รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **ชุดโครงการวิจัย** : วิจัยและพัฒนาการเพิ่มมูลค่าผลผลิต

2. **โครงการวิจัย** : การผลิตผลิตภัณฑ์ใหม่จากพืช

   กิจกรรม : การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการสกัดสารสำคัญและเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์

3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : การผลิตแอนโทไซยานินผง

   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Anthocyanins Powder Production

4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

   หัวหน้าการทดลอง : นางสาววิมลวรรณ วัฒนวิจิตร
   สำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

   ผู้ร่วมงาน : นางสาวสุปรียา ศุขเกษม
   นายประยูร เอ็นมาก
   นายโกเมศ สัตยาวุธ
   นางสาวอกนิษฐ์ พิศาลวัชรินทร์
   สำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

5. **บทคัดย่อ**

การศึกษาการผลิตแอนโทไซยานินผงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดและศึกษาองค์ประกอบของแอนโทไซยานินจากเปลือกมังคุด ผลการโคพิกเมนต์ต่อการเปลี่ยนแปลงของสีแอนโทไซยานินและการทำแห้งแอนโทไซยานินจากเปลือกมังคุด ดำเนินการทดลองระหว่างปี 2554 – 2556 ที่สำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร เริ่มด้วยการศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสมโดยใช้ใช้สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 M ในเอทานอล 95 % v/v และสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 M ในเอทานอล 50 % v/v ผลของชนิดกรดในตัวทำละลาย อัตราส่วนของเปลือกมังคุดต่อตัวทำละลายที่เหมาะสม และเวลาในการสกัด พบว่าการใช้สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 M

ในเอทานอล 95 % v/v เป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดแอนโทไซยานินจากเปลือกมังคุดมากกว่าสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 M ในเอทานอล 50 % v/v และ สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 M โดยการใช้กรดไฮโดรคลอริกสามารถสกัดแอนโทไซยานินจากเปลือกมังคุดได้ดีกว่ากรดซิตริก และกรดอะซิติก อัตราส่วนเปลือกมังคุดต่อปริมาตรตัวทำละลายที่เหมาะสมคือ 1 : 30 และเวลาในการสกัด 20 นาที และศึกษาองค์ประกอบของสารสกัดแอนโทไซยานินจากเปลือกมังคุดโดยวิธี Liquid Chromatography – Mass spectrometry (LC-ESI-MSn) พบว่าแอนโทไซยานินจากเปลือกมังคุดมีแอนโทไซยานิน 2 ชนิดเป็นองค์ประกอบหลัก คือ cyanidin-3-o-sophoroside และ cyanidin-3-o-glucoside เมื่อนำสารสกัดแอนโทไซยานินจากเปลือกมังคุดมาศึกษาผลของโคพิกเมนต์ 5 ชนิด ได้แก่ tannic acid caffeic acid ferulic acid coumaric acid และ benzoic acid พบว่าการเติมโคพิกเมนต์สามารถเพิ่มค่าการดูดกลืนแสงของแอนโทไซยานินจากเปลือกมังคุดได้เล็กน้อยเท่านั้น โดยไม่สามารถช่วยเพิ่มการดูดกลืนแสงที่ pH 4 และ 6 ได้ เมื่อศึกษาการทำแห้งแบบพ่นฝอยแอนโทไซยานินจากเปลือกมังคุดโดยใช้อุณหภูมิลมขาเข้า 160°C จะทำให้แอนโทไซยานินเกิดการสลายตัว จึงใช้อุณหภูมิลมขาเข้า 120°C โดยการทำแห้งโดยใช้อาร์จีเนทเป็นสารช่วยทำแห้งจะให้แอนโทไซยานินที่มีสีเข้มกล่าสารช่วยทำแห้งชนิดอื่น เนื่องจาก อาร์จีเนทมีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้สูงกว่ามอลโตเดกตริน กลูโคสไซรัป และ คอร์นไซรัป และจากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของสีแอนโทไซยานิน พบว่าการให้อุณหภูมิที่สูงขึ้น และเวลาในการให้ความร้อนมากขึ้นจะทำให้สีของแอนโทไซยานินจางลง

6. คำนำ

ในปัจจุบันการศึกษาสีจากธรรมชาติได้รับความสนใจมากขึ้น เนื่องจากการขยายตัวแทนที่สีสังเคราะห์ซึ่งมีผลกระทบต่อมนุษย์ สีเป็นปัจจัยสำคัญที่ช่วยดึงดูดให้ผู้บริโภคอยากซื้อสินค้า เนื่องจากสีเป็นปัจจัยแรกที่กระทบประสาทสัมผัสของผู้บริโภค และเป็นคุณลักษณะที่แสดงคุณภาพของสินค้าต่างๆ ให้ปรากฏแก่ผู้บริโภค สีของอาหารจะเป็นคุณลักษณะที่ช่วยบอกคุณภาพของอาหาร ทั้งอาหารธรรมชาติและอาหารที่ผ่านการแปรรูปแล้ว สำหรับอาหารธรรมชาติ เช่น ผัก ผลไม้ เนื้อสัตว์และปลาชนิดต่างๆ สีเป็นปัจจัยบ่งบอกความแก่อ่อนลักษณะเฉพาะของผักผลไม้ เนื้อสัตว์และปลาชนิดต่างๆ เป็นต้น ส่วนอาหารที่ผ่านการแปรรูปแล้ว สีที่มีอยู่ตามธรรมชาติมักจะมีการเปลี่ยนแปลงผู้ผลิตจึงได้พยายามใช้สีผสมอาหารต่าง ๆ ซึ่งอาจเป็นสีธรรมชาติหรือสีสังเคราะห์แต่งผลิตภัณฑ์อาหารนั้นให้มีสีใกล้เคียงกับอาหารธรรมชาติ ทั้งนี้เพื่อดึงดูดใจผู้บริโภค

แอนโทไซยานิน เป็นสีจากพืชที่นิยมใช้กันมากในอุตสาหกรรมอาหาร สีจากธรรมชาติที่ที่ละลายน้ำได้ในสภาพความเป็นกรด-ด่างต่ำ จะมีสีแดงและในสภาพความเป็นกรด-ด่างสูงจะมีสีน้ำเงิน พบมากในดอกอัญชัน กระเจี๊ยบ องุ่น และมังคุด แอนโทไซยานิน มีคุณสมบัติที่โดดเด่นและได้รับการยอมรับแพร่หลายว่าเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะเพิ่มคุณค่าและสร้างความแตกต่างให้กับผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ได้ แต่เนื่องจากความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ แสง เอนไซม์ และโลหะ มีผลต่อความคงตัวของสีสารชนิดนี้ ดังนั้น

การนำ แอนโทไซยานินไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมจำเป็นคำนึงถึงการเพิ่มความคงทนของสีแอนโทไซยานินที่จะนำไปใช้ประโยชน์ด้วย

