

การศึกษาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระของน้ำมะหวด

Investigation of antioxidant capacity and antioxidant activity of Ma-huad (*Lepisanthes rubiginosa* (Roxb.) Leenh.) juice

วิชณี มัธยม^{1*} กานดาวดี โนชัย¹ กัญญา กอแก้ว¹ กาญจนา พิศาภาค¹
และ ดารานัย รบเมือง¹

Wishanee Matthayom^{1*}, Kandawadee Nochai¹, Kanya KoKaew¹, Kanjana Pisapak¹
and Daranai Robmuang¹

บทคัดย่อ

มะหวด เป็นไม้ยืนต้นขนาดเล็กอยู่ในวงศ์เงาะ (Sapindaceae) สามารถพบได้ตามป่าโปร่งของประเทศไทยและประเทศเพื่อนบ้าน ผลสุกของมะหวดที่มีสีม่วงแดงมีสารสำคัญกลุ่มแอนโทไซยานิน (anthocyanin) และนอกจากนี้ยังอาจพบสารกลุ่มโพลีฟีนอลอื่นๆ ร่วมด้วย งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมะหวดที่เตรียมจากผลมะหวดสุกในอัตราส่วนน้ำหนักผลมะหวดต่อน้ำกลั่นเท่ากับ 1:1, 1:2 และ 1:3 ตามลำดับ ใช้เวลาในการต้ม 5-15 นาที (เปลี่ยนช่วงเวลาทุก 5 นาที) โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 95 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพของน้ำมะหวดและวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินรวมด้วยวิธี pH-differential ปริมาณฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS ผลการศึกษาพบว่า ตัวอย่าง T3 (อัตราส่วนน้ำหนักผลมะหวดต่อน้ำเท่ากับ 1:1 ที่เวลา 15 นาที) แสดงปริมาณแอนโทไซยานิน ปริมาณฟีนอลิกรวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS สูงกว่าตัวอย่างอื่นๆ คือ 86.00 ± 1.77 mg CGE/100g of FW, 118.64 ± 1.40 mg GAE/100 g crude extract, 57.78 เปอร์เซ็นต์ และ 96.62 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ ยังพบว่าความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแอนโทไซยานินรวมและปริมาณฟีนอลิกรวมต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ($r=0.82$ และ 0.88) และ ABTS ($r=0.64$ และ 0.72) มีความสัมพันธ์กันในระดับสูง ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ($p>0.05$)

คำสำคัญ: มะหวด แอนโทไซยานิน ฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระ

Abstract

Ma-huad (*Lepisanthes rubiginosa* (Roxb.) Leenh.) is a perennial plant of the Sapindaceae family. This plant has been found in the sparse forest of Thailand and neighboring countries. The color of ripe Ma-huad fruits is red - purple and the active substances found in this fruit are anthocyanins. Furthermore, others polyphenols, may be found as constituents in this plant. In the present study, antioxidant contents and antioxidant activity of Ma-huad

¹ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ

¹ Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Suvarnabhumi

* Corresponding author. E-mail: Wichanee.m@rmutsb.ac.th

Received: April 27, 2020; Revised: June 25, 2020; Accepted: September 17, 2020

juices were determined. Preparation of Ma-huad juices was done by using the ratio of ripe Ma-huad fruit weight and distilled water into 1:1, 1:2 and 1:3, respectively. The boiling temperature was controlled at 95 °C while the boiling times were changed from 5 to 15 minutes (5-minute intervals). Some physical properties of Ma-huad juices were analyzed. These samples were determined for total anthocyanin content by using pH-differential method, total phenolic content by using Folin-Ciocalteu reagent, antioxidant activity by DPPH and ABTS assays. The results showed that the maximum total anthocyanin contents, total phenolic contents and antioxidant activities from DPPH and ABTS methods were 86.00±1.77 mg CGE/100g of FW, 118.64±1.40 mg GAE/100 g crude extract, 57.78%, and 96.62%, respectively which was obtained from T3 sample (ratio of ripe Ma-huad fruit weight and distilled water was 1:1 at 15 minutes). Total anthocyanin contents and total phenolic contents were highly correlated to the percentage of the inhibition of antioxidant activity both DPPH assay ($r=0.82$ and 0.88) and also ABTS assay ($r=0.64$ and 0.72) at 0.05 significance ($p>0.05$).

Keywords: Ma-huad (*Lepisanthes rubiginosa* (Roxb.) Leenh.), anthocyanin, antioxidant activity

บทนำ

ในปัจจุบันยังคงมีการศึกษาวิจัยค้นหาพืชสมุนไพรชนิดใหม่ๆ เพื่อนำมาใช้ประโยชน์อย่างต่อเนื่อง ไม่ว่าจะเป็นการใช้เป็นยารักษาโรค การใช้เป็นส่วนประกอบในเครื่องสำอาง หรืออาหารเสริม เป็นต้น พืชสมุนไพรที่พบตามท้องถิ่นของไทยหลายชนิดนอกจากจะสามารถรับประทานเป็นผักหรือผลไม้แล้วยังมีฤทธิ์ที่สำคัญทางยามากมาย

