

## รายงานวิจัย

การวิเคราะห์สารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ในพืชบางชนิดและ  
ศึกษาผลการเตรียมสารตัวอย่างต่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณของ  
สารในกลุ่มแคโรทีนอยด์

Analysis and Study of Effects Various Pretreatments on  
Quantitative analysis of Carotenoids in Some Plants

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ศิริพร จันทรศิริ

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยทักษิณ

2551

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณรายได้ มหาวิทยาลัยทักษิณ  
ประจำปีงบประมาณ 2546



## คำรับรองคุณภาพ

ข้าพเจ้า รองศาสตราจารย์เกษม อัสวศิริรัตนกุล ได้ประเมินคุณภาพงานวิจัย

เรื่อง การวิเคราะห์สารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ในพืชบางชนิดและศึกษาผลการเตรียมสารตัวอย่าง  
ต่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์

โดย ศิริพร จันทศิริ

มีความเห็นว่า ผลงานวิจัยฉบับนี้มีคุณภาพอยู่ในเกณฑ์

- ☐ ดีมาก  
☐ ดี  
☒ ปานกลาง  
☐ ต่ำ

ซึ่งสมควรเผยแพร่ในแวดวงวิชาการได้

ลงชื่อ

ผู้ประเมิน

(รองศาสตราจารย์เกษม อัสวศิริรัตนกุล)

วันที่ ๑๖ เดือน ๓ พ.ศ. 2551

## ประกาศคุณูปการ

งานวิจัยเรื่องนี้สามารถดำเนินงานให้สำเร็จลุล่วงโดยได้รับการสนับสนุนเงินทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณรายได้ มหาวิทยาลัยทักษิณ ประจำปีงบประมาณ 2546 รวมถึงการให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัยจากภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ

ผู้วิจัย

ศิริพร จันทศิริ



การวิเคราะห์สารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ในพืชบางชนิดและศึกษาผลการเตรียมสารตัวอย่าง  
ต่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์

Analysis and Study of Effects Various Pretreatments on Quantitative analysis of  
Carotenoids in Some Plants

ศิริพร จันทศิริ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ สงขลา 90000

บทคัดย่อ

งานวิจัยมีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบวิธีการเตรียมสารตัวอย่าง 3 แบบ คือ เตรียมแบบ  
ตัวอย่างสด ตัวอย่างอบแห้ง และตัวอย่างฟรียดรายด์ รวมทั้งศึกษาประสิทธิภาพในการสกัดจาก  
ตัวทำละลายผสม 3 ชนิด คือ acetone-methanol-petroleum ether, chloroform-methanol และ  
hexane-acetone-ethanol ซึ่งพบว่าการเตรียมตัวอย่างแบบสด และใช้สารละลายผสมระหว่าง  
hexane-acetone-ethanol อัตราส่วน 2:1:1 สามารถสกัดสารออกมาได้มากที่สุด

การวิเคราะห์หาปริมาณเบต้า-แคโรทีนและแอสต้าแซนทินในพืชตัวอย่าง ได้แก่ เปลือก  
ข้าวโพด สาหร่ายผมนาง ดอกเข็ม ดอกดาวเรือง ดอกเฟื่องฟ้า แครอท และเปลือกเงาะ โดยใช้  
เทคนิคUV-Vis spectrophotometry ซึ่งพบปริมาณเบต้า-แคโรทีนในดอกดาวเรืองมากที่สุด  
( $411.5562 \pm 0.6377 \mu\text{g/g}$ ) รองลงมาคือ สาหร่ายผมนาง( $167.0658 \pm 0.7913 \mu\text{g/g}$ ) แครอท  
( $142.3117 \pm 4.1854 \mu\text{g/g}$ ) ดอกเข็ม( $105.2184 \pm 0.3011 \mu\text{g/g}$ ) ดอกเฟื่องฟ้า( $34.6650 \pm 0.1966$   
 $\mu\text{g/g}$ ) เปลือกเงาะ( $22.7979 \pm 0.1796 \mu\text{g/g}$ ) และเปลือกข้าวโพด( $6.1141 \pm 0.0026 \mu\text{g/g}$ )  
ตามลำดับ

ส่วนปริมาณแอสตาแซนทินพบในดอกดาวเรือง( $43.4084 \pm 0.0673 \mu\text{g/g}$ ) มากที่สุด  
รองลงมาคือสาหร่ายผมนาง( $17.6211 \pm 0.0835 \mu\text{g/g}$ ) แครอท( $15.0102 \pm 0.4415 \mu\text{g/g}$ ) ดอกเข็ม  
( $11.0978 \pm 0.0318 \mu\text{g/g}$ ) ดอกเฟื่องฟ้า( $3.6563 \pm 0.0207 \mu\text{g/g}$ ) เปลือกเงาะ( $2.4046 \pm 0.0189$   
 $\mu\text{g/g}$ ) และเปลือกข้าวโพด( $0.6449 \pm 0.0003 \mu\text{g/g}$ ) ตามลำดับ



## Abstract

Effects of various samples preparation methods, and extraction conditions on the carotenoid content of some plants were studied by a high-performance liquid chromatography method and UV-Visible spectroscopy.

Samples preparation were treated by freshly, by drying and freeze-drying method, then the samples were further extracted using various solvents, acetone-methanol-petroleum ether, chloroform-methanol and hexane-acetone-ethanol. The best samples preparation conditions was by freshly and the best solvent was hexane-acetone-ethanol (2:1:1).

Quantitative analysis of  $\beta$ -carotene and astaxanthin from some plants such as, fruit hull of maize (*Zea mays* Linn.), Phom-nang Seaweed (*Gracilaria fisheri*), Red Ixora flower (*Ixora chinensis* lamk.), Marigold flower (*Tagetes erecta* Linn.) and Paper flower (*Bougainvillea hybrida*), carrot (*Daucus carota* Linn.), and fruit hull of Rambutan (*Nephelium lappaceum* Linn.), were determined by UV-Visible spectrophotometry.

The highest concentration of  $\beta$ -carotene was found in Marigold flower ( $411.5562 \pm 0.6377 \mu\text{g/g}$ ), Phom-nang Seaweed ( $167.0658 \pm 0.7913 \mu\text{g/g}$ ), carrot ( $142.3117 \pm 4.1854 \mu\text{g/g}$ ), Red Ixora flower ( $105.2184 \pm 0.3011 \mu\text{g/g}$ ), Paper flower ( $34.6650 \pm 0.1966 \mu\text{g/g}$ ), fruit hull of Rambutan ( $22.7979 \pm 0.1796 \mu\text{g/g}$ ), and hull of maize ( $6.1141 \pm 0.0026 \mu\text{g/g}$ ) respectively.

The maximum astaxanthin content was found maximal in Marigold flower ( $43.4084 \pm 0.0673 \mu\text{g/g}$ ), Phom-nang Seaweed ( $17.6211 \pm 0.0835 \mu\text{g/g}$ ), carrot ( $15.0102 \pm 0.4415 \mu\text{g/g}$ ), Red Ixora flower ( $11.0978 \pm 0.0318 \mu\text{g/g}$ ) Paper flower ( $3.6563 \pm 0.0207 \mu\text{g/g}$ ) fruit hull of Rambutan ( $2.4046 \pm 0.0189 \mu\text{g/g}$ ) and hull of maize ( $0.6449 \pm 0.0003 \mu\text{g/g}$ ) respectively.

# สารบัญ

|                                                                                                                                 | หน้า |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| บทที่ 1 บทนำ                                                                                                                    | 1    |
| 1.1 หลักการและความเป็นมาของงานวิจัย                                                                                             | 1    |
| 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย                                                                                                     | 2    |
| 1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ                                                                                                   | 2    |
| 1.4 ขอบเขตของการวิจัย                                                                                                           | 2    |
| บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง                                                                                          | 3    |
| 2.1 เอกสารที่เกี่ยวข้องกับแคโรทีนอยด์                                                                                           | 3    |
| 2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับแคโรทีนอยด์                                                                                         | 10   |
| บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย                                                                                                      | 13   |
| 3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี                                                                                                      | 13   |
| 3.2 วิธีการวิจัย                                                                                                                | 15   |
| 3.2.1 ศึกษาการเตรียมตัวอย่าง                                                                                                    | 15   |
| 3.2.2 ศึกษาการสกัดสารตัวอย่าง                                                                                                   | 15   |
| 3.2.3 การวิเคราะห์สารเชิงปริมาณโดยเทคนิค HPLC                                                                                   | 16   |
| 1) การวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์                                                                                  |      |
| 2) การหาปริมาณแอสตาแซนทินในตัวอย่างโดยใช้กราฟมาตรฐาน                                                                            |      |
| 3.2.4 การวิเคราะห์สารเชิงปริมาณโดยเทคนิค UV-Vis spectrophotometry                                                               | 18   |
| 1) การวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์                                                                                  |      |
| 2) การหาปริมาณสารผสมเบต้า-แคโรทีน และแอสตาแซนทิน                                                                                |      |
| บทที่ 4 ผลการวิจัย                                                                                                              | 20   |
| 4.1 การศึกษาความยาวคลื่นที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์                                                                            | 20   |
| 4.2 ศึกษาการหาปริมาณเบต้า-แคโรทีน และแอสตาแซนทิน โดยเทคนิค High-performance liquid chromatography                               | 23   |
| 4.3 ศึกษาการหาปริมาณเบต้า-แคโรทีน และแอสตาแซนทิน โดยเทคนิค UV-Vis spectrophotometry ด้วยวิธีการสร้างกราฟมาตรฐานแบบสารผสม 2 ชนิด | 29   |
| 4.4 ศึกษาวิธีการเตรียมตัวอย่างและชนิดของสารสกัด                                                                                 | 33   |
| 4.5 การหาปริมาณเบต้า-แคโรทีน และแอสตาแซนทิน ในตัวอย่าง                                                                          | 37   |

|                                                           | หน้า |
|-----------------------------------------------------------|------|
| บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย และอภิปรายผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ | 40   |
| บรรณานุกรม                                                | 42   |



## สารบัญตาราง

| ตารางที่                                                                                                                                                                                                                           | หน้า |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 2.1 สรุปวิธีการสกัดที่ใช้สำหรับเตรียมตัวอย่างผลไม้และผัก                                                                                                                                                                           | 10   |
| 4.1 ข้อมูลการดูดกลืนแสงช่วงยูวี-วิสิเบิล ของสารประกอบแคโรทีนอยด์                                                                                                                                                                   | 21   |
| 4.2 แสดงความสัมพันธ์อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่กับค่า Capacity factor ( $k'$ ) และจำนวน Theoretical plates (N) โดยมีสภาวะการทดลองคือ C <sub>30</sub> Column, hexane-acetone, Flow rate 1.0 ml/min, ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร         | 23   |
| 4.3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่กับค่า Capacity factor ( $k'$ ), HETP และจำนวน Theoretical plates (N) โดยมีสภาวะการทดลองคือ C <sub>30</sub> Column, hexane-acetone อัตราส่วน 70:30 ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร | 26   |
| 4.4 แสดงพื้นที่ใต้พีคของแอสตาแซนทิน ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10, 15, 20, 25, 30 mg/L โดยมีสภาวะการทดลองคือ C <sub>30</sub> Column, Flow rate 1.0 ml/min, hexane - acetone อัตราส่วน 70:30 ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร                  | 27   |
| 4.5 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของเบต้า-แคโรทีน ที่ความยาวคลื่น 473.5 และ 450.5 นาโนเมตร                                                                                                                                                  | 30   |
| 4.6 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของแอสตาแซนทิน ที่ความยาวคลื่น 473.5 และ 450.5 นาโนเมตร                                                                                                                                                    | 30   |
| 4.7 แสดงวิธีสกัดที่เหมาะสมโดยใช้ hexane-acetone-ethanol อัตราส่วน 2 : 1 : 1 เป็นตัวสกัด โดยมีสภาวะการทดลองคือ C <sub>30</sub> Column, Flow rate 1.0 ml/min, hexane - acetone อัตราส่วน 70:30 ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร             | 33   |
| 4.8 แสดงการหาชนิดของตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับใช้สกัด ใช้ตัวอย่างเป็นแครอทสด โดยมีสภาวะการทดลองคือ C <sub>30</sub> Column, Flow rate 1.0 ml/min, hexane - acetone อัตราส่วน 70:30 ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร                        | 35   |
| 4.9 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของเบต้า-แคโรทีนและแอสตาแซนทินในพืชตัวอย่าง                                                                                                                                                                | 38   |
| 4.10 แสดงปริมาณเบต้า-แคโรทีนและแอสตาแซนทินในพืชตัวอย่าง                                                                                                                                                                            | 39   |

# สารบัญรูป

| รูปที่                                                                                                                                                                                         | หน้า |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 2.1 โครงสร้างทางเคมีของ hydrogenated carotenoid derivatives                                                                                                                                    | 4    |
| 2.2 โครงสร้างทางเคมีของ oxygenated carotenoid derivatives                                                                                                                                      | 4    |
| 3.1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสาร I, II และของผสม (I+II)                                                                                                                                          | 18   |
| 4.1 (ก) แสดงสเปกตรัมของเบต้า-แคโรทีน (ข) แสดงสเปกตรัมของแอสตาแซนทิน                                                                                                                            | 20   |
| 4.2 แสดงโครมาโทแกรมของแอสตาแซนทิน โดยมีสภาวะการทดลองคือ C <sub>30</sub> Column, acetonitrile:dichloromethane:methanol(71:7:22) Flow rate 1.0 ml/min                                            | 24   |
| 4.3 แสดงโครมาโทแกรมของแอสตาแซนทิน โดยมีสภาวะของการทดลองคือ C <sub>30</sub> Column, acetone: methanol :น้ำ อัตราส่วน 50:45:5 Flow rate 1.0 ml/min                                               | 24   |
| 4.4 แสดงโครมาโทแกรมของแอสตาแซนทิน โดยมีสภาวะของการทดลองคือ C <sub>30</sub> Column, hexane:acetone อัตราส่วน 70:30 Flow rate 1.0 ml/min                                                         | 24   |
| 4.5 แสดงผลของอัตราส่วนเฟสเคลื่อนที่ hexane:acetone ที่มีต่อโครมาโทแกรมของแอสตาแซนทิน โดยมีสภาวะการทดลองคือ C <sub>30</sub> Column Flow rate 1.0 ml/min                                         | 25   |
| 4.6 แสดงผลของ flow rate ที่มีต่อโครมาโทแกรมของแอสตาแซนทิน โดยมีสภาวะของการทดลองคือ C <sub>30</sub> Column, hexane:acetone อัตราส่วน 70:30                                                      | 26   |
| 4.7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้พีคของแอสตาแซนทินที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ สภาวะการทดลองคือ C <sub>30</sub> Column, Flow rate 1.0 ml/min, hexane-acetone (70:30) ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร | 27   |
| 4.8 แสดงตัวอย่างโครมาโทแกรมในสภาวะการทดลองต่างๆของการหาปริมาณเบต้า-แคโรทีน และแอสตาแซนทินในเวลาเดียวกัน                                                                                        | 28   |
| 4.9 แสดงกราฟมาตรฐานของเบต้า-แคโรทีน ช่วงความเข้มข้น 3 – 10 ppm<br>(ก) ที่ความยาวคลื่น 450.5 นาโนเมตร (ข) ที่ความยาวคลื่น 473.5 นาโนเมตร                                                        | 31   |
| 4.10 แสดงกราฟมาตรฐานของแอสตาแซนทิน ช่วงความเข้มข้น 2 – 10 ppm<br>(ก) ที่ความยาวคลื่น 450.5 นาโนเมตร (ข) ที่ความยาวคลื่น 473.5 นาโนเมตร                                                         | 32   |
| 4.11 แสดงโครมาโทแกรมของสารสกัดจากแครอท โดยวิธีการเตรียมแบบต่างๆ สภาวะของการทดลอง : C <sub>30</sub> Column, hexane:acetone(70:30), Flow rate 1.0 ml/min                                         | 34   |
| 4.12 แสดงโครมาโทแกรมของสารสกัดจากแครอทเมื่อใช้ตัวทำละลายสกัดชนิดต่างๆในการสกัด สภาวะการทดลองคือ C <sub>30</sub> Column, hexane:acetone (70:30) Flow rate 1.0 ml/min                            | 36   |



## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 หลักการและความเป็นมาของงานวิจัย

แคโรทีนอยด์จัดเป็นกลุ่มสารไฟโตเคมีคอล(phytochemical)ที่พบในธรรมชาติทั้งพืชและสัตว์ สารประกอบในกลุ่มแคโรทีนอยด์ส่วนใหญ่มีสีแดงและเหลือง มีคุณสมบัติละลายได้ในไขมัน สารประกอบในกลุ่มนี้มีมากกว่า 600 ชนิด ซึ่งล้วนแล้วแต่มีผลต่อกลไกสำคัญในร่างกายมนุษย์ โดยบางส่วนสามารถทำหน้าที่เป็นสารต่อต้านอนุมูลอิสระ(antioxidant) แต่มีเพียง 50 ชนิดเท่านั้นที่มีคุณสมบัติเป็นโปรวิตามินเอ(provitamin A) โปรวิตามินเอที่รู้จักกันดีคือ เบต้า-แคโรทีน( $\beta$ -carotene) และแอลฟา-แคโรทีน( $\alpha$ -carotene) โดยร่างกายมนุษย์จะสามารถเปลี่ยนสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ไปเป็นวิตามินเอได้ประมาณ 10%ของแคโรทีนอยด์ที่ได้รับทางอาหารในลำไส้เล็กและตับ และกระจายตัวในร่างกายได้ประมาณ 25%ของวิตามินเอทั้งหมด ซึ่งจะเห็นได้ว่าปริมาณวิตามินเอที่ร่างกายสามารถได้รับจากอาหารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ทั้งหมดที่รับประทานมีปริมาณที่น้อยมาก ดังนั้นควรมีการส่งเสริมการบริโภคสารในกลุ่มนี้ให้เพียงพอ โดยแหล่งอาหารธรรมชาติของสารแคโรทีนอยด์มีอยู่มากมายทั้งจากพืชและสัตว์ เช่น แครอท มะเขือเทศ ปลาซอลมอน ปลาตับทิม กุ้ง ไข่ไก่ เป็นต้น ซึ่งปริมาณแคโรทีนอยด์จากสัตว์นั้นจะมีมากหรือน้อยนั้นขึ้นอยู่กับอาหาร สิ่งแวดล้อมและธรรมชาติของสัตว์ ซึ่งโดยธรรมชาติแล้วแคโรทีนอยด์ เป็นสารที่พืชและสาหร่ายบางชนิดสามารถสร้างขึ้นเองได้ ซึ่งสัตว์ไม่สามารถสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ได้ จึงจำเป็นต้องรับสารเหล่านั้นจากพืชบางชนิด (Britton *et al.* 1995) ดังนั้นหากส่งเสริมให้มีการผลิตอาหารสัตว์ซึ่งมีส่วนผสมของแคโรทีนอยด์ปริมาณสูงจากพืชที่ไม่มีค่าทางเศรษฐกิจ และหาได้ง่ายในท้องถิ่น ก็จะประโยชน์อย่างมาก

