

5.4 ใช้ค่า E_x เท่ากับ 350 นาโนเมตร และค่า E_m เท่ากับ 430 นาโนเมตร และบันทึกค่า Fluorescence intensity

6. การคำนวณ

ทำกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแอสคอร์บิก



คำนวณปริมาณกรดแอสคอร์บิกในตัวอย่าง หน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากกราฟมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก รายงานผลเป็น มิลลิกรัมต่อกรัมตัวอย่าง

ปริมาณกรดแอสคอร์บิกของตัวอย่างที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐาน X มิลลิกรัม เช่น กราฟมาตรฐาน $y = 0.3636X + 16.978$ เมื่อ y คือ ค่า Fluorescence intensity

จากกราฟมาตรฐานค่าที่อ่านได้เท่ากับ X มิลลิกรัม ใช้สารละลายตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร
ในการทำปฏิกิริยา

สารละลายตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร มีปริมาณกรดแอสคอร์บิก เท่ากับ X มิลลิกรัม

สารละลายตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร มีปริมาณกรดแอสคอร์บิก เท่ากับ $\frac{100 \text{ มิลลิลิตร} \times X \text{ มิลลิกรัม}}{5 \text{ มิลลิลิตร}}$

5 มิลลิลิตร

สารละลายตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร มาจากตัวอย่าง 10 กรัม

ตัวอย่าง 10 กรัม มีปริมาณกรดแอสคอร์บิก เท่ากับ $\frac{100 \text{ มิลลิลิตร} \times X \text{ มิลลิกรัม}}{5 \text{ มิลลิลิตร}}$

5 มิลลิลิตร

ตัวอย่าง A กรัม มีปริมาณกรดแอสคอร์บิก เท่ากับ $\frac{100 \text{ มิลลิลิตร} \times X \text{ มิลลิกรัม} \times A \text{ กรัม}}{5 \text{ มิลลิลิตร} \times 10 \text{ กรัม}}$

5 มิลลิลิตร x 10 กรัม

ดังนั้น ตัวอย่างที่วิเคราะห์จึงมีปริมาณกรดแอสคอร์บิก เท่ากับ B มิลลิกรัมต่อกรัม

เมื่อ A คือ น้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม) ในรูป dry weight basis

6. ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu method (Miliauskas *et al.*, 2004)

อุปกรณ์

1. ไมโครปิเปต ขนาด 10-200 และ 20-1000 ไมโครลิตร
2. หลอดหมุนเหวี่ยง ขนาด 15 มิลลิลิตร (สำหรับเจือจางตัวอย่าง)
3. ไมโครเพลท (Microplate) ขนาด 96 หลุม
4. เครื่อง Microplate reader

สารเคมี

1. สารละลาย Folin-Ciocalteu's reagent
2. กรดแกลลิก (Gallic acid)
3. โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate anhydrous; Na_2CO_3) ความเข้มข้น 0.71 โมลาร์
4. Absolute ethanol

วิธีการ

1. การเตรียมตัวอย่าง

1.1 ชั่งสารสกัดกระเจียบแดงผงแห้ง 10 มิลลิกรัม (0.01 กรัม) ละลายด้วยน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร (ให้ความเข้มข้น เท่ากับ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

1.2 เจือจางตัวอย่างให้ให้ความเข้มข้นที่ต้องการ ด้วยการปิเปตตัวอย่างและเติมด้วยน้ำกลั่น ให้ให้ความเข้มข้นที่ 1,000 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2. การเตรียมสารละลาย

2.1 เตรียม Na_2CO_3 solution โดยการชั่ง Na_2CO_3 7.5 กรัม ละลายและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

2.2 เตรียม Folin-Ciocalteu's solution โดยการปิเปต Folin-Ciocalteu's reagent 10 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

3. การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก

ชั่งสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก 10 มิลลิกรัม (0.01 กรัม) ปรับปริมาตรด้วยเอทานอล 10 มิลลิลิตร (ให้ความเข้มข้น เท่ากับ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) จากนั้นเจือจางตัวอย่างให้มีความเข้มข้น 250, 200, 100, 50 และ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วย Absolute ethanol

4. การวิเคราะห์

4.1 ปิเปตตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ลงในหลุม Microplate เติมด้วย Folin-Ciocalteu's solution 100 ไมโครลิตร และเติมด้วย Na_2CO_3 solution 80 ไมโครลิตร

4.2 Blank ของตัวอย่าง เตรียมโดยปิเปตน้ำกลั่น 20 ไมโครลิตร ลงในหลุม Microplate เติมด้วย Folin-Ciocalteu's solution 100 ไมโครลิตร และเติมด้วย Na_2CO_3 solution 80 ไมโครลิตร

4.3 ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด นาน 30 นาที

4.4 วัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader

4.5 สร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก โดยนำสารละลายกรดแกลลิก แต่ละความเข้มข้น ทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 4.1-4.4

4.6 คำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของตัวอย่าง โดยการเปรียบเทียบค่าที่ได้กับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก รายงานค่าที่วัดได้ในรูปมิลลิกรัมสมมูลย์ของกรดแกลลิกต่อกรัมตัวอย่าง โดยการนำค่าต่างๆ แทนในสมการคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง

สมการจากกราฟ

$$y = mx + c$$

$$x = (y - c) / m$$

เมื่อ x คือ ความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง

y คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ

โดย $y = OD_{\text{sample}} - OD_{\text{blank}}$ เมื่อ m และ c คือ ค่าคงที่

7. สมบัติการจับอนุมูล DPPH ด้วยวิธี DPPH scavenging assay (Yamasaki *et al.*, 1994)

อุปกรณ์

1. ไมโครปิเปต ขนาด 10-200 และ 20-1000 ไมโครลิตร
2. หลอดหมุนเหวี่ยง ขนาด 15 มิลลิลิตร (สำหรับเจือจางตัวอย่าง)
3. ไมโครเพลท (Microplate) ขนาด 96 หลุม
4. เครื่อง Microplate reader

สารเคมี

1. Absolute ethanol
2. DPPH (1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)
3. BHT (Butylhydroxytoluene)

วิธีการ

1. การเตรียมตัวอย่าง

1.1 ชั่งสารสกัดกระเจียบแดงผงแห้ง 10 มิลลิกรัม (0.01 กรัม) ละลายด้วยน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร (ได้ความเข้มข้น เท่ากับ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เก็บเป็น Stock solution

1.2 เตรียมสารละลายตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้น เท่ากับ 200, 100, 50, 10 และ 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จาก Stock solution ความเข้มข้นละ 2 มิลลิลิตร โดยใช้ น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย (ความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 100, 50, 25, 5 และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ)

2. การเตรียมสารละลาย DPPH ใน Absolute ethanol

เตรียมสารละลาย DPPH ใน Absolute ethanol ให้มีความเข้มข้น 6×10^{-5} โมลาร์ โดยชั่ง DPPH 2.4 มิลลิกรัม (0.0024 กรัม) ละลายและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วย Absolute ethanol เก็บไว้ในที่มืด (สารละลายที่เตรียมแล้วเก็บได้ไม่เกิน 3 วัน ที่อุณหภูมิ 4.0 องศาเซลเซียส)

3. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน BHT

3.1 เตรียมสารละลาย BHT ให้มีความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่ง BHT 10 มิลลิกรัม (0.01 กรัม) ละลายด้วย Absolute ethanol 10 มิลลิลิตร

3.2 เตรียมสารละลายมาตรฐาน BHT ให้มีระดับความเข้มข้น เท่ากับ 200, 100, 20, 10 และ 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 2 มิลลิลิตร โดยใช้ Absolute ethanol เป็นตัวทำละลาย (ความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 100, 50, 10, 5 และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ)

4. การวิเคราะห์

4.1 ปิเปตสารละลายตัวอย่างในแต่ละระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 100 ไมโครลิตร ลงในหลุม Microplate เติมด้วยสารละลาย DPPH ใน Absolute ethanol 100 ไมโครลิตร

4.2 Blank ของสารละลายตัวอย่าง เตรียมโดยปิเปตสารละลายตัวอย่างในแต่ละระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 100 ไมโครลิตร เติมด้วยน้ำกลั่น 100 ไมโครลิตร ลงในหลุม Microplate

4.3 Control เตรียมโดย ปิเปตน้ำกลั่น 100 ไมโครลิตร เติมด้วยสารละลาย DPPH ใน Absolute ethanol 100 ไมโครลิตร ลงในหลุม Microplate

4.4 Blank control เตรียมโดย ปิเปต Absolute ethanol 100 ไมโครลิตร เติมด้วยน้ำกลั่น 100 ไมโครลิตร ลงในหลุม Microplate

4.5 ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด นาน 30 นาที

4.6 วัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate Reader

4.7 คำนวณค่า % Inhibition ในแต่ละความเข้มข้น แล้วนำไปทำ Linear regression เพื่อหาความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่สามารถลดความเข้มข้นของอนุมูล DPPH ลง 50% ต่อ 1 มิลลิลิตรของสารละลายตัวอย่างเริ่มต้น)

5. การคำนวณ % Inhibition

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{blank, control}}) - (\text{OD}_{\text{sample}} - \text{OD}_{\text{blank, sample}})}{(\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{blank, control}})} \times (100)$$

เมื่อ $\text{OD}_{\text{Control}}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ใน Absolute ethanol 100 ไมโครลิตร กับน้ำกลั่น 100 ไมโครลิตร

$\text{OD}_{\text{Blank control}}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของเอทานอล 100 ไมโครลิตร กับน้ำกลั่น 100 ไมโครลิตร

OD_{Sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ 100 ไมโครลิตร กับ สารละลาย DPPH ใน Absolute ethanol 100 ไมโครลิตร

OD_{Blank sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ 100 ไมโครลิตร กับน้ำกลั่น 100 ไมโครลิตร

8. สมบัติการจับอนุมูล ABTS ด้วยวิธี ABTS radical scavenging activity (Re *et al.*, 1999)

อุปกรณ์

1. ไมโครปิเปต ขนาด 10-200 และ 20-1,000 ไมโครลิตร
2. หลอดหมุนเหวี่ยงขนาด 15 มิลลิลิตร (สำหรับเจือจางตัวอย่าง)
3. คิวเวท
4. เครื่อง Spectrophotometer

สารเคมี

1. ABTS (2, 2'-azinobis [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid])
2. โทรลอกซ์ (Trolox)
3. โพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ($K_2S_2O_8$)
4. Absolute ethanol

วิธีการ

1. การเตรียมสารละลาย ABTS^{•+}

1.1 เตรียมสารละลาย ABTS^{•+} ให้มีความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ โดยการชั่ง ABTS 0.0384 กรัม ละลายและปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

1.2 เตรียมสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ให้มีความเข้มข้น 140 มิลลิโมลาร์ โดยการชั่ง $K_2S_2O_8$ 0.9461 กรัม ละลาย และปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

1.3 ผสมสารละลาย ABTS^{•+} (ข้อ 1.1) จำนวน 5 มิลลิลิตร กับสารละลาย โพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต (ข้อ 1.2) จำนวน 88 ไมโครลิตร (ซึ่งทำให้สารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต มีความเข้มข้นสุดท้าย ประมาณ 2.45 มิลลิโมลาร์) ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดประมาณ 12-16 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้งาน (สารละลาย ABTS^{•+} เมื่อเตรียมแล้ว สามารถเก็บได้นาน 7 วัน ที่อุณหภูมิ บรรยากาศปกติ)

1.4 เจือจางสารละลาย ABTS^{•+} (ข้อ 3) ด้วย Absolute ethanol ให้มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.70 ± 0.02 ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร โดยผสมสารละลาย ABTS^{•+} จำนวน 1 มิลลิลิตร กับ Absolute ethanol 89 มิลลิลิตร

2. การเตรียมสารละลายมาตรฐานของ Trolox

- 2.1 เตรียมสารละลาย Trolox ให้มีความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ โดยการชั่ง Trolox 0.0626 กรัม
- 2.2 ละลายและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วย Absolute ethanol
- 2.3 เจือจางสารละลายให้มีความเข้มข้น 1.5, 1.0, 0.5, 0.25 และ 0.1 มิลลิโมลาร์

3. การเตรียมตัวอย่าง

ชั่งสารสกัดกระเจี๊ยบแดงแห้ง 0.0663 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 8.2875 มิลลิลิตร ได้ความเข้มข้น เท่ากับ 8,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4. การวิเคราะห์

- 4.1 ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร ลงในคิวเวท
- 4.2 เติมสารละลาย ABTS^{•+} 2 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 6 นาที ในที่มืด
- 4.3 วัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer
- 4.3 ใช้ น้ำกลั่น 20 ไมโครลิตร เติมสารละลาย ABTS^{•+} 2 มิลลิลิตร เป็น Blank ของตัวอย่าง (Set zero ด้วยน้ำกลั่น)
- 4.4 สร้างกราฟมาตรฐานของ Trolox โดยนำสารละลาย Trolox แต่ละความเข้มข้น วิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 4.1-4.3
- 4.5 คำนวณสมบัติการจับอนุมูล ABTS โดยการเปรียบเทียบค่าที่ได้กับกราฟมาตรฐานของ Trolox รายงานค่าที่วัดได้ในรูปไมโครโมลสมมูลของ Trolox ต่อมิลลิลิตร ตัวอย่าง

9. ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกไอออน ด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP) (Benzie and Strain, 1996)

อุปกรณ์

1. ไมโครปิเปตขนาด 10-200 และ 20-1000 ไมโครลิตร
2. หลอดหมุนเหวี่ยงขนาด 15 มิลลิลิตร (สำหรับเจือจางตัวอย่าง)
3. คิวเวท
4. เครื่อง Spectrophotometer
5. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

สารเคมี

1. โซเดียม อะซิเตรต ไตรไฮเดรต ($C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$)
2. กรดอะซิตรีกเข้มข้น
3. TPTZ (2, 4, 6-tripyridyl-s-triazine)
4. กรดไฮโดรคลอริก
5. เฟอริกคลอไรด์ เฮกซะไฮเดรต ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$)