แอนโทไซยานิน เป็นรงควัตถุตามธรรมชาติอยู่ในกลุ่ม Flavonoids ละลายได้ในน้ำ ให้เฉดสีต่าง ๆ กัน เช่น ฟ้า, ม่วง, แดง, และส้ม ขึ้นอยู่กับค่าความเป็นกรดเป็นเบส (Jackman and Smith, 1996) สารจำพวกแอนโทไซยานินสามารถช่วยยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชั่นและต่อต้านอนุมูลอิสระได้ (Conner et al., 2002; Prior et al., 1998; Youdim et al., 2002) จึงช่วยป้องกันโรคประสาท (neuronal) โรคหลอดเลือดและหัวใจ (cardiovascular illnesses) มะเร็ง และเบาหวาน(Castañeda-Ovando et al.,2009) แอนโทไซยานินพบในพืชต่าง ๆ เช่น บลูเบอร์รี่ (Cho et al., 2004), ลูกหม่อน (Gerasopoulos and Stavroulakis, 1997), มะเกี๋ยง (Lampang Agricultural and Training Centre, 2001), ฝรั่งและแก้วมังกรที่มีเนื้อภายในเป็นสีแดง นอกจาก anthocyanins แล้วผลไม้จำพวกสตรอเบอร์รี่ พลัม ลูกพีช ยังมีสารประกอบประเภท phenolics อื่น ๆ อีกเช่น caffeic acid, rutin, quercetin 3-glucoside, chlorogenic acid อีกด้วย (Tomas-Lorente et al., 1992)

แอนโทไซยานินเป็นสีจากธรรมชาติที่ไม่มีพิษ ละลายน้ำได้ทำให้เป็นที่น่าสนใจในการประโยชน์เป็นจำนวนมาก แต่เนื่องจากเป็นสีที่เปลี่ยนตามสภาพความเป็นกรด-ด่าง สลายตัวได้ที่มีอุณหภูมิและแสง จึงมีงานวิจัยศึกษาและพัฒนาสีแอนโทไซยานินจากพืชต่าง ๆ เช่น การพัฒนาสีที่มีความเสถียรในอาหารและเครื่องดื่มในช่วง pH 2-8 จาก Heavenly Blue และ Morning Glory โดยการ acylated กับ caffeic acid ได้ peonidin 3-(dicaffeylsophoroside)-5-glucoside (Asen et al.,1979) การเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของแอนโทไซยานินจากกลีบดอก hydrangea และ Chinese bell flower กับโลหะอลูมิเนียมและแมกนีเซียม เกิดเป็นสารประกอบสีน้ำเงิน (Køhler et al.,2005) การพัฒนาสีแอนโทไซยานินจากทานตะวันเปลือกสีม่วง โดยสกัดด้วยสารละลายในสภาวะที่เป็นกรด ซึ่งจะได้สารสีที่มีสีแดงและมีความเสถียรในช่วง pH กว้าง (Fox, 2000)

การสกัดแอนโทไซยานินสามารถสกัดได้โดย โดยนำตัวอย่างพืชมาบดแล้วสกัดด้วยสารผสม 3 ชนิด ได้แก่ methanol, acetic acid และน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 25:1:24 (Garcia-Viguera et al.,1997) นอกจากนี้ ยุภาพร (2547) ได้สกัดแอนโทไซยานินจากเปลือกมังคุดโดยใช้ 1%HCl ใน 95% ethanol เป็นตัวทำละลาย พบว่าพบว่าอัตราส่วนระหว่างเปลือกมังคุดต่อตัวทำละลายที่เหมาะสมคือ 1:25 และเวลาในการสกัดน้อยที่สุดที่ให้ค่าปริมาณแอนโทไซยานินสูงสุดคือ 1 ชั่วโมง ส่วนด้านนอกของเปลือกมังคุดเป็นส่วนที่มีปริมาณแอนโทไซยานินสูงกว่าส่วนด้านในของเปลือกมาก และความคงตัวของแอนโทไซยานินที่ pH ต่ำ (1.0) จะมีความคงตัวสูงกว่าสภาวะที่ pH สูง (4.0) ที่อุณหภูมิต่ำ (4±3°C)ความคงตัวสูงกว่าสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง (30±3°C) สภาวะที่ไม่มีแสงความคงตัวของแอนโทไซยานินสูงกว่าสภาวะที่มีแสง และความคงตัวของแอนโทไซยานินจะลดลงตาม

ระยะเวลาการเก็บที่นานขึ้น แสงและอุณหภูมิจะส่งผลต่อความคงตัวของแอนโทไซยานินในทางที่เสริมกันคือ สภาวะที่มีแสงและอุณหภูมิสูงความคงตัวของแอนโทไซยานินจะต่ำที่สุด

นอกจากนี้มีการศึกษาเพื่อพัฒนาการทำแห้งแบบพ่นฝอยสีแอนโทไซยานินจากพืชหลายชนิดเช่น microencapsulated ของสีแอนโทไซยานินสกัดจากดอกกุหลาบโดยไมโครเวฟ และใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย อัตราส่วนระหว่างของตัวอย่างต่อตัวทำละลายเป็น 1 : 5 ทำให้บริสุทธิ์ด้วย AB-8 macrospore resin ชะด้วยเอทานอล 70 % แล้ว microencapsulated โดยส่วนของแกนเป็นแอนโทไซยานินจากดอกกุหลาบ 15 % และส่วนผนังหุ้มเป็นขี้ผึ้ง (bee's wax) และ stearic acid ในอัตราส่วน 1 : 1 พบว่าความเสถียรของแอนโทไซยานินเพิ่มขึ้นในสภาวะที่มี pH แสง และความร้อน (Ge, *et al*., 2009) และ microencapsulated ของสีแอนโทไซยานินจากแครอทดำ (black carrot) โดยใช้ maltodextrins [Stardri 10 (10DE), Glucodry 210 (20–23DE) และ MDX 29 (28–31 DE) เป็นผนังหุ้มและตัวพาในการทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray drying) ซึ่งพบว่าใช้ Glucodry 210 เป็นผนังหุ้มได้ดีที่สุด (Ersus and Yurdagel, 2007)

7. วิธีดำเนินการ :

- อุปกรณ์และสารเคมี

- ตัวอย่างมังคุด ซื้อมาจากตลาดไท
- เอทานอล (AR)
- กรดไฮโดรคลอริก (AR)
- โปแทสเซียม คลอไรด์ (AR)
- โซเดียม อะซีเตท (AR)
- กรดซิตริก (เกรดอาหาร,บริษัท รวมเคมี 1986 จำกัด)
- โซเดียมอาร์จีเนท (เกรดอาหาร,บริษัท รวมเคมี 1986 จำกัด)
- มอลโตเดกตริน (DE 10, เกรดอาหาร,บริษัท รวมเคมี 1986 จำกัด)
- กลูโคสไซรัป
- คอร์นไซรัป
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิพร้อมเครื่องเขย่า Julabo รุ่น SW 21

- เครื่องเตรียมอาหารขนาดเล็ก (Mara, MR1168)
- สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Cecil, Model 2000)
- เครื่องวัดปริมาณน้ำอิสระ Novasina รุ่น TH 200
- เครื่องวัดสี (Chroma meter, Minolta รุ่น CR 400)
- เครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย

- วิธีการ

1. การศึกษาวิธีที่เหมาะสมในการสกัดแอนโทไซยานินจากเปลือกมังคุด

การเตรียมตัวอย่างเปลือกมังคุด

นำเปลือกมังคุดที่ล้างสะอาดมาคว้านเอาเฉพาะผิวด้านนอก เก็บใส่ซิปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20°C ก่อนนำมาทดลองทิ้งไว้ให้ละลายที่อุณหภูมิห้อง แล้วบดละเอียดด้วยเครื่องปั่นไฟฟ้า

1.1 การศึกษาผลของชนิดตัวทำละลายในการสกัดแอนโทไซยานินจากเปลือกมังคุด

การศึกษาผลของชนิดของตัวทำละลายการสกัดแอนโทไซยานินจากเปลือกมังคุดโดยเปรียบการสกัดแอนโทไซยานินจากเปลือกมังคุดด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 M สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 M ในเอทานอล 50%v/v และสารละลายกรดโอโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 M ในเอทานอล 95%v/v โดยมีวิธีการดังนี้

- ชั่งเปลือกมังคุดบดละเอียดแล้ว 1 g ใส่ในขวดรูปชมพู่
- เติมตัวทำละลาย ได้แก่ สารละลายกรดโอโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 M และสารละลายกรดโอโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 M ในเอทานอล 95%v/v ปริมาตร 30 mL แล้วปิดปากขวดด้วยพาราฟิล์ม
- นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า ตั้งอุณหภูมิ 25°C และความเร็วรอบ 120 rpm เป็นเวลา 20 นาที
- กรองแยกกากแบบลดความดันโดยใช้กระดาษกรอง whatman no.1 สังเกตสีของสารละลายที่สกัดได้
- หาปริมาณแอนโทไซยานินโดยใช้วิธี pH-differential ประยุกต์ตามวิธี AOAC Official method 2005.02

1.2 การศึกษาชนิดกรดในตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดแอนโทไซยานินจากเปลือกมังคุด

การศึกษาผลของกรดในตัวทำละลายในการสกัดแอนโทไซยานินจากเปลือกมังคุดโดยศึกษาโดยศึกษาถึงชนิดกรด ได้แก่ กรดไฮโดรคลอริก กรดกรดอะซีติก และกรดซิตริก ความเข้มข้น 0.1 M ในเอทา

นอล 95 % v/v สกัดแอนโทไซยานินโดยใช้เปลือกนอกมังคุดบดละเอียด 1 g ปริมาตรตัวทำละลาย 30 mL ใช้เวลาในการสกัด 20 นาที แล้วหาปริมาณแอนโทไซยานินโดยวิธี pH-differential ประยุกต์ตามวิธี AOAC Official method 2005.02

1.3 ศึกษาอัตราส่วนเปลือกมังคุดต่อปริมาตรตัวทำละลายที่เหมาะสม

การศึกษาอัตราส่วนเปลือกมังคุดต่อปริมาตรตัวทำละลายที่เหมาะสมโดยใช้สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 M ในเอทานอล 95 % v/v เป็นตัวทำละลาย และศึกษาอัตราส่วนเปลือกมังคุดต่อตัวทำละลาย 3 อัตราส่วนคือ 1 : 10 1 : 20 และ 1 : 30 ใช้เวลาในการสกัด 20 นาที โดยมีวิธีการสกัดดังนี้

1. ชั่งตัวอย่างเปลือกนอกมังคุดบดละเอียดน้ำหนัก 1 กรัม ใส่ในขวดรูปกรวย
2. เติมตัวทำละลายปริมาตร 10 20 และ 30 mL เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 20 นาที
3. กรองแยกกากด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 เก็บสารละลายส่วนใส
4. นำตะกอนสกัดซ้ำจนกว่าจะได้สารละลายที่ได้ จะมีสีจางหรือไม่มีสี เปรียบเทียบจำนวนครั้งในการสกัดซ้ำ

1.4 ศึกษาผลของเวลาในการสกัดต่อปริมาณแอนโทไซยานินที่สกัดได้

การศึกษาผลของเวลาในการสกัดต่อปริมาณแอนโทไซยานินที่สกัดได้ โดยใช้สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 M ในเอทานอล 95 % v/v ในอัตราส่วนเปลือกมังคุดต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1 : 30 ใช้เวลาในการสกัด 20 40 และ 60 นาที

2. การวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดแอนโทไซยานินจากเปลือกมังคุด

การวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดแอนโทไซยานินจากเปลือกมังคุดโดยวิธี Liquid Chromatography – Mass spectrometry (LC-ESI-MSn) ส่งวิเคราะห์ที่หน่วยเครื่องมือกลาง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เทียบกับสารมาตรฐาน 5 ชนิด ได้แก่ delphinidin-3,5-O-diglucoside, cyanidin-3-O-sophoroside, cyanidin-3-Oglucoside, cyanidin-3-O-rurinoside และ pelargonidin-3-O-glucoside โดยรายละเอียดเครื่องมือที่วิเคราะห์มีดังนี้

- Mass spectrometer ; Bruker Daltanic Model : Esquire 3000+ (Ion trap with electrospray ionization source)
- Liquid Chromatography module ; Agilant Model : 1100 (Binary pump, Degasser, Autosampler, DAD)
- Column ; Couple of two Hypersil Gold 4.6 x 150 mm, particle size 3 micron

สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์แสดงในตาราง 1 โดย mobile phase ที่ใช้ได้แก่สารละลายผสม เมทานอล : กรดฟอร์มิก และน้ำ ในอัตราส่วน 15:3.75:81.25 และ เมทานอล อัตราการไหล 0.25 mL/min ใช้เวลาวิเคราะห์ 65 นาที

ตารางที่ 1 อัตราส่วน mobile phase ในการวิเคราะห์แอนโทไซยานินโดย LC LC-ESI-MSn

time(min.)	mobile phase A MeOH : Formic acid : H_2O 15:3.75:81.25	mobile phase B 100 % MeOH
0	90	10
5	90	10
40	60	40
50	60	40
51	90	10
60	90	10

3. ศึกษาผลของโคพิกเมนต์ต่อความคงตัวของสีแอนโทไซยานินจากเปลือกมังคุดที่ pH ต่าง ๆ

เตรียมสารสกัดแอนโทไซยานินจากเปลือกมังคุดโดยใช้เปลือกนอกมังคุด 10 g สกัดด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 M ในเอทานอล 95 % v/v ปริมาตร 300 mL เขย่าให้เข้ากัน เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นกรองแยกกาก นำสารสสัดที่ได้หาปริมาณแอนโทไซยานินโดยใช้วิธี pH-differentai differential ประยุกต์ตามวิธี AOAC Official method 2005.02

การศึกษาผลของโคพิกเมนต์ต่อความคงตัวของสีแอนโทไซยานินจากเปลือกมังคุดที่ pH ต่าง ๆ โดยพิกเมนต์ที่ศึกษา ได้แก่ tannic acid, caffeic acid, ferulic acid, coumaric acid และ benzoic acid โดยเติมโคพิกเมนต์ในอัตราส่วน 1 : 1 โดยโมลกับแอนโทไซยานินในสารละลายบัพเฟอร์ ที่ pH 2 4 และ 6 เก็บไว้ในตู้เย็นห่ออลูมิเนียมฟอยล์เพื่อป้องกันแสง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุดทุก 7 วัน

4. ศึกษาวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอยสารสกัดแอนโทไซยานินจากเปลือกมังคุด

ในการศึกษาการทำแห้งแบบพ่นฝอยสารสกัดแอนโทไซยานินจากเปลือกมังคุด เตรียมสารสกัดแอนโทไซยานินจากเปลือกมังคุด โดยใช้เปลือกนอกมังคุดบดละเอียด 100 g สกัดด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 M ในเอทานอล 95 % v/v ปริมาตร 900 mL ใช้เวลาในการสกัด 20 นาที แล้วกรองแยกกาก จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไประเหยแห้งจนมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้เท่ากับ 5°Brix ก่อนนำไปทำแห้งแบบพ่นฝอย

4.1 ศึกษาผลของชนิดสารช่วยทำแห้งในการทำแห้งแบบพ่นฝอยแอนโทไซยานินจากเปลือกมังคุด

การจะศึกษาผลของชนิดสารช่วยทำแห้งในการทำแห้งแบบพ่นฝอยแอนโทไซยานินจากเปลือกมังคุด 4 ชนิด ๆ ได้แก่ อาร์จีเนท มอลโตเดกตริน กลูโคสไซรัป และคอร์นไซรัป โดยนำสารสกัดแอนโทไซยานินจากเปลือกมังคุดผสมสารช่วยทำแห้งจนมีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้เท่ากับ 20°Brix ก่อนนำไปทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอยที่อุณหภูมิลมขาเข้า 160 และ 120°C แล้วนำตัวอย่างแอนโทไซยานินผงที่วิเคราะห์ค่าสี L* a* b* ปริมาณน้ำอิสระ และเปรียบเทียบผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของสีแอนโทไซยานิน

4.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของสีแอนโทไซยานิน

การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของสีแอนโทไซยานินโดยนำแอนโทไซยานินผงมาละลายในสารละลายกรดซิตริกความเข้มข้น 1% w/v ให้มีความเข้มข้น 0.1 % แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ70 80 และ 90°C เป็นเวลา 0 5 10 15 20 25 และ 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคืน 510 nm ซึ่งเป็นความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด

ระยะเวลาดำเนินการ : ตุลาคม 2553 - กันยายน 2556
สถานที่ดำเนินการ : สำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การศึกษาวิธีที่เหมาะสมในการสกัดแอนโทไซยานินจากเปลือกมังคุด

1.1 การศึกษาผลของตัวทำละลายในการสกัดแอนโทไซยานินจากเปลือกมังคุด

จากการศึกษาผลของตัวทำละลายในการสกัดแอนโทไซยานินจากเปลือกมังคุดโดยเปรียบการสกัดแอนโทไซยานินจากเปลือกมังคุดด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 M สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 M ในเอทานอล 50%v/v และสารละลายกรดโอโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 M ในเอทานอล 95%v/v ให้ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 1 จะเห็นได้ว่าการสกัดแอนโทไซยานินจากเปลือกมังคุดด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 M ในเอทานอล 95 %v/v สามารถสกัดแอนโทไซยานินได้ดีกว่าสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 M ในเอทานอล 50 %v/v และสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 M โดยมีปริมาณแอนโทไซยานินที่สกัดได้ 10.90 ± 0.05 6.64 ± 0.05 และ 4.20 ± 0.05 mg as cyanidin 3-glucoside/L ตามลำดับ ดังนั้นการใช้สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 M ในเอทานอล 95 % v/v เป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดแอนโทไซยานินจากเปลือกมังคุดมากกว่าสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 M ในเอทานอล 50 % v/v และสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 M

ตารางที่ 1 ปริมาณแอนโทไซยานินจากเปลือกมังคุดที่สกัดได้ในการสกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ

ตัวทำละลาย	ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (mg as cyanidin 3-glucoside/L)
สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 M	4.20 ± 0.05
สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 M ในเอทานอล 50 % v/v	6.64 ± 0.05
สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 M ในเอทานอล 95 % v/v	10.90 ± 0.05

1.2 การศึกษาชนิดของกรดในตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด

จากการศึกษาผลของกรดในตัวทำละลายในการสกัดแอนโทไซยานินจากเปลือกมังคุดโดยใช้กรดไฮโดรคลอริก กรดกรดอะซีติก และกรดซิตริก ความเข้มข้น 0.1 M ในเอทานอล 95 % v/v ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 2 พบว่าปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดที่ได้จากการใช้กรดไฮโดรคลอริกกรดอะซีติก และกรดซิตริก ความเข้มข้น 0.1 M ในเอทานอล 95 % v/v เป็นตัวทำละลายมีค่าเท่ากับ 10.60 ± 0.42 2.22 ± 0.34 และ 4.42 ± 0.24 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าการใช้กรดไฮโดรคลอริกเป็นสารปรับความค่าเป็นกรดด่างในสารละลายเอทานอล 95 % v/v ในการสกัดแอนโทไซยานินจากเปลือกมังคุดจะสามารถสกัดแอนโทไซยานินได้ดีกว่าการใช้กรดซิตริก และกรดอะซีติกตามลำดับ

ตารางที่ 2 ปริมาณแอนโทแอนโทไซยานินจากเปลือกมังคุดที่สกัดได้จากการใช้กรดชนิดต่าง ๆ ในเอทานอล 95 %v/v

ชนิดกรดใน เอทานอล 95% v/v	ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (mg as cyanidin 3-glucoside/L)
HCl	10.60 ± 0.42
acetic	2.22 ± 0.34
citric	4.42 ± 0.24

1.3 ศึกษาอัตราส่วนเปลือกมังคุดต่อปริมาตรตัวทำละลายที่เหมาะสม

จากการศึกษาอัตราส่วนเปลือกมังคุดต่อปริมาตรตัวทำละลายที่เหมาะสม ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3 จะเห็นได้ว่า การสกัดโดยใช้อัตราส่วนเปลือกมังคุดต่อตัวทำละลาย 1:30 สามารถสกัดแอนโทไซ

ยานินได้ดีกว่าที่อัตราส่วน 1:20 และ 1:10 โดยมีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดเป็น 9.27±0.24 8.85±0.05 และ 8.21±0.24 mg as cyanidin 3-glucoside/100g ตามลำดับ นอกจากนี้เมื่อทดลองนำกากที่เหลือมาสกัดซ้ำพบว่าการสกัดโดยใช้อัตราส่วนเปลือกมังคุดต่อตัวทำละลาย 1 : 10 1 : 10 1 : 20 และ 1 : 30 สามารถสกัดแอนโทไซยานินจากเปลือกมังคุดได้หมดหรือสารละลายมีสีจางในการสกัด 7 5 และ 3 ซ้ำ ตามลำดับ ดังนั้นการสกัดแอนโทไซยานินจากเปลือกมังคุดในอัตราส่วนเปลือกมังคุดต่อตัวทำละลายเป็น 1 : 30 จึงเป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมในการสกัดแอนโทโซยานินจากเปลือกมังคุดต่อเปลือกมังคุดเนื่องจากใช้จำนวนรอบในการสกัดน้อยกว่าอัตราส่วน 1:10 และ 1:20