มะหูด (*Lepisanthes rubiginosa* (Roxb.) Leenh) เป็นไม้ยืนต้นขนาดเล็กอยู่ในวงศ์เงาะ (Sapindaceae) พบได้ในป่าโปร่ง สวนหรือบริเวณทุ่งนา สามารถพบได้ทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทยและประเทศเพื่อนบ้าน โดยทั่วไปชาวบ้านจะนำใบอ่อนและผลมาบริโภค ตำรายาโบราณมีการกล่าวถึงสรรพคุณทางยาของพืชชนิดนี้เช่น รากสามารถแก้ไข้พิษฝ้ายใน แก้วพิษร้อน ขับพยาธิ แก้ไข้ที่มีพิษร้อน แก้งูสวัด ปวดศีรษะ รักษาโรคผิวหนังผื่นคัน ผลช่วยสมานแผล แก้บิดมูกเลือด แก้ไข้รากสาด แก้ก้องร่วง แก้ปวดมวนในท้อง เป็นต้น

(BGO Plant Databases, The Botanical Garden Organization, n.d.) แม้จะมีการนำส่วนต่างๆ ของพืชชนิดนี้มาใช้ประโยชน์อยู่บ้างแต่ก็ยังนับว่ายังมีผู้ศึกษาค้นคว้าหาความรู้ในรายละเอียดด้านองค์ประกอบทางเคมีค่อนข้างน้อย จึงควรมีการศึกษาพืชชนิดนี้มากยิ่งขึ้นเพื่อนำไปสู่การใช้ประโยชน์ที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น ตลอดจนสามารถส่งเสริมให้เกิดการปลูกเพื่อการอนุรักษ์และขยายพันธุ์พืชให้เป็นที่รู้จักมากยิ่งขึ้น

สารสำคัญที่พบในผลของมะหูดที่มีสีม่วงแดงชื่อว่า แอนโทไซยานิน (anthocyanins) ซึ่งเป็นเม็ดสีที่ละลายน้ำได้ เป็นสีตามธรรมชาติที่มีโครงสร้างของโมเลกุลอยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Chaovanalokit, 2011) และนอกจากนี้ยังอาจพบสารกลุ่มโพลีฟีนอลอื่นๆ เช่น สารประกอบฟีนอลิก เป็นต้น (Diaconeasa et al., 2015) สีของแอนโทไซยานินจะเปลี่ยนไปตามสภาวะความเป็นกรด-ด่าง แอนโทไซยานินเป็นสารที่ให้สีตั้งแต่สีน้ำเงินเข้มหรืออาจไม่มีสีเลยเมื่ออยู่ใน

สภาวะต่าง (pH>7) เมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นกลางจะมีสีม่วง (pH=7) และจะเปลี่ยนเป็นสีแดงถึงแดงเข้มได้ในสภาวะเป็นกรด (pH<7) (Giusti, & Wrolstad, 2001; Hurtado, Morales, Gonzalez-Miret, & Escudero-Gilete, 2009) สารในกลุ่มแอนโทไซยานิน ที่พบบ่อยมีอยู่ 6 ชนิด (Cabrita, Fossen, & Andersen, 2000) ได้แก่ เพลาโกนินิดิน (pelargonidin) ไชยานิดิน (cyanidin) เดลฟินิดิน (delphinidin) พีโอนินิดิน (peonidin) เพทูนิดิน (petunidin) และ มัลวิดิน (malvidin) จากงานวิจัยที่มีอยู่ในปัจจุบัน ชี้ให้เห็นว่าแอนโทไซยานิน มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ที่มีฤทธิ์สูงกว่าวิตามินซีและอีถึงสองเท่า (Lourith, Kanlayavattanukul, & Chanpirom, 2009; Aninbon, Banterng, Sanitchon, & Songsri, 2011) นอกจากนี้ยังมีสมบัติลดอาการอักเสบ (anti-inflammatory) ช่วยปกป้องหลอดเลือดลดคอเลสเตอรอลในเลือดลดความเสี่ยงของโรคหัวใจและต้านไวรัส (Wetwitayaklung, Charoenteeraboon, Limmatvapirat, & Phaechemud, 2012)

การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นหนึ่งๆ และวิธีพีเอช-ดิฟเฟอเรนเชียล ซึ่งในปัจจุบันวิธีหลังได้รับความนิยมมากกว่าวิธีแรกเนื่องจากเป็นวิธีที่มีความถูกต้องแม่นยำสูงกว่า (Lee, Durst, & Wrolstad, 2005; Shafazila, Pat, & Lee, 2010) โดยจะทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงของแอนโทไซยานินในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ pH 1.0 และ 4.5 ซึ่งแอนโทไซยานินจะมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างจากรูปออกโซเนียม (oxonium form) ใน pH 1.0 กลายเป็นรูปเฮมิคีทาล (hemiketal form) ที่ pH 4.5 วิธีการนี้ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงของแอนโทไซยานิน ณ ความยาว

คลื่นสูงสุด (λ_{max}) ที่ pH 1.0 และ 4.5 แล้วนำมาหักลบกันเพื่อเป็นการกำจัดการดูดกลืนแสงของสารอื่นๆที่ไม่ใช่แอนโทไซยานิน และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 700 นาโนเมตร เพื่อหักลบค่าความขุ่นที่อาจเกิดขึ้น (Chaovanalokit, 2011)

จากข้อมูลข้างต้น ผู้วิจัยคาดการณ์ว่าการนำผลของมะหาดมาพัฒนาเป็นเครื่องดื่มน้ำผลไม้เพื่อเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการให้กับผู้บริโภค โดยคัดเลือกอัตราส่วนที่เหมาะสมของมะหาดต่อการผลิตเป็นน้ำผลไม้ และทดสอบหาปริมาณโพลีฟีนอลรวมและแอนโทไซยานินรวม เพื่อให้ได้องค์ความรู้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มน้ำมะหาดและผลิตภัณฑ์ใหม่ๆที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพและอาจจะสามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์จำหน่ายในเชิงพาณิชย์ต่อไป