วิธีการ

1. สารละลาย FRAP reagent

เตรียมสารละลายอะซิเตรต บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ (ค่าพีเอช 3.6) โดยการชั่ง $C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$ 3.1 กรัม เติมกรดอะซิตรีกเข้มข้น 16 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

2. สารละลาย TPTZ

เตรียมสารละลาย TPTZ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ โดยการชั่ง TPTZ 0.062 กรัม ละลายด้วยกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ จำนวน 20 มิลลิลิตร

3. สารละลาย $FeCl_3 \cdot 6H_2O$

เตรียมสารละลาย $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ โดยการชั่ง $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0.1350 กรัม ละลายและปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

4. สารละลาย FRAP reagent

โดยการผสม สารละลายอะซิเตรต บัฟเฟอร์ (ข้อ 1) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร กับ สารละลาย TPTZ (ข้อ 2) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และสารละลาย $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (ข้อ 3) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน และนำไปอุ่นให้สารละลาย FRAP reagent มีอุณหภูมิ ประมาณ 37.0 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้งาน

5. การเตรียมตัวอย่าง

ชั่งสารสกัดกระเจียบแดงผงแห้ง 10 มิลลิกรัม (0.01 กรัม) ละลายด้วยน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร (ได้ความเข้มข้น เท่ากับ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

6. การวิเคราะห์

6.1 ปิเปตสารละลาย FRAP reagent 1,800 ไมโครลิตร น้ำกลั่น 180 ไมโครลิตร และสารละลายตัวอย่าง 60 ไมโครลิตร ลงในคิวเวท (ระดับความเจือจางของตัวอย่าง เท่ากับ 1 ต่อ 34)

6.2 ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด นาน 2 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer

6.3 กำหนดความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกไอออน (FRAP) โดยการเปรียบเทียบค่าที่ได้กับกราฟมาตรฐานของโทรลอคซ์ รายงานค่าที่วัดได้ในรูปไมโครโมลสมมูลย์ของโทรลอคซ์ต่อกรัมตัวอย่าง

ก-3 การวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์

1. วิเคราะห์ Flat sour bacteria (USFDA, 2001a)

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Acid broth
2. Malt extract broth
3. Nutrient agar
4. Potato dextrose agar (PDA) ผ่านการปรับค่าพีเอช เท่ากับ 3.5 ด้วย 10.0% กรดทาร์ตาริก

วิธีการ

กรณี ตัวอย่างที่มีค่าพีเอช ต่ำกว่า 4.6

1. ใส่ตัวอย่างอาหารลงในอาหารเหลว Acid broth จำนวน 4 หลอด และ Malted extract broth 2 หลอด (ใช้ตัวอย่างอาหาร 2 มิลลิลิตรต่อหลอด)

2. ป่มอาหารเลี้ยงเชื้อ

- ใน Acid broth จำนวน 2 หลอด ป่มที่อุณหภูมิ 55.0 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง
- ใน Acid broth จำนวน 2 หลอด ป่มที่อุณหภูมิ 30.0 องศาเซลเซียส นาน 96 ชั่วโมง
- ใน Malted extract broth จำนวน 2 หลอด ป่มที่อุณหภูมิ 30.0 องศาเซลเซียส นาน 96 ชั่วโมง

96 ชั่วโมง

3. หากมีการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียจำพวก Flat sour อาหารเลี้ยงเชื้อจะขุ่น

4. ตรวจสอบโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้ Loop จุ่มตัวอย่างอาหารมาเกลี่ยบนสไลด์ รอให้แห้งแล้วตรึงเซลล์ ทำการย้อมแกรม ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ บันทึกลักษณะรูปร่าง และการเคลื่อนที่ของจุลินทรีย์

2. วิเคราะห์ Coliform bacteria (USFDA, 2002)

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Brilliant-green lactose bile broth (BGLB)
2. Lauryl sulphate tryptose broth (LST) 2X และ 1X
3. EC broth
4. Eosin methylene blue agar (EMB)
5. Nutrient agar (NA)

วิธีการ

การตรวจนับจำนวนขั้นแรก (Presumptive test)

1. เขย่าตัวอย่างให้เข้ากัน ดูดตัวอย่างใส่หลอดอาหาร LST (2X) หลอดละ 10 มิลลิลิตร จำนวน 5 หลอด ส่วนหลอดอาหาร LST (1X) ดูดตัวอย่าง หลอดละ 1 มิลลิลิตร จำนวน 5 หลอด และ 0.1 มิลลิลิตร จำนวน 5 หลอด
2. บ่มหลอดอาหารทั้งหมด ที่อุณหภูมิ 37.0 ± 1.0 องศาเซลเซียส นาน 24 และ 48 ชั่วโมง
3. สังเกตการเกิดก๊าซในหลอดค้ำก๊าซในหลอดอาหารแต่ละหลอดหลังจากบ่มเชื้อ 1 วัน นาน 24 ชั่วโมง หากหลอดใดไม่เกิดก๊าซให้บ่มเชื้อต่ออีก 24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลเช่นเดียวกัน
4. บันทึกจำนวนหลอดที่เกิดก๊าซในแต่ละหลอด นำไปเปิดตาราง MPN รายงานผลเป็น MPN ของโคลิฟอร์มแบคทีเรียขั้นแรกต่อมิลลิลิตร

การตรวจนับจำนวนขั้นยืนยัน (Confirmed test)

1. ถ่ายเชื้อจากหลอดที่เกิดก๊าซในขั้นแรกของแต่ละหลอด ลงในอาหารเหลว BGLB หลอดต่อหลอด
2. บ่มหลอดอาหาร ที่อุณหภูมิ 37.0 ± 1.0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
3. บันทึกผลหลอดที่เกิดก๊าซ นำไปเปิดตาราง MPN รายงานผลเป็น MPN ของโคลิฟอร์มแบคทีเรียขั้นยืนยันต่อมิลลิลิตร

การตรวจนับจำนวนขั้นสมบูรณ์ (Completed test)

1. นำหลอดที่เกิดก๊าซในขั้นยืนยัน มาเขย่าเบาๆ แล้วใช้รูปลูกที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ถ่ายเชื้อจากหลอดดังกล่าวไปตากแวนบนอาหารแข็ง EMB ในลักษณะโคโลนีเดี่ยวหลังจากบ่มเชื้อ
2. นำไปบ่ม ที่อุณหภูมิ $35.0-37.0$ องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบดูโคโลนีที่เป็นลักษณะเฉพาะของโคลิฟอร์ม โดยโคโลนีมีสีเข้ม อาจมีสีแดงหรือสีม่วงเข้ม
3. ถ่ายเชื้อจากโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะดังกล่าว ลงในอาหารเหลว BGLB หรือ LST และบนอาหาร NA

