



โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การตรวจหา delphinidin-3, 5-diglucoside ในสารสกัด anthocyanin จาก maqui berry ด้วยเทคนิค LC-MS/MS

Determination of delphinidin-3, 5-diglucoside in anthocyanin extract from maqui berry by LC-MS/MS

ชื่อนิสิต นางสาวภารดี อ่อนสำโรง เลขประจำตัว 6033077523

ภาควิชา เคมี

ปีการศึกษา 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การตรวจหา delphinidin-3, 5-diglucoside ในสารสกัด anthocyanin จาก
maqui berry ด้วยเทคนิค LC-MS/MS

Determination of delphinidin-3, 5-diglucoside in anthocyanin
extract from maqui berry by LC-MS/MS

โดย

นางสาวภารดี อ่อนสำโรง

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2563

โครงการ การตรวจหา delphinidin-3, 5-diglucoside ในสารสกัด anthocyanin จาก maqui berry
ด้วยเทคนิค LC-MS/MS

โดย นางสาว ภารดี อ่อนสำโรง

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเคมี ภาควิชาเคมี คณะ
วิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

- | | |
|---|----------------------|
| 1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนวัช อาชวาคม | ประธานกรรมการ |
| 2. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นำพล อินสิน | กรรมการ |
| 3. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พุทธรักษา วรรณสุภากุล | อาจารย์ที่ปรึกษา |
| 4. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภาณุวัฒน์ ผดุงรส | อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม |

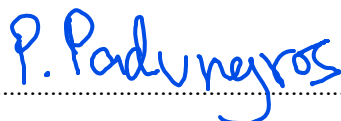
รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี



(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พุทธรักษา วรรณสุภากุล)
อาจารย์ที่ปรึกษา



(รองศาสตราจารย์ ดร. วรวิทย์ โฮเว่น)
หัวหน้าภาควิชาเคมี



(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภาณุวัฒน์ ผดุงรส)
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

วันที่ 15 เดือน ธันวาคม พ.ศ. 2563

ชื่อโครงการ การตรวจหา delphinidin-3,5-diglucoside ในสารสกัด anthocyanin จาก maqui berry ด้วยเทคนิค LC-MS-MS

ชื่อนิติในโครงการ นางสาว ภารดี อ่อนสำโรง เลขประจำตัว 6033077523

ชื่อ อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พุทธิรักษา วรรณสุภากุล (อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก)

ชื่อ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภาณุวัฒน์ ผดุงรส (อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม)

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2563

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาการวิเคราะห์หาปริมาณ delphinidin-3, 5-diglucoside ในสารสกัด anthocyanin จาก maqui berry โดย delphinidin-3, 5-diglucoside เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ที่มีคุณสมบัติช่วยบำรุงสายตา และป้องกันโรคตาแห้ง โดยใช้วิธีการตรวจวิเคราะห์ในเชิงคุณภาพด้วยเทคนิค LC-MS/MS (LC-Triple-quadrupole) และวิเคราะห์ปริมาณ delphinidin-3, 5-diglucoside ในสารสกัดจากผล maqui berry โดยวิธี HPLC-UV (High Performance Liquid Chromatography-Ultraviolet) ได้ 1.18 ± 0.16 % (w/w) และวิธี pH-differential ด้วยสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ได้ 1.62 ± 0.24 % (w/w) เมื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณ delphinidin-3, 5-diglucoside ด้วยวิธี HPLC-UV กับวิธี pH-differential ด้วย t-test พบว่าการวิเคราะห์ทั้งสองวิธีได้ผลการวิเคราะห์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เนื่องจากเทคนิคในการวิเคราะห์ pH-differential มีช่วงการดูดกลืนแสงของ anthocyanin ชนิดอื่นมาทับซ้อนกับ delphinidin-3, 5-diglucoside ทำให้ได้ผลการวิเคราะห์มากกว่าความเป็นจริง

Project Title Determination of delphinidin-3, 5-diglucoside in anthocyanin
extract from maqui berry by LC-MS/MS

Student Name Miss Paradee Onsamrong Student ID 6033077523

Advisor Name Asst.Prof. Puttaruksa Varanusupakul, Ph.D.

Co-advisor Name Asst.Prof. Panuwat Padungros, Ph.D.