ตารางที่ 3 ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในการสกัดเปลือกมังคุดด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 M ในเอทานอล 95 % v/v ในอัตราส่วนต่าง ๆ

อัตราส่วนเปลือกมังคุดต่อตัวทำละลาย	ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (mg as cyanidin 3-glucoside/100g)
1:10	8.21 ± 0.05
1:20	8.85 ± 0.12
1:30	9.27 ± 0.24

1.4 ศึกษาผลของเวลาในการสกัดต่อปริมาณแอนโทไซยานินที่สกัดได้

การศึกษาผลของเวลาในการสกัดต่อปริมาณแอนโทไซยานินที่สกัดได้ โดยใช้สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 M ในเอทานอล 95 % v/v ในอัตราส่วนเปลือกมังคุดต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1 : 30 ใช้เวลาในการสกัด 20 40 และ 60 นาที พบกว่าการใช้เวลาในการสกัดทั้ง 3 เวลา ให้ความเข้มสีของแอนโทไซยานิน และปริมาณแอนโทไซยานินที่สกัดได้ใกล้เคียงกัน ดังตารางที่ 4 ดังนั้นจึงควรใช้เวลาในการสกัด 20 นาที เพื่อประหยัดเวลาในการสกัด

ตารางที่ 4 ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในเปลือกมังคุดที่สกัดด้วยเวลาต่าง ๆ

เวลา (นาที)	total anthocyanins content (mg as cyanidin 3-glucoside/100g)
20	10.697 ± 0.085

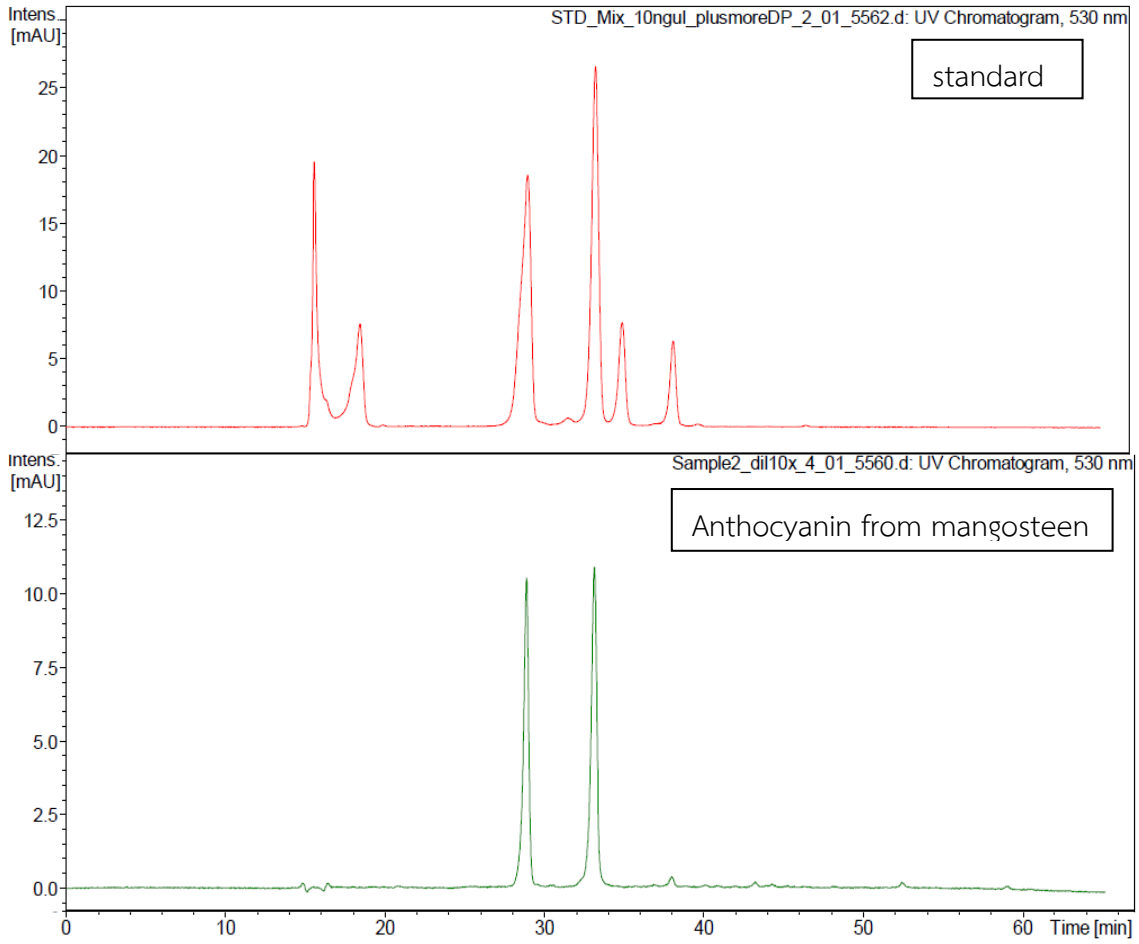
40	10.502 ± 0.440
60	10.381 ± 0.195

2. การวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดแอนโทไซยานินจากเปลือกมังคุด

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดแอนโทไซยานินจากเปลือกมังคุดเทียบกับสารมาตรฐาน 5 ชนิดโดยวิธี Liquid Chromatography – Mass spectrometry (LC-ESI-MSn) .ให้ผลดังแสดงในตารางที่ 5 และโครมาโตรแกรมแสดงดังภาพที่ 1 แสดงให้เห็นว่าสารสกัดแอนโทไซยานินจากเปลือกมังคุด มีแอนโทไซยานินที่เป็นองค์ประกอบ 2 ชนิด คือ cyanidin-3-O-sophoroside และ cyanidin-3-Oglucoside

ตารางที่ 5 ผลการวิเคราะห์สารสกัดแอนโทไซยานินจากเปลือกมังคุดโดย Liquid Chromatography – Mass spectrometry (LC-ESI-MSn)

sample	RT(min)	MS,M^+(m/z)	MS/MS (m/z)
delphinidin-3,5-O-diglucoside	15.62	627.2	627.2 >> 465.1, 303.0
	18.47	627.2	627.2 >> 465.1, 303.0
cyanidin-3-O-sophoroside	29.04	611.2	611.2 >> 287.0
cyanidin-3-Oglucoside	33.29	449.1	449.1 >> 287.0
cyanidin-3-O-rurinoside	34.97	595.2	595.2 >> 449.1, 286.9
pelargonidin-3-O-glucoside	38.17	433.2	443.0 >> 270.9
Anthocyanin extracted	28.82	611.2	611.2 >> 287.0
	33.07	449.2	449.1 >> 287.0