4. บ่มเชื้อ ที่อุณหภูมิ 35.0-37.0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูการเกิดก๊าซในอาหารเหลว ถ้ามีก๊าซเกิดขึ้นให้นำเชื้อจากอาหาร NA ไปย้อมสีแกรม ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ถ้าติดสีแกรมลบ รูปร่างท่อนสั้น ไม่สร้างสปอร์ แสดงว่าเป็น โคลิฟอร์มแบคทีเรีย

3. วิเคราะห์ *Staphylococcus aureus* (USFDA, 2001b)

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Baird parker agar
2. Brain heart infusion broth (BHI)
3. พลาสมา
4. สารละลายเปปโตน ร้อยละ 0.1 (0.1% Peptone water)

วิธีการ

1. ปิเปตตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลายเปปโตน 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน (ตัวอย่างที่ได้มีความเจือจางเท่ากับ 10^{-1})

2. เจือจางสารละลายตัวอย่างด้วยสารละลายเปปโตน ให้มีระดับความเจือจาง เท่ากับ 10^{-2} ถึง 10^{-3} แล้วผสมตัวอย่างให้เข้ากัน

3. นำตัวอย่างที่ความเจือจางทุกระดับ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มา Spread บนผิวหน้าจานอาหาร Baird Parker agar

4. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35.0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

5. ลักษณะโคโลนีของ *Staphylococcus aureus* มีลักษณะเยิ้มหนูน สีดำขอบขาว และมีโซนรอบๆ โคโลนี

6. แยกโคโลนีที่คาดว่า เป็นเชื้อ *Staphylococcus aureus* มาทดสอบ Coagulase test โดยเชื้อที่สงสัยมา 1 ลูบ ลงในอาหาร BHI ที่มีปริมาตร 0.2-0.3 มิลลิลิตร

7. ปิเปตพลาสมา เดิมลงไป 0.5 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35.0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง หรือมากกว่า หากพบว่าพลาสมาแข็งตัว แสดงว่าเชื้อที่ทดสอบ คือ *Staphylococcus aureus*

4. ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total viable count) ด้วยวิธี pour plate (USFDA, 2001c)

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Plate count agar (PCA)
2. สารละลายเปปโตน ร้อยละ 0.1 (0.1% Peptone solution)

วิธีการ

1. เขย่าตัวอย่าง แล้วเปิดฝาด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ
2. ทำการเจือจางตัวอย่างให้เป็น 10^{-1} - 10^{-3} ด้วยสารละลายเปปโตน ร้อยละ 0.1
3. ปิเปิดตัวอย่างจากข้อ 2 อย่างละ 1 มิลลิลิตร (ทำ 2 ซ้ำ) ลงในงานเพาะเชื้อที่นำเชื้อแล้ว
4. เททับด้วยอาหาร PCA ประมาณ 15 มิลลิลิตร
5. หมุนงานเพาะเชื้อเบาๆ เป็นวงกลม แล้วตั้งทิ้งไว้ให้วุ้นแข็งตัวประมาณ 15 นาที
6. บ่มเชื้อ ที่อุณหภูมิ 35.0 องศาเซลเซียส ในลักษณะงานคว่ำ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
7. ตรวจสอบจำนวนโคโลนีจากงานเพาะเชื้อที่มีจำนวนประมาณ 30-300 โคโลนี รายงานผล

เป็นจำนวน โคโลนีต่อมิลลิลิตรตัวอย่าง (CFU/ml)

5. ปริมาณยีสต์และรา ด้วยวิธี Spread plate (USFDA, 2001d)

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Potato dextrose agar (PDA) ผ่านการปรับค่าพีเอช เท่ากับ 3.5 ด้วย 10.0% กรดทาร์ทาริก
2. สารละลายเปปโตน ร้อยละ 0.1 (0.1% Peptone solution)

วิธีการ

1. เขย่าตัวอย่าง แล้วเปิดฝาด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ
2. ทำการเจือจางตัวอย่างให้เป็น 10^{-1} - 10^{-3} ด้วยสารละลายเปปโตน ร้อยละ 0.1
3. ปิเปิดตัวอย่างจากข้อ 2 อย่างละ 0.1 มิลลิลิตร (ทำ 2 ซ้ำ) ลงในงานเพาะเชื้อที่นำเชื้อแล้ว
4. ใช้แท่งแก้วปราศจากเชื้อเกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วผิวหน้าอาหาร
5. บ่มเชื้อ ที่อุณหภูมิ 25.0 องศาเซลเซียส ในลักษณะงานคว่ำ เป็นเวลา 3-5 วัน
6. ตรวจสอบจำนวนโคโลนีจากงานเพาะเชื้อที่มีจำนวนประมาณ 30-300 โคโลนี รายงานผล

เป็นจำนวน โคโลนีต่อมิลลิลิตรตัวอย่าง (CFU/ml)

ภาคผนวก ข การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส

ชุดที่.....

ผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น

ชื่อ-สกุล ผู้ทดสอบ วันที่ เวลา.....

คำอธิบาย กรุณาทดสอบชิมตัวอย่างที่เสนอให้จากซ้ายไปขวา แล้วให้คะแนนความชอบของตัวอย่างในแต่ละคุณลักษณะที่ใกล้เคียงกับความรู้สึกของท่านมากที่สุด โดยกำหนดให้

- | | |
|-------------------|---------------------|
| 9 = ชอบมากที่สุด | 4 = ไม่ชอบเล็กน้อย |
| 8 = ชอบมาก | 3 = ไม่ชอบปานกลาง |
| 7 = ชอบปานกลาง | 2 = ไม่ชอบมาก |
| 6 = ชอบน้อยที่สุด | 1 = ไม่ชอบมากที่สุด |
| 5 = เฉยๆ | |

คะแนนความชอบรวมของตัวอย่าง

รหัสตัวอย่าง
สี
รสหวาน
รสเปรี้ยว
ความรู้สึกภายในปาก (Mouthfeel)
คุณลักษณะ โดยรวม

หมายเหตุ คุณลักษณะ โดยรวมพิจารณาจากสี รสหวาน รสเปรี้ยว และความรู้สึกภายในปาก (Mouthfeel)

ข้อเสนอแนะ.....
.....

ขอบคุณค่ะ

ภาคผนวก ค ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ

Appendix Table 1. Analysis of variances in physical and chemical properties of fresh and dried roselle juices

	Levene's Test for Equality of Variances				t-test for Equality of Means				
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
								Upper	Lower
<i>L</i> *									
Equal variances assumed	.142	.714	16.219	10	.000	7.81167	.48164	6.73851	8.88483
Equal variances not assumed			16.219	9.920	.000	7.81167	.48164	6.73733	8.88600
<i>a</i> *									
Equal variances assumed	.375	.554	-2.852	10	.017	-.88833	.31144	-1.58227	-.19440
Equal variances not assumed			-2.852	9.925	.017	-.88833	.31144	-1.58298	-.19369
<i>b</i> *									
Equal variances assumed	1.333	.275	1.375	10	.199	.29667	.21576	-.18407	.77740
Equal variances not assumed			1.375	8.185	.206	.29667	.21576	-.19892	.79226
moisture									
Equal variances assumed	.095	.764	836.318	10	.000	78.82167	.09425	78.61167	79.03167
Equal variances not assumed			836.318	9.779	.000	78.82167	.09425	78.61102	79.03231
pH									
Equal variances assumed	16.875	.002	2.381	10	.039	.02167	.00910	.00139	.04194
Equal variances not assumed			2.381	5.869	.056	.02167	.00910	-.00072	.04405
TSS									
Equal variances assumed	.625	.448	-107.923	10	.000	-6.63333	.06146	-6.77028	-6.49638
Equal variances not assumed			-107.923	9.966	.000	-6.63333	.06146	-6.77035	-6.49632
Acidity									
Equal variances assumed	.063	.807	-89.482	10	.000	-2.20500	.02464	-2.25991	-2.15009
Equal variances not assumed			-89.482	9.260	.000	-2.20500	.02464	-2.26051	-2.14949

Appendix Table 1. Analysis of variances in physical and chemical properties of fresh and dried roselle juices (Cont.)