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University

Abstract

Quantitative analysis of delphinidin-3, 5-diglucoside in anthocyanin extract from maqui berry was studied in this research. Delphinidin-3, 5-diglucoside is an antioxidant that help nourish eyes and prevent dry eye disease. The qualitative analysis was performed using LC-MS/MS (LC-Triple-quadrupole) technique. In addition, the delphinidin-3, 5-diglucoside in anthocyanin extract from maqui berry were determined by HPLC-UV (High Performance Liquid Chromatography-Ultraviolet) and pH differential using spectrophotometer at wavelength 520 nanometer which reported as 1.18 ± 0.161 %(w/w) and 1.62 ± 0.244 %(w/w), respectively. Comparing these two analysis methods by t-test, the determination of delphinidin-3, 5-diglucoside in anthocyanin extract from maqui berry are significantly different at the 95% confidence level. This might be the positive error in pH-differential method due to the overlapped absorption of other anthocyanins with delphinidin-3, 5-diglucoside.

กิตติกรรมประกาศ

ในการจัดทำโครงการนี้ ต้องขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร. ณสพล โพธิ์วิจิตร ผู้ให้โอกาสให้เข้ามาฝึกงานในบริษัท ดีทีเอก (ประเทศไทย) จำกัด และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พุทธิรักษา วรรณศุภากุล และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภาณุวัฒน์ ผดุงรส ที่ให้คำแนะนำในการทำวิจัย เพื่อแก้ไขปรับปรุง และ ช่วยให้แนวคิดเพื่อ ต่อยอดความรู้ความเข้าใจมากขึ้น ขอขอบคุณพี่ๆ แผนก R&D ของบริษัท ดีทีเอกซ์ (ประเทศไทย) จำกัด ที่คอยให้การช่วยเหลือในหลาย ๆ ด้าน ไม่ว่าจะเป็น ให้ความรู้ แนะนำแนวทางการทดลอง สอนใช้เครื่องมือ LC-MS/MS และ UV-Spectrophotometer ให้ใช้งานได้อย่างถูกวิธี และขอขอบคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่มีส่วนในการทดสอบนิสิตก่อนจบการศึกษา ในการฝึกประสบการณ์ก่อนทำงานจริง

นางสาว ภารดี อ่อนสำโรง

สารบัญ

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญภาพ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ญ
บทที่ 1: บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	2
1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	2
1.4 ขอบเขตการศึกษา.....	2
1.5 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	2
1.5.1 maqui berry	2
1.5.2 anthocyanin.....	3
1.5.2.1 สมบัติทางเคมีของ anthocyanin.....	3
1.5.2.2 การสกัด anthocyanin จากธรรมชาติ	7
1.5.3 การวิเคราะห์ anthocyanin	8
1.5.3.1 เทคนิค pH-differential	8
1.5.3.2 เทคนิค HPLC-UV (High Performance Liquid Chromatography-Ultraviolet).....	9
1.5.3.3 เทคนิค LC-MS/MS (Liquid Chromatography-Triple-quadrupole)	9
บทที่ 2: วิธีการทดลอง	11
2.1 อุปกรณ์.....	11

2.2 สารเคมี	12
2.3 การเตรียมสารละลาย.....	12
2.4 การสารสกัด anthocyanin จาก maqui berry	16
2.5 การตรวจหา delphinidin-3, 5-diglucoside ในสารสกัด anthocyanin	17
2.5.1 วิธี pH-differential.....	17
2.5.2 HPLC-UV (High Performance Liquid Chromatography-Ultraviolet).....	17
2.5.2.1 ภาวะในการวิเคราะห์.....	17
2.5.2.2 การคำนวณความเข้มข้นของ delphinidin-3, 5-diglucoside	18
2.5.3 LC-MS/MS (Liquid Chromatography-Triple-quadrupole).....	18
2.5.3.1 condition ที่เหมาะสม.....	18
2.5.3.2 การคำนวณความเข้มข้นของ delphinidin-3, 5-diglucoside	19
บทที่ 3: ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง.....	20
3.1 การสกัด anthocyanin จาก maqui berry	20
3.2 การหาปริมาณ delphinidin-3, 5-diglucoside ด้วยเทคนิค pH-differential	20
3.2.1 ค่าการดูดกลืนแสงของ anthocyanin ที่ pH 1.0 และ pH 4.5	20
3.2.2 การคำนวณหาปริมาณ delphinidin-3 ,5-diglucoside โดยวิธี pH-differential.....	22
3.3 การหาปริมาณ delphinidin-3, 5-diglucoside ด้วยเทคนิค HPLC-UV	24
3.4 การเปรียบเทียบการหาปริมาณ delphinidin-3, 5-diglucoside ด้วยเทคนิค pH-differential กับ HPLC UV.....	27
3.4.1 การเปรียบเทียบความเที่ยงของการวิเคราะห์ด้วย F-test.....	27
3.4.2 การเปรียบเทียบความเที่ยงของการวิเคราะห์ด้วย T- test	27
3.5 การวิเคราะห์ delphinidin-3, 5-diglucoside ด้วยเทคนิค LC-MS/MS	29
3.5.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมของการวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS	29