จากปัญหาและแนวคิดดังกล่าว ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาปริมาณสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ในพืชบางชนิด เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการนำพืชไปประยุกต์เป็นอาหารสัตว์ และศึกษาการเตรียมสารตัวอย่างต่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์



## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. ศึกษาแหล่งอาหารที่มีสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ปริมาณสูง เพื่อส่งเสริมการบริโภค หรือเป็นแหล่งวัตถุดิบในการทำอาหารสัตว์
2. ศึกษาผลของการเตรียมสารตัวอย่าง และวิธีการสกัดสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ต่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์
3. ศึกษาการวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์

## 1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทำให้ทราบปริมาณสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ ในพืชตัวอย่างที่ศึกษา
2. ทำให้ทราบวิธีการเตรียมสารตัวอย่าง และวิธีการสกัดที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์
3. ทำให้ทราบวิธีการหาปริมาณของสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์

## 1.4 ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาผลของการเตรียมสารตัวอย่าง และวิธีการสกัดสารเบต้า-แคโรทีน และแอสตาแซนทิน ซึ่งใช้เป็นตัวแทนของสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ ต่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณ ด้วยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์แมนลิกวิดโครมาโทกราฟี (high-performance liquid chromatography; HPLC)

วิเคราะห์หาปริมาณเบต้า-แคโรทีน และแอสตาแซนทิน(astaxantin) ซึ่งใช้เป็นตัวแทนของสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ ด้วยเทคนิคHPLC และเทคนิคอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตเมทรี (Ultraviolet-Visible spectrophotometry)

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

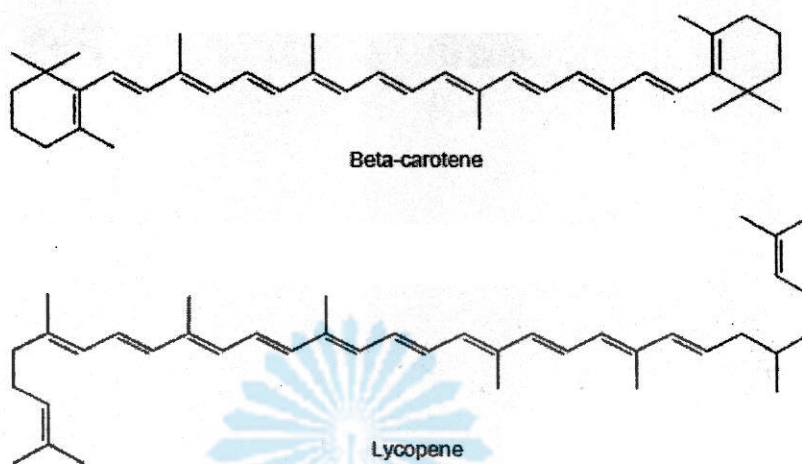
#### 2.1 เอกสารที่เกี่ยวข้องกับแคโรทีนอยด์

แคโรทีนอยด์เป็นสารสี (pigment) ธรรมชาติที่พบได้ทั้งในพืช และสัตว์ รวมทั้งสาหร่ายทะเล แบบที่เรียที่สามารส่งเคราะห์แสงได้ ยีสต์ และเชื้อรา สารประกอบของแคโรทีนอยด์ส่วนใหญ่มีสี แดง ส้มและเหลือง ละลายได้ในไขมัน พบมากในใบพืช ผลไม้ ดอกไม้ แมลง ปลาแซลมอน นกที่มีสี บางชนิด เช่น นกฟลามิงโก และสัตว์น้ำที่มีกระดูก สสารประกอบกลุ่มนี้มีมากกว่า 600 ชนิด(Ong A.S.H., และ Tee, E.S.,1992) ซึ่งล้วนแล้วแต่มีผลต่อกลไกสำคัญในร่างกาย โดยบางส่วนสามารถ ทำหน้าที่เป็นสารต่อต้านอนุมูลอิสระ(antioxidant) แต่มีเพียงประมาณ 50 ชนิดเท่านั้นที่มีคุณสมบัติ เป็นโปรวิตามินเอ

โครงสร้างโมเลกุลของแคโรทีนอยด์ประกอบด้วยหน่วยไอโซพรีน (isoprene unit) จำนวน 8 หน่วย ที่เกิดพันธะโควาเลนต์กัน และทำให้เกิดคอนจูเกชันของพันธะคู่เป็นสายยาว(extensive conjugated double bond) ซึ่งระบบคอนจูเกชันนี้เองที่ทำให้แคโรทีนอยด์สามารถดูดกลืนพลังงาน แสงอัลตราไวโอเลต และแสงสีขาว และทำให้แคโรทีนอยด์เป็นสารที่มีสีและมีคุณสมบัติในการต้าน ปฏิกริยาออกซิเดชัน

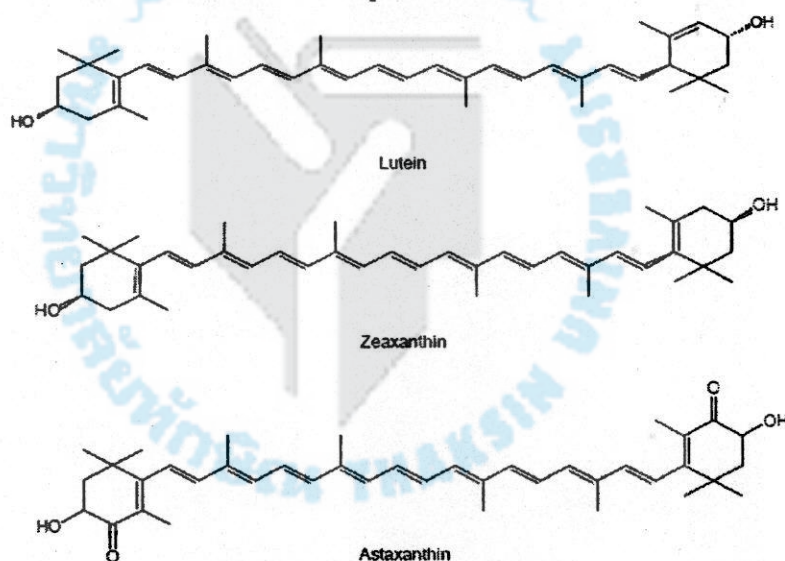
โมเลกุลของแคโรทีนอยด์อาจเป็นเส้นตรง ดังที่พบในไลโคพีน(lycopene) หรือเป็นวงแหวน (ring) ที่ปลายโซ่ของโมเลกุล ดังที่พบในเบต้า-แคโรทีน ซึ่งสามารถแยกแคโรทีนอยด์เป็น 2 กลุ่ม คือ

1. กลุ่มอนุพันธ์แคโรทีนอยด์ที่ถูกแทนที่ด้วยไฮโดรเจน(hydrogenated carotenoid derivatives) เรียกว่ากลุ่มแคโรทีน (carotene) เป็นโมเลกุลที่ประกอบด้วยสายไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon) ทำให้เป็นสารไม่มีขั้วและละลายได้ในไขมัน แคโรทีนของพืชสามารถถูกสังเคราะห์ไปเป็นวิตามิน เอ ในร่างกายสัตว์ได้ พบมากในพืชและสาหร่ายทุกชนิด ตัวอย่างแคโรทีนอยด์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ เบต้า-แคโรทีน และ ไลโคพีนเป็นต้น (รูปที่ 2.1)



รูปที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีของ hydrogenated carotenoid derivatives

2. กลุ่มอนุพันธ์ oxygenated carotenoid derivatives หรือเรียกว่า กลุ่มแซนโทฟิลล์ (xanthophyll) มีอะตอมของออกซิเจนอยู่ในโมเลกุล จึงมีขั้วมากกว่าและละลายในไขมันได้น้อยกว่า แคโรทีนอยด์กลุ่มแรก ละลายได้ในเอทิลแอลกอฮอล์ และเอทิลอีเทอร์ พบมากในพืชโดยทั่วไป และสาหร่ายทุกชนิด ตัวอย่างแคโรทีนอยด์ในกลุ่มนี้ได้แก่ ลูทีน (lutein) ซีแซนทิน (zeaxanthin) และแอสตาแซนทิน (astaxanthin) เป็นต้น (รูปที่ 2.2)



รูปที่ 2.2 โครงสร้างทางเคมีของ oxygenated carotenoid derivatives



### ความสำคัญของแคโรทีนอยด์

สิ่งมีชีวิตที่ใช้ออกซิเจนในการหายใจและเมแทบอลิซึมเพื่อให้ได้พลังงานในการดำเนินชีวิต และการทำงานของอวัยวะต่าง ๆ นั้น ในระหว่างกระบวนการสร้างพลังงาน จะเกิดอนุมูลอิสระขึ้นมา ด้วย ซึ่งเป็นอนุภาคที่มีพลังงานสูง และสามารถเกิดปฏิกิริยาเคมีได้ง่าย โดยเฉพาะสารเคมีในร่างกาย เช่น ไขมัน คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และ DNA ทำให้การทำหน้าที่ของอวัยวะต่าง ๆ ที่มีสารเหล่านี้เป็นองค์ประกอบเปลี่ยนแปลงไป นอกจากอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในร่างกายแล้ว ยังมีอนุมูลอิสระและสิ่งกระตุ้นจากภายนอกที่ทำอันตรายต่อเซลล์และเนื้อเยื่อได้ เช่น การสูบบุหรี่ รังสีอัลตราไวโอเลต รังสีเอกซ์ มลภาวะ ความเครียด และการสัมผัสกับสารเคมีอันตรายต่าง ๆ มีการวิจัยพบว่าปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกายอันเนื่องมาจากออกซิเจนและอนุมูลอิสระมีความสัมพันธ์กับอัตราเร็วของการเกิดความแก่ (aging process) และโรคเรื้อรังต่าง ๆ ในการพยายามชะลอความแก่และลดอัตราเสี่ยงต่อเกิดโรคเรื้อรังต่าง ๆ

แคโรทีนอยด์น่าจะเป็นทางเลือกหนึ่ง เพราะแคโรทีนอยด์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูงโดยเฉพาะ เบต้า-แคโรทีน ไลโคพีน และลูทีน อีกทั้งสามารถมารับประทานได้ง่าย และราคาไม่แพง มีรายงานว่าแคโรทีนอยด์ช่วยในการป้องกันการเกิดโรคหัวใจ โรคมะเร็ง ชะลอความแก่ และป้องกันความผิดปกติของผิวหนังอันเนื่องมาจากแสงแดด เพราะนอกจากแคโรทีนอยด์เป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันแล้ว ยังช่วยเพิ่มการสื่อสารระหว่างเซลล์ มีฤทธิ์ด้านการอักเสบ เพิ่มการกำจัดสิ่งแปลกปลอมออกจากร่างกาย และเพิ่มภูมิคุ้มกันด้วย สารกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่มีประสิทธิภาพสูงและมีความสำคัญต่อการสร้างเสริมสุขภาพของมนุษย์ ได้แก่ เบต้า-แคโรทีน ลูทีน ซีแซนทีน ไลโคพีน และแอสตาแซนทีน

#### 1) เบต้า-แคโรทีนและวิตามินเอ

เบต้า-แคโรทีนพบมากในพืชที่มีสีเหลือง และสีส้ม เช่น หัวแครอท หัวผักกาดแดง มะเขือเทศ เป็นต้น เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์วิตามินเอ โดยร่างกายมนุษย์สามารถเปลี่ยน 9-cis-beta-carotene ไปเป็นวิตามินเอที่ตับและลำไส้ด้วยเอนไซม์ 15,15'-beta-carotenoid dioxygenase ซึ่งวิตามินเอ เป็นสารที่มีความสำคัญต่อการมองเห็น การสร้างสเปิร์ม การสร้างกระดูกและฟัน การซ่อมแซมเนื้อเยื่อ และสุขภาพของผิวหนัง เบต้า-แคโรทีนตามธรรมชาติ มี 2 ไอโซเมอร์ คือ *trans*-isomers และ *cis*-isomers และพบว่าเฉพาะ 9-cis betacarotene เท่านั้นที่สามารถเปลี่ยนแปลงเป็นเรตินอลหรือวิตามินเอได้

เบต้า-แคโรทีนยังใช้ในการรักษาโรคบางชนิด เช่น โรคกระดูก ความผิดปกติของผิวหนังอันเนื่องมาจากความไวต่อแสง ซึ่งการที่ผิวหนังมีความไวต่อแสงจะกระตุ้นให้มีการสร้างพorphyrins (porphyrins) ที่ผิวหนังซึ่งจะดูดกลืนพลังงานจากแสงและทำให้เกิดอนุมูลอิสระ และอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจะทำลายเซลล์และทำให้เกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อ การได้รับเบต้า-แคโรทีนจะทำให้อาการเจ็บปวดลดลง เนื่องจากเบต้า-แคโรทีนไปหยุดปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระ โดยใช้กลไกทางฟิสิกส์ โดยอนุมูลอิสระที่มีพลังงานสูง (singlet state,  $^1O_2^*$ ) ถ่ายเทพลังงานให้กับเบต้า-แคโรทีนซึ่งมีอิเล็กตรอนในโครงสร้างสูงและสามารถดูดกลืนพลังงานได้ดี ( $^1Car$ ) ได้ผลิตภัณฑ์ของออกซิเจนที่มีพลังงานต่ำลง (triplet state,  $^3O_2$ ) และเบต้า-แคโรทีนพลังงานสูง (triplet state,  $^3Car^*$ ) จากนั้นเบต้า-แคโรทีนคายพลังงานออกมาในรูปความร้อน จะเห็นว่าการทำการหยุดยั้งปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระโครงสร้างของเบต้า-แคโรทีนไม่มีการเปลี่ยนแปลง เพราะใช้กลไกทางฟิสิกส์ ไม่ใช่กลไกทางเคมี



แคโรทีนอยด์ยังสามารถช่วยป้องกันโรคหัวใจ โดยยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของ LDL การมีฤทธิ์เป็นสารต้านออกซิเดชันของเบต้า-แคโรทีนและแคโรทีนอยด์ตัวอื่น ๆ ยังช่วยลดอัตราการเกิดโรคมะเร็ง มีการศึกษาพบว่า การรับประทานผัก ผลไม้ ที่มีแคโรทีนอยด์ปริมาณสูงจะแปรผกผันกับอัตราการเกิดโรคมะเร็งปอด หลอดลม กระเพาะอาหารลำไส้ใหญ่ รังไข่ และคอ อย่างไรก็ตาม เมื่อให้เบต้า-แคโรทีน กับผู้ที่สูบบุหรี่ พบว่าอัตราการตายและอัตราการเกิดมะเร็งปอดเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับผู้ที่ไม่ได้รับเบต้า-แคโรทีน ซึ่งผลการศึกษาี้สรุปว่า เบต้า-แคโรทีนไปเพิ่มอัตราการเกิดมะเร็งปอดในคนสูบบุหรี่ และผลการศึกษาต่อมาในผู้ที่ไม่สูบบุหรี่ พบว่าเบต้า-แคโรทีนไม่เพิ่มอัตราการเกิดมะเร็งปอด ซึ่งผลการวิจัยเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าการสูบบุหรี่ร่วมกับการได้รับเบต้า-แคโรทีนจะทำให้อัตราการเกิดมะเร็งปอดสูงขึ้น ซึ่งอาจเป็นผลมาจากเบต้า-แคโรทีนไปเพิ่มการดูดซึมของสารก่อมะเร็งจากบุหรี่ และทำให้มีการสะสมของสารก่อมะเร็งที่ปอดมากขึ้น

## 2) ลูทีนและซีแซนทิน

ลูทีนและซีแซนทินเป็นสารในกลุ่มแซนโทฟิล คือมีอะตอมออกซิเจนอยู่ในโมเลกุล โครงสร้างทางเคมีของลูทีนและซีแซนทินมีความเหมือนกันมาก แตกต่างกันเพียงพันธะคู่ที่อยู่บนวงแหวนที่อยู่ส่วนปลายเท่านั้น (รูปที่ 2.2) ซึ่งความแตกต่างนี้เอง ที่ทำให้ลูทีนและซีแซนทินมีจำนวนไอโซเมอร์ต่างกัน โดยลูทีนมีสเตอริโอไอโซเมอร์ได้ถึง 8 ไอโซเมอร์ ส่วนซีแซนทินมีเพียง 3 ไอโซเมอร์ ลูทีนและซีแซนทินดูดซึมได้ ดีกว่าเบต้า-แคโรทีนทั้งในรูปปกติและในรูปเอสเทอร์ โดยในรูปเอสเทอร์จะดูดซึมได้ดีเมื่อให้พร้อมกับอาหารที่มีไขมันสูง ลูทีนและซีแซนทินในอาหารมีบทบาทในการป้องกันโรคตา



ต่างๆ เช่น โรคตาบอดเนื่องจากการเสื่อมสภาพของแมคูลาลูเทีย (macula lutea) ในผู้สูงอายุ โรคต้อกระจก เป็นต้น