		Levene's Test for Equality of Variances										t-test for Equality of Means	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference		Upper	Lower	
TAC	Equal variances assumed	3.775	.081	18.094	10	.000	114.72000	6.34038	100.59274	128.84726			
	Equal variances not assumed			18.094	6.211	.000	114.72000	6.34038	99.33254	130.10746			
Ascorbic	Equal variances assumed	2.218	.167	17.391	10	.000	1.76000	.10120	1.53450	1.98550			
	Equal variances not assumed			17.391	7.331	.000	1.76000	.10120	1.52286	1.99714			
Phenolic	Equal variances assumed	1.922	.196	3.769	10	.004	1.57000	.41661	.64174	2.49826			
	Equal variances not assumed			3.769	7.767	.006	1.57000	.41661	.60425	2.53575			
EC ₅₀	Equal variances assumed	3.171	.105	-1.190	10	.853	-.28367	1.49225	-3.60861	3.04128			
	Equal variances not assumed			-1.190	8.541	.854	-.28367	1.49225	-3.68720	3.11987			
ABTS	Equal variances assumed	.418	.533	-37.215	10	.000	-33.08333	.88898	-35.06409	-31.10257			
	Equal variances not assumed			-37.215	9.342	.000	-33.08333	.88898	-35.08317	-31.08350			
FRAP	Equal variances assumed	8.285	.016	-4.57	10	.657	-1.81667	3.97546	-10.67455	7.04121			
	Equal variances not assumed			-4.57	6.739	.662	-1.81667	3.97546	-11.29134	7.65801			

Appendix Table 2. Analysis of variances in physical and chemical properties of dried roselle extracts and concentrated roselle extracts

Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means				95% Confidence Interval of the Difference				
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Upper	Lower	
<i>L</i> *	Equal variances assumed	.000	1.000	.000	10	1.000	.00000	.00236	-.00525	.00525
	Equal variances not assumed			.000	10.000	1.000	.00000	.00236	-.00525	.00525
<i>a</i> *	Equal variances assumed	.250	.628	1.000	10	.341	.00500	.00500	-.00614	.01614
	Equal variances not assumed			1.000	7.353	.349	.00500	.00500	-.00671	.01671
<i>b</i> *	Equal variances assumed	.000	.000	.000	10	1.000	.00000	.00316	-.00705	.00705
	Equal variances not assumed			.000	10.000	1.000	.00000	.00316	-.00705	.00705
pH	Equal variances assumed	1.008	.339	3.271	10	.008	.05167	.01579	.01648	.08686
	Equal variances not assumed			3.271	8.440	.011	.05167	.01579	.01557	.08776
TSS	Equal variances assumed	1.914	.197	-113.591	10	.000	-20.60000	.18135	-21.00408	-20.19592
	Equal variances not assumed			-113.591	6.525	.000	-20.60000	.18135	-21.03524	-20.16476
Acidity	Equal variances assumed	.134	.722	-117.833	10	.000	-6.05500	.05139	-6.16950	-5.94050
	Equal variances not assumed			-117.833	9.915	.000	-6.05500	.05139	-6.16963	-5.94037

Appendix Table 2. Analysis of variances in physical and chemical properties of dried roselle extracts and concentrated roselle extracts (Cont.)

		Levene's Test for Equality of Variances										t-test for Equality of Means	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference		Upper	Lower	
TAC	Equal variances assumed	19.142	.001	5.554	10	.000	39.82667	7.17032	23.85019	55.80314			
	Equal variances not assumed			5.554	5.185	.002	39.82667	7.17032	21.59126	58.06207			
Ascorbic	Equal variances assumed	3.739	.082	-7.499	10	.000	-29.45833	3.92842	-38.21141	-20.70526			
	Equal variances not assumed			-7.499	7.032	.000	-29.45833	3.92842	-38.73903	-20.17764			
Phenolic	Equal variances assumed	3.106	.109	129.159	10	.000	34.91000	.27029	34.30776	35.51224			
	Equal variances not assumed			129.159	6.821	.000	34.91000	.27029	34.26746	35.55254			
EC ₅₀	Equal variances assumed	2.276	.162	-8.048	10	.000	-9.05000	1.12455	-11.55566	-6.54434			
	Equal variances not assumed			-8.048	8.573	.000	-9.05000	1.12455	-11.61335	-6.48665			
ABTS	Equal variances assumed	21.829	.001	85.382	10	.000	215.79167	2.52738	210.16031	221.42302			
	Equal variances not assumed			85.382	5.249	.000	215.79167	2.52738	209.38638	222.19695			
FRAP	Equal variances assumed	68.075	.000	136.464	10	.000	438.62333	3.21420	431.46165	445.78502			
	Equal variances not assumed			136.464	5.006	.000	438.62333	3.21420	430.36398	446.88269			

Appendix Table 3. Analysis of variances in physical and chemical properties of concentrated roselle extract product before and after pasteurization

Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means					95% Confidence Interval of the Difference			
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Upper	Lower	
<i>L</i> *	Equal variances assumed	6.250	.031	1.000	10	.341	.00167	.00167	-.00205	.00538
	Equal variances not assumed			1.000	5.000	.363	.00167	.00167	-.00262	.00595
<i>a</i> *	Equal variances assumed	4.495	.060	.255	10	.804	.00167	.00654	-.01291	.01624
	Equal variances not assumed			.255	6.144	.807	.00167	.00654	-.01425	.01758
<i>b</i> *	Equal variances assumed	4.000	.073	1.195	10	.260	.00333	.00279	-.00288	.00955
	Equal variances not assumed			1.195	9.245	.262	.00333	.00279	-.00295	.00962
pH	Equal variances assumed	4.476	.060	-12.351	10	.000	-1.0000	.00810	-.11804	-.08196
	Equal variances not assumed			-12.351	6.637	.000	-1.0000	.00810	-.11936	-.08064
TSS	Equal variances assumed	23.034	.001	3.861	10	.003	2.16667	.56115	.91635	3.41699
	Equal variances not assumed			3.861	5.298	.011	2.16667	.56115	.74823	3.58510
Acidity	Equal variances assumed	1.250	.290	2.712	10	.022	.11667	.04302	.02080	.21253
	Equal variances not assumed			2.712	9.204	.023	.11667	.04302	.01967	.21367

Appendix Table 3. Analysis of variances in physical and chemical properties of concentrated roselle extract product before and after pasteurization (Cont.)