3.5.2 การหาสารละลายเจือจางที่เหมาะสม	32
3.5.3 ผลการวิเคราะห์เชิงคุณภาพของ anthocyanin.....	34
3.6 อภิปรายผลการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ	35
บทที่ 4: สรุปผลการทดลอง.....	36
เอกสารอ้างอิง	37
ภาคผนวก	39

สารบัญภาพ

ภาพที่ 1: ประเภทของ anthocyanin	4
ภาพที่ 2: ผลของ pH ต่อโครงสร้างของ anthocyanin.....	5
ภาพที่ 3: ความสัมพันธ์ของอุณหภูมิกับเวลาของ anthocyanin กราฟ a คือกรณีที่มีแสง	6
ภาพที่ 4: ผลของตัวทำละลายในการสกัด anthocyanin.....	7
ภาพที่ 5: การดูดกลืนแสงของ radish anthocyanin ที่ pH 1.0 และ pH 4.5.....	8
ภาพที่ 6: ส่วนประกอบหลักของเครื่อง LC-MS/MS.....	9
ภาพที่ 7: ขั้นตอนการสกัด anthocyanin จาก maqui berry	16
ภาพที่ 8: ขั้นตอนการวิเคราะห์ delphinidin-3, 5-diglucoside ด้วย 3 เทคนิค.....	19
ภาพที่ 9: UV-Vis spectroscopy ของ anthocyanin จากผล maqui berry ในตัวอย่างที่ 1 pH1.0 (3 ซ้ำ)	21
ภาพที่ 10: UV-Vis spectroscopy ของ anthocyanin จากผล maqui berry ในตัวอย่างที่ 1 pH 4.5 (3 ซ้ำ). 21	
ภาพที่ 11: โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน 35% anthocyanin ใน 0.3% trifluoro acetate acid ในน้ำ.....	24
ภาพที่ 12: โครมาโทแกรมของสารสกัดตัวอย่างที่ 1	25
ภาพที่ 13: Calibration curve ของ standard 35% anthocyanin ชนิด delphinidin-3, 5-diglucoside.....	26
ภาพที่ 14: โครมาโทแกรมของการแยก anthocyanin ที่สภาวะการวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS	31
ภาพที่ 15: โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS	33
ภาพที่ 16: ผลการทดลอง mass spectroscopy ของ delphinidin-3,5-diglucoside	34
ภาพที่ 17: การแตกโมเลกุล ของ delphinidin-3, 5-diglucoside	35

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1: anthocyanin ใน maqui berry.....	1
ตารางที่ 2: ความสำคัญของ pH ที่มีต่อโครงสร้างและสีของ anthocyanin ที่ pH ต่าง ๆ	6
ตารางที่ 3: การเตรียมสารละลายมาตรฐานของเทคนิค HPLC-UV	13
ตารางที่ 4: การเตรียมสารละลายมาตรฐานของ anthocyanin สำหรับเทคนิค LC-MS/MS	14
ตารางที่ 5: การหาช่วงความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่เหมาะสม.....	15
ตารางที่ 6: สภาวะการวิเคราะห์ของเทคนิค HPLC (high performance liquid chromatography).....	18
ตารางที่ 7: condition ของ เทคนิค HPLC (high performance liquid chromatography)	19
ตารางที่ 8: น้ำหนักของสารสกัด anthocyanin.....	20
ตารางที่ 9: : ค่าการดูดกลืนแสงของ anthocyanin ด้วยเทคนิค UV-vis spectrophotometer	20
ตารางที่ 10: ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัด anthocyanin ที่ pH 1.0 และ pH 4.5 ตัวอย่างเฉลี่ย	22
ตารางที่ 11: ปริมาณ delphinidin-3, 5-diglucoside ด้วยเทคนิค pH-differential.....	23
ตารางที่ 12: ลำดับการแยกของสารสกัด 35% anthocyanin.....	24
ตารางที่ 13: ผลการวิเคราะห์โครมาโทแกรมของตัวอย่างเฉลี่ย	25
ตารางที่ 14: การวิเคราะห์ปริมาณ delphinidin-3, 5-diglucoside ด้วยเทคนิค HPLC.....	26
ตารางที่ 15: เปรียบเทียบความเที่ยงของการวิเคราะห์ delphinidin-3, 5-diglucoside ด้วยวิธี F-test.....	27
ตารางที่ 16: เปรียบเทียบ %w/w delphinidin-3, 5-diglucoside ด้วยวิธี T-test	27
ตารางที่ 17: สภาวะการวิเคราะห์ anthocyanin ด้วยเทคนิค LC-MS/MS.....	29
ตารางที่ 18: ค่า retention time ของ anthocyanin ที่สภาวะการวิเคราะห์ต่าง ๆ	30
ตารางที่ 19: การเปรียบเทียบตัวทำละลายในการวิเคราะห์สารมาตรฐานและสารสกัด anthocyanin.....	32
ตารางที่ 20: ค่า retention time, m/z และพื้นที่ใต้พีคของการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS.....	34