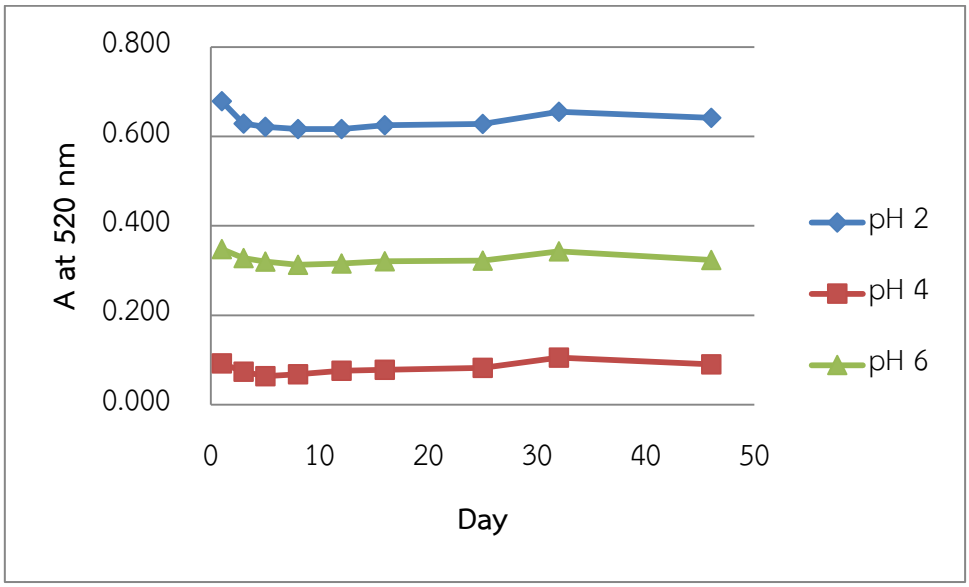


ภาพที่ 1 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานแอนโทไซยานิน 5 ชนิด และสารสกัดแอนโทไซยานินจากเปลือกมังคุด

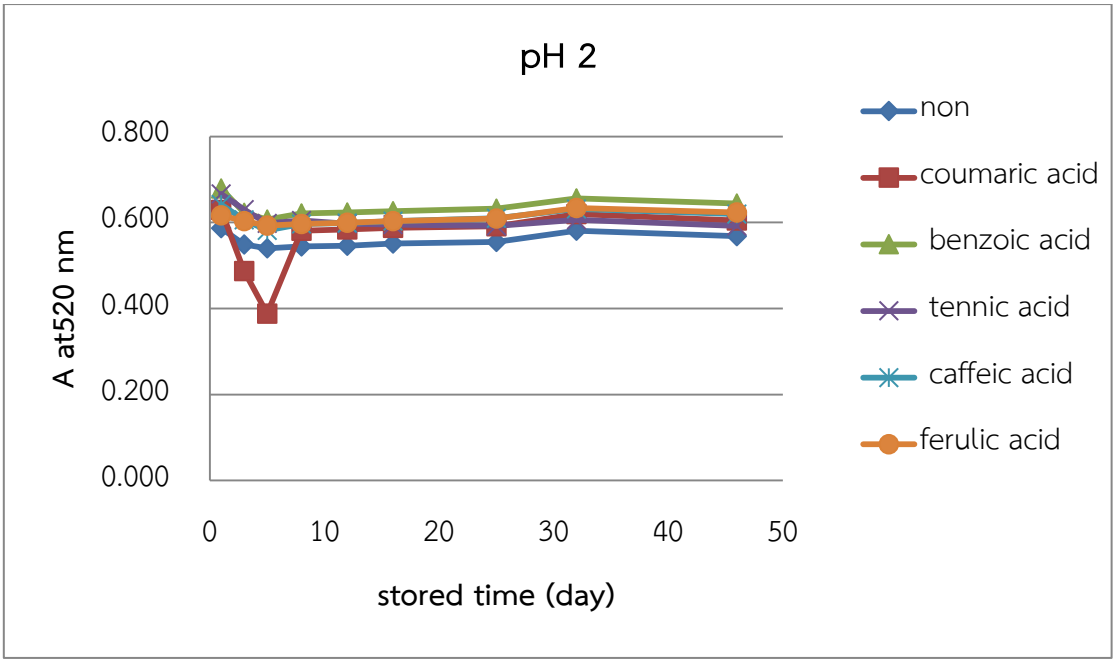
3. ศึกษาผลของโคพิกเมนต์ต่อความคงตัวของสีแอนโทไซยานินจากเปลือกมังคุดที่ pH ต่าง ๆ

จากผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายแอนโทไซยานินจากเปลือกมังคุดที่ pH 2 4 และ 6 แสดงในภาพที่ 2 จะเห็นได้ว่า ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายแอนโทไซยานินจากเปลือกมังคุดที่ 520 nm ซึ่งเป็นค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารละลาย จะมีค่าลดลงเมื่อค่า pH ของสารละลายเพิ่มขึ้น ทั้งนี้เนื่องการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของแอนโทไซยานินจะไม่มีสีเมื่อค่า pH สูงกว่า 7 (Castañeda-Ovando *et al*., 2009) การศึกษาผลของโคพิกเมนต์ได้แก่ ได้แก่ tannic acid, caffeic acid, ferulic acid, coumaric acid และ benzoic acid ซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอล (phenolic compound) :ซึ่งสารประกอบฟีนอลเหล่านี้สามารถเกิดโครงสร้างเชิงซ้อนกับโมเลกุลของแอนโทไซยานินทำให้สีของแอนโทไซยานินมีความคงทนมากขึ้น เช่นในรายงานของ Girs *et al*. (2007) :พบว่าสีของแอนโทไซยานินใน cabernet sauvignon grape จะมี

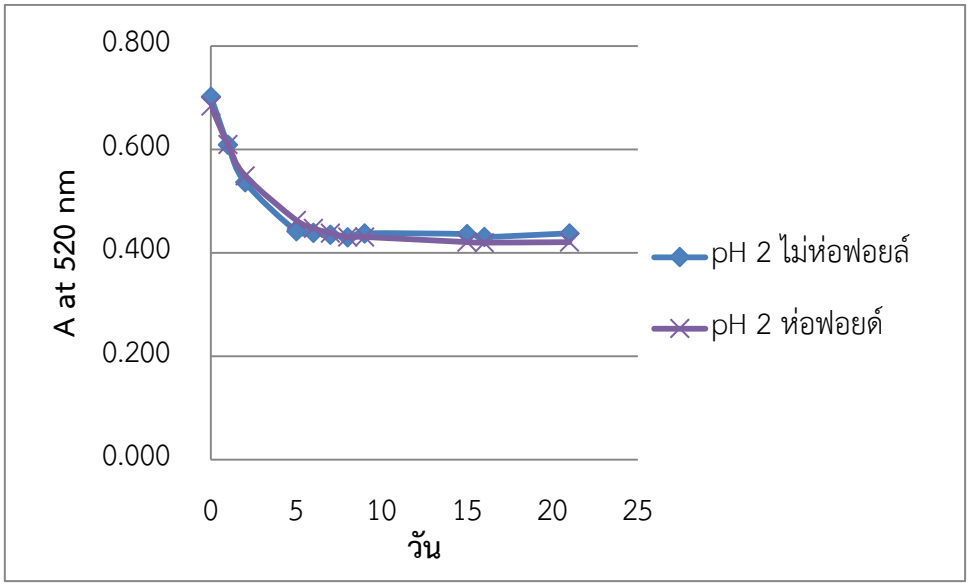
ความคงตัวมากขึ้นมีเมื่อ caffeic acid จากการทดลองเติมโคพิกเมนต์ในอัตราส่วน 1 : 1 โดยโมลกับแอนโทไซยานินแสดงดังภาพที่ 3 จะเห็นได้ว่าเมื่อเติมโคพิกเมนต์ต่าง ๆ ในอัตราส่วน 1 : 1 โดยโมลกับแอนโทไซยานินในเปลือกมังคุด ค่าการดูดกลืนแสงจะเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย และไม่ได้เพิ่มค่าการดูดกลืนแสงในสารละลายที่ pH 4 และ 6 อีกด้วย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากโครงสร้างของแอนโทไซยานินจากเปลือกมังคุดไม่เกิดโครงสร้างเชิงซ้อนกับโคพิกเมนต์ต่าง ๆ นอกจากนี้จากการศึกษาการเก็บสารละลายแอนโทไซยานินจากเปลือกมังคุดที่ pH 2 ไว้ที่อุณหภูมิห้อง (อุณหภูมิเฉลี่ย 26.4 °C) พบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 nm ของสารละลายจะลดลงหลังจากเก็บไว้ประมาณ 5 วัน แล้วหลังจากนั้นจะค่อนข้างคงที่โดยการห่อฟอยล์และไม่ห่อฟอยด์ให้ผลการทดลองที่ไม่แตกต่างกัน ดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 2 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดแอนโทไซยานินจากเปลือกมังคุดในสารละลายบัฟเฟอร์ค่า pH 2 4 และ 6 เก็บรักษาไว้ในตู้เย็น (อุณหภูมิเฉลี่ย 55°C)