Levene's Test for		t-test for Equality of Means									
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference			
								Upper	Lower		
TAC	2.441	.149	48.398	10	.000	128.41500	2.65331	122.50307	134.32693		
			48.398	7.341	.000	128.41500	2.65331	122.19957	134.63043		
Ascorbic	2.239	.165	2.866	10	.017	6.40333	2.23451	1.42453	11.38213		
			2.866	7.802	.022	6.40333	2.23451	1.22771	11.57895		
Phenolic	.918	.360	-18.788	10	.000	-2.89000	.15383	-3.23274	-2.54726		
			-18.788	9.308	.000	-2.89000	.15383	-3.23623	-2.54377		
EC ₅₀	2.130	.175	-.721	10	.487	-14.04500	19.47002	-57.42691	29.33691		
			-.721	7.490	.493	-14.04500	19.47002	-59.48086	31.39086		
ABTS	.344	.571	-12.013	10	.000	-5.34500	.44494	-6.33639	-4.35361		
			-12.013	9.549	.000	-5.34500	.44494	-6.34278	-4.34722		
FRAP	139.215	.000	-1.543	10	.154	-5.4000	.35003	-1.31991	.23991		
			-1.543	5.301	.180	-5.4000	.35003	-1.42464	.34464		

Appendix Table 4. Analysis of variances in physical, chemical and antioxidant properties concentrated roselle extract products during storage in the presence of light at 27.0 °C for 0, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 months

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
<i>L*</i>	Between Groups	464.176	6	77.363	8868.969	.000
	Within Groups	.305	35	.009		
	Total	464.482	41			
<i>a*</i>	Between Groups	6.210	6	1.035	298.572	.000
	Within Groups	.121	35	.003		
	Total	6.332	41			
<i>b*</i>	Between Groups	14.259	6	2.376	463.596	.000
	Within Groups	.179	35	.005		
	Total	14.438	41			
pH	Between Groups	.024	6	.004	24.879	.000
	Within Groups	.006	35	.000		
	Total	.030	41			
TSS	Between Groups	5.183	6	.864	10.029	.000
	Within Groups	3.015	35	.086		
	Total	8.198	41			
Total acidity	Between Groups	.037	6	.006	2.682	.030
	Within Groups	.080	35	.002		
	Total	.117	41			
TAC	Between Groups	329468.083	6	54911.347	2579.833	.000
	Within Groups	744.970	35	21.285		
	Total	330213.053	41			

Appendix Table 4. Analysis of variances in physical, chemical and antioxidant properties concentrated roselle extract products during storage in the presence of light at 27.0 °C for 0, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 months (Cont.)

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Ascorbic acid	Between Groups	1708.089	6	284.682	80.675	.000
	Within Groups	123.506	35	3.529		
	Total	1831.596	41			
Phenolic	Between Groups	1157.719	6	192.953	3024.299	.000
	Within Groups	2.233	35	.064		
	Total	1159.952	41			
EC ₅₀	Between Groups	229424.261	6	38237.377	43.340	.000
	Within Groups	30879.587	35	882.274		
	Total	260303.848	41			
ABTS	Between Groups	805.465	6	134.244	192.579	.000
	Within Groups	24.398	35	.697		
	Total	829.863	41			
FRAP	Between Groups	1272.347	6	212.058	702.532	.000
	Within Groups	10.565	35	.302		
	Total	1282.912	41			

Appendix Table 5. Analysis of variances in physical, chemical and antioxidant properties concentrated roselle extract products during storage in the absence of light at 27.0 °C for 0, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 months

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
<i>L*</i>	Between Groups	451.028	6	75.171	12207.864	.000
	Within Groups	.216	35	.006		
	Total	451.244	41			
<i>a*</i>	Between Groups	5.173	6	.862	174.221	.000
	Within Groups	.173	35	.005		
	Total	5.346	41			
<i>b*</i>	Between Groups	12.256	6	2.043	435.785	.000
	Within Groups	.164	35	.005		
	Total	12.420	41			
pH	Between Groups	.014	6	.002	15.863	.000
	Within Groups	.005	35	.000		
	Total	.019	41			
TSS	Between Groups	3.320	6	.553	21.051	.000
	Within Groups	.920	35	.026		
	Total	4.240	41			
Total acidity	Between Groups	.048	6	.008	2.961	.019
	Within Groups	.095	35	.003		
	Total	.144	41			
TAC	Between Groups	322564.140	6	53760.690	1327.049	.000
	Within Groups	1417.901	35	40.511		
	Total	323982.041	41			

Appendix Table 5. Analysis of variances in physical, chemical and antioxidant properties concentrated roselle extract products during storage in the absence of light at 27.0 °C for 0, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 months (Cont.)

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Ascorbic acid	Between Groups	8795.665	6	1465.944	98.287	.000
	Within Groups	522.022	35	14.915		
	Total	9317.686	41			
Phenolic	Between Groups	1123.841	6	187.307	3946.426	.000
	Within Groups	1.661	35	.047		
	Total	1125.502	41			
EC ₅₀	Between Groups	170092.725	6	28348.787	32.277	.000
	Within Groups	30740.229	35	878.292		
	Total	200832.954	41			
ABTS	Between Groups	718.425	6	119.738	80.254	.000
	Within Groups	52.219	35	1.492		
	Total	770.645	41			
FRAP	Between Groups	1181.964	6	196.994	864.083	.000
	Within Groups	7.979	35	.228		
	Total	1189.943	41			

Appendix Table 6. Analysis of variances of concentrated roselle extract products during storage at 4.0 °C for 0 and 12 months

	Levene's Test for		t-test for Equality of Means					95% Confidence Interval of			
	Equality of Variances		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	the Difference	
										Upper	Lower
color	Equal variances assumed	.735	.401	.684	22	.501	.167	.244	-.339	.672	
	Equal variances not assumed			.684	20.654	.501	.167	.244	-.340	.674	
sweetness	Equal variances assumed	3.943	.060	.277	22	.784	.083	.300	-.540	.706	
	Equal variances not assumed			.277	17.452	.785	.083	.300	-.549	.716	
sourness	Equal variances assumed	1.568	.224	1.680	22	.107	.583	.347	-.137	1.303	
	Equal variances not assumed			1.680	20.315	.108	.583	.347	-.140	1.307	
Mouthfeel	Equal variances assumed	1.150	.295	1.956	22	.063	.667	.341	-.040	1.373	
	Equal variances not assumed			1.956	20.598	.064	.667	.341	-.043	1.376	
overall	Equal variances assumed	6.296	.020	1.254	22	.223	.417	.332	-.273	1.106	
	Equal variances not assumed			1.254	17.640	.226	.417	.332	-.283	1.116	

Appendix Table 7. Analysis of variances of concentrated roselle extract products during storage at 27.0 °C for 0 and 12 months