ลูทีนและซีแซนทีนพบสะสมอยู่ในส่วนแมคูลาลูเทียของเรตินา โดยแมคูลาลูเทียเกี่ยวข้องกับการมองเห็นและทำหน้าที่กรองแสงสีน้ำเงิน ป้องกันการทำลายตัวรับแสง (photoreceptor) จากพลังงานแสงของแสงสีน้ำเงิน และยังช่วยคงสภาพความสมบูรณ์ของเรตินาด้วย ซึ่งแคโรทีนอยด์เหล่านี้ ไม่สามารถสร้างขึ้นได้เองจากร่างกายมนุษย์ แต่จะต้องได้รับจากอาหารที่มีแคโรทีนอยด์ปริมาณสูง ลูทีนและซีแซนทีนยังป้องกันการทำลายเรตินาด้วยการเป็นสารต้านออกซิเดชัน ปัจจัยเสี่ยงของโรค AMD คือ อายุ (อายุมากกว่าหรือเท่ากับ 65 ปี) การรับประทานผักและผลไม้ไม่ในปริมาณต่ำ การสูบบุหรี่ การดื่มเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ การสัมผัสกับแสงมากเกินไป และการลดลงของประสิทธิภาพการดำเนินปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกาย โรค AMD เป็นสาเหตุสำคัญของโรคตาบอดในผู้ที่มีอายุตั้งแต่ 65 ปีขึ้นไป แต่อย่างไรก็ตามโรค AMD สามารถป้องกันได้ มีการศึกษาพบว่า การรับประทานผัก ผลไม้ ที่มีปริมาณของแคโรทีนอยด์สูงมีความสัมพันธ์กับการลดลงของการเกิดโรค AMD และโรคต้อกระจก และมีรายงานว่า การรับประทานผักขมจะช่วยลดอัตราการเกิด AMD ได้มากที่สุด เมื่อเทียบกับการได้รับแคโรทีนอยด์จากอาหารแหล่งอื่น และจากการวิเคราะห์หาปริมาณแคโรทีนอยด์ในเลือด พบว่าการมีลูทีนและซีแซนทีนในเลือดสูงสัมพันธ์กับการลดลงของโอกาสการเกิด AMD ต้อกระจกเป็นโรคจากการขุ่นมัวของเลนส์ตา เนื่องจากอายุมากขึ้นและบดบังการมองเห็น มีรายงานว่า การรับประทานอาหารที่มีแคโรทีนอยด์ปริมาณสูง โดยเฉพาะลูทีนและซีแซนทีนจะลดอัตราการเกิดต้อกระจก และมีรายงานวิจัยสนับสนุนว่าในกลุ่มคนที่รับประทานผักขมและบรอกโคลี จะลดอัตราการผ่าตัดต้อกระจกมากที่สุด

### 3) ไลโคพีน

ไลโคพีนเป็นสารที่มีสีแดงส้ม พบมากในมะเขือเทศ และยังพบได้ในแตงโม องุ่นแดง มะละกอ และฝรั่งสีแดง เป็นแคโรทีนอยด์ที่พบได้มากที่สุดในกระแสเลือด อาจพบที่บริเวณอื่นๆ ด้วย เช่น อัณฑะ ต่อมหมวกไต ตับ ต่อมลูกหมาก เต้านม ตับอ่อน และผิวหนัง เนื่องจากไลโคพีนมีโครงสร้างโมเลกุลเป็นโซ่ตรง (รูปที่ 2.1) และเป็นสารที่ไม่มีขั้วจึงดูดซึมได้ไม่ดี แต่ถ้าผ่านการปรุงด้วยความร้อนแล้วจะดูดซึมดีขึ้น ดังเห็นได้จากการดูดซึมไลโคพีนจากมะเขือเทศสด ในระดับที่ต่ำกว่าจากมะเขือเทศที่ผ่านการปรุงแล้ว เนื่องจากการประกอบอาหารด้วยความร้อนจะทำให้ไลโคพีนที่อยู่ในรูป *trans*-lycopene เปลี่ยนเป็น *cis*-lycopene ซึ่งในรูป *cis*-lycopene จะดูดซึมได้ดีกว่า *trans*-lycopene และการผสมน้ำ มันพืชในขณะที่ประกอบอาหารที่มีขอสมะเขือเทศ จะทำให้ดูดซึมไลโคพีนได้ดีกว่าจากอาหารที่มีขอสมะเขือเทศอย่างเดียว ไลโคพีนสามารถยับยั้งออกซิเจนพลังงาน

สูง (singlet state,  $^1O_2^*$ ) ได้มากที่สุดในการบรรดาสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ด้วยกัน และยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งได้ดีกว่าทั้งแอลฟาแคโรทีนและเบต้า-แคโรทีน และคาดว่าไลโคพีนสามารถยับยั้งการเกิดโรคหัวใจและโรคมะเร็งโดยการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันบนเมมเบรน DNA รวมทั้ง LDL และโมเลกุลอื่น ๆ ที่ถูกทำลายได้ด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยไลโคพีนจะจับอนุมูลอิสระและไปสะเทินความไวในการเกิดปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระเหล่านั้น มีรายงานวิจัยว่าการลดลงของอัตราเสี่ยงในการเกิดมะเร็งต่อมลูกหมาก มะเร็งปอด และมะเร็งกระเพาะอาหาร มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับการรับประทานมะเขือเทศ สำหรับการป้องกันโรคหัวใจ พบว่ากลุ่มตัวอย่างที่มีไลโคพีนสะสมในเนื้อเยื่อไขมันในปริมาณสูงจะมีอัตราเสี่ยงในการเกิดโรคหัวใจที่ต่ำลง ไลโคพีนยังช่วยป้องกันการเกิดออกซิเดชันอันเนื่องจากการกระตุ้นของแสงบนผิวหนัง และให้ผลดีกว่าเบต้า-แคโรทีน

#### 4) แอสตาแซนทิน

แอสตาแซนทิน (3, 3'-dihydroxy- $\beta$ - $\beta$ -carotene-4, 4'-dione) เป็นสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่มีคุณสมบัติแอนติออกซิแดนท์ (anti-oxidant) ซึ่งเป็นสารประกอบที่ละลายในไขมัน มีสีแดงเกิดขึ้นตามธรรมชาติในสิ่งมีชีวิต เช่น พืช สาหร่าย และสัตว์ทะเล พวกกุ้ง หอย สาหร่ายชนิดต่างๆ และพบมากในดอกไม้ ผลไม้สุกที่มีสีส้มและสีแดง โมเลกุลของแอสตาแซนทินมีลักษณะคล้ายกับเบต้า-แคโรทีน โดยมีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย ดังรูปที่ 2.1 ซึ่งนำไปสู่คุณสมบัติทางเคมีที่แตกต่างเป็นอันมาก ถึงแม้ว่าการนำแอสตาแซนทินมาใช้ในฟาร์ม จะเป็นที่แพร่หลายในปัจจุบัน แต่การใช้แอสตาแซนทินเป็นสารแอนติออกซิแดนท์ ในมนุษย์ยังอยู่ในขั้นเริ่มต้นเท่านั้น

แอสตาแซนทินเป็นรงควัตถุสีแดงพบทั่วไปในสิ่งมีชีวิต ซึ่งจะเห็นว่าเป็นเมื่อประกอบอาหารจากสัตว์เหล่านี้จะเห็นเป็นสีแดงที่เปลือกกุ้งหรือกระดองของปู นอกจากกุ้งหอยแล้ว สีของปลาชนิดต่างๆ ก็มักจะเป็นสีของแอสตาแซนทิน เช่น ปลาแซลมอนก็มีสีชมพูของแอสตาแซนทินเช่นเดียวกัน ด้วยเหตุนี้ในฟาร์มสัตว์น้ำจึงมีการให้อาหารที่มีส่วนผสมของแอสตาแซนทิน เพื่อช่วยเพิ่มสีแก่สัตว์น้ำ นอกจากนี้แอสตาแซนทินยังมีส่วนสำคัญต่อการเจริญเติบโต และการดำรงชีวิตของสัตว์เหล่านั้นด้วย (Torrissen, O.J., 1995)

โดยธรรมชาติแล้วแคโรทีนอยด์ เป็นสารที่พืชและสาหร่ายบางชนิดสามารถสร้างขึ้นเองได้ ซึ่งสัตว์ไม่สามารถสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ได้ จึงจำเป็นต้องรับสารเหล่านั้นจากพืชบางชนิด (Britton, G., 1995) การผลิตแอสตาแซนทินจากสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* ถือเป็นแหล่งทางการค้าที่สำคัญของโลก นอกจากนี้แอสตาแซนทิน ยังสามารถผลิตได้จากกระบวนการหมักของยีสต์ *Xanthophyllomyces dendrorhous* หรือการสกัดจากสัตว์มีเปลือกหุ้ม และการสังเคราะห์ทางเคมี



## ประโยชน์ของแอสตาแซนทิน

### 1) ใช้ผสมอาหารสัตว์

แอสตาแซนทินเป็นรงควัตถุพื้นฐานที่พบได้ในเนื้อสัตว์จำพวกแซลมอน (salmonids) ได้แก่ ปลาแซลมอนและปลาเทราท์ และสัตว์ที่มีกระดอง (crustaceans) เช่น กุ้ง กั้ง และปูชนิดต่างๆ ซึ่งตามธรรมชาติแล้วสัตว์เหล่านี้จะได้รับรงควัตถุนี้จากอาหารที่มีอยู่อย่างจำกัด ทำให้สีของเนื้อสัตว์มีสีสันจืดจางไม่สวยและขายได้ในราคาต่ำ ดังนั้นผู้เลี้ยงจึงนิยมใช้แอสตาแซนทิน เติมลงไป ในอาหารเพาะเลี้ยง เพื่อที่จะทำให้สัตว์น้ำดังกล่าวมีสีสันสวยงาม และขายได้ในราคาสูง ซึ่งมีคำแนะนำให้ใช้แอสตาแซนทินประมาณ 20 ไมโครกรัมต่อกรัมของอาหารเลี้ยงปลาแซลมอน เป็นระยะเวลาประมาณ 2 – 4 เดือน ก็จะทำให้ปลามีสีสันสวยงาม (Johnson, E.A., et al., 1980) นอกจากนี้จะช่วย ในการ สร้างสีแล้ว แอสตาแซนทินยังช่วยให้ไข่ของปลาแซลมอน มีอัตราการรอด พักตัวได้ดี และยัง กระตุ้นให้ปลามีการเจริญเติบโตได้ดี

สำหรับอุตสาหกรรมสัตว์ปีก มีการทดลองใช้แอสตาแซนทินที่สกัดจากเปลือกกุ้งร่วมกับลูทีน เพียงเล็กน้อยผสมลงในอาหารเลี้ยงสัตว์ พบว่าสามารถทำให้ได้ไข่แดงมีสีเหลืองมากขึ้น ความเข้มของสีจะใกล้เคียงกับที่ใช้ลูทีนปริมาณมากเพียงอย่างเดียว และเมื่อมีการใช้แอสตาแซนทินเพียงอย่างเดียวจะทำให้ไข่แดงมีสีชมพู ซึ่งจะไม่พบลักษณะของไข่แดงที่เป็นสีชมพูนี้ในอาหารเลี้ยงที่ผสมแอสตาแซนทินร่วมกับลูทีน (Marusich และ Bauernfeind, 1989)

### 2) ใช้ผสมในอาหารมนุษย์

ใช้แอสตาแซนทินผสมในปุ๊อดทำให้ปุ๊อดมีสีแดงน่ารับประทานยิ่งขึ้น (สูตรสายชล, 2541)

### 3) ใช้ในทางการแพทย์

Jyonouchi, H., et al. (1996) รายงานว่าแอสตาแซนทินสามารถเพิ่ม T-helper ในหนูได้สูงกว่าแคโรทีนอยด์ชนิดอื่นๆ โดยการเพิ่ม T-helper ทำให้หนูมีระบบภูมิคุ้มกันที่ดีขึ้น และนอกจากนี้พบว่าแอสตาแซนทินเป็นสารที่มีคุณสมบัติแอนติออกซิแดนซ์ที่สูงกว่าแคโรทีนอยด์อื่นๆ ทำให้เชื่อว่าสามารถป้องกันการเกิดโรคมะเร็งและเนื้องอกได้ เนื่องจากการเกิดโรคมะเร็งและเนื้องอกนั้นมีอนุมูลอิสระเป็นจุดเริ่มต้นและส่งเสริมการเกิดเซลล์มะเร็ง ดังนั้นการที่แอสตาแซนทินมีสมบัติเป็นแอนติออกซิแดนซ์ที่สูง จึงมีส่วนช่วยกำจัดอนุมูลอิสระได้ดี และทำให้สามารถป้องกันการเกิดโรคมะเร็งได้

## 2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับแคโรทีนอยด์

ผักและผลไม้ชนิดต่างๆมีองค์ประกอบของชนิดและปริมาณแคโรทีนอยด์แตกต่างกัน รวมทั้งสารประกอบอื่นๆด้วย ซึ่งความแตกต่างนี้ส่งผลถึงอิทธิพลต่อการสกัดและการวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารแคโรทีนอยด์ การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์แคโรทีนอยด์ ส่วนใหญ่ต้องผ่านการเตรียมสารโดยวิธีการสกัด เพื่อกำจัดเมทริกซ์(matrix) ในตัวอย่างก่อนไปวิเคราะห์สารด้วย HPLC เอกสารงานวิจัยหลายเรื่องแสดงให้เห็นถึงวิธีการสกัดสารจากตัวอย่างชนิดต่างๆด้วยตัวทำละลายเดี่ยว หรือตัวทำละลายผสม ดังในตารางที่ 2.1 (Taungbodhitham, A. K. *et al.*, 1998)

ตารางที่ 2.1 สรุปวิธีการสกัดที่ใช้สำหรับเตรียมตัวอย่างผลไม้และผัก

| สารแคโรทีนอยด์                                                                | ตัวอย่าง   | ตัวทำละลาย                                                                                             | งานวิจัย                                                          |
|-------------------------------------------------------------------------------|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| $\alpha$ -, $\beta$ -carotene and cryptoxanthin                               | น้ำส้ม     | petroleum ether: isopropanol (1:3), diethyl ether <sup>a</sup>                                         | Reeder, S. K. and Park, G. L. (1975)                              |
| $\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ -carotene, $\alpha$ -, $\beta$ -cryptoxanthin | น้ำส้ม     | dichloroethane: methanol (1:1), hexane, diethyl ether <sup>a</sup>                                     | Stewart, I. (1977)                                                |
| $\alpha$ -, $\beta$ -carotene, lycopene                                       | มะเขือเทศ  | acetone, petroleum ether <sup>a</sup>                                                                  | Zakaria, M. <i>et al.</i> , 1979                                  |
| $\beta$ -carotene                                                             | พืชสด      | acetone: hexane (2:3), acetone, hexane or ethanol: hexane (4:3), ethanol, hexane                       | Association of Official Analytical Chemists, 1984, Section 43.015 |
| $\alpha$ -, $\beta$ -carotene                                                 | ผลไม้, ผัก | Tetrahydrofuran (สำหรับแคโรทีนปริมาณสูง)<br>tetrahydrofuran, petroleum ether (สำหรับแคโรทีนปริมาณน้อย) | Bushway, R. J. and Wilson, A.M. (1982)                            |
| $\alpha$ -, $\beta$ -carotene                                                 | ผลไม้, ผัก | tetrahydrofuran                                                                                        | Bushway, R. J. 1985                                               |
| $\alpha$ -, $\beta$ -carotene                                                 | ผลไม้, ผัก | acetone:petroleum ether (1:1)                                                                          | Hsieh, Y. P. C. and Karel, M. (1983)                              |
| carotenoids                                                                   | ส้ม        | acetone, methanol:acetone (1:1)<br>acetone, diethyl ether <sup>a</sup>                                 | Noga, G. and Lenz, F. (1983)                                      |

หมายเหตุ <sup>a</sup> การนำสารสกัดทำปฏิกิริยา saponification



งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์สารแคโรทีนอยด์โดยส่วนใหญ่มักใช้ HPLC ในการวิเคราะห์เนื่องจากเป็นเทคนิคที่สามารถแยกสารแคโรทีนอยด์ที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงออกจากกันได้ ทั้งยังสามารถวิเคราะห์สารในปริมาณน้อยๆได้อย่างรวดเร็ว เช่น

Abushita, A.A., *et al.* (1997). วิเคราะห์หาแคโรทีนอยด์ที่มีคุณสมบัติแอนติออกซิแดนทิกในมะเขือเทศ โดยใช้เทคนิค HPLC เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการแยกหาปริมาณแคโรทีนอยด์ได้ใกล้เคียงกันในพีชชนิดเดียวกันแต่เพาะปลูกในพื้นที่ต่างกัน ในประเทศอังการี ปี ค.ศ.1995 ซึ่งในการวิเคราะห์หาแคโรทีนอยด์ด้วย HPLC จะใช้คอลัมน์ Chromsil C-18 และใช้ Acetonitrile – isopropanol-methanol-H<sub>2</sub>O ในอัตราส่วน 39:52:5:4 เป็นตัวชะ อัตราการไหลเท่ากับ 0.9-1.2 ml/min โดยใช้ดีเทคเตอร์ในช่วงวิสิเบิลที่ความยาวคลื่น 440 nm

Hodisan, T., *et al.* (1997). วิเคราะห์หาแคโรทีนอยด์ในผลไม้จำพวก Rosa canina (Rosaceae) ในสารสกัดทั้งหมดและสารสกัด 3 ส่วนที่แตกต่างจากการแยกสารบนอลูมินา คอลัมน์ แล้วชะสารด้วย 100% petroleum ether (ส่วนที่ 1), petroleum ether-ethyl ether(1:1) (ส่วนที่ 2) และ ethanol 5%(v/v) ใน ethyl ether (ส่วนที่ 3) และทำการเปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างวิธี TLC และ HPLC ดังนี้

- วิธี TLC แบ่งการสกัดทั้งหมดเป็น 2 ขั้นตอน ก็คือ ขั้นที่ 1 ใช้ acetone ใน petroleum ether 15%(v/v)เป็นตัวทำละลาย และขั้นที่ 2 ใช้ petroleum ether 100% เป็นตัวทำละลาย
- วิธี HPLC ศึกษาทั้งระบบไอโซเครติก (isocratic) และระบบแกรเดียน (gradient) โดยระบบแกรเดียนใช้เฟสเคลื่อนที่ผสม acetonitrile-methanol-ethyl acetate (70:10:9) ร่วมกับ TEA 1% เป็นตัวทำละลาย A รวมกับตัวทำละลาย B ประกอบด้วย methanol-acetonitrile-hexane-dichloromethane(50:12:10:8) ร่วมกับ TEA 0.5% ซึ่งมีโปรแกรมผสมระหว่างตัวทำละลาย A กับ ตัวทำละลาย B ด้วยอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่เป็น 1.5 ml/min ดังนี้ 0-6 นาที ใช้ตัวทำละลาย A 100% 6-7.5 นาที เป็นตัวทำละลาย B จาก 0-100% 7.5-11 นาที เป็นตัวทำละลาย B 100% และ 11-13 นาที เป็นตัวทำละลาย B จาก 100-0%

การวิเคราะห์ด้วยวิธีทั้งสองทำให้ทราบว่าแคโรทีนอยด์ที่เป็นองค์ประกอบหลักเป็น lycopene,  $\beta$ - carotene,  $\beta$ - chryptoxanthin, rubixanthin, zeaxanthin และ leutene

Ottes, S. และ Atli, Y. (2000) ทำการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและปริมาณหาแคโรทีนอยด์ในมะเขือเทศที่มีลักษณะชั้นเหนียว โดยเปรียบเทียบระหว่างวิธี HPLC และ OCC พบว่าการวิเคราะห์