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

anthocyanin เป็นรงควัตถุหรือสารสี ที่อยู่ในกลุ่มของผลไม้ตระกูลเบอร์รี่ องุ่น ทับทิม ผัก เมล็ด ธัญพืช และพืชตระกูลหัว⁽¹⁴⁾ ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ ที่ช่วยรักษาผู้ที่มีปัญหาสุขภาพเกี่ยวกับ โรคอ้วน โรคหัวใจ โรคมะเร็ง ความดันและโรคเบาหวานปริมาณน้ำตาลในเลือดสูง^(5,7,15) โดย anthocyanin เป็นสารสีที่ละลายน้ำได้ และจัดอยู่ในกลุ่ม flavonoid สีของ anthocyanin จะเปลี่ยนไปตามสภาวะความเป็นกรด-ด่าง โดยเมื่ออยู่ในสภาวะต่าง (pH>7)จะมีสีน้ำเงินเข้มหรืออาจไม่มีสีเลยมีสีม่วงเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นกลาง (pH=7) และจะมีสีแดงถึงแดงเข้มในสภาวะเป็นกรด (pH<7)⁽¹²⁾ สารในกลุ่ม anthocyanin นั้นมีหลายชนิด โดยชนิดที่สามารถพบได้บ่อย คือ cyanidin, delphinidin, peonidin, petunidin, pelargonidin และ malvidin⁽⁵⁾ โดย anthocyanin ที่กล่าวไปข้างต้นจะอยู่ในพืชที่แตกต่างกัน เช่น cyanidin พบได้ใน black berry, raspberries, elderberries, red cabbage หรือ delphinidin พบได้ใน blackcurrants, blueberries และ maqui berry เป็นต้น

ในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยสนใจสารสกัด anthocyanin จาก maqui berry เนื่องจากมีการรายงานว่า maqui berry มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระมากกว่าพืชกลุ่มอื่น ๆ โดย maqui berry มี anthocyanin ที่เป็นองค์ประกอบหลัก ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1: anthocyanin ใน maqui berry

ประเภท anthocyanin	ชนิด anthocyanin
delphinidin	delphinidin-3-sambubioside-5-glucoside
	delphinidin-3, 5-diglucoside
	delphinidin-3-sambubioside
	delphinidin-3-glucoside
cyanidin	cyanidin-3-sambubioside-5-glucoside
	cyanidin-3, 5-diglucoside
	cyanidin-3-sambubioside
	cyanidin-3-sambubioside

สาร anthocyanin ที่สนใจศึกษาในงานวิจัยนี้คือ delphinidin-3, 5-diglucoside เนื่องจากเป็นโมเลกุลที่มีคุณสมบัติช่วยออกฤทธิ์ยับยั้งโรคตาแห้งทางสายตา และเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยศึกษาเทคนิคในการวิเคราะห์ 3 เทคนิคคือ LC-MS/MS (Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry), HPLC-UV (High Performance Liquid Chromatography-Ultraviolet) และ เทคนิค pH-differential ด้วย UV-Spectrophotometer

1.2 วัตถุประสงค์

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณ delphinidin-3, 5-diglucoside ในสารสกัด maqui berry ด้วยเทคนิค LC-MS/MS

1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

ได้วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณ delphinidin-3, 5-diglucoside โดยใช้เทคนิค LC-MS-MS