	Levene's Test for Equality of Variances				t-test for Equality of Means				95% Confidence Interval of the Difference	
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Upper	Lower	
color	Equal variances assumed	3.725	.067	4.795	22	.000	2.083	.434	1.182	2.984
	Equal variances not assumed			4.795	16.100	.000	2.083	.434	1.163	3.004
sweetness	Equal variances assumed	12.166	.002	2.356	22	.028	1.083	.460	.130	2.037
	Equal variances not assumed			2.356	13.532	.034	1.083	.460	.094	2.073
sourness	Equal variances assumed	4.546	.044	2.717	22	.013	1.167	.429	.276	2.057
	Equal variances not assumed			2.717	17.115	.015	1.167	.429	.261	2.072
mouthfeel	Equal variances assumed	4.089	.055	2.659	22	.014	1.083	.407	.238	1.928
	Equal variances not assumed			2.659	17.840	.016	1.083	.407	.227	1.940
overall	Equal variances assumed	7.472	.012	3.527	22	.002	1.250	.354	.515	1.985
	Equal variances not assumed			3.527	16.779	.003	1.250	.354	.501	1.999

Appendix Table 8. Analysis of variances of concentrated roselle extract products during storage at 4.0 °C and 27.0 °C for 0 months

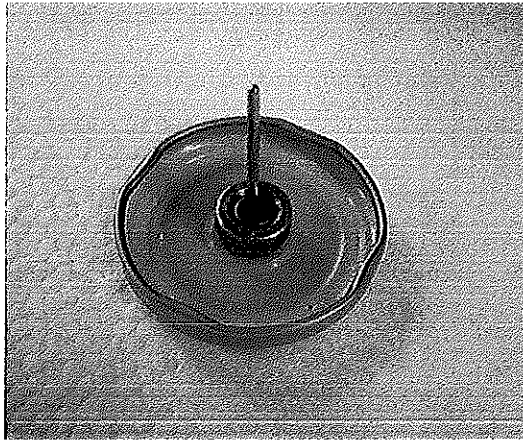
Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means					95% Confidence Interval of the Difference		
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Upper	Lower
color	.000	1.000	.000	22	1.000	.000	.273	-.566	.566
			.000	22.000	1.000	.000	.273	-.566	.566
sweetness	.000	1.000	.000	22	1.000	.000	.210	-.436	.436
			.000	22.000	1.000	.000	.210	-.436	.436
sourness	.000	1.000	.000	22	1.000	.000	.293	-.608	.608
			.000	22.000	1.000	.000	.293	-.608	.608
mouthfeel	.000	1.000	.000	22	1.000	.000	.293	-.608	.608
			.000	22.000	1.000	.000	.293	-.608	.608
overall	.000	1.000	.000	22	1.000	.000	.236	-.489	.489
			.000	22.000	1.000	.000	.236	-.489	.489

Appendix Table 9. Analysis of variances of concentrated roselle extract products during storage at 4.0 °C and 27.0 °C for 12 months

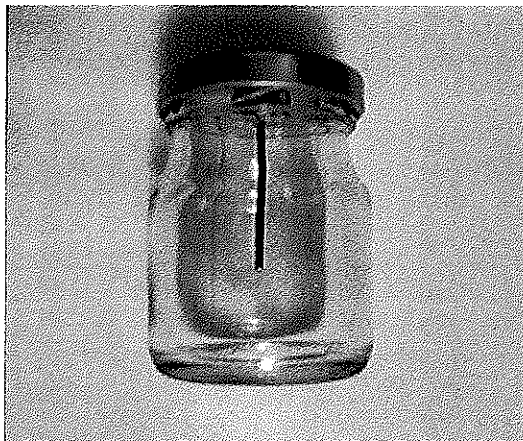
Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means				95% Confidence Interval of the Difference				
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Upper	Lower	
color	Equal variances assumed	6.498	.018	4.600	22	.000	1.917	.417	1.053	2.781
	Equal variances not assumed			4.600	14.142	.000	1.917	.417	1.024	2.809
sweetness	Equal variances assumed	3.882	.062	1.970	22	.062	1.000	.508	-.053	2.053
	Equal variances not assumed			1.970	18.011	.064	1.000	.508	-.066	2.066
sourness	Equal variances assumed	1.145	.296	1.246	22	.226	.583	.468	-.387	1.554
	Equal variances not assumed			1.246	20.282	.227	.583	.468	-.392	1.559
mouthfeel	Equal variances assumed	1.009	.326	.940	22	.357	.417	.443	-.502	1.336
	Equal variances not assumed			.940	20.666	.358	.417	.443	-.506	1.339
overall	Equal variances assumed	.124	.728	1.961	22	.063	.833	.425	-.048	1.715
	Equal variances not assumed			1.961	21.846	.063	.833	.425	-.048	1.715

ภาคผนวก ง การหาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (ปารมี ชุมศรี, 2550)

ตำแหน่งของการติดตั้งส่วน Stuffing box เข้ากับฝาขวดแก้ว โดยให้ส่วนปลายของเทอร์โมคัปเปิล อยู่ที่จุดร้อนซ้ำที่สุดของขวดแก้ว ประมาณ 1/2 และ 1/3 เท่าของความสูงของขวดแก้ว วัดจากก้นขวด



ติดตั้งส่วน Stuffing box เข้ากับฝาขวดแก้ว



ปลายเทอร์โมคัปเปิลอยู่ที่ตำแหน่ง 1/2 และ 1/3 เท่าของความสูงของขวดแก้ว

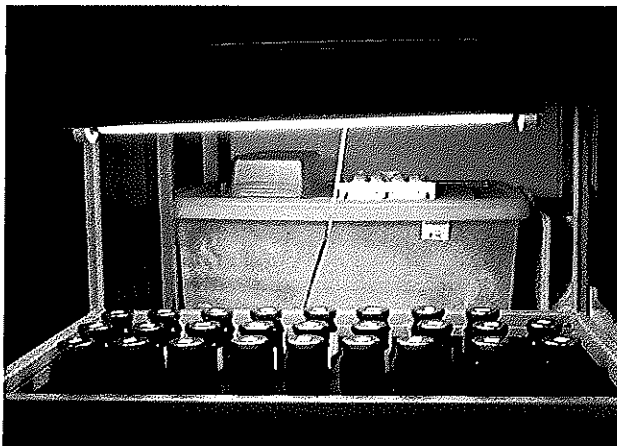
ภาคผนวก จ ผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น และสถานะการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดง
สกัดเข้มข้น

จ-1 ผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น



Appendix Figures 1. Concentrated roselle extract product

จ-2 สถานะการเก็บรักษา (ในสถานะที่มีและไม่มีแสงสว่าง) ต่อคุณภาพทางกายภาพ เคมี และสมบัติ
การต้านอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น



Appendix Figures 2. The concentrated roselle extract products during storage in the presence of
light at $27.0 \pm 1.0^\circ \text{C}$ for 0, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 months



Appendix Figures 3. The concentrated roselle extract products during storage in the absence of light at $27.0 \pm 1.0^\circ \text{C}$ for 0, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 months

จ-3 สภาวะการเก็บรักษา (ในสภาวะที่ไม่มีแสงสว่าง) ต่อคุณภาพทางจุลินทรีย์ และทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์กระเจียบแดงสกัดเข้มข้น