ด้วยวิธี HPLC จะไม่มีปัญหาเรื่องช่วงเวลา เพราะสารสกัดจะถูกฉีดเข้าไปในระบบ HPLC อย่างรวดเร็ว และใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อยกว่าวิธี OCC และวิธี HPLC จะมีสัญญาณตอบสนองที่สูงกว่า ดังจะเห็นได้จากค่า Recovery โดยวิธี HPLC จะมีค่าเท่ากับ 76.61% ส่วนวิธี OCC จะมีค่าเท่ากับ 75.90%

Lee, H.S., et al. (2001) ใช้วิธี HPLC เพื่อแยกและบอกลักษณะของแคโรทีนอยด์จากผลส้ม (New sweet orange, Earlygold) โดยใช้ hexane-acetone-ethanol ในการสกัดแคโรทีนอยด์ และใช้ methanolic potassium hydroxide 10% ในการทำปฏิกิริยา Saponification ใช้ระบบแก๊สเฉื่อย (acetonitrile-methanol, methyl tert-butyl ether และ  $H_2O$ ) ในการชะสารผ่านคอลัมน์ สามารถแยกแคโรทีนอยด์ออกมาได้ 25 ชนิด ภายในเวลา 40 นาที

Lin, C.H. และ Chen, B.H. (2005) ศึกษาความเสถียรของสารแคโรทีนอยด์ในน้ำมันมะเขือเทศ ระหว่างการเก็บรักษา น้ำมันมะเขือเทศถูกเตรียมโดยการให้ความร้อนมะเขือเทศบดที่  $82^{\circ}C$  แล้วเพิ่มเป็น  $121^{\circ}C$  (40 วินาที) นำไปเก็บในที่มืดและที่มีแสง ที่อุณหภูมิ 4, 25 และ  $35^{\circ}C$  เป็นเวลา 12 อาทิตย์ พบว่าปริมาณของ trans-lutein ทั้งหมดและ cis-isomers ลดลง เมื่อเวลาการเก็บเพิ่มขึ้น สำหรับทุกตัวอย่าง และยังพบว่าแสงเป็นปัจจัยที่เพิ่มการสลายตัวและการเกิดไอโซเมอร์ไรเซชัน (isomerization) ของ trans-lutein และ 13-cis-lutein ทั้งหมด รวมทั้ง  $\beta$ -carotene และ lycopene ด้วย แต่อย่างไรก็ดี แสงมีส่วนช่วยในการกระตุ้นให้เกิด di-cis-, 9-cis- และ 13-cis- $\beta$ -carotene โดยพบว่า 15-cis-lycopene เป็นไอโซเมอร์หลักที่เกิดขึ้นระหว่างการเก็บในที่มืดที่  $4^{\circ}C$  ในขณะที่ 9-cis- และ 13-cis-lycopene พบที่  $25^{\circ}C$  และ 5-cis- และ 13-cis-lycopene พบมากที่สุดที่  $35^{\circ}C$  และเมื่อเก็บตัวอย่างในที่สัมผัสกับแสง พบว่าทั้ง 9-cis- และ di-cislycopene(II) เป็นไอโซเมอร์ซึ่งพบมากที่สุดที่  $35^{\circ}C$

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

##### วัสดุอุปกรณ์

1. เครื่อง liquid chromatography ของ Perkin Elmer รุ่น Esquire 3000 ประกอบด้วย Agilent 1000 series Variable Wavelength Detector, Agilent 1000 series Micro Vacuum Degasser, Agilent 1000 series Binary Pump
2. เครื่อง UV-Vis spectrophotometer ของ Shimadzu รุ่น UV-1670
3. เครื่องฟรีซไดรยด์ (Freeze Dryer -1.5 litre รุ่น Freezone 4.5)
4. เครื่อง Rotary evaporator
5. เครื่อง Ultrasonic (Brason รุ่น 3210)
6. เครื่องกรองลดความดัน (Buchi รุ่น B-169 Vacuum - System)
7. ชุดกรองสารตัวอย่าง
8. กระดาษกรอง
9. เครื่องเซนตริฟิวจ์
10. ขวดวัดปริมาตร
11. เครื่องปั่น
12. ปีกเกอร์
13. กรวยแยก
14. แท่งแก้วคน
15. ข้อนตักสาร
16. หลอดหยด
17. ปีเปต
18. ขวดตัวอย่างสีชา (vial)
19. แผ่นอะลูมิเนียมฟอยด์ (aluminium foil)
20. เครื่องคนสาร
21. กระบอกดวง



สารเคมี

1. sodium hydrogen sulphate
2.  $\beta$ -carotene standard
3. Astaxantin standard
4. Methanol
5. Ethanol
6. Acetone
7. Hexane
8. Acetronitrile
9. Ethyl ether
10. Diethyl ether
11. Isopropanol
12. Chloroform
13. Petroleum ether
14. Ethyl acetate
15. Dichloromethane
16. Potassium hydroxide
17. พืชตัวอย่าง ได้แก่ แครอท ดอกเข็ม ดอกดาวเรือง ดอกเฟื่องฟ้า เปลือกข้าวโพด เปลือกเงาะ  
สาหร่ายผสมนาง

### 3.2 วิธีการทดลอง

#### 3.2.1 ศึกษาการเตรียมตัวอย่าง

##### วิธีทำ

- นำตัวอย่างแครอทประมาณ 500 กรัม มาศึกษาวิธีการเตรียมสารตัวอย่าง 3 แบบ โดยมีวิธีการดังนี้
  - วิธีที่ 1 การอบแห้ง : นำตัวอย่างมาอบให้แห้งในที่มืด ด้วยอุณหภูมิ  $40^{\circ}\text{C}$  จนมีความชื้นเหลือน้อยกว่า 10% บดให้ละเอียด
  - วิธีที่ 2 วิธีฟรีซดรายน์ (freeze-dry) : นำตัวอย่างทำให้แห้งโดยใช้ freeze-dryer  $-53^{\circ}\text{C}$  จนมีความชื้นเหลือน้อยกว่า 10% บดให้ละเอียด
  - วิธีที่ 3 แบบสด : นำตัวอย่างประมาณ 500 กรัม บดให้ละเอียด
- นำตัวอย่างบดละเอียดมาสกัดโดยใช้ hexane-acetone-ethanol อัตราส่วน 2 : 1 : 1 เป็นตัวสกัด และทำการทดลองตามหัวข้อ 3.6.2
- นำมาหาปริมาณแอสตาแซนทินเพื่อเปรียบเทียบผลการทดลอง โดยใช้เทคนิค HPLC มีสภาวะการทดลองคือ  $\text{C}_{30}$  Column, Flow rate 1.0 ml/min, hexane - acetone อัตราส่วน 70:30 ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร

#### 3.6.2 ศึกษาการสกัดสารตัวอย่าง

เลือกวิธีการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสมจาก 3.6.1 แล้วทำการศึกษานิตตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการสกัด ดังนี้

##### วิธีทำ

- นำตัวอย่างพืชสด มาบดให้ละเอียด
- นำตัวอย่างบดละเอียด น้ำหนักประมาณ 200 กรัม มาสกัดด้วย acetone-methanol-petroleum ether อัตราส่วน 3:2:1 เป็นเวลา 5 ชั่วโมง
- กรองสารสกัดหยาบ แล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยการลดความดันให้แห้ง แล้วนำไปละลายใน diethyl ether
- ทำปฏิกิริยา saponification โดยเติม KOH-methanol (10:90 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) จากนั้นนำไปคนเป็นเวลา 8 ชั่วโมง ด้วยแท่งคนแม่เหล็ก
- สกัดด้วย diethyl ether ติดต่อกัน 5 ครั้ง แล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยการลดความดันให้มีปริมาตรตามต้องการ
- ทำตามข้อ 1-5 แต่เปลี่ยนสารที่ใช้สกัดเป็น chloroform-methanol อัตราส่วน 3:1
- ทำตามข้อ 1-5 แต่เปลี่ยนสารที่ใช้สกัดเป็น hexane-acetone-ethanol อัตราส่วน 2:1:1

### 3.6.3 การวิเคราะห์สารเชิงปริมาณโดยเทคนิค HPLC

#### 1) การวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์

##### 1.1) การหาความยาวคลื่นที่เหมาะสม โดยใช้เทคนิค UV-Vis spectrophotometry

1. นำสารละลายมาตรฐาน  $\beta$ -แคโรทีน มาวิเคราะห์หาความยาวคลื่นที่สามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุด ในช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่ 300-600 นาโนเมตร
2. นำสารละลายมาตรฐานแอสตาแซนทิน มาวิเคราะห์หาความยาวคลื่นที่สามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุด ในช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่ 460-500 นาโนเมตร
  - C<sub>30</sub> Column
  - Flow rate 1.0 ml/min
  - เฟสเคลื่อนที่ hexane - acetone อัตราส่วน 70:30
  - ความยาวคลื่น 465- 495 นาโนเมตร

##### 1.2) การหาองค์ประกอบที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่

นำสารละลายมาตรฐานแอสตาแซนทินมาวิเคราะห์โดยใช้สภาวะการทดลองดังนี้

- C<sub>30</sub> Column
- Flow rate 1.0 ml/min
- ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร

#### วิธีทำ

1. ใช้สารละลายมาตรฐานแอสตาแซนทินความเข้มข้น 50 mg/L ปริมาตร 20  $\mu$ L โดยใช้ acetonitrile-dichloromethane-methanol อัตราส่วน 7:1:7:22 เป็นเฟสเคลื่อนที่ โดยจะทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อนำมาหาค่าเฉลี่ย
2. ใช้สารละลายมาตรฐานแอสตาแซนทินความเข้มข้น 50 mg/L ปริมาตร 20  $\mu$ L โดยใช้ acetone-methanol-H<sub>2</sub>O อัตราส่วน 50:45:5 เป็นเฟสเคลื่อนที่ โดยจะทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อนำมาหาค่าเฉลี่ย
3. ใช้สารละลายมาตรฐานแอสตาแซนทินความเข้มข้น 50 mg/L ปริมาตร 20  $\mu$ L โดยใช้ hexane-acetone อัตราส่วน 70:30 โดยจะทำการทดลองซ้ำแต่ละอัตราส่วน 3 ครั้ง เพื่อนำมาหาค่าเฉลี่ย
4. เลือกเฟสเคลื่อนที่ที่สามารถแยกพีคของแอสตาแซนทินได้ดีที่สุด โดยการเปรียบเทียบจำนวน Theoretical plates (N) จากนั้นนำมาปรับอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่เพื่อหาอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุด



### การคำนวณค่า N

$$N = 16(t_r/W)^2$$

โดยที่  $t_r$  = retention time

$W$  = ความกว้างของฐานพีค (หน่วยเดียวกับ  $t_r$ )

### 1.3) การศึกษาอัตราการไหลที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่

นำสารละลายมาตรฐานแอสตาแซนทินมาทำการวิเคราะห์โดยใช้สภาวะการทดลองดังนี้

- $C_{30}$  Column
- เฟสเคลื่อนที่ hexane - acetone อัตราส่วน 70:30
- ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร

ใช้สารละลายมาตรฐานแอสตาแซนทินความเข้มข้น 50 mg/L ปริมาตร 20  $\mu$ L โดยจะใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ต่างๆ กัน และทำการทดลองซ้ำอัตราการไหลละ 3 ครั้งเพื่อนำมาหาค่าเฉลี่ยประสิทธิภาพของอัตราการไหล สามารถเปรียบเทียบได้จากค่า HETP

การคำนวณ HETP

$$H = L/N$$

โดยที่  $L$  = ความยาวของคอลัมน์

$N$  = จำนวน theoretical plate

### 2) การหาปริมาณแอสตาแซนทินในตัวอย่างโดยใช้กราฟมาตรฐาน

#### วิธีทำ

1. นำสารละลายมาตรฐานแอสตาแซนทิน ความเข้มข้น 5, 10, 15, 20, 25, 30 mg/L ฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยมีสภาวะการทดลองคือ  $C_{30}$  Column, Flow rate 1.0 ml/min, hexane - acetone อัตราส่วน 70:30 และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร
2. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้สร้างกราฟมาตรฐาน โดยการแทนพื้นที่ได้พิกัดด้วยแกน Y และแทนค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานแอสตาแซนทินด้วยแกน X
3. นำตัวอย่างที่ได้ผ่านการสกัด มาฉีดเข้าเครื่องโดยใช้สภาวะการทดลองเหมือนข้อ 1

### 3.6.4 การวิเคราะห์สารเชิงปริมาณ โดยเทคนิค UV-Vis spectrophotometry

#### 1) การวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์

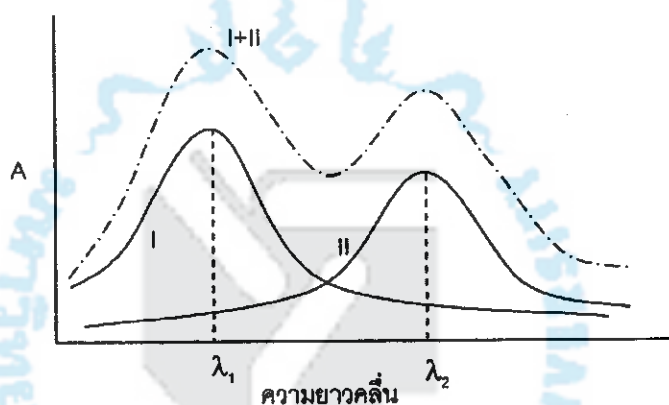
##### 1.1) การหาความยาวคลื่นที่เหมาะสม โดยใช้เทคนิค UV-Vis spectrophotometry

##### วิธีทำ

1. นำสารละลายมาตรฐาน  $\beta$ -แคโรทีน มาวิเคราะห์หาความยาวคลื่นที่สามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดในช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่ 300-600 นาโนเมตร
2. นำสารละลายมาตรฐาน แอสตาแซนทิน มาวิเคราะห์หาความยาวคลื่นที่สามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดในช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่ 460-500 นาโนเมตร

#### 2) การหาปริมาณสารผสม $\beta$ -แคโรทีน และ แอสตาแซนทิน

จากกฎของเบียร์ สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์สารในตัวอย่างผสม โดยที่สารแต่ละชนิด ไม่มีอิทธิพลต่อการตรวจวัดหรือการดูดกลืนแสงของสารอีกชนิดหนึ่ง ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จะเป็นผลรวมของค่าการดูดกลืนแสงของสารแต่ละชนิด ดังรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสาร I, II และของผสม (I+II)

จากกฎของเบียร์

$$A = \epsilon bc$$

เมื่อ  $A$  = ค่าการดูดกลืนแสง(absorbance)

$\epsilon$  = molar absorptivity

$b$  = ความยาวของเซลล์ที่แสงผ่าน

$C$  = ความเข้มข้นของสารละลายที่ดูดกลืนแสง

แต่  $\epsilon$  และ  $b$  เป็นค่าคงที่ ซึ่ง  $\epsilon b = k$  (ถ้า  $b = 1 \text{ cm}$ ,  $\epsilon = k$ )

ดังนั้น

$$A = kC$$

$k$  คือ ค่าความชันของกราฟที่เขียนระหว่าง  $A$  และ  $C$

ดังนั้นเมื่อมีสาร  $n$  ชนิด ในสารละลาย ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่มีความยาวคลื่น คือ

$$A_{\text{total}} = A_1 + A_2 + \dots + A_n$$

ที่ความยาวคลื่น  $\lambda_1$

$$A_{\text{total}, \lambda_1} = A_{1, \lambda_1} + A_{2, \lambda_1} + \dots + A_{n, \lambda_1}$$

$$= k_{11}C_1 + k_{12}C_2 + \dots + k_{1n}C_n \quad \text{---1)}$$

ที่ความยาวคลื่น  $\lambda_2$

$$A_{\text{total}, \lambda_2} = A_{1, \lambda_2} + A_{2, \lambda_2} + \dots + A_{n, \lambda_2}$$

$$= k_{21}C_1 + k_{22}C_2 + \dots + k_{2n}C_n \quad \text{---2)}$$

เมื่อ  $A_{\text{total}, \lambda_1}$  = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายผสม ที่ความยาวคลื่น  $\lambda_1$

$A_{\text{total}, \lambda_2}$  = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายผสม ที่ความยาวคลื่น  $\lambda_2$

$k_{11}$  และ  $k_{12}$  = ค่าคงที่การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น  $\lambda_1$  ของสารตัวที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

$k_{21}$  และ  $k_{22}$  = ค่าคงที่การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น  $\lambda_2$  ของสารตัวที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

### วิธีทำ

1. นำสารละลายมาตรฐาน  $\beta$ -แคโรทีน ความเข้มข้น 3, 6, 9, 12 ppm มาวิเคราะห์ มาวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450.5 และ 473.5 นาโนเมตร
2. นำสารละลายมาตรฐาน แอสตาแซนทิน ความเข้มข้น 2, 4, 6, 8, 10 ppm มาวิเคราะห์ มาวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450.5 และ 473.5 นาโนเมตร
3. นำผลการทดลองที่ได้มาเขียนกราฟมาตรฐาน ของ  $\beta$ -แคโรทีน และ แอสตาแซนทิน ที่ความยาวคลื่น 450.5 และ 473.5 นาโนเมตร และคำนวณค่า  $k_{11}$ ,  $k_{12}$ ,  $k_{21}$  และ  $k_{22}$  จากสมการที่ 1) และ 2)

(กำหนดให้  $k_{11}$ ,  $k_{12}$  =  $k$  ที่ความยาวคลื่น  $\lambda_1$  ของ  $\beta$ -แคโรทีน และ แอสตาแซนทิน

$k_{21}$ ,  $k_{22}$  =  $k$  ที่ความยาวคลื่น  $\lambda_2$  ของ  $\beta$ -แคโรทีน และ แอสตาแซนทิน