วิธีการศึกษา

การเตรียมตัวอย่างและศึกษาคุณภาพเบื้องต้นบางประการด้วยวิธีทางกายภาพของน้ำมะหาด

นำผลมะหาดสุกมาล้างน้ำให้สะอาด ผึ่งให้แห้งนำมาแยกเนื้อและเมล็ด จากนั้นนำเฉพาะส่วนเนื้อมาคั้นน้ำ โดยกำหนดอัตราส่วนระหว่างน้ำหนักเนื้อมะหาดสุกและน้ำหนักน้ำเป็นอัตราส่วน 1:1, 1:2 และ 1:3 นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส แต่ละอัตราส่วนจะมีการปรับเวลาในการต้มเป็น 5, 10 และ 15 นาที ตามลำดับ ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นและนำมารองผ่านผ้าขาวบาง จากนั้นนำไปกรองด้วยกระดาษกรอง 1 ครั้ง นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียสจนได้ตัวอย่างจำนวน 9 ตัวอย่าง (T1-T9) สำหรับนำไปวิเคราะห์คุณภาพของน้ำมะหาดเบื้องต้นด้วยวิธีทางกายภาพ ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)

การตรวจวัดสีโดยวัดความเข้มของสีด้วยเครื่อง spectrophotometer ของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ (total soluble solid : TSS) ด้วยเครื่อง refractometer รวมทั้งการวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระต่อไป

การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินรวม

วิเคราะห์โดยใช้วิธี pH differential (Shafazila, Pat, & Lee, 2010) เจือจางตัวอย่างทั้ง 9 ตัวอย่างที่จะทดสอบ 1 ส่วนใน 9 ส่วนโดยปริมาตรของสารละลายบัฟเฟอร์ 2 ชนิด คือโพแทสเซียมคลอไรด์บัฟเฟอร์ (0.025 M KCl, pH 1.0) และอะซีเตทบัฟเฟอร์ (0.4 M CH₃COONa, pH 4.5) นำสารละลายที่เตรียมไว้ไปเขย่า และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 นาโนเมตร (A_{510}) และ 700 นาโนเมตร (A_{700}) ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-Vis spectrophotometer) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณแอนโทไซยานินรวม (total anthocyanin contents : TA) โดยแสดงข้อมูลปริมาณแอนโทไซยานินรวม ในหน่วยของมิลลิกรัมสมมูลของ cyanidin-3-glucoside (cyanidin-3-glucoside equivalent: CGE) ต่อตัวอย่างสด (FW) 100 กรัม (mg CGE/100g of FW) ตามสมการต่อไปนี้

$$A = (A_{510} - A_{700})_{pH_{1.0}} - (A_{510} - A_{700})_{pH_{4.5}} \quad (1)$$

$$TA \text{ content} = \frac{(A \times Mw \times \text{dilution factor} \times 100)}{\epsilon} \quad (2)$$

โดยที่ A, A_{510} และ A_{700} หมายถึง ผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุดของ

ตัวอย่างในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 1.0 และ 4.5 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุดของตัวอย่างที่ 510 นาโนเมตร และ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุดของตัวอย่างที่ 700 นาโนเมตรตามลำดับ

Mw หมายถึง มวลโมเลกุลของ cyanidin-3-glucoside ซึ่งเท่ากับ 449.2 g/mol

ϵ หมายถึง โมลาร์แอบซอร์บิตีวิตี (molar absorptivity) ซึ่งขึ้นกับชนิดของแอนโทไซยานินและตัวทำละลาย โดยทั่วไป นิยมใช้ค่าของ cyanidin-3-glucoside ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 1.0 ซึ่งเท่ากับ 26,900 M.cm

dilution factor หมายถึง แฟคเตอร์ที่เกิดจากการเจือจางสารละลาย ซึ่งในที่นี้ใช้ตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร เจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์จนมีปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใช้ค่า dilution factor เท่ากับ 10

การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม

วิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกของสารสกัดทั้งหมดโดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu colorimetric method (Lourith, Kanlayavattanukul, & Chanpirom, 2009) โดยนำตัวอย่างทั้ง 9 ตัวอย่าง ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรเติมสารละลาย Folin Ciocalteu reagent ปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย 7.5 เปอร์เซนต์ Na₂CO₃ ปริมาตร 1.2 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 60 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร (A_{765}) ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้กับกราฟมาตรฐานของสารละลาย gallic acid (เตรียมสาร

มาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้น 100, 200, 300, 400 และ 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น) แสดงในรูปมิลลิกรัม gallic acid equivalent/100 กรัมของสารสกัด (mg GAE/100 g crude extract)

การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

วิเคราะห์โดยวิธี DPPH (Lourith, Kanlayavattanukul, & Chanpirom, 2009) นำตัวอย่างทั้ง 9 ตัวอย่าง ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายมาตรฐาน DPPH ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 10

มิลลิลิตร ด้วยเมทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เขย่าให้สารละลายผสมกัน ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาในที่มืด อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 525 นาโนเมตร (A_{525}) ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง นำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างเปรียบเทียบกับตัวควบคุม (control) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ scavenging activity ตามสมการ

$$\text{DPPH scavenging activity (\%)} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \times 100 \quad (3)$$