1.4 ขอบเขตการศึกษา

ศึกษาการสกัด anthocyanin จาก maqui berry และตรวจวัดปริมาณ anthocyanin โดยเน้นตรวจวัด delphinidin-3, 5-diglucoside ด้วยเครื่องมือ LC-MS-MS และนำมาเปรียบเทียบกับ การตรวจวัดปริมาณด้วยวิธี pH – differential และ HPLC-UV

1.5 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1.5.1 maqui berry

maqui berry เป็นพืชดอกในสกุล “*Aristotelia*” กลุ่มเดียวกับ blueberry, black berry currants, acai, raspberry และ elderberries โดยผลของ maqui berry มีสีม่วงเข้มจนถึงดำ มีลักษณะต้นเป็นพุ่มไม้ ขนาดใหญ่ที่มีความสูงถึง 5 เมตร เจริญเติบโตในป่าพาทาโกเนียของประเทศชิลี และบางส่วนในประเทศอาเจนตินา⁽⁹⁾ ชาวอินเดียนแดง ชนเผ่า mapuche ในแถบทวีปอเมริกาใต้ รู้จักและใช้ประโยชน์จาก maqui berry มาเป็นเวลานานหลาย ดังนั้นชนเผ่า mapuche จึงยกย่อง maqui berry เป็นสัญลักษณ์ของความแข็งแรง สุขภาพดี สดชื่น และมีชีวิตชีวา⁽¹³⁾

maqui berry มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ และมีรายงานว่ามีความต้านอนุมูลอิสระมากกว่าพืชหลายชนิด เช่น มากกว่ามะนาว 20 เท่า, brack current 3.5 เท่า และ blueberry 2.9 เท่า โดยวัดจากปริมาณ ORAL (Oxygen Radical Absorbance Capacity) หรือค่าความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระ พืชที่มีค่า

ORAL สูงจะมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ ช่วยป้องกันโรคที่มีสาเหตุจากอนุมูลอิสระ เช่น โรคมะเร็ง โรคหัวใจ และปกป้องเซลล์ให้ปลอดภัยจากการถูกทำลาย ซึ่งเรียกว่าการปิดกั้นการเกิดอนุมูลอิสระของเซลล์ได้ดี ช่วยชะลอความเสื่อมของร่างกาย ต่อด้านริ้วรอย เสริมสร้างภูมิคุ้มกัน ช่วยควบคุมน้ำหนัก ช่วยการนอนหลับสนิท (5,15) เป็นต้น

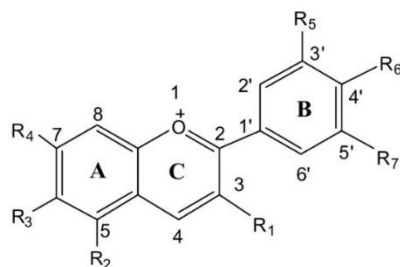
1.5.2 anthocyanin

anthocyanin เป็นรงควัตถุหรือสารสี ที่ให้สีแดง ม่วง และน้ำเงิน ใช้เป็นสารให้สีธรรมชาติในอาหาร สารสกัด anthocyanin เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ช่วยชะลอความเสื่อมของเซลล์ ช่วยลดอัตราเสี่ยงของการเกิดโรคหัวใจและเส้นเลือดอุดตันในสมอง ด้วยการยับยั้งไม่ให้เลือดจับตัวเป็นก้อน ชะลอความเสื่อมของดวงตา ช่วยยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค *Escherichia coli* ในระบบทางเดินอาหาร⁽¹⁰⁾

1.5.2.1 สมบัติทางเคมีของ anthocyanin

Anthocyanin เป็นสารประกอบพวก Flavonoid ละลายในตัวทำละลายที่มีขี้ว โดยทั่วไปจะอยู่ในรูปของ flavylium salt หรือ 2-phenylbenzopyrylium salt ในโครงสร้างประกอบด้วยวง benzene 2 วง คือวง A และ B โดยมีการนับตำแหน่งตามภาพที่ 1⁽⁶⁾

โครงสร้างที่ไม่มีน้ำตาล จะเรียกว่า anthocyanidin เมื่อมีน้ำตาลที่ตำแหน่ง 3,5 หรือ 7 จะถูกเรียกว่า anthocyanin สามารถแบ่งประเภทตามหมู่แทนที่ R_1-R_7 ตามตารางในภาพที่ 1



General anthocyanins structure

Name	Abbreviation	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6	R_7
Cyanidin	Cy	OH	OH	H	OH	OH	OH	H
Delphinidin	Dp	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH
Malvidin	Mv	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OMe
Pelargonidin	Pg	OH	OH	H	OH	H	OH	H
Peonidin	Pn	OH	OH	H	OH	OMe	OH	H
Petunidin	Pt	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OH