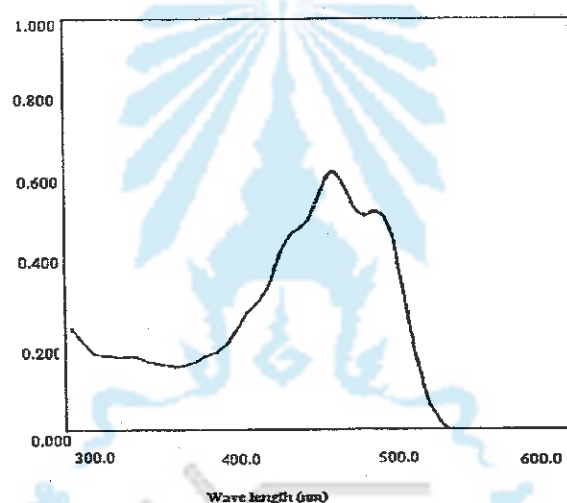


## บทที่ 4

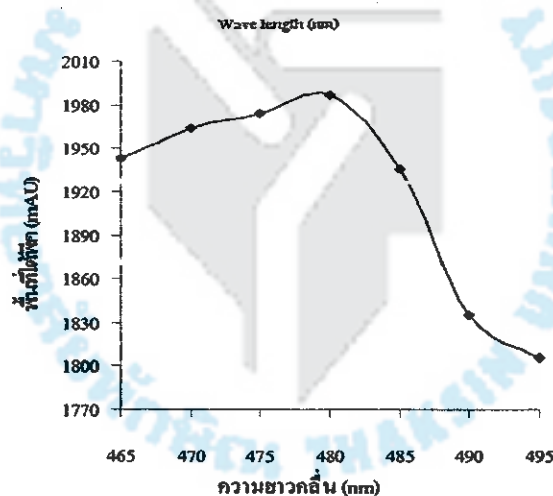
### ผลการวิจัย

#### 4.1 การศึกษาความยาวคลื่นที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์

จากการทดลองเมื่อนำสารละลายมาตรฐาน เบต้า-แคโรทีน 100 ppm และแอสตาแซนทิน 100 ppm ในตัวทำละลายเฮกเซน มาวัดความยาวคลื่นตั้งแต่ 300-600 นาโนเมตร และ 450-500 นาโนเมตร ตามลำดับ โดยเทคนิค UV-Vis spectrophotometry ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.1



(ก)



(ข)

รูปที่ 4.1 (ก) แสดงสเปกตรัมของเบต้า-แคโรทีน

(ข) แสดงสเปกตรัมของแอสตาแซนทิน (ระหว่างพื้นที่ที่ได้พิกัดกับความยาวคลื่น ตั้งแต่ 465-495 นาโนเมตร)

จากรูป 4.1 เมื่อสังเกตรูปร่างของสเปกตรัมที่ได้ พบว่า เบต้า-แคโรทีนสามารถดูดกลืนแสงสูงสุด ได้ตามความยาวคลื่น โดยดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 450.5 นาโนเมตร ส่วนแอสตาแซนทิน สามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุด ที่ความยาวคลื่น 473.5 นาโนเมตร ซึ่งลักษณะสเปกตรัมดังกล่าวเกิดจากการคอนจูเกตของพันธะคู่ภายในโมเลกุล และความยาวคลื่นสูงสุดที่สารดูดกลืนได้จะเลื่อนได้ หากเปลี่ยนตัวทำละลาย ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ข้อมูลการดูดกลืนแสงช่วงยูวี-วิสิเบิล ของสารประกอบแคโรทีนอยด์

| Carotenoid                            | Solvent                  | $\lambda$ max(nm) |     |     |
|---------------------------------------|--------------------------|-------------------|-----|-----|
| Antheraxanthin                        | Chloroform               | 430               | 456 | 484 |
|                                       | Ethanol                  | 422               | 444 | 472 |
|                                       | Hexane, petroleum ether  | 422               | 445 | 472 |
| Astaxanthin                           | Acetone                  |                   | 480 |     |
|                                       | Benzene, chloroform      |                   | 485 |     |
|                                       | Ethanol                  |                   | 478 |     |
|                                       | Petroleum ether          |                   | 468 |     |
| Auroxanthin                           | Acetone                  | 381               | 402 | 427 |
|                                       | Chloroform               | 385               | 413 | 438 |
|                                       | Ethanol, petroleum ether | 380               | 400 | 425 |
| Bixin                                 | Chloroform               | 433               | 470 | 502 |
|                                       | Ethanol                  | 429               | 457 | 484 |
|                                       | Petroleum ether          | 432               | 456 | 490 |
| Canthaxanthin                         | Chloroform               |                   | 482 |     |
|                                       | Ethanol                  |                   | 474 |     |
|                                       | Petroleum ether          |                   | 466 |     |
| Capsanthin                            | Ethanol                  |                   | 476 |     |
|                                       | Petroleum ether          | (450)             | 475 | 505 |
| Capsorubin                            | Petroleum ether          | (455)             | 479 | 510 |
| $\alpha$ -Carotene                    | Acetone                  | 424               | 448 | 476 |
|                                       | Chloroform               | 433               | 457 | 484 |
|                                       | Ethanol                  | 423               | 444 | 473 |
|                                       | Hexane, petroleum ether  | 422               | 445 | 473 |
| $\beta$ -Carotene                     | Acetone                  | (429)             | 452 | 478 |
|                                       | Chloroform               | (435)             | 461 | 485 |
|                                       | Ethanol                  | (425)             | 450 | 478 |
|                                       | Hexane, petroleum ether  | (425)             | 450 | 477 |
| $\beta$ -Carotene-5,6-epoxide         | Ethanol                  | 423               | 445 | 474 |
| $\beta$ -Carotene-5,8-epoxide         | Ethanol                  | 407               | 428 | 452 |
| $\beta$ -Carotene-5,6,5',6'-diepoxide | Ethanol                  | 417               | 440 | 468 |
| $\beta$ -Carotene-5,8,5',8'-diepoxide | Ethanol                  | 388               | 400 | 425 |
| $\delta$ -Carotene                    | Chloroform               | 440               | 470 | 503 |
|                                       | Petroleum ether          | 431               | 456 | 489 |
| $\gamma$ -Carotene                    | Acetone                  | 439               | 461 | 491 |
|                                       | Chloroform               | 446               | 475 | 509 |
|                                       | Ethanol                  | 440               | 460 | 489 |
|                                       | Hexane, petroleum ether  | 437               | 462 | 494 |
| $\zeta$ -Carotene                     | Ethanol                  | 377               | 399 | 425 |
|                                       | Hexane, petroleum ether  | 378               | 400 | 425 |
| Crocetin                              | Chloroform               | 413               | 435 | 462 |
|                                       | Ethanol                  | 401               | 423 | 447 |
|                                       | Petroleum ether          | ether             | 400 | 422 |
| $\alpha$ -Cryptoxanthin/Zeaxanthin    | Chloroform               | 435               | 459 | 487 |
|                                       | Ethanol                  | 423               | 446 | 473 |
|                                       | Hexane                   | 421               | 445 | 475 |
| $\beta$ -Cryptoxanthin                | Chloroform               | (435)             | 459 | 485 |
|                                       | Ethanol                  | (428)             | 450 | 478 |
|                                       | Petroleum ether          | (425)             | 449 | 476 |

ตารางที่ 4.1 ข้อมูลการดูดกลืนแสงช่วงยูวี-วิสิเบิล ของสารประกอบแคโรทีนอยด์(ต่อ)

| Carotenoid            | Solvent                          | $\lambda$ max(nm) |     |       |
|-----------------------|----------------------------------|-------------------|-----|-------|
| Echinenone            | Acetone                          |                   |     | 460   |
|                       | Chloroform                       | 471               |     |       |
|                       | Ethanol                          | 461               | 0   |       |
|                       | Petroleum                        | ether             | 458 | (482) |
| Lutein                | Chloroform                       | 435               | 458 | 485   |
|                       | Ethanol                          | 422               | 445 | 474   |
|                       | Petroleum ether                  | 421               | 445 | 474   |
| Lutein-5,6-epoxide    | Chloroform                       | 433               | 453 | 483   |
|                       | Ethanol                          | 420               | 441 | 470   |
|                       | Hexane, petroleum ether          | 420               | 440 | 470   |
| Lycopene              | Acetone                          | 448               | 474 | 505   |
|                       | Chloroform                       | 458               | 484 | 518   |
|                       | Ethanol                          | 446               | 472 | 503   |
|                       | Petroleum ether                  | 444               | 470 | 502   |
| Mutatoxanthin         | Chloroform                       | 437               | 468 |       |
|                       | Ethanol                          | 409               | 427 | 457   |
|                       | Petroleum ether                  | 407               | 426 | 456   |
| Neoxanthin            | Acetone                          | 416               | 440 | 470   |
|                       | Chloroform                       | 423               | 448 | 476   |
|                       | Ethanol                          | 415               | 439 | 467   |
|                       | Petroleum ether                  | 416               | 438 | 467   |
| Neurosporene          | Chloroform                       | 424               | 451 | 480   |
|                       | Ethanol, hexane                  | 416               | 440 | 470   |
|                       | Petroleum ether                  | 414               | 439 | 467   |
| Phytoene              | Hexane, petroleum ether          | (276)             | 286 | (297) |
| Phytofluene           | Hexane, petroleum ether          | 331               | 348 | 367   |
| Rubixanthin           | Chloroform                       | 439               | 474 | 509   |
|                       | Ethanol                          | 433               | 463 | 496   |
|                       | Petroleum ether                  | 434               | 460 | 490   |
| Violaxanthin          | Chloroform                       | 426               | 449 | 478   |
|                       | Ethanol                          | 419               | 440 | 470   |
|                       | Petroleum ether                  | 416               | 440 | 465   |
| $\alpha$ -Zeacarotene | Hexane                           | 398               | 421 | 449   |
| $\beta$ -Zeacarotene  | Ethanol, hexane, petroleum ether | 406               | 428 | 454   |
| Zeaxanthin            | Acetone                          | (430)             | 452 | 479   |
|                       | Chloroform                       | (433)             | 462 | 493   |
|                       | Ethanol                          | (428)             | 450 | 478   |
|                       | Petroleum ether                  | (424)             | 449 | 476   |

ที่มา : Britton(1995) and Davies(1976).

## 4.2 ศึกษาการหาปริมาณเบต้า-แคโรทีน และแอสตาแซนทิน

โดยเทคนิค High-performance liquid chromatography

### 4.2.1 การศึกษาองค์ประกอบที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่

#### 1. ศึกษาชนิดและอัตราส่วนขององค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่

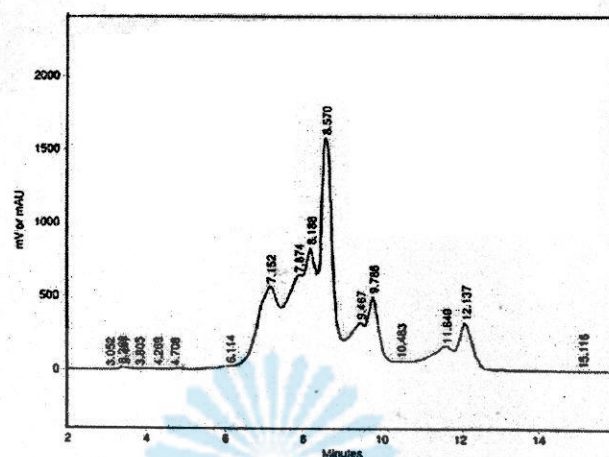
จากการทดลองพบว่าเมื่อใช้ acetonitrile-dichloromethane-methanol อัตราส่วน 71:7:22 และ acetone-methanol-H<sub>2</sub>O อัตราส่วน 50:45:5 เป็นเฟสเคลื่อนที่ ได้ผลการวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพต่ำ ดังรูปที่ 4.2 และรูปที่ 4.3 ตามลำดับ แต่เมื่อใช้ hexane-acetone อัตราส่วน 70:30 ได้ผลการวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด ดังรูปที่ 4.4

นำ hexane-acetone ซึ่งเป็นเฟสเคลื่อนที่ที่สามารถวิเคราะห์แอสตาแซนทินได้อย่างมีประสิทธิภาพ มาศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมโดยใช้ hexane-acetone อัตราส่วน 90:10, 80:20, 70:30 และ 60:40 ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.5 จากผลการทดลองพบว่าเมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น hexane-acetone อัตราส่วน 70:30 จะให้ค่าจำนวนเพลตสูงที่สุดในขณะที่อัตราส่วน 90:10, 80:20 และ 60:40 ได้ผลการวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพต่ำ และไม่เกิดการแยกของพีคที่ชัดเจน ดังนั้นจึงเลือก hexane-acetone อัตราส่วน 70:30 เป็นเฟสเคลื่อนที่ในการศึกษา

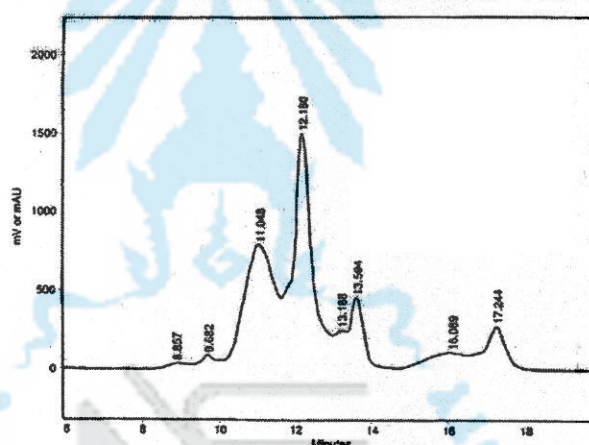
ตารางที่ 4.2 แสดงความสัมพันธ์อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่กับค่า Capacity factor (k') และจำนวน Theoretical plates (N) โดยมีสภาวะการทดลองคือ C<sub>30</sub> Column, เฟสเคลื่อนที่คือ hexane-acetone, Flow rate 1.0 ml/min, ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร

| เฟสเคลื่อนที่  | อัตราส่วน | N                   | k'    |
|----------------|-----------|---------------------|-------|
| hexane:acetone | 90:10     | ไม่เกิดการแยกของพีค |       |
| hexane:acetone | 80:20     | 508.674             | 0.116 |
| hexane:acetone | 70:30     | 2231.300            | 0.136 |
| hexane:acetone | 60:40     | ไม่เกิดการแยกของพีค |       |

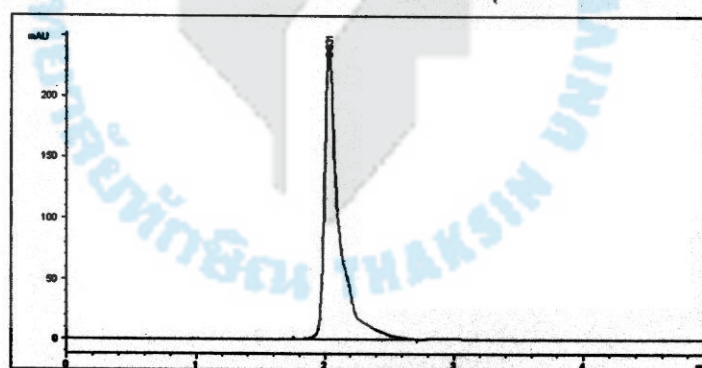




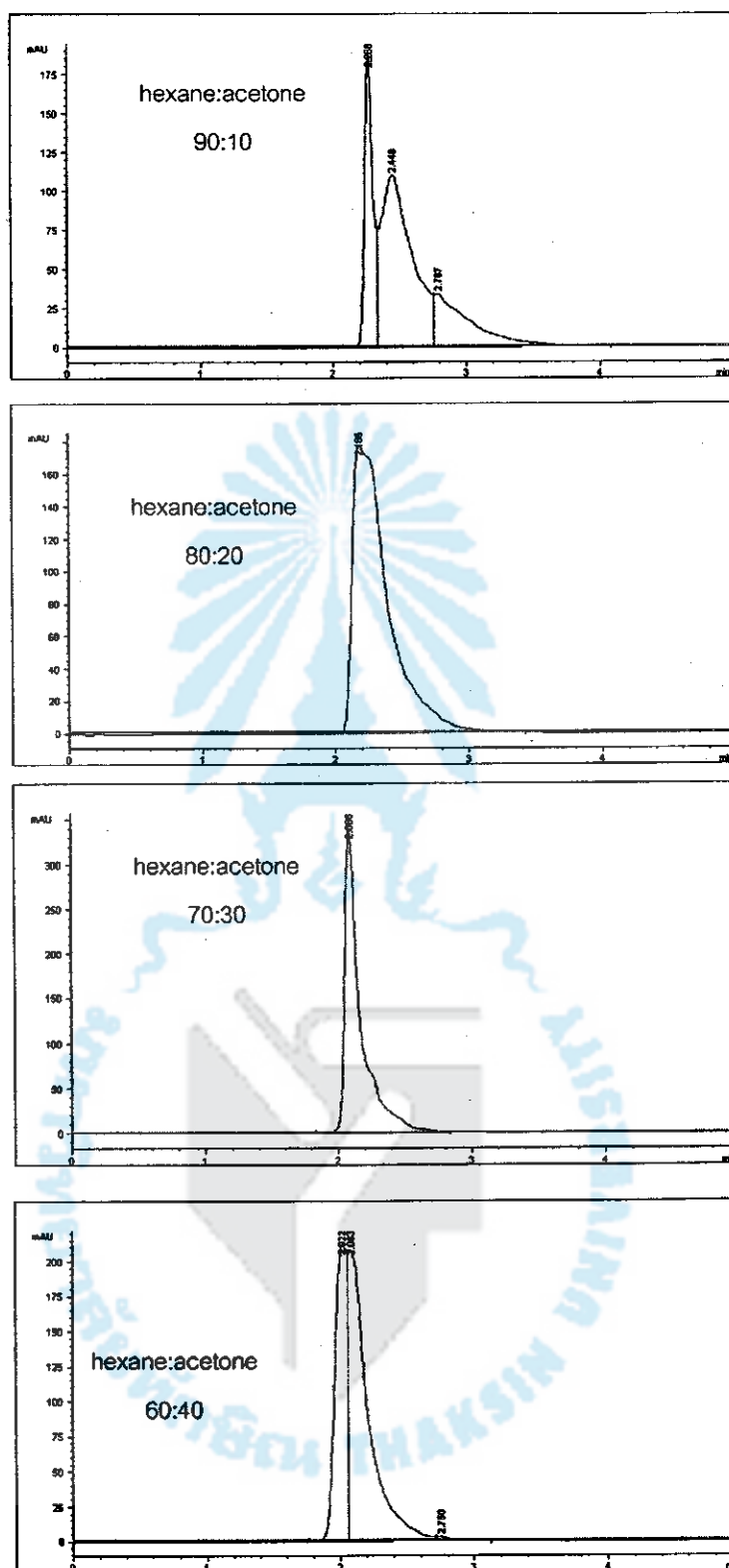
รูปที่ 4.2 แสดงโครมาโทแกรมของแอสตาแซนทิน โดยมีสภาวะของการทดลองคือ  $C_{30}$  Column, acetonitrile: dichloromethane: methanol อัตราส่วน 71:7:22 Flow rate 1.0 ml/min



รูปที่ 4.3 แสดงโครมาโทแกรมของแอสตาแซนทิน โดยมีสภาวะของการทดลองคือ  $C_{30}$  Column, acetone: methanol :น้ำ อัตราส่วน 50:45:5 Flow rate 1.0 ml/min



รูปที่ 4.4 แสดงโครมาโทแกรมของแอสตาแซนทิน โดยมีสภาวะของการทดลองคือ  $C_{30}$  Column, hexane:acetone อัตราส่วน 70:30 Flow rate 1.0 ml/min