ภาพที่ 3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 nm ของสารละลายแอนโทไซยานินจากเปลือกมังคุดและโคพิกเมนต์ต่าง ๆ ในอัตราส่วน 1:1 ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 2 เก็บรักษาไว้ในตู้เย็น (อุณหภูมิเฉลี่ย 55°C)



ภาพที่ 4 การดูดกลืนแสงของสารละลายแอนโทไซยานินจากเปลือกมังคุดในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 2 เก็บรักษาอุณหภูมิห้อง (อุณหภูมิเฉลี่ย 26.4 °C) ที่ห่อและไม่ห่อฟอยล์ป้องกันแสง

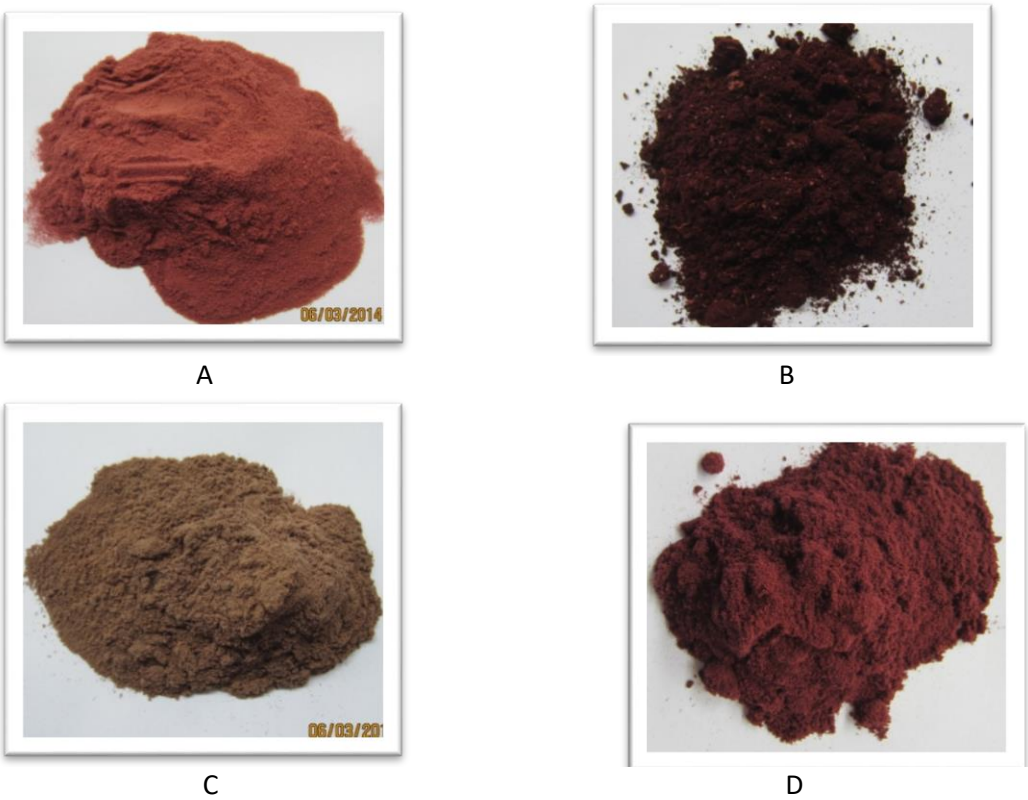
4. ศึกษาวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอยสารสกัดแอนโทไซยานินจากเปลือกมังคุด

การศึกษาการทำแห้งแบบพ่นฝอยสารสกัดแอนโทไซยานินจากเปลือกมังคุดที่อุณหภูมิลมขาเข้าเป็น 160°C นั้น ทำให้แอนโทไซยานินผงที่ได้มีลักษณะเป็นสีน้ำตาลซึ่งบ่งบอกถึงการสลายตัวของแอนโทไซยานิน การทำแห้งแอนโทไซยานินจากเปลือกมังคุดโดยการทำแห้งแบบพ่นฝอยที่อุณหภูมิลมขาเข้า 120°C โดยใช้สารช่วยทำแห้งอาร์จีเนท มอลโตเดกตริน กลูโคสไซรัป และคอร์นไซรัป ค่าสีและปริมาณน้ำอิสระของแอนโท

ไซยานินผง แสดงดังตารางที่ 6 และภาพที่ 5 จะเห็นได้ว่า การใช้อาร์จีเนทเป็นสารช่วยทำแห้งจะให้แอนโทไซยานินผงที่มีสีเข้มกว่าคอร์นไซรัป มอลโตเดกตริน และกลูโคสไซรัป ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากอาร์จีเนทปริมาณเล็กน้อยเมื่อละลายน้ำแล้วจะให้ค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้สูงกว่าสารอื่น ๆ จึงทำให้มีปริมาณสารช่วยทำแห้งน้อย ซึ่งแอนโทไซยานินผงที่ใช้อาร์จีเนท มอลโตเดกตริน และคอร์นไซรัป เป็นสารช่วยทำแห้งจะให้แอนโทไซยานินผงที่มีโทนสีแดง แต่เมื่อใช้กลูโคสไซรัปเป็นสารช่วยทำแห้งจะได้สารผงที่มีสีน้ำตาลอ่อนซึ่งแสดงให้เห็นว่าเกิดการสลายตัวของแอนโทไซยานิน

ตารางที่ 6 ค่าสีและปริมาณน้ำอิสระของแอนโทไซยานินผงที่ใช้สารช่วยทำแห้งชนิดต่าง ๆ

Properties	Anthocyanin powder property			
	Maltodextrin	Alginate	Glucose syrup	Corn syrup
Lightness score (L*)	43.77	33.90	46.03	36.97
Green-Red score (a*)	17.30	7.48	7.85	11.90
Blue-Yellow score (b*)	4.28	-2.04	4.54	-0.22
a_w	0.252	0.362	0.273	0.348