A_{control} = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุม

A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

วิเคราะห์โดยวิธี ABTS (Kriengsak, Boonprakob, Crosby, Cisneros-Zevallos, & Byrne, 2006) เตรียมสารละลาย ABTS^{•+} radical โดยนำ 7 mM ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ในน้ำกลั่น กับ 2.45 mM K₂S₂O₈ (dipotassium peroxodisulphate) ในอัตราส่วน 1:1 ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลาย ABTS^{•+} มาเจือจางในเมทานอล

95 เปอร์เซ็นต์ ให้สารละลายมีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 7.00 ± 0.05 ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร

นำตัวอย่างทั้ง 9 ตัวอย่าง ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย ABTS^{•+} ที่เจือจางแล้ว 4.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงเทียบกับตัวควบคุม ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณค่า ABTS scavenging activity (%) ตามสมการ

$$\text{ABTS scavenging activity (\%)} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \times 100 \quad (4)$$

A_{control} = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุม

A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

เนื่องจากกลไกการต้านอนุมูลอิสระสามารถเกิดได้หลายรูปแบบ เช่น แบบฟรีแรดิคัล แบบแรดิคัล-แคตไอออน จึงควรทำการศึกษาการต้านอนุมูลอิสระ 2 วิธีขึ้นไป

การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำผลการศึกษามาวิเคราะห์หาความแปรปรวนทางสถิติ (analysis of variance: ANOVA) และวิเคราะห์หาค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple's range test (DMRT) และหาความสัมพันธ์ของข้อมูลทางสถิติด้วยวิธี Pearson correlation test เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการคัดเลือกชุดทดลองที่เหมาะสม

ไปศึกษาปริมาณน้ำมะหุดต่อปริมาณน้ำตาลที่เหมาะสมในการพัฒนาเป็นน้ำมะหุดพร้อมดื่มต่อไป

ผลการศึกษา

ผลการศึกษาคุณภาพเบื้องต้นบางประการด้วยวิธีทางกายภาพของน้ำมะหุด

น้ำมะหุดทั้ง 9 ตัวอย่างที่เตรียมได้ให้ค่าความสว่าง (L^*) อยู่ในช่วง 27.88-29.75 ค่าความเป็นสีแดง (a^*) เป็นบวกทั้งหมด และค่าความเป็นสีเหลือง (b^*) เป็นลบทั้งหมด แสดงถึงน้ำมะหุดตัวอย่างที่เตรียมได้มีสีแดงม่วงเข้ม ผลดังแสดงใน (Table 1)

Table 1 Some qualitative analysis results (means $\pm$ S.D.) of Ma-huad juice samples (T1-T9).

sample	sample ratio/ time (min)	brightness (L^*)	red (a^*)	yellow (b^*)	pH	TSS ($^{\circ}$ Brix)
T1	1:1/5	27.80 $\pm$ 2.99	0.53 $\pm$ 0.19	-0.82 $\pm$ 0.18	5.48 $\pm$ 0.07 ^{cd 1/}	5.67 $\pm$ 0.70 ^b
T2	1:1/10	29.69 $\pm$ 0.05	0.68 $\pm$ 0.13	-0.80 $\pm$ 0.22	5.40 $\pm$ 0.07 ^d	7.00 $\pm$ 1.73 ^a
T3	1:1/15	29.66 $\pm$ 0.11	0.78 $\pm$ 0.15	-0.81 $\pm$ 0.13	5.38 $\pm$ 0.06 ^d	7.60 $\pm$ 0.72 ^a
T4	1:2/5	29.75 $\pm$ 0.24	0.64 $\pm$ 0.03	-0.89 $\pm$ 0.01	5.67 $\pm$ 0.12 ^{abc}	3.00 $\pm$ 0.20 ^d
T5	1:2/10	28.34 $\pm$ 2.27	0.59 $\pm$ 0.07	-0.84 $\pm$ 0.30	5.6 $\pm$ 0.02 ^{abc}	4.00 $\pm$ 0.00 ^{cd}
T6	1:2/15	29.55 $\pm$ 0.19	0.68 $\pm$ 0.25	-0.86 $\pm$ 0.28	5.55 $\pm$ 0.03 ^{bcd}	4.67 $\pm$ 0.58 ^{bc}
T7	1:3/5	29.75 $\pm$ 0.17	0.69 $\pm$ 0.05	-0.93 $\pm$ 0.20	5.78 $\pm$ 0.22 ^a	3.07 $\pm$ 0.81 ^d
T8	1:3/10	28.81 $\pm$ 1.44	0.71 $\pm$ 0.30	-0.66 $\pm$ 0.20	5.73 $\pm$ 0.17 ^{ab}	3.00 $\pm$ 0.00 ^d
T9	1:3/15	29.61 $\pm$ 0.15	0.73 $\pm$ 0.15	-0.96 $\pm$ 0.21	5.78 $\pm$ 0.06 ^a	3.00 $\pm$ 0.00 ^d

Note : ^{1/} Means significant difference ($p < 0.05$).

ผลการวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินรวม (TA) และปริมาณฟีนอลิกรวม (TPC)

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของน้ำมะหุดตัวอย่างด้วยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric โดยใช้กรดแกลลิก (gallic acid) เป็นสารมาตรฐาน ได้กราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกที่ $y = 0.0164x + 0.0338$, $R^2 = 0.9895$

ผลศึกษาปริมาณแอนโทไซยานินรวม (TA) และปริมาณฟีนอลิกรวม (TPC) ในน้ำมะหุดตัวอย่างดังแสดงใน (Table 2) ตัวอย่างน้ำมะหุดที่มีปริมาณแอนโทไซยานินรวมสูงสุดและปริมาณฟีนอลิกรวมสูงสุดคือ ตัวอย่าง T3 (อัตราส่วน 1:1 เวลาในการต้ม 15 นาที) ได้ปริมาณแอนโทไซยานิน 86.00 ± 1.77 mg CGE/100g of FW และปริมาณฟีนอลิก 118.64 ± 1.40 mg GAE/100 g

crude extract ในขณะที่ตัวอย่าง T8 เป็นตัวอย่างที่มีปริมาณแอนโทไซยานินและปริมาณฟีนอลิกต่ำที่สุดได้ 24.63 ± 0.59 mg CGE/100g of FW และ 20.98 ± 0.04 mg GAE/100 g crude extract ตามลำดับ

Table 2 Total anthocyanins (TA) and total phenolic contents (TPC) (means $\pm$ S.D.) of Ma-huad juice samples (T1-T9).

sample	total anthocyanins (TA) (mg CGE/100g of FW)	total phenolic content (TPC) (mg GAE/100 g crude extract)
T1	47.38 $\pm$ 2.66	62.32 $\pm$ 0.38
T2	81.66 $\pm$ 6.26	83.88 $\pm$ 0.86
T3	86.00 $\pm$ 1.77	118.64 $\pm$ 1.40
T4	42.75 $\pm$ 0.35	43.57 $\pm$ 0.04
T5	44.46 $\pm$ 3.36	89.21 $\pm$ 2.85
T6	42.21 $\pm$ 0.30	104.89 $\pm$ 1.53
T7	33.36 $\pm$ 1.48	35.85 $\pm$ 0.14
T8	24.63 $\pm$ 0.59	45.96 $\pm$ 0.53
T9	33.56 $\pm$ 0.94	65.37 $\pm$ 0.40

การต้านอนุมูลอิสระที่สูงที่สุด รองลงมาคือตัวอย่าง T2 และ T6 ตามลำดับ คิดเป็นร้อยละ 96.62, 95.38 และ 94.81 ตามลำดับ ส่วนตัวอย่าง T7 และ T8 เป็นตัวอย่างที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุด คิดเป็นร้อยละ 64.68 และ 76.16 ตามลำดับ

Table 3 DPPH and ABTS antioxidant activities (means $\pm$ S.D.) of Ma-huad juice samples (T1-T9).

sample	% DPPH radical scavenging activity	% ABTS scavenging activity
T1	55.22 $\pm$ 0.55	81.05 $\pm$ 1.16
T2	54.77 $\pm$ 0.73	95.38 $\pm$ 1.17
T3	57.78 $\pm$ 0.77	96.62 $\pm$ 1.40
T4	39.91 $\pm$ 0.88	81.77 $\pm$ 0.81
T5	47.01 $\pm$ 0.82	91.38 $\pm$ 1.85
T6	54.49 $\pm$ 0.12	94.81 $\pm$ 1.53
T7	26.88 $\pm$ 0.23	64.68 $\pm$ 0.69
T8	28.27 $\pm$ 0.59	76.16 $\pm$ 0.85
T9	35.36 $\pm$ 0.13	79.37 $\pm$ 0.40

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity (Table 3) พบว่า น้ำมะหุดตัวอย่าง T3 มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่สูงที่สุด รองลงมาคือตัวอย่าง T2 และ T1 ตามลำดับ คิดเป็นร้อยละ 57.78, 55.22 และ 54.77 ตามลำดับ ส่วนตัวอย่าง T7 และ T8 เป็นตัวอย่างที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุด คิดเป็นร้อยละ 26.88 และ 28.27 ตามลำดับ

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS (Table 3) พบว่าน้ำมะหุดตัวอย่าง T3 มีฤทธิ์ใน

อภิปรายผล

การศึกษาคุณภาพเบื้องต้นบางประการด้วยวิธีทางกายภาพของน้ำมะหุด

การศึกษาคุณภาพเบื้องต้นบางประการด้วยวิธีทางกายภาพของน้ำมะหุด ได้ผลดังแสดงใน (Table 1) การวัดค่าสี (L^* , a^* และ b^*) ที่เป็นค่าที่นิยมในการประเมินลักษณะปรากฏของตัวอย่างที่ทำการศึกษา ค่า L^* ที่เข้าใกล้ 100 หมายถึง ตัวอย่างมีความสว่างมากจนเป็นสีขาวหรือสีจาง แต่ถ้าค่า L^* เข้าใกล้ 0 หมายถึง ตัวอย่างมีความสว่างน้อยลงจนเป็นสีดำ ค่า a^* ที่เป็นบวก แสดงว่าตัวอย่างเป็นสีแดง แต่ถ้าค่า a^* ที่เป็นลบแสดงว่าตัวอย่างเป็นสีเขียว

และค่า b^* ที่เป็นบวกแสดงว่าตัวอย่างเป็นสีเหลือง แต่ถ้าวค่า b^* เป็นลบแสดงว่าตัวอย่างเป็นสีน้ำเงิน (Choudhury, 2014) น้ำมะหุดทั้ง 9 ตัวอย่างที่เตรียมได้ให้ค่าความสว่าง (L^*) อยู่ในช่วง 27.88-29.75 ค่าความเป็นสีแดง (a^*) เป็นบวกทั้งหมด และค่าความเป็นสีเหลือง (b^*) เป็นลบทั้งหมด แสดงถึงน้ำมะหุดตัวอย่างที่เตรียมได้มีสีแดงม่วงเข้ม เนื่องจากแอนโทไซยานินที่เป็นรงควัตถุที่พบในมะหุดที่ให้สีแดง น้ำเงิน ม่วง (Chaovanalokit, 2011)