รูปที่ 4.5 แสดงผลของอัตราส่วนเฟสเคลื่อนที่ระหว่าง hexane:acetone ที่มีต่อโครมาโทแกรมของ แอสตาแซนทิน โดยมีสภาวะของการทดลองคือ C<sub>30</sub> Column Flow rate 1.0 ml/min

## 2. การศึกษาอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่

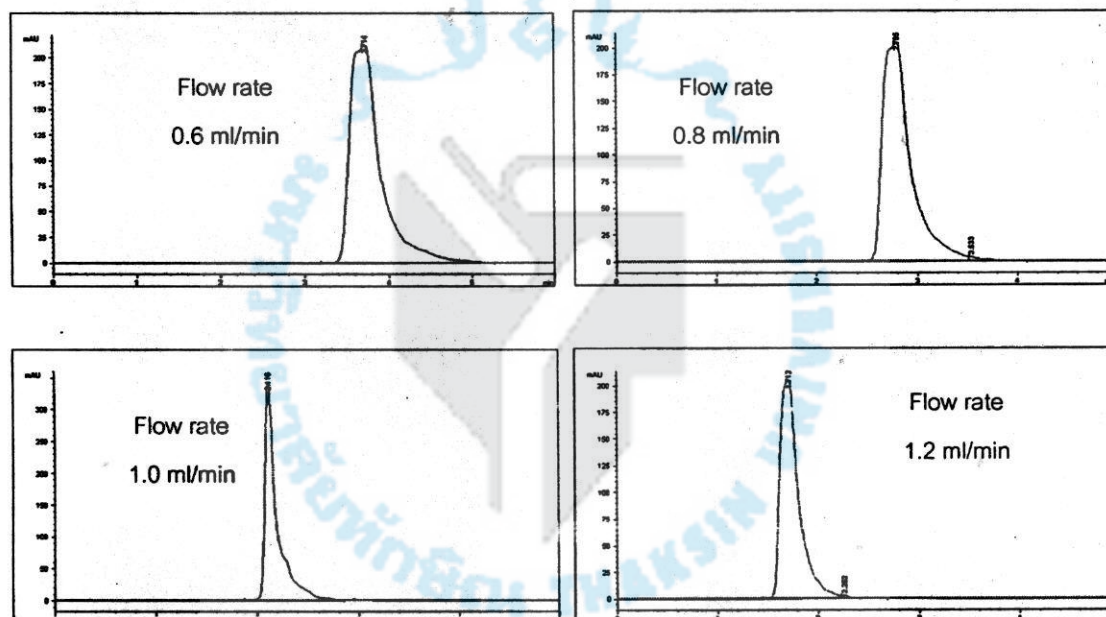
จากการทดลองเมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น hexane-acetone อัตราส่วน 70:30 มาทำการศึกษอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ โดยใช้อัตราการไหล 0.6, 0.8, 1.0 และ 1.2 ml/min ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.6 และข้อมูลดังตารางที่ 4.3 จากตารางพบว่าเมื่อใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.0 ml/min จะให้ค่า HETP ต่ำที่สุด คือ 0.013 ดังนั้นจึงเลือกอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.0 ml/min ในการศึกษาสารแอสตาแซนทินจากสารสกัด

ตารางที่ 4.3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่กับค่า Capacity factor ( $k'$ ),

HETP และจำนวน Theoretical plates ( $N$ ) โดยมีสภาวะการทดลองคือ  $C_{30}$  Column,

hexane - acetone อัตราส่วน 70:30 ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร

| อัตราการไหล ml/min | N        | HETP  | $k'$  |
|--------------------|----------|-------|-------|
| 0.6                | 760.160  | 0.040 | 0.151 |
| 0.8                | 738.275  | 0.040 | 0.146 |
| 1.0                | 2231.300 | 0.013 | 0.136 |
| 1.2                | 569.789  | 0.051 | 0.168 |



รูปที่ 4.6 แสดงผลของ flow rate ที่มีต่อโครมาโทแกรมของแอสตาแซนทิน โดยมีสภาวะของการทดลองคือ  $C_{30}$  Column, hexane:acetone อัตราส่วน 70:30

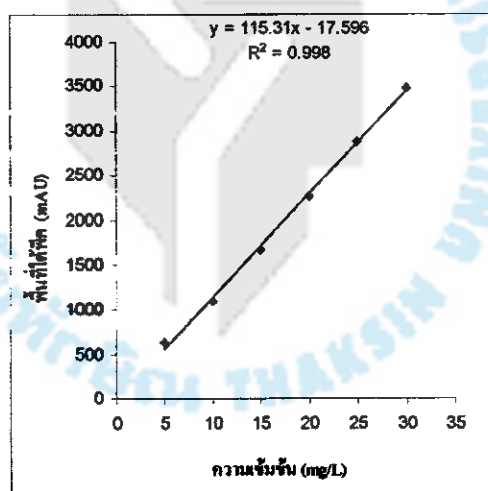
#### 4.2.2 การหาปริมาณแอสตาแซนทิน โดยวิธีการสร้างกราฟมาตรฐาน

เมื่อนำสารละลายมาตรฐานแอสตาแซนทิน ที่ความเข้มข้น 5, 10, 15, 20, 25, 30 mg/L ฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยมีสภาวะการทดลองคือ  $C_{30}$  Column, Flow rate 1.0 ml/min, hexane - acetone อัตราส่วน 70:30 และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.4 และนำมาสร้างกราฟมาตรฐาน โดยการแทนพื้นที่ใต้พีคด้วยแกน Y และแทนค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานแอสตาแซนทินด้วยแกน X ดังรูปที่ 4.7

จากรูปจะเห็นว่ากราฟที่ได้มีลักษณะเป็นเส้นตรง  $y = 115.31x - 17.596$  โดยมีค่า  $R^2 = 0.998$  ซึ่งกราฟมาตรฐานนี้จะสามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณแอสตาแซนทินจากพืชตัวอย่าง

ตารางที่ 4.4 แสดงพื้นที่ใต้พีคของแอสตาแซนทิน ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10, 15, 20, 25, 30 mg/L โดยมีสภาวะการทดลองคือ  $C_{30}$  Column, Flow rate 1.0 ml/min, hexane - acetone อัตราส่วน 70:30 ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร

| ความเข้มข้น (mg/L) | พื้นที่ใต้พีค (mAU) |
|--------------------|---------------------|
| 5                  | 631.36              |
| 10                 | 1088.12             |
| 15                 | 1662.190            |
| 20                 | 2109.050            |
| 25                 | 2882.880            |
| 30                 | 3469.110            |



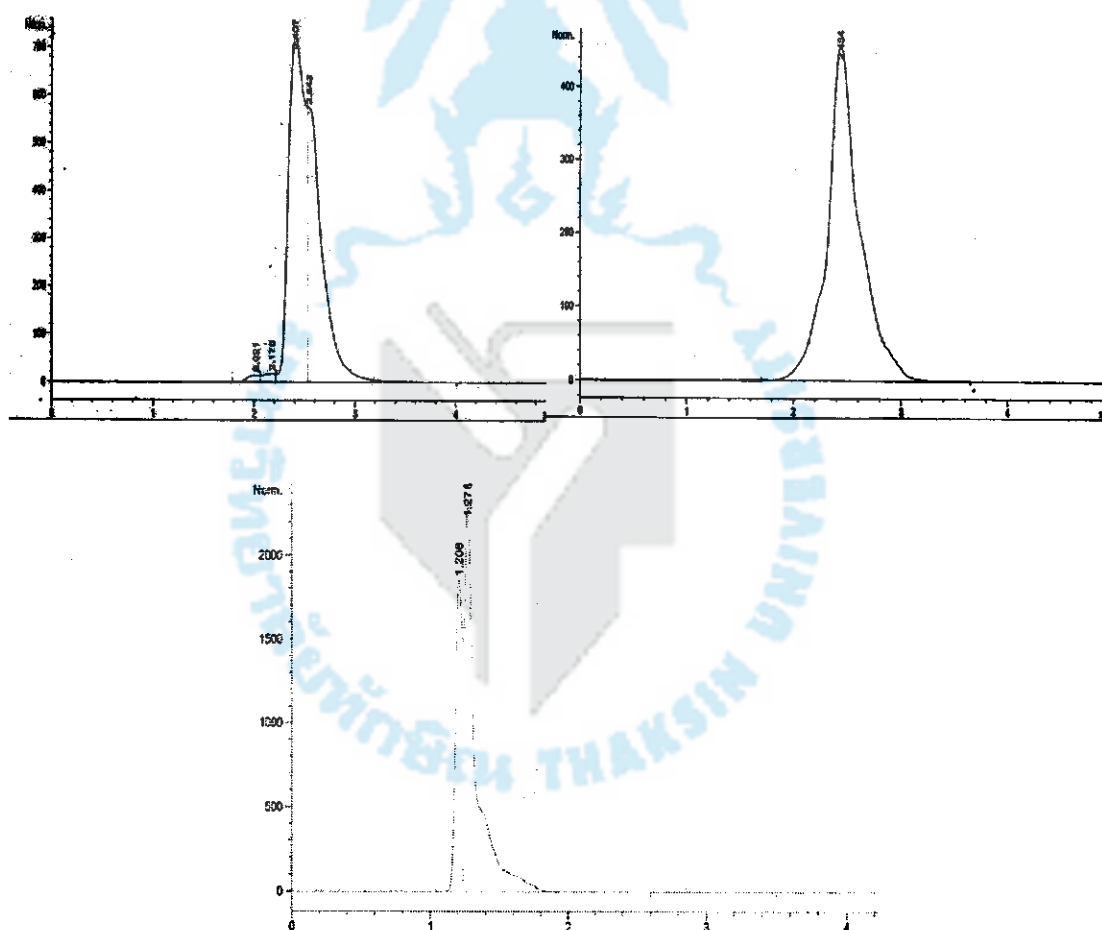
รูปที่ 4.7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้พีคของแอสตาแซนทินที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

สภาวะการทดลองคือ  $C_{30}$  Column, Flow rate 1.0 ml/min, hexane - acetone(70:30) ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร



#### 4.2.3 การหาปริมาณเบต้า-แคโรทีน และแอสตาแซนทิน

ในการทดลองได้ทำการศึกษาการหาปริมาณเบต้า-แคโรทีน และแอสตาแซนทินในเวลาเดียวกัน โดยใช้เทคนิค HPLC แต่พบว่ามีปัญหาและข้อจำกัดทางเครื่องมือหลายประการได้แก่ (1) การเสื่อมคุณภาพของคอลัมน์ที่ใช้วิเคราะห์ เนื่องจากมีข้อจำกัดด้านงบประมาณ ต้องใช้คอลัมน์ร่วมกับงานวิจัยอื่นๆ ซึ่งเมื่อต้องศึกษาการแยกเพื่อหาปริมาณเบต้า-แคโรทีน และแอสตาแซนทิน ประสิทธิภาพของคอลัมน์เกิดการเปลี่ยนแปลงจากสภาวะที่เคยแยกได้ (2) เครื่อง HPLC ที่ใช้ในงานวิจัยไม่สามารถทำการวิเคราะห์ในระบบเกรเดียนต์ (gradient elution) จึงไม่สามารถปรับปรุงการแยกให้ดีขึ้น และ (3) ไม่มีอุปกรณ์ควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์ในการแยกสาร ซึ่งทำให้ไม่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการแยกพีคของเบต้า-แคโรทีนและแอสตาแซนทิน ที่มีคุณสมบัติและโครงสร้างโมเลกุลใกล้เคียงกันมากออกจากกันได้ ส่งผลทำให้ในการทดลองไม่สามารถหาปริมาณเบต้า-แคโรทีน และแอสตาแซนทินในเวลาเดียวกันได้ ดังรูปที่ 4.8



รูปที่ 4.8 แสดงตัวอย่างโครมาโทแกรมในสภาวะการทดลองต่างๆของการหาปริมาณเบต้า-แคโรทีน และแอสตาแซนทินในเวลาเดียวกัน

### 4.3 ศึกษาการหาปริมาณเบต้า-แคโรทีน และแอสตาแซนทิน โดยใช้เทคนิค UV-Vis spectrophotometry ด้วยวิธีการสร้างกราฟมาตรฐานแบบสารผสม 2 ชนิด

นำสารละลายมาตรฐานเบต้า-แคโรทีน ที่ความเข้มข้น 3, 6, 9, 12 ppm และสารละลายมาตรฐานแอสตาแซนทิน ที่ความเข้มข้น 2, 4, 6, 8, 10 ppm วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 473.5 และ 450.5 นาโนเมตร ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.5 และ 4.6 ตามลำดับ แล้วนำมาสร้างกราฟมาตรฐาน ดังรูปที่ 4.9 และ 4.10 ตามลำดับ

จากรูปที่ 4.9 พบว่ากราฟมาตรฐานของเบต้า-แคโรทีน ที่ความยาวคลื่น 450.5 นาโนเมตร มีลักษณะเป็นเส้นตรงตามสมการ  $y = 0.1605x$  โดยมีค่า  $R^2 = 0.9997$  และที่ความยาวคลื่น 473.5 นาโนเมตร มีลักษณะเป็นเส้นตรงตามสมการ  $y = 0.1387x$  โดยมีค่า  $R^2 = 0.9996$

จากรูปที่ 4.10 พบว่ากราฟมาตรฐานของ แอสตาแซนทิน ที่ความยาวคลื่น 450.5 นาโนเมตร มีลักษณะเป็นเส้นตรงตามสมการ  $y = 0.1365x$  โดยมีค่า  $R^2 = 0.9843$  และที่ความยาวคลื่น 473.5 นาโนเมตร มีลักษณะเป็นเส้นตรงตามสมการ  $y = 0.1550x$  โดยมีค่า  $R^2 = 0.9945$

จากข้อมูลสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน สามารถใช้ความชันของกราฟแทนค่าคงที่ของการดูดกลืนตามสมการดังนี้

ที่ความยาวคลื่น 450.5 nm 
$$A_{\text{total}, \lambda_1} = k_{11}C_1 + k_{12}C_2 \quad (1)$$

ค่าคงที่การดูดกลืนแสง  $k_{11}$  ของเบต้า-แคโรทีน มีค่าเท่ากับ 0.1605 และ

ค่าคงที่การดูดกลืนแสง  $k_{12}$  ของแอสตาแซนทินมีค่าเท่ากับ 0.1365

ดังนั้น จะได้สมการที่(2)

$$A_{\text{total}, 450.5} = 0.1605C_1 + 0.1365C_2 \quad (2)$$

ที่ความยาวคลื่น 473.5 nm 
$$A_{\text{total}, \lambda_2} = k_{21}C_1 + k_{22}C_2 \quad (3)$$

ค่าคงที่การดูดกลืนแสง  $k_{21}$  ของเบต้า-แคโรทีน มีค่าเท่ากับ 0.1387 และ

ค่าคงที่การดูดกลืนแสง  $k_{12}$  ของแอสตาแซนทินมีค่าเท่ากับ 0.1550

ดังนั้น จะได้สมการที่(4)

$$A_{\text{total}, 473.5} = 0.1387C_1 + 0.1550C_2 \quad (4)$$

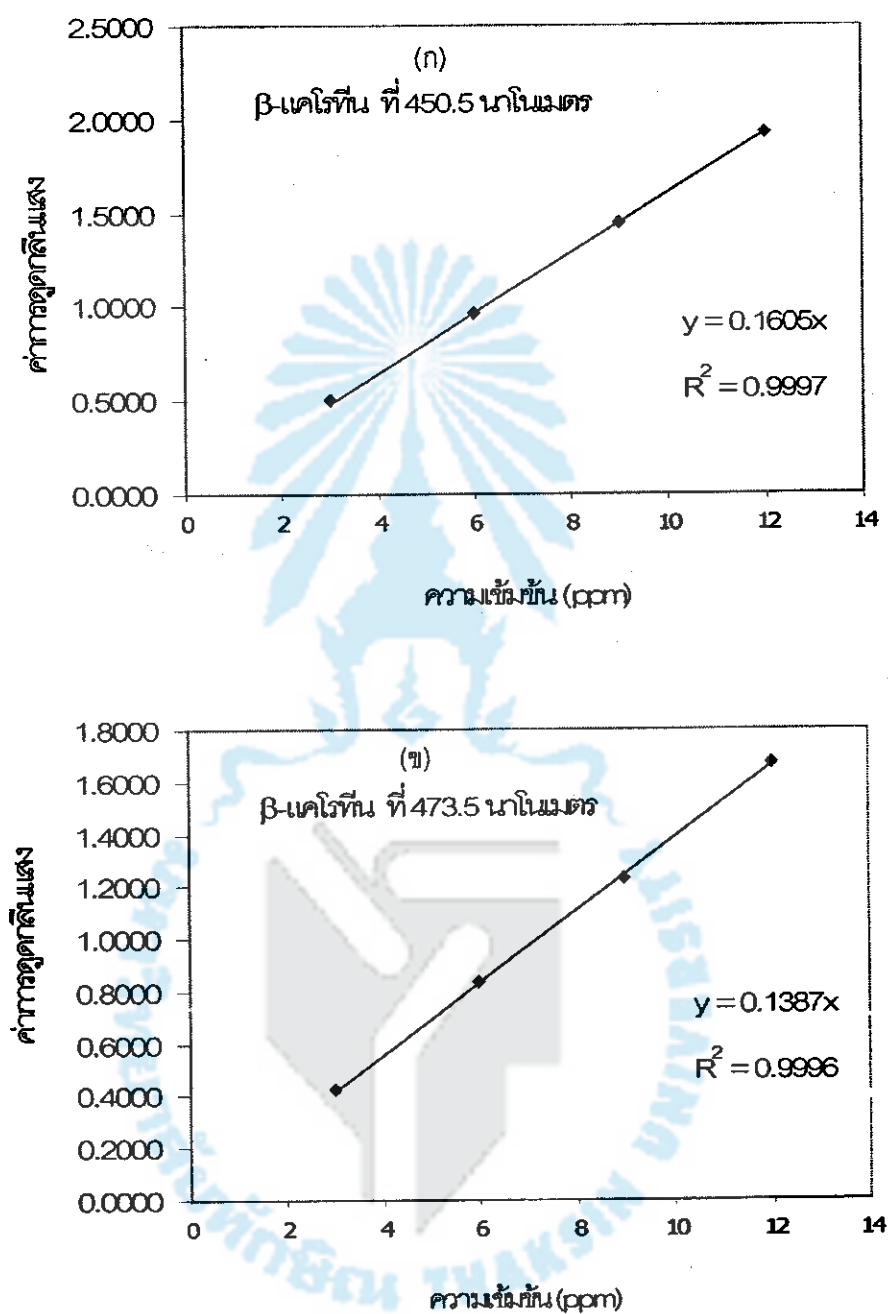
จากนั้นเมื่อต้องการหาปริมาณผลระหว่างเบต้า-แคโรทีน และแอสตาแซนทิน ในตัวอย่างชนิดต่างๆ สามารถทำได้โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของเบต้า-แคโรทีน และแอสตาแซนทิน ที่ความยาวคลื่น 473.5 และ 450.5 นาโนเมตร แล้วนำมาแทนค่าลงในสมการที่ (2) และ (4) และแก้สมการหาค่า  $C_1$  (เบต้า-แคโรทีน) และ  $C_2$  (แอสตาแซนทิน) ตามลำดับ