ภาพที่ 5 แอนโทไซยานินผงจากสารช่วยทำแห้งชนิดต่าง ๆ

A : maltodextrin

B : alginate

C : glucose syrup

D : corn syrup

4.1 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของสีแอนโทไซยานิน

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของสีแอนโทไซยานินผงที่ได้ โดยนำแอนไซยานินผงละลายในสารละลายกรดซิตริกแล้วให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 80 และ 90°C ให้ผลแสดงดังภาพที่ 6 จะเห็นได้ว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิ แอนโทไซยานินผงที่ใช้มอลโตเดกตริน อาร์จีเนท คอร์นไซรัป และกลูโคสไซรัปเป็นสารช่วยทำแห้ง จะมี % การลดลงของค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าการใช้อุณหภูมิสูงจะทำให้แอนโทไซยานินในสารละลายเกิดการสลายตัวมากขึ้น โดยแอนโทไซยานินผงที่ใช้สารช่วยทำแห้งทั้งหมดมีแนวโน้มการสลายตัวเช่นเดียวกัน

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ :

- การใช้สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 M ในเอทานอล 95 % v/v เป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดแอนโทไซยานินจากเปลือกมังคุดมากกว่าสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 M ในเอทานอล 50 % v/v และ สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 M โดยการใช้กรดไฮโดรคลอริกสามารถสกัดแอนโทไซยานินจากเปลือกมังคุดได้ดีกว่ากรดซิตริก และกรดอะซิติก อัตราส่วนเปลือกมังคุดต่อปริมาตรตัวทำละลายที่เหมาะสมคือ 1 : 30 และเวลาในการสกัด 20 นาที
- องค์ประกอบของสารสกัดแอนโทไซยานินจากเปลือกมังคุดมีแอนโทไซยานิน 2 ชนิดเป็นองค์ประกอบหลัก คือ cyanidin-3-o-sophoroside และ cyanidin-3-o-glucoside
- โคพิกเมนต์ได้แก่ tannic acid caffeic acid ferulic acid coumaric acid และ benzoic acid สามารถเพิ่มค่าการดูดกลืนแสงของแอนโทไซยานินจากเปลือกมังคุดได้เล็กน้อยเท่านั้น โดยไม่สามารถช่วยเพิ่มการดูดกลืนแสงที่ pH 4 และ 6 ได้
- การทำแห้งแบบพ่นฝอยแอนโทไซยานินจากเปลือกมังคุดโดยใช้อุณหภูมิลมขาเข้า 160°C จะทำให้แอนโทไซยานินเกิดการสลายตัว จึงใช้อุณหภูมิลมขาเข้า 120°C โดยการทำแห้งโดยใช้อาร์จีเนทเป็นสารช่วยทำแห้งจะให้แอนโทไซยานินที่มีสีเข้มกล่าสารช่วยทำแห้งชนิดอื่น เนื่องจาก อาร์จีเนทมีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้สูงกว่ามอลโตเดกตริน กลูโคสไซรัป และ คอร์นไซรัป และจากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของสีแอนโทไซยานิน พบว่าการให้อุณหภูมิที่สูงขึ้น จะทำให้สีของแอนโทไซยานินจางลง

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ :

ผลจากการทดลองนี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการสกัดและกระบวนการทำแห้งแอนโทไซยานินจากเปลือกมังคุด ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นองค์ประกอบในผลิตภัณฑ์อาหารและเครื่องสำอาง หรือต่อยอดเพื่อพัฒนาคุณสมบัติของสารสกัดให้มีประสิทธิ์ภาพดีมากขึ้นต่อไป และเป็นเพิ่มมูลค่าโดยใช้ประโยชน์จากเปลือกผลไม้เหลือทิ้งอีกด้วย

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี)

-

12. เอกสารอ้างอิง

ยุพาพร ผลาขจรศกดิ์. 2547. การสกัดและความคงตัวของแอนโธไซยานินส์ที่สกัดได้จากเปลือกมังคุด. บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร.

Asen, S., Stewart, R.N. and Norris, K.H.1979. Stable foods and beverages containing the anthocyanin, peonidin 3-(dicaffeylsophoroside)-5-glucoside. U.S.Pat 4,172,902. Oct. 30, 1979.

Castañeda-Ovando,A., Pacheco-Hernández,M.L., Páez-Hernández,M.E., Rodríguez,J.A. and Galán-Vidal,C.A. 2009. Chemical studies of anthocyanins : A review. Food Chemistry. 113:857-871.

Cho, M.J., L.R. Howard, R.L. Prior, and J.R. Clark. 2004. Flavonoid glycosides and antioxidant capacity of various blackberry, blueberry and red grape genotypes determined by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. J Sci Food Agric. 84: 1771-1782.

Conner, A.M., J.J. Luby, J.F. Hancock, S. Berkheimer, and E.J. Hanson. 2002. Changes in fruit antioxidant activity among blueberry cultivars during cold-temperature storage. J Agric Food Chem. 50: 893-898.

Ersus, S., and Yurdagel, U., 2007. Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (Daucus carota L) by spray drier. Journal of Food Engineering 80, 805–812.

Fox, G.J. and Dak, F.N. 2000. Natural Red Sunflower Anthocyanin Colorant with Naturally Stabilized Color Qualities, and the Process of Making. U.S.Pat. 6,132,791. Oct.17,2000.

Ge, X., Wan, Z., Song, N., Fan, A. and Wu, R. 2009. Efficient methods for the extraction and microencapsulation of red pigments from a hybrid rose. Journal of Food Engineering 94, 122-128.

Gerasopoulos, D.and G. Stavroulakis. 1997. Quality Characteristics of Four Mulberry (*Morus* sp) Cultivars in the Area of Chania, Greece. Journal of the Science of Food and Agriculture. 73: 261-264.

Gris, E.F., Ferreira, E.A., Falcão, L.D., Bordignon-Luiz, M.T., 2007. Caffeic acid copigmentation of anthocyanins from Cabernet Sauvignon grape extracts in model systems. Food Chemistry 100, 1289-1296.

Jackman, R.L.and J.L. Smith. 1996. Anthocyanins and betalains, p. 244-280. In: G.A.F. Hendry and J.D. Houghton (eds.). Natural Food Colorants. Blackie Academic & Professional, New York.

Lampang Agricultural and Training Centre. 2001. Makiang. Rajamangala University of Technology Lanna, Lampang.

Prior, R.L., G. Cao, A. Martin, E. Sofic, J. McEwen, C. O'Brien, N. Lischner, M. Ehlenfeldt, W. Kalt, G. Krewer, and C.M. Mainland. 1998. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. J Agric Food Chem. 46: 2686-2693.

Tomas-Lorente, F., C. Garcia-Viguera, F. Ferreres, and F.A. Tomas-Barberan. 1992. Phenolic compounds analysis in the determination of fruit jams genuineness. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 40: 1800-1804.

Youdim, K.A., J. McDonald, W. Kalt, and J.A. Joseph. 2002. Potential role of dietary flavonoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and inflammatory insults. Journal of Nutritional Biochemistry. 13: 282-288.