Appendix Figures 4. The concentrated roselle extract products during storage in the absence of light at 4.0 ± 1.0 and $27.0 \pm 1.0^\circ \text{C}$ for 0 and 12 months

ภาคผนวก ข คุณภาพทางเคมี และสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของส่วนผสมในผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบ
แดงสกัดเข้มข้น

Appendix Table 10. Total phenolic content (mg GAE/g sample) of the each ingredient from concentrated roselle extract products

Ingredients	Total phenolic content (mg GAE/g sample)
A	9.95±0.06
B	9.94±0.03
C	7.86±0.04
D	6.75±0.08
E	6.70±0.05
F	6.66±0.11
G	20.54±0.32
H	19.57±0.24
I	6.78±0.06
J	6.74±0.02

* Determination was done in triplicate

GAE, Gallic acid equivalents

Total phenolic contents, expressed as milligrams of gallic acid equivalents per gram of freeze-dried sample using gallic acid standard curve

A: Concentrated roselle extract (CR)

B: CR+Fructose

C: CR+Fructose+Honey

D: CR+Fructose+Honey+Oligofructose

E: CR+ Fructose+Honey+Oligofructose+Vitamin A

F: CR+ Fructose+Honey+Oligofructose+Vitamin A+Vitamin E

G: CR+Honey

H: CR+Oligofructose

I: CR+ Vitamin A

J: CR+ Vitamin E

Appendix Table 11. Total anthocyanin content (mg/l sample) of the each ingredient from concentrated roselle extract products

Ingredients	Total anthocyanin contents (mg/l sample)
A	439.18±24.22
B	529.68±1.73
C	571.60±2.17
D	588.22±1.07
E	608.34±4.10
F	619.95±43.74
G	525.10±1.40
H	473.66±3.53
I	431.83±2.55
J	425.32±0.95

*Determination was done in triplicate

Total anthocyanin contents, expressed as cyanidin 3-glucoside milligrams per liter concentrated roselle extract

A: Concentrated roselle extract (CR)

G: CR+Honey

B: CR+Fructose

H: CR+Oligofructose

C: CR+Fructose+Honey

I: CR+ Vitamin A

D: CR+Fructose+Honey+Oligofructose

J: CR+ Vitamin E

E: CR+ Fructose+Honey+Oligofructose+Vitamin A

F: CR+ Fructose+Honey+Oligofructose+Vitamin A+Vitamin E

Appendix Table 12. The antioxidant properties (by DPPH assay) of the each ingredient from concentrated roselle extract products

Ingredients	DPPH, EC ₅₀ (µg/ml)
A	438.63±23.70
B	318.69±8.39
C	321.07±19.20
D	500.99±6.51
E	402.61±34.39
F	360.95±9.34
G	147.42±4.87
H	110.03±3.60
I	40.01±1.29
J	388.90±13.51

*Determination was done in triplicate

DPPH radical scavenging activity, expressed as EC₅₀ and BHT as positive standard

EC₅₀, Efficient concentration, the amount of roselle extract (µg) needed for 50% decreasing in the initial DPPH concentration per 1.0 ml of initial solution

The EC₅₀ of BHT standard = 13.82±0.38 ug/ml

A: Concentrated roselle extract (CR)

B: CR+Fructose

C: CR+Fructose+Honey

D: CR+Fructose+Honey+Oligofructose

E: CR+ Fructose+Honey+Oligofructose+Vitamin A

F: CR+ Fructose+Honey+Oligofructose+Vitamin A+Vitamin E

G: CR+Honey

H: CR+Oligofructose

I: CR+ Vitamin A

J: CR+ Vitamin E

Appendix Table 13. The antioxidant properties (by ABTS assay) of the each ingredient from concentrated roselle extract products

Ingredients	ABTS, TEAC ($\mu\text{mol TE/g}$)
A	243.25 \pm 2.11
B	38.50 \pm 0.73
C	31.84 \pm 1.01
D	25.45 \pm 1.00
E	27.11 \pm 0.89
F	28.57 \pm 0.86
G	94.75 \pm 0.69
H	82.74 \pm 2.49
I	251.72 \pm 1.43
J	258.94 \pm 0.63

*Determination was done in triplicate

ABTS radical scavenging activity, expressed as millimoles Trolox equivalents per gram of freeze-dried sample using Trolox standard curve

TEAC: Trolox equivalents antioxidant capacity

TE: Trolox equivalents, millimolar of Trolox solution having an antioxidant capacity equivalent to 1.0 gram of the substance under investigation

A: Concentrated roselle extract (CR)

G: CR+Honey

B: CR+Fructose

H: CR+Oligofructose

C: CR+Fructose+Honey

I: CR+ Vitamin A

D: CR+Fructose+Honey+Oligofructose

J: CR+ Vitamin E

E: CR+ Fructose+Honey+Oligofructose+Vitamin A

F: CR+ Fructose+Honey+Oligofructose+Vitamin A+Vitamin E

Appendix Table 14. The antioxidant properties (by FRAP assay) of the each ingredient from concentrated roselle extract products

Ingredients	FRAP, TEAC ($\mu\text{mol TE/g}$)
A	467.26 \pm 5.12
B	67.34 \pm 0.47
C	56.63 \pm 0.30
D	48.20 \pm 2.36
E	46.21 \pm 0.34
F	366.23 \pm 0.97
G	299.56 \pm 3.18
H	304.44 \pm 2.69
I	434.31 \pm 3.94
J	458.03 \pm 3.60

* Determination was done in triplicate

FRAP: Ferric reducing antioxidant power, expressed as millimoles Trolox equivalents per gram of freeze-dried sample using Trolox standard curve

TEAC: Trolox equivalents antioxidant capacity

TE: Trolox equivalents, millimolar of Trolox solution having an antioxidant capacity equivalent to 1.0 gram of the substance under investigation

A: Concentrated roselle extract (CR)

G: CR+Honey

B: CR+Fructose

H: CR+Oligofructose

C: CR+Fructose+Honey

I: CR+ Vitamin A

D: CR+Fructose+Honey+Oligofructose

J: CR+ Vitamin E

E: CR+ Fructose+Honey+Oligofructose+Vitamin A

F: CR+ Fructose+Honey+Oligofructose+Vitamin A+Vitamin E

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล	นางสาวเพ็ญศรี เรืองศรี		
รหัสประจำตัวนักศึกษา	4911020073		
วุฒิการศึกษา			
วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา	
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีอาหาร)	มหาวิทยาลัยรังสิต	2548	

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

- Ruang Sri, P., Chumsri, P., Sirichote, A. and Itharat, A. 2008. Changes in quality and bioactive properties of concentrated roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) extract. *As. J. Food Ag-Ind.* 1: 62-67.
- Ruang Sri, P., Chumsri, P., Sirichote, A. and Itharat, A. 2007. Changes in quality and bioactive properties of concentrated roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) extract. *In Proceeding of The 9th Agro-Industrial Conference, Food Innovation Asia 2007: "Q" Food for Good Life.* BITEC Bangkok, Thailand. 14-15 June 2007.