ตารางที่ 4.5 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของเบต้า-แคโรทีน ที่ความยาวคลื่น 473.5 และ 450.5 นาโนเมตร

| ความเข้มข้นเบต้า-แคโรทีน<br>(ppm) | ค่าการดูดกลืนแสง |            |            |               |                |            |            |               |
|-----------------------------------|------------------|------------|------------|---------------|----------------|------------|------------|---------------|
|                                   | 473.5 นาโนเมตร   |            |            |               | 450.5 นาโนเมตร |            |            |               |
|                                   | ครั้งที่ 1       | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย        | ครั้งที่ 1     | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย        |
| 3                                 | 0.4230           | 0.4279     | 0.4297     | 0.4269±0.0035 | 0.4966         | 0.4978     | 0.5002     | 0.4982±0.0018 |
| 6                                 | 0.8344           | 0.8351     | 0.8373     | 0.8356±0.0015 | 0.9583         | 0.9625     | 0.9661     | 0.9623±0.0039 |
| 9                                 | 1.2274           | 1.2363     | 1.2383     | 1.2340±0.0058 | 1.4412         | 1.4426     | 1.4470     | 1.4436±0.0030 |
| 12                                | 1.6680           | 1.6704     | 1.6730     | 1.6705±0.0025 | 1.9131         | 1.9265     | 1.9310     | 1.9235±0.0093 |

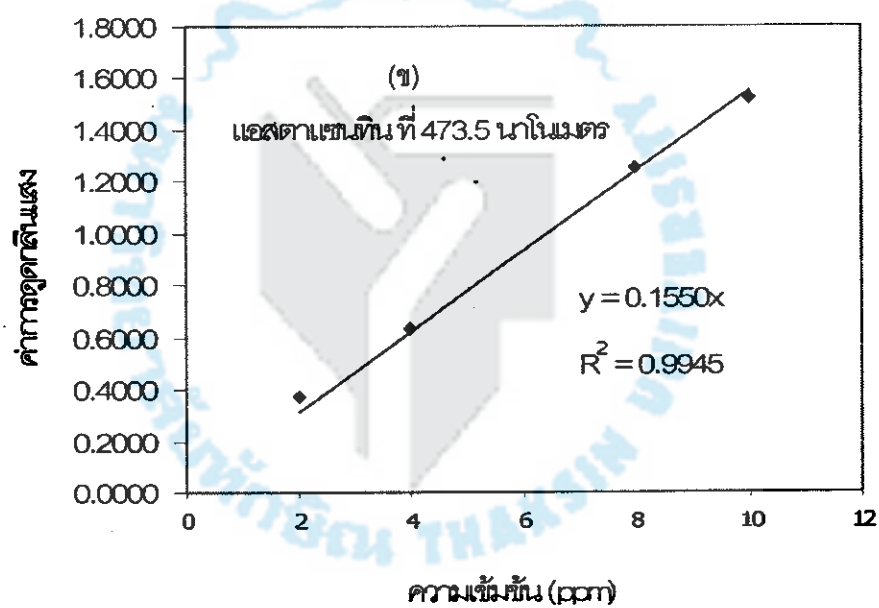
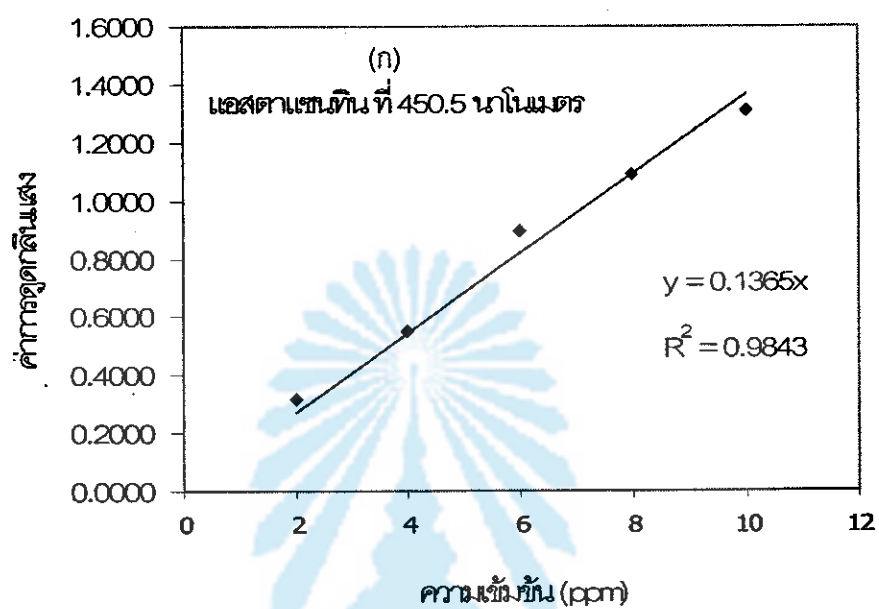
ตารางที่ 4.6 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของแอสตาแซนทีน ที่ความยาวคลื่น 473.5 และ 450.5 นาโนเมตร

| ความเข้มข้นแอสตาแซนทีน<br>(ppm) | ค่าการดูดกลืนแสง |            |            |               |                |            |            |               |
|---------------------------------|------------------|------------|------------|---------------|----------------|------------|------------|---------------|
|                                 | 473.5 นาโนเมตร   |            |            |               | 450.5 นาโนเมตร |            |            |               |
|                                 | ครั้งที่ 1       | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย        | ครั้งที่ 1     | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย        |
| 2                               | 0.3690           | 0.3704     | 0.3710     | 0.3701±0.0010 | 0.3171         | 0.3168     | 0.3173     | 0.3171±0.0003 |
| 4                               | 0.6322           | 0.6370     | 0.6398     | 0.6363±0.0038 | 0.5499         | 0.5526     | 0.5533     | 0.5519±0.0018 |
| 6                               | 1.0502           | 1.0560     | 1.0574     | 1.0545±0.0038 | 0.8867         | 0.8911     | 0.8948     | 0.8909±0.0041 |
| 8                               | 1.2456           | 1.2493     | 1.2550     | 1.2500±0.0047 | 1.0896         | 1.0916     | 1.0929     | 1.0914±0.0017 |
| 10                              | 1.5189           | 1.5240     | 1.5289     | 1.5239±0.0050 | 1.3079         | 1.3110     | 1.3132     | 1.3107±0.0027 |



รูปที่ 4.9 แสดงกราฟมาตรฐานของเบต้า-แคโรทีน ช่วงความเข้มข้น 3 – 10 ppm  
(ก) ที่ความยาวคลื่น 450.5 นาโนเมตร (ข) ที่ความยาวคลื่น 473.5 นาโนเมตร





รูปที่ 4.10 แสดงกราฟมาตรฐานของแอสดาแซนติน ช่วงความเข้มข้น 2 – 10 ppm  
 (ก) ที่ความยาวคลื่น 450.5 นาโนเมตร (ข) ที่ความยาวคลื่น 473.5 นาโนเมตร

#### 4.4 ศึกษาวิธีการเตรียมตัวอย่างและชนิดของสารสกัด

การศึกษาวิธีการเตรียมตัวอย่างและชนิดของตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับใช้สกัดสารตัวอย่างในที่นี้ จะทำการทดลองโดยใช้แคโรทเป็นตัวอย่างศึกษา และนำมาหาปริมาณแอสตาแซนทิน เพื่อเปรียบเทียบผลการทดลอง โดยใช้เทคนิค HPLC มีสภาวะการทดลองคือ C<sub>30</sub> Column, Flow rate 1.0 ml/min, hexane - acetone อัตราส่วน 70:30 ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร และหาปริมาณโดยใช้กราฟมาตรฐานดังรูปที่ 4.11

##### 4.4.1 วิธีการเตรียมตัวอย่าง

การเตรียมตัวอย่างเพื่อหาปริมาณสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์มีความสำคัญต่อความถูกต้องของผลการทดลอง เนื่องจากสารในกลุ่มนี้เกิดการสลายตัวได้ง่ายเมื่อโดนแสง หรือความร้อน โดยในการทดลองใช้แคโรท เป็นตัวอย่างมาทดสอบวิธีการเตรียมที่แตกต่างกัน 3 แบบ ได้แก่ (1) การอบแห้ง (2) การฟริชดรายด์ และ (3) การใช้ตัวอย่างสด

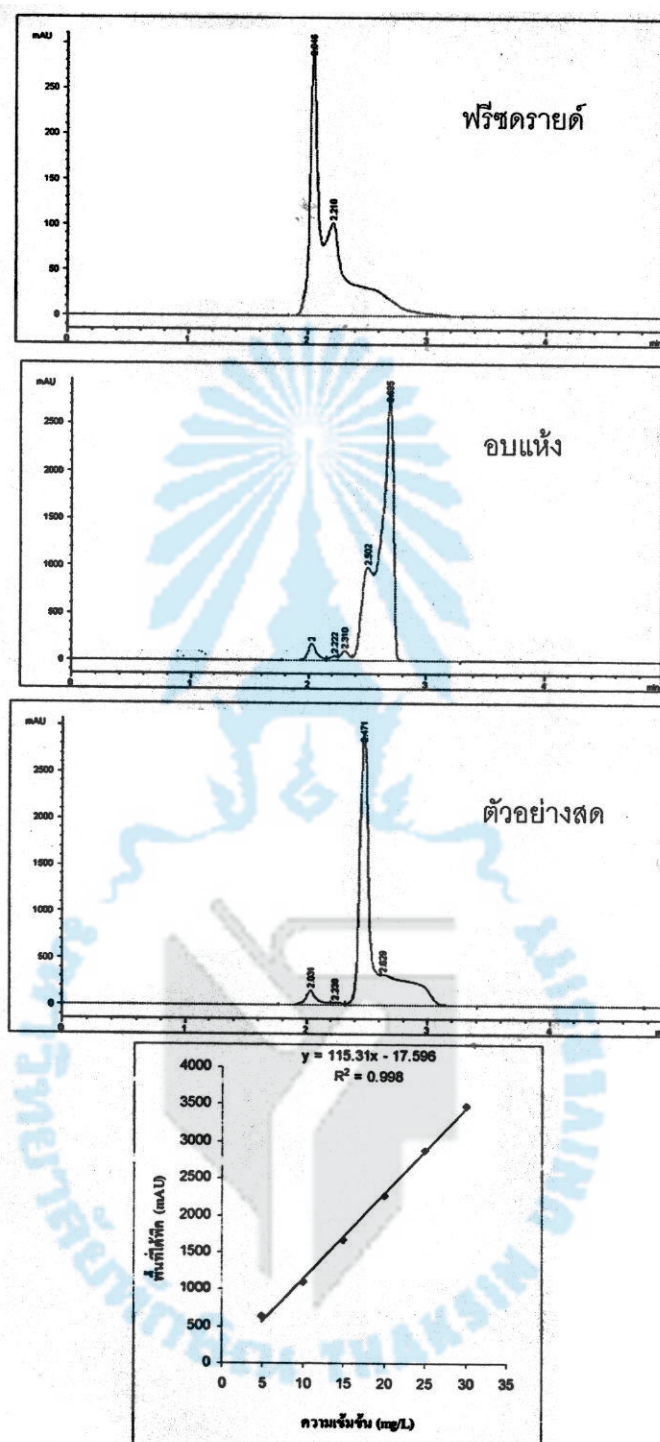
การเตรียมตัวอย่างทั้ง 3 แบบ จะนำตัวอย่างมาบดให้ละเอียดก่อน โดยการอบแห้ง จะอบสารที่อุณหภูมิ 40°C จนมีความชื้นเหลือน้อยกว่า 10% แล้วนำไปบดให้ละเอียด วิธีฟริชดรายด์ จะทำสารให้แห้งโดยใช้ freeze-dryer -53 °C จนมีความชื้นเหลือน้อยกว่า 10% บดให้ละเอียด และแบบสดจะใช้ตัวอย่างสดมาบดละเอียดแล้วนำไปสกัดทันที โดยใช้ hexane-acetone-ethanol อัตราส่วน 2:1:1 เป็นสารละลายสกัด

จากการทดลองได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.7 ซึ่งพบว่า การเตรียมตัวอย่างจากตัวอย่างสด จะสามารถสกัดแอสตาแซนทิน ออกมาจากแคโรทได้มากที่สุด รองลงมาคือการอบแห้ง ตามลำดับ ส่วนวิธีฟริชดรายด์ไม่สามารถหาปริมาณได้ เนื่องจากโครมาโทแกรมที่ได้จากผลการทดลองพีคของแอสตาแซนทินไม่เกิดการแยก

ตารางที่ 4.7 แสดงวิธีสกัดที่เหมาะสมโดยใช้ hexane-acetone-ethanol อัตราส่วน 2 : 1 : 1 เป็น

ตัวสกัด โดยมีสภาวะการทดลองคือ C<sub>30</sub> Column, Flow rate 1.0 ml/min, hexane - acetone อัตราส่วน 70:30 ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร

| การเตรียมตัวอย่าง   | พื้นที่ใต้พีค (mAU)                              |            |            |                 | ปริมาณแอสตาแซนทิน (µg/g) |
|---------------------|--------------------------------------------------|------------|------------|-----------------|--------------------------|
|                     | ครั้งที่ 1                                       | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย          |                          |
| ตัวอย่างสด          | 1045.603                                         | 1051.180   | 1008.560   | 1035.114±23.165 | 9.129±0.201              |
| ตัวอย่างอบ          | 950.387                                          | 944.177    | 945.373    | 946.660±3.295   | 8.362±0.181              |
| ตัวอย่างฟริช-ดรายด์ | ไม่สามารถหาปริมาณได้เนื่องจากไม่เกิดการแยกของพีค |            |            |                 |                          |



รูปที่ 4.11 แสดงโครมาโทแกรมของสารสกัดจากแครอท โดยวิธีการเตรียมแบบต่างๆ

สภาวะของการทดลอง : C<sub>30</sub>Column, hexane:acetone(70:30), Flow rate 1.0 ml/min  
และกราฟมาตรฐานการหาปริมาณแอสตาแซนทิน

#### 4.4.2 การศึกษาชนิดของตัวทำละลายที่ใช้สกัดสารตัวอย่าง

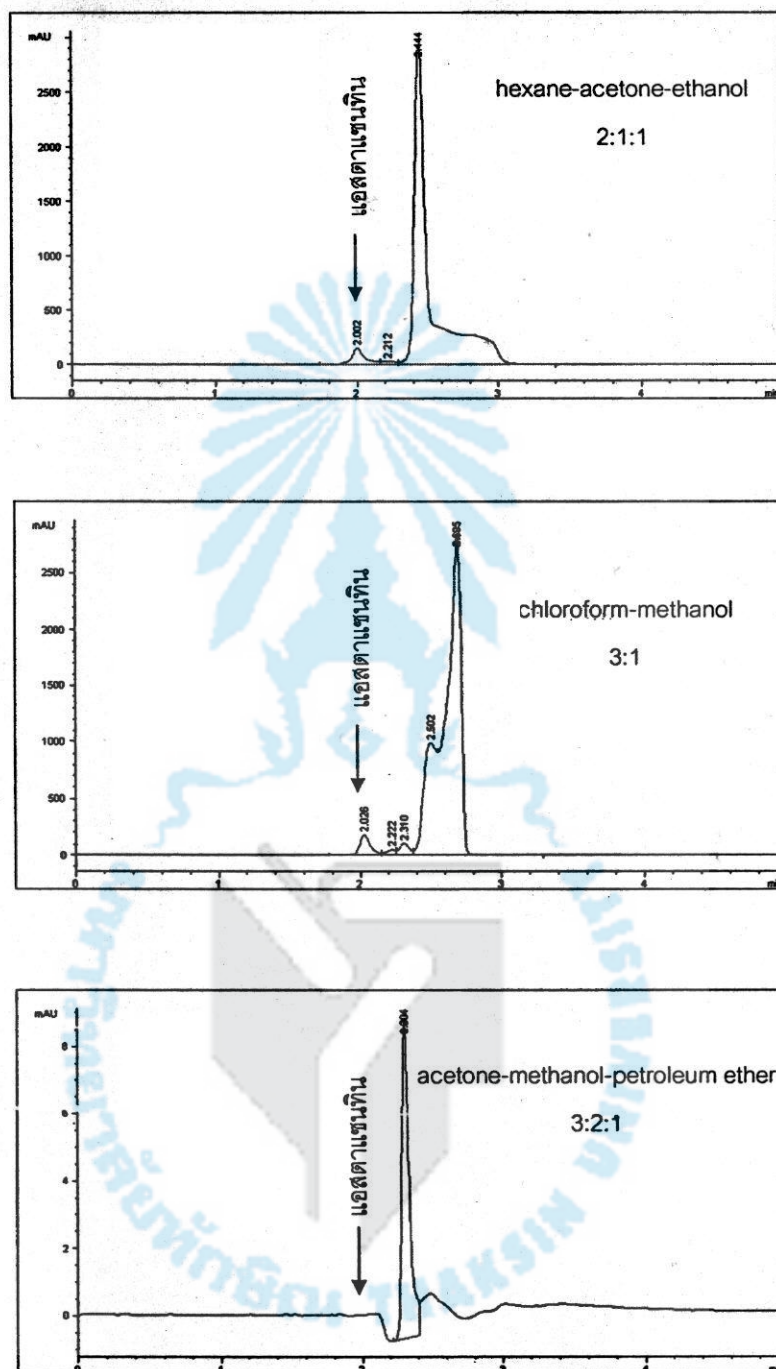
การศึกษาชนิดของตัวทำละลายที่ใช้สกัดสารตัวอย่าง จะเลือกชนิดของตัวทำละลายจากงานวิจัยที่มีผู้เคยทำการทดลองมาแล้ว โดยในการทดลองครั้งนี้ได้เลือกตัวทำละลายมา 3 ชนิดเพื่อนำมาทดสอบการสกัด ดังนี้ (1) hexane-acetone-ethanol ในอัตราส่วน 2:1:1 (2) chloroform-methanol ในอัตราส่วน 3:1 (3) acetone-methanol-petroleum ether ในอัตราส่วน 3:2:1