การศึกษาปัจจัยอัตราส่วนของมะหุดและน้ำในอัตราส่วน 1:1, 1:2 และ 1:3 พบว่าไม่มีผลต่อค่าสีของน้ำมะหุด โดยไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) แต่มีผลต่อค่าความเป็นกรดต่าง และปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด ($p<0.05$) ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณน้ำที่เพิ่มทำให้ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดถูกเจือจางลงด้วยน้ำ ในขณะที่ปัจจัยระยะเวลาการต้มสกัดไม่มีผลต่อค่าสีของน้ำมะหุด และค่าความเป็นกรดต่าง ($p>0.05$) แต่มีผลต่อปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด ($p<0.05$) ทั้งนี้เนื่องจากระยะเวลาการต้มสกัดที่เพิ่มขึ้นอาจทำให้เกิดการระเหยของน้ำ จึงอาจทำให้ปริมาณของแข็งทั้งหมดเพิ่มมากขึ้น

ในการพัฒนาน้ำมะหุดเพื่อเป็นเครื่องดื่ม น้ำผลไม้ต่อไป จำเป็นที่จะต้องวัดค่า pH ค่าความเป็นกรด และส่วนประกอบน้ำตาล (องศาบริกซ์) เนื่องจากตัวแปรเหล่านี้มีผลต่อทั้งรสชาติและอายุการเก็บรักษาน้ำผลไม้จาก (Table 1) จะเห็นว่า pH ของน้ำมะหุดตัวอย่างที่มีอัตราส่วนเดียวกันจะให้ผลที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่าอยู่ในช่วง 5.38-5.78 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณความเป็นกรดต่างของน้ำ

มะหุดเริ่มต้น มีค่าเท่ากับ 5.34 อยู่ในช่วงใกล้เคียงกัน ค่าความเข้มข้นของน้ำผลไม้ (TSS หรือ °Brix) บอกถึงปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในน้ำทั้งหมดใช้บ่งชี้ความเข้มข้นของอาหารเหลว เช่น น้ำเชื่อม น้ำผลไม้เข้มข้น จากการทดลองพบว่า มะหุดตัวอย่างทั้ง 9 ตัวอย่างมีค่าความเข้มข้นของน้ำผลไม้ อยู่ในช่วง 3.00-7.60 °Brix โดยที่อัตราส่วนที่เข้มข้น 1:1 เวลา 10 และ 15 นาที (T2 และ T3) แสดงค่าความเข้มข้นสูงที่สุดที่ 7.00 และ 7.60 °Brix ตามลำดับ ระดับความเข้มข้นที่ได้สามารถระบุคุณภาพของน้ำมะหุดตัวอย่างได้ว่ามีระดับความหวานน้อยและลักษณะปรากฏของน้ำมะหุดอยู่ในระดับใสมาก (extra-light) (Thai industrial standards institute (TISI), 2006)

การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินรวม (TA) และปริมาณฟีนอลิกรวม (TPC)

จากผลการทดลองเห็นได้ว่า ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกรวมพบว่า น้ำมะหุดตัวอย่าง T2, T3, T5 และ T6 ให้ผลที่สูงกว่าสารตัวอย่างอื่นๆ โดยปริมาณฟีนอลิกที่ได้อยู่ในช่วง 83-119 mg GAE/100 g crude extract ซึ่งค่าที่ได้แตกต่างจากงานของ Sonchai (2009) ที่ได้ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกจากสารสกัดมะหุดด้วยตัวทำละลายเอทานอล โดยพบว่าปริมาณฟีนอลิกเท่ากับ 24.96 mg/L gallic acid equivalent ส่วนปริมาณแอนโทไซยานินรวมของน้ำมะหุดตัวอย่าง T2 และ T3 สูงกว่าในตัวอย่างอื่นๆ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะค่า pH ของมะหุดตัวอย่าง T2 และ T3 ต่ำกว่าตัวอย่างอื่นๆ เล็กน้อย ซึ่งจากการศึกษาของ Cabrita, Fossen, & Andersen (2000); Pajareon (2019) บ่งชี้ว่าในสภาวะกรด (pH เท่ากับ 1 และ 4) จะมีความคงตัวของแอนโทไซยานินดีกว่า

สภาวะกรดอ่อน หรือกลาง และจะไม่คงตัวที่ pH เท่ากับ 9 ส่วน อัตราส่วนระหว่างน้ำหนักเนื้อมะหาด และระยะเวลาในการต้มส่งผลต่อปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระทั้ง 2 ชนิด โดยพบว่าระยะเวลาที่ใช้ในการต้มเพิ่มขึ้นอาจส่งผลให้ได้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเพิ่มขึ้น โดย Roobha, Saravanakumar, Aravindhan, & Devi (2011) ได้อธิบายว่าอุณหภูมิสูงจะส่งผลให้โครงสร้างของแอนโทไซยานินถูกเปลี่ยนแปลงไปเนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลเซชันของน้ำตาลที่เกาะอยู่กับโครงสร้างของแอนโทไซยานินทำให้เกิดเป็นโครงสร้างที่มีความคงตัวน้อยและกลายเป็นสารประกอบสีน้ำตาลของสารฟีนอลิกในธรรมชาติที่ไม่ละลายน้ำและไม่คงตัว ทั้งนี้จากการทดลองครั้งนี้ที่ใช้อุณหภูมิสูงในการต้มน้ำมะหาดทั้ง 9 ตัวอย่าง อาจกล่าวได้ว่าการใช้ระยะเวลา ไม่เกิน 10-15 นาที อาจส่งผลต่อปริมาณแอนโทไซยานินมากกว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมะหาด

จากผลการทดลองความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS แสดงให้เห็นว่าปริมาณแอนโทไซยานินและปริมาณฟีนอลิกรวมที่สูงจะมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงด้วยสอดคล้องกับงานวิจัยของ Pimrote, Teekayu, & Sudprasert (2020) นอกจากนั้นการใช้อุณหภูมิสูง และระยะเวลาในการต้มนาน มีผลต่อปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่ง Pajareon (2019) พบว่าที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส มีผลทำให้แอนโทไซยานินสลายตัวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และพบว่าค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS สูงกว่า DPPH ทั้งนี้เนื่องมาจากความแตกต่าง

ของปฏิกิริยาที่ใช้ในการวิเคราะห์ แต่มีแนวโน้มไปในทางเดียวกัน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Wangcharoen, & Morasuk (2007)

ความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระปริมาณฟีนอลิกรวม และปริมาณแอนโทไซยานินรวม

เมื่อนำผลของปริมาณของสารประกอบฟีนอลิก รวมมาเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมะหาดตัวอย่าง T1-T9 ทั้ง 2 วิธี ซึ่งพบว่าตัวอย่าง T3 มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่สูงที่สุด รองลงมาได้แก่ T2, T6 และ T5 ตามลำดับ ซึ่งผลการวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระทั้งจากวิธี DPPH และ ABTS สอดคล้องกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมที่พบในตัวอย่าง เนื่องจากการที่สารประกอบฟีนอลิกมีคุณสมบัติเป็นกรดอ่อนจึงทำให้ตัวอย่าง T3 และ T2 มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าตัวอย่างอื่นๆ (Diaconeasa et al., 2015) แต่เมื่อพิจารณาปริมาณแอนโทไซยานินรวมพบว่าในตัวอย่าง T3 และ T2 มีปริมาณสูงสุดเป็นลำดับที่ 1 และ 2 ตามลำดับ แต่ในตัวอย่างอื่นๆ มีปริมาณแอนโทไซยานินใกล้เคียงกัน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะในสภาวะที่สารสกัดมี pH เป็นกรดมากกว่าจะมีความคงตัวของแอนโทไซยานินดีกว่า (Cabrita, Fossen, & Andersen, 2000; Hurtado, Morales, Gonzalez-Miret, & Escudero-Gilete, 2009) นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี Pearson correlation test (Kriengsak, Boonprakob, Crosby, Cisneros-Zevallos, & Byrne, 2006) พบว่า ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟีนอลิกรวมและปริมาณแอนโทไซยานินรวมต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS มีความสัมพันธ์กันในระดับสูง โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ดังแสดงใน (Table 4)

ซึ่งจากข้อมูลดังกล่าวสามารถบอกได้ว่าฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมมากกว่าปริมาณแอนโทไซยานินรวม เนื่องจากสารสกัดที่ได้เป็นสารสกัดหยาบที่มีสารออกฤทธิ์หลากหลายชนิดซึ่งแต่ละชนิดมีกลไกในการต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกัน และการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระแต่ละวิธีก็มีกลไกที่แตกต่างกัน โดยในการทดสอบวิธี DPPH และ ABTS เป็นการทดสอบความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการดักจับอนุมูลอิสระ ซึ่งมักจะให้ผลที่สอดคล้องกัน

Table 4 Pearson's correlation coefficients of DPPH and ABTS assays versus total phenolic content (TPC) and total anthocyanin content (TAC).

variable	correlation coefficient (r)	
	DPPH	ABTS
TPC	0.88 [*]	0.72 [*]
TAC	0.82 [*]	0.64 [*]

Note: ^{*} Means significance at $p < 0.05$.

สรุป

จากการศึกษาปริมาณฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu reagent ปริมาณแอนโทไซยานินรวมด้วยวิธี pH differential และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS ในน้ำมะหุดที่อัตราส่วนของน้ำหนักระหว่างมะหุดสดต่อน้ำ เป็น 1:1, 1:2 และ 1:3 ที่ผ่านการต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5, 10 และ 15 นาที รวม 9 ตัวอย่าง พบว่าตัวอย่าง T3 คืออัตราส่วน 1:1 ที่ผ่านการต้ม 15 นาที มีปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณแอนโทไซยานินรวม

และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS สูงที่สุด ส่วนตัวอย่าง T2, T5, T6 และ T1 เป็นตัวอย่างที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระอยู่ในกลุ่มที่สูงกว่าตัวอื่นๆ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง เช่น ค่า pH ของตัวอย่าง และระยะเวลาที่ใช้ในการต้ม เป็นต้น ทำให้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมีความแตกต่างกัน และเมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสถิติระหว่างฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณฟีนอลิกรวม และปริมาณแอนโทไซยานินรวม พบว่า ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟีนอลิกรวมและปริมาณแอนโทไซยานินรวมต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS มีความสัมพันธ์กันในระดับสูง ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 อย่างไรก็ตาม สำหรับการจะพัฒนาต่อยอดผลิตภณช์น้ำมะหุดเพื่อผลิตเป็นเครื่องดื่ม น้ำผลไม้ จึงยังมีปัจจัยอีกหลายประการในระหว่างกระบวนการแปรรูปน้ำผลไม้ ที่มีอิทธิพลต่อปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ไม่ว่าจะเป็นการเก็บรักษาวัตถุดิบ กระบวนการล้าง การให้ความร้อนและระยะเวลาที่เหมาะสม การบรรจุภัณฑ์และการเก็บรักษา ที่ส่งผลต่อปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในน้ำผลไม้ ดังนั้นในการศึกษาวิจัยครั้งต่อไป จึงควรศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในขั้นตอนต่างๆ ของการผลิตน้ำผลไม้ เพื่อให้เป็นแนวทางในการพัฒนาการผลิตน้ำผลไม้ให้ได้ประโยชน์ของสารต้านอนุมูลอิสระที่สูงที่สุด

คำขอบคุณ

งานวิจัยเรื่องนี้ ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) และ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ
ปีงบประมาณ 2559 นอกจากนี้คณะผู้วิจัยต้อง
ขอขอบพระคุณสาขาวิทยาศาสตร์ ในการเอื้อเพื่อ
สถานที่ทำการวิจัย และทรัพยากรสนับสนุนงานวิจัย
อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่องานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- Aninbon, C., Banterng, P., Sanitchon, J., & Songsri, P. (2011). A study of anthocyanin content in black glutinous rice using HPLC and spectrophotometric methods. *Khonkaen AGR. J.*, 39(Special issue), 353-357.
- BGO Plant Databases, The Botanical Garden Organization. (n.d.). *Mahuad*. Retrieved 20 January 2018, from http://www.qsbgo.org/database/botanic_book20full%20option/search_detail.asp?botanic_id=1497 (in Thai)
- Cabrita, L., Fossen, T., & Andersen, O. M. (2000). Colour and stability of the six common anthocyanidin 3-glucosides in aqueous solutions. *Food Chem.*, 68, 101-107.
- Chaovanalokit, A. (2011). Extraction and analysis of anthocyanin. *SWU J Sci. & Tech.*, 6, 26-36. (in Thai)
- Choudhury, A. K. R. (2014). *Principles of colour and appearance measurement*. Cambridge: Woodhead.
- Diaconeasa, Z., Ranga, F., Rugina, D., Leopold, L., Pop, O., Vodnar, D., Cuiibus, L., & Socaciu, C. (2015). Phenolic content and their antioxidant activity in various berries cultivated in Romania. *Bulletin UASVM Food Sci. & Tech.*, 72(1), 99-103.
- Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 00(1), F1.2.1-F1.2.13.
- Hurtado, N. H., Morales, A. L., Gonzalez-Miret, M. L., & Escudero-Gilete, M. L. (2009). Color, pH stability and antioxidant activity of anthocyanin rutinosides isolated from tamarillo fruit (*Solanum betaceum* Cav.). *Food Chem.*, 117, 88-93.
- Kriengsak, T., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Byrne, D. H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J. Food Comp. Anal.*, 19, 669-675.
- Lee, J., Durst, R. W., & Wrolstad, R. E. (2005). Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. *J. AOAC Int.*, 88(5), 1269-1278.
- Lourith, N., Kanlayavattanukul, M., & Chanpirom, S. (2009). Free radical scavenging efficacy of tamarind seed coat and its cosmetics applications. *J. Health Res.*, 23, 159-162.
- Pajareon, S. (2019). Stability of anthocyanin extract from riceberry rice bran encapsulated with rice bran protein concentrate under different pH and heating conditions. *RMUTSB Academic Journal*, 7(2), 205-215. (in Thai)
- Pimrote, K., Teekayu, K., & Sudprasert, P. (2020). Antioxidant activity and inhibition effect on *Pseudomonas aeruginosa* of extracts from Pa-Yom (*Shorea roxburghii* G. Don). *RMUTSB Academic Journal*, 8(1), 15-27. (in Thai)
- Roobha, J. J., Saravanakumar, M., Aravindhan, K. M., & Devi, P. S. (2011). The effect of light, temperature, pH on stability of anthocyanin pigments in *Musa acuminata* bract. *Res. Plant Biol.*, 1, 5-12.

- Shafazila, T. S., Pat, M. L., & Lee, K. H. (2010). Radical scavenging activities of extract and solvent-solvent partition fractions from *Dendrobium Sonia* 'Red Bom' flower. In *Proceeding of International Conference on Science and Social Research* (pp. 762-765). Kuala Lumpur, Malaysia: Universiti Teknologi MARA.
- Sonchai, B. (2009). *Study on the radical scavenging activity of Lepisanthes rubiginosa (Roxb.) Leenh. wine and Melodorum fruticosum Lour. Wine* (Master's thesis). Ubon Ratchathani Rajabhat University, Ubon Ratchathani.
- Thai industrial standards institute (TISI). (2006). *Draft Thai industrial standards (TIS 112-2549) fruit juice: pine juice*. Retrieved 20 January 2018, from http://appdb.tisi.go.th/tis_dev/p3_tis/p3tis.php (in Thai)
- Wangcharoen, W., & Morasuk, W. (2007). Antioxidant capacity and phenolic content of holy basil. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 29(5), 1407-1415.
- Wetwitayaklung, P., Charoenteeraboon, J., Limmatvapirat, C., & Phaechemud, T. (2012). Antioxidant activities of some Thai and exotic fruits cultivated in Thailand. *RJPBCS*, 3(1), 12-21.