จากการทดลองนำตัวอย่างแครอทสดมาบดให้ละเอียดแล้ว นำไปสกัดโดยใช้สารสกัดชนิดต่างๆ แล้วนำสารสกัดไปหาปริมาณแอสตาแซนทินเพื่อเปรียบเทียบผลการทดลอง โดยใช้เทคนิค HPLC พบว่าเมื่อใช้ hexane-acetone-ethanol อัตราส่วน 2:1:1 เป็นตัวทำละลายที่ใช้สกัด จะสามารถสกัดแอสตาแซนทินออกมาจากแครอทสดได้มากที่สุด ดังตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 แสดงการหาชนิดของตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับใช้สกัด ใช้ตัวอย่างเป็นแครอทสด โดยมีสภาวะการทดลองคือ C<sub>30</sub> Column, Flow rate 1.0 ml/min, hexane – acetone อัตราส่วน 70:30 ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร

| สารที่ใช้สกัด                                    | พื้นที่ใต้พีค (mAU)  |            |            |                 | ปริมาณ<br>แอสตาแซนทิน<br>(µg/g) |
|--------------------------------------------------|----------------------|------------|------------|-----------------|---------------------------------|
|                                                  | ครั้งที่ 1           | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย          |                                 |
| hexane-acetone-ethanol<br>(2 : 1 : 1)            | 1045.603             | 1051.180   | 1008.560   | 1035.114±23.165 | 9.129±0.201                     |
| chloroform-methanol<br>(3:1)                     | 230.406              | 288.386    | 263.460    | 260.750±29.085  | 2.414±0.405                     |
| acetone-methanol-<br>petroleum ether (3 : 2 : 1) | ไม่สามารถหาปริมาณได้ |            |            |                 |                                 |





รูปที่ 4.12 แสดงโครมาโทแกรมของสารสกัดจากแครอทเมื่อใช้ตัวทำละลายสกัดชนิดต่างๆ ในการสกัด  
สภาวะของการทดลองคือ  $C_{30}$  Column, hexane:acetone (70:30) Flow rate 1.0 ml/min

#### 4.5 การหาปริมาณเบต้า-แคโรทีน และแอสตาแซนทิน ในตัวอย่าง

นำตัวอย่างชนิดต่างๆ ได้แก่ เปลือกข้าวโพด สาหร่ายผมนาง ดอกเข็ม ดอกดาวเรือง แครอท ดอกเฟื่องฟ้า และเปลือกเงาะ มาสับและบดให้ละเอียด แล้วนำไปสกัดด้วยสารละลายผสม hexane-acetone-ethanol อัตราส่วน 2:1:1 และนำไปหาปริมาณเบต้า-แคโรทีน และแอสตาแซนทิน ด้วยเทคนิค UV-Vis spectrophotometry

จากการทดลองได้ผลการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 4.9 เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ คำนวณหาปริมาณสารตามสมการที่ (2) และ(4) แล้วนำความเข้มข้นไปคูณค่า dilution factor พบว่า พืชตัวอย่างชนิดต่างๆมีปริมาณเบต้า-แคโรทีน และแอสตาแซนทิน ดังตารางที่ 4.10 โดยมีปริมาณ เบต้า-แคโรทีนในดอกดาวเรืองมีมากที่สุด ( $411.5562 \pm 0.6377 \mu\text{g/g}$ ) รองลงมาคือ สาหร่ายผมนาง ( $167.0658 \pm 0.7913 \mu\text{g/g}$ ) แครอท ( $142.3117 \pm 4.1854 \mu\text{g/g}$ ) ดอกเข็ม ( $105.2184 \pm 0.3011 \mu\text{g/g}$ ) ดอกเฟื่องฟ้า ( $34.6650 \pm 0.1966 \mu\text{g/g}$ ) เปลือกเงาะ ( $22.7979 \pm 0.1796 \mu\text{g/g}$ ) และเปลือกข้าวโพด ( $6.1141 \pm 0.0026 \mu\text{g/g}$ ) ตามลำดับ

ส่วนปริมาณแอสตาแซนทินพบในดอกดาวเรืองมากที่สุด ( $43.4084 \pm 0.0673 \mu\text{g/g}$ ) รองลงมา คือ สาหร่ายผมนาง ( $17.6211 \pm 0.0835 \mu\text{g/g}$ ) แครอท ( $15.0102 \pm 0.4415 \mu\text{g/g}$ ) ดอกเข็ม ( $11.0978 \pm 0.0318 \mu\text{g/g}$ ) ดอกเฟื่องฟ้า ( $3.6563 \pm 0.0207 \mu\text{g/g}$ ) เปลือกเงาะ ( $2.4046 \pm 0.0189 \mu\text{g/g}$ ) และ เปลือกข้าวโพด ( $0.6449 \pm 0.0003 \mu\text{g/g}$ ) ตามลำดับ

ตารางที่ 4.9 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของเบต้า-แคโรทีนและแอสต้าแซนทีนในพืชตัวอย่าง

| พืชตัวอย่าง   | น้ำหนักสด<br>(กรัม) | ปริมาตร<br>สารสกัด<br>(มิลลิลิตร) | Dilution<br>Factor* | ค่าการดูดกลืนแสง |            |            |               |               |                |            |            |               |               |
|---------------|---------------------|-----------------------------------|---------------------|------------------|------------|------------|---------------|---------------|----------------|------------|------------|---------------|---------------|
|               |                     |                                   |                     | 450.5 นาโนเมตร   |            |            |               |               | 473.5 นาโนเมตร |            |            |               |               |
|               |                     |                                   |                     | ครั้งที่ 1       | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย        | เฉลี่ย        | ครั้งที่ 1     | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย        | เฉลี่ย        |
| เปลือกข้าวโพด | 200.18              | 50.0                              | 1                   | 0.9403           | 0.9399     | 0.9395     | 0.9399±0.0004 | 0.9399±0.0004 | 0.6932         | 0.6940     | 0.7039     | 0.6970±0.0060 | 0.6970±0.0060 |
| สำหรับยมนาง   | 200.11              | 42.0                              | 16                  | 1.9001           | 1.9131     | 1.9175     | 1.9102±0.0090 | 1.9102±0.0090 | 1.5120         | 1.5189     | 1.5222     | 1.5177±0.0052 | 1.5177±0.0052 |
| ดอกเข็ม       | 200.08              | 40.0                              | 16                  | 1.2589           | 1.2646     | 1.2656     | 1.2630±0.0036 | 1.2630±0.0036 | 1.0653         | 1.0671     | 1.0684     | 1.0669±0.0016 | 1.0669±0.0016 |
| ดอกดาวเรือง   | 192.94              | 33.0                              | 64                  | 1.4412           | 1.4441     | 1.4456     | 1.4436±0.0022 | 1.4436±0.0022 | 1.2512         | 1.2589     | 1.2617     | 1.2573±0.0054 | 1.2573±0.0054 |
| แครอท         | 200.13              | 45.0                              | 32                  | 0.7350           | 0.7645     | 0.7788     | 0.7594±0.0223 | 0.7594±0.0223 | 0.6305         | 0.6602     | 0.6747     | 0.6551±0.0225 | 0.6551±0.0225 |
| ดอกเฟื่องฟ้า  | 119.17              | 30.0                              | 4                   | 1.3267           | 1.3256     | 1.3132     | 1.3218±0.0075 | 1.3218±0.0075 | 0.9805         | 0.9835     | 0.9897     | 0.9846±0.0047 | 0.9846±0.0047 |
| เปลือกเงาะ    | 200.14              | 32.0                              | 4                   | 1.3571           | 1.3707     | 1.3784     | 1.3687±0.0108 | 1.3687±0.0108 | 1.0490         | 1.0566     | 1.0634     | 1.0563±0.0072 | 1.0563±0.0072 |

\* เจือจางหลังการสกัด



ตารางที่ 4.10 แสดงปริมาณเบต้า-แคโรทีนและแอสต้าแซนทีนในพืชตัวอย่าง

| ตัวอย่าง      | น้ำหนักสด<br>(กรัม) | ปริมาตรสารสกัด<br>(มิลลิลิตร) | เบต้า-แคโรทีน(C <sub>1</sub> ) |                 | แอสต้าแซนทีน(C <sub>2</sub> ) |                |
|---------------|---------------------|-------------------------------|--------------------------------|-----------------|-------------------------------|----------------|
|               |                     |                               | ppm                            | ug/g*           | ppm                           | ug/g*          |
| เปลือกข้าวโพด | 200.18              | 50.0                          | 24.4784±0.0104                 | 6.1141±0.0026   | 2.5818±0.0011                 | 0.6449±0.0003  |
| สาหร่ายผสมนาง | 200.11              | 42.0                          | 795.9890±3.7700                | 167.0658±0.7913 | 83.9560±0.3976                | 17.6211±0.0835 |
| ดอกเข็ม       | 200.08              | 40.0                          | 526.3025±1.5061                | 105.2184±0.3011 | 55.5112±0.1589                | 11.0978±0.0318 |
| ดอกดาวเรือง   | 192.94              | 33.0                          | 2406.2321±3.7283               | 411.5562±0.6377 | 253.7946±0.3932               | 43.4084±0.0673 |
| แครอท         | 200.13              | 45.0                          | 632.9076±18.6141               | 142.3117±4.1854 | 66.7552±1.9633                | 15.0102±0.4415 |
| ดอกเฟื่องฟ้า  | 119.17              | 30.0                          | 137.7011±0.7810                | 34.6650±0.1966  | 14.5239±0.0824                | 3.6563±0.0207  |
| เปลือกมะละ    | 200.14              | 32.0                          | 142.5869±1.1236                | 22.7979±0.1796  | 15.0392±0.1185                | 2.4046±0.0189  |

หมายเหตุ \* ug/g หมายถึง น้ำหนักสาร(เบต้า-แคโรทีน หรือแอสต้าแซนทีน) ต่อ น้ำหนักตัวอย่างสด



## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การศึกษาเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการสกัดสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ในงานวิจัยครั้งนี้ ศึกษาการสกัดโดยการหาปริมาณแอสตาแซนทินจากตัวอย่างแครอท ซึ่งทำโดยนำแครอทมาทดลองเตรียมตัวอย่าง 3 วิธี คือ ตัวอย่างสด ตัวอย่างอบ และตัวอย่างฟรีซดรายน์ แล้วนำไปสกัดจากตัวทำละลายผสม 3 ชนิด คือ (1) acetone-methanol-petroleum ether อัตราส่วน 3:2:1 (2) chloroform-methanol อัตราส่วน 3:1 และ (3) hexane-acetone-ethanol อัตราส่วน 2:1:1 และวิเคราะห์ปริมาณแอสตาแซนทินด้วยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี ซึ่งใช้สภาวะการทดลองที่เหมาะสมดังนี้

- คอลัมน์  $C_{30}$  reverse phase column
- ความยาวคลื่นที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์คือ 480 nm
- เฟสเคลื่อนที่ hexane-acetone อัตราส่วน 70:30
- อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่คือ 1.0 ml/min

จากการศึกษาวิธีการเตรียมตัวอย่างที่นำมาสกัดโดยใช้วิธีสกัด 3 วิธี พบว่าเมื่อสกัดจากตัวอย่างสดจะสามารถสกัดแอสตาแซนทินออกมาจากแครอทได้มากที่สุด เนื่องจากตัวอย่างแครอทสดมีโอกาสสูญเสียแอสตาแซนทินจากความร้อนและแสงได้น้อย สำหรับตัวอย่างที่ดองน้ำออกด้วยวิธีฟรีซดรายน์ ต้องนำตัวอย่างมาทำให้แห้งซึ่งต้องใช้เวลานาน ทำให้ตัวอย่างมีโอกาสสัมผัสกับแสงมาก และตัวอย่างที่ผ่านการอบอาจมีการสูญเสียหรือเกิดการสลายตัวของแอสตาแซนทินจากความร้อนได้ และการศึกษาตัวทำละลายที่ใช้สกัดสารจากตัวอย่างแครอทสด พบว่าสารละลายผสมระหว่าง hexane-acetone-ethanol อัตราส่วน 2:1:1 สามารถสกัดแอสตาแซนทินออกมาได้มากที่สุด

การวิเคราะห์หาปริมาณเบต้า-แคโรทีนและแอสต้าแซนทินในพืชตัวอย่าง 7 ชนิด ได้แก่ เปลือกข้าวโพด สาหร่ายผมนาง ดอกเข็ม ดอกดาวเรือง แครอท ดอกเฟื่องฟ้า และเปลือกเงาะ โดยใช้เทคนิค UV-Vis spectrophotometry ซึ่งพบปริมาณเบต้า-แคโรทีนในดอกดาวเรืองมากที่สุด ( $411.5562 \pm 0.6377 \mu\text{g/g}$ ) รองลงมาคือ สาหร่ายผมนาง ( $167.0658 \pm 0.7913 \mu\text{g/g}$ ) แครอท ( $142.3117 \pm 4.1854 \mu\text{g/g}$ ) ดอกเข็ม ( $105.2184 \pm 0.3011 \mu\text{g/g}$ ) ดอกเฟื่องฟ้า ( $34.6650 \pm 0.1966 \mu\text{g/g}$ ) เปลือกเงาะ ( $22.7979 \pm 0.1796 \mu\text{g/g}$ ) และเปลือกข้าวโพด ( $6.1141 \pm 0.0026 \mu\text{g/g}$ ) ตามลำดับ

ส่วนปริมาณแอสตาแซนทินพบในดอกดาวเรือง( $43.4084 \pm 0.0673 \mu\text{g/g}$ ) มากที่สุด รองลงมาคือสารร่ายผมนาง( $17.6211 \pm 0.0835 \mu\text{g/g}$ ) แครอท( $15.0102 \pm 0.4415 \mu\text{g/g}$ ) ดอกเข็ม ( $11.0978 \pm 0.0318 \mu\text{g/g}$ ) ดอกเฟื่องฟ้า( $3.6563 \pm 0.0207 \mu\text{g/g}$ ) เปลือกเงาะ( $2.4046 \pm 0.0189 \mu\text{g/g}$ ) และเปลือกข้าวโพด( $0.6449 \pm 0.0003 \mu\text{g/g}$ ) ตามลำดับ



## บรรณานุกรม

- นิธิยา รัตนปนนท์. เคมีอาหาร. กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์, 2545.
- วีระศักดิ์ สามี(2005) แคโรทีนอยด์: โครงสร้างทางเคมีและกลไกที่มีผลต่อการทำหน้าที่ของร่างกาย J Pharm Sci ;10(1):58-66
- สุดสายชล หอมทอง. 2541. การผลิต astaxanthin จากสาหร่าย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.
- Abushita, A.A., Hebshi, E.A., Daood, H.G. and Biacs, P.A. (1997). Determination of antioxidant vitamins in tomatoes. Food Chemistry.: 207-212
- Association of Official Analytical Chemists (1984) Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Section 43.014-43.017 Carotenes in Fresh Plant Materials and Silages Spectrophotometric Method Final Action, 14th edn. The Association of Official Analytical Chemists, Inc., Arlington, VA.
- Britton, G.(1995) Structure and properties of carotenoids in relation to function. FASEB J; 9:1551-1558.
- Bushway, R. J. (1985) Separation of carotenoids in fruits and vegetables by high performance liquid chromatography. Journal of Liquid Chromatography 8(8), 1527-1547.
- Bushway, R. J. and Wilson, A.M. (1982) Determination of  $\alpha$ - and  $\beta$ -carotene in fruit and vegetables by HPLC. Canadian Institute of Food Science and Technology Journal 15(3), 165-169.
- Hamano, P.S. and Mercadante, A.Z. (2001). Composition of carotenoid from commercial product of caja. J. food composition and analysis. : 335-343
- Hodisan, T., Socaciu, C., Ropan, I., and Neamtu, G.(1997). Carotenoid composition of *Rosa canina* fruits determined by thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography. J. Pharm. Biomed. Anal., 16, 521-528.
- Hsieh, Y. P. C. and Karel, M. (1983) Rapid extraction and determination of  $\alpha$ - and  $\beta$ -carotene in foods. J.Chromatography 259, 515-518.
- Johnson, E.A., Villa, T.G. and Lewis, M.J. (1980). Phaffia rhodozyma as an astaxanthin source in salmonid diets. Aquaculture 20: 123-134.

- Jyonouchi, H., Sun, S., Mizokami, M. and Gross M.D. (1996). Effect of various carotenoids on clone, effectorstage T-helper cell activity. *Nutrition and Cancer* 26: 313-324.
- Kobayashi, M., Kakizono, T. and Nagai, S. (1991), Astaxanthin production by a green algae, *Haematococcus pluvialis* accompanied with morphological changes in acetate medium. *Journal of Fermentation Bioengineering.* : 61-63
- Lee, H.S., Castle, W.S. and Coates, G.A. (2001). High performance liquid chromatography for characterization of carotenoid in the new sweet orange (Earlygold) grown in Florida, USA. *J. Chromatogr. A.* : 371-377
- Lin, C.H. and Chen, B.H. (2005). Stability of carotenoids in tomato juice during storage. *Food Chemistry*; 90, 837–846.
- Maursich, W.L. and Bauernfeind. (1989). Oxycarotenoids in poultry feeds, pp. 319-462. In.: Bauernfeind, S.C.editor. *Carotenoids as Colorants and Vitamin A Precursors : Food Science and Technology a series of Monograph.* Academic Press, Inc., London.
- Noga, G. and Lenz, F. (1983) Separation of citrus carotenoids by reversed phase high performance liquid chromatography. *Chromatographia* 17(3), 139-142.
- Ong A.S.H. and Tee, E.S. (1992) Natural sources of carotenoids from plants and oils. *Meth Enzymol*; 213:142-167.
- Ottes, S. and Atli, Y. (2000). Analysis of carotenoids in tomato paste by HPLC and OCC. *Application note.* : 22-24
- Reeder, S. K. and Park, G. L. (1975) A specific method for the determination of provitamin A carotenoids in orange juice. *J.AOAC.* 58(3), 595-598.
- Shibata, N. and Kinumaki, Y. (1979). An improvement of TBA procedure as the measure of the oxidativedeterioration occurring in fish oils II intact sample procedure. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* : 505-509
- Stewart, I. (1977) High performance liquid chromatographic determination of provitamin A in orange juice. *J.AOAC* 60(1), 132-136.
- Taungbodhitham, A. K., Jones, G.P., Wahlqvistc, M.L. and Briggs, D.R. (1998) Evaluation of extraction method for the analysis of carotenoids in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 63(4), 577-584.



Torrissen, O.J.(1995). Strategies for salmonid pigmentation. J.Appl. Ichthyol. 11, 276-281.

Zakaria, M., Simpson, K., Brown, P. R. and Krstulovic, A. (1979) Use of reversed phase high performance liquid chromatographic analysis for the determination of provitamin A carotenes in tomatoes. J, Chromatography 176, 109-117.