ภาพที่ 1: ประเภทของ anthocyanin

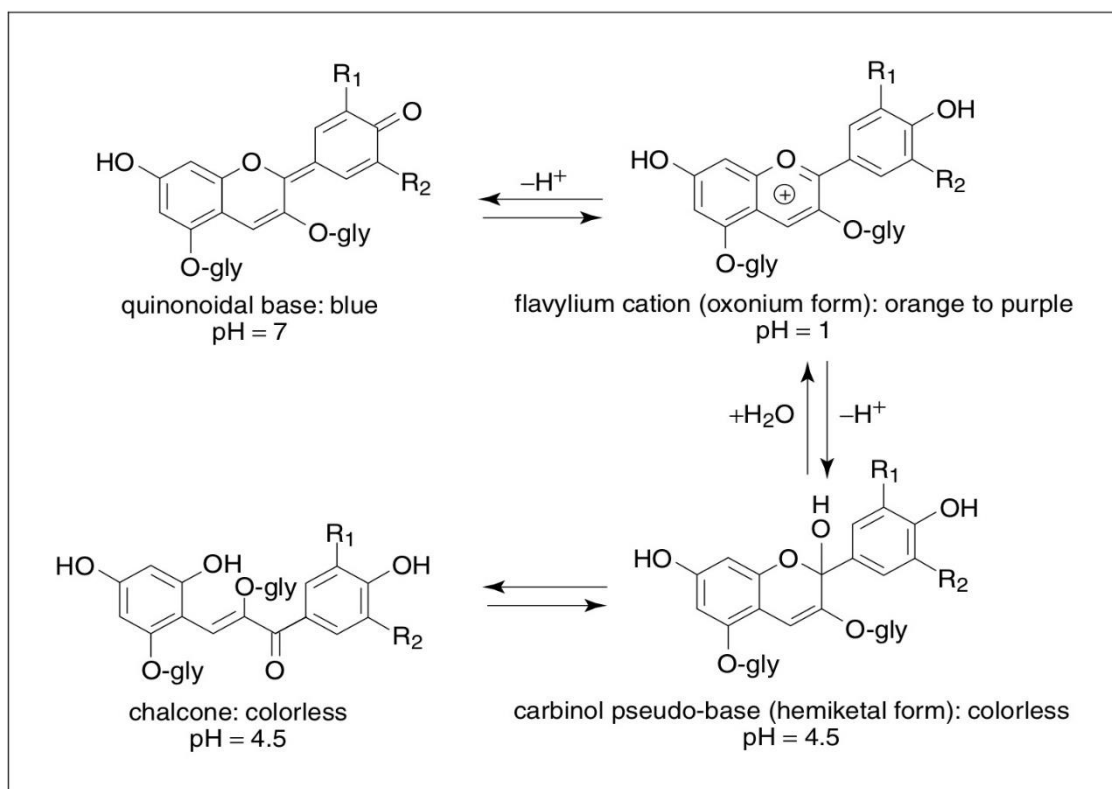
ที่มา: Araceli Castaneda-Ovando (2012)

Anthocyanin จะปรากฏสีได้ดี ในภาวะที่เป็นกรด pH 1 โดยประจุบวกของออกซิเจนในวงเฮเทอโรไซคลิก จะย้ายตำแหน่งระหว่างพันธะคู่ทั้ง 8 ในชั้นพายอิเล็กตรอน ช่วงการดูดกลืนของ flavonoid แบ่งออกเป็น 2 ช่วง

ช่วงที่ 1 ดูดกลืนความยาวคลื่นที่สามารถมองเห็น (Visible) ของพันธะคู่ในวงแหวน B ในช่วงความยาวคลื่น 465 ถึง 550 nm

ช่วงที่ 2 ดูดกลืนความยาวคลื่นช่วง ultraviolet ของพันธะคู่ในวงแหวน A ช่วงความยาวคลื่น 270 ถึง 280 nm

เมื่อ pH เปลี่ยนโครงสร้างของวงแหวน A และ B จะเปลี่ยนไป จึงเป็นเหตุผลทำให้สีของ anthocyanin เปลี่ยนไป⁽¹²⁾ ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2: ผลของ pH ต่อโครงสร้างของ anthocyanin

ที่มา: M.Monica Giusti และ Ronald E. Wrolstad (2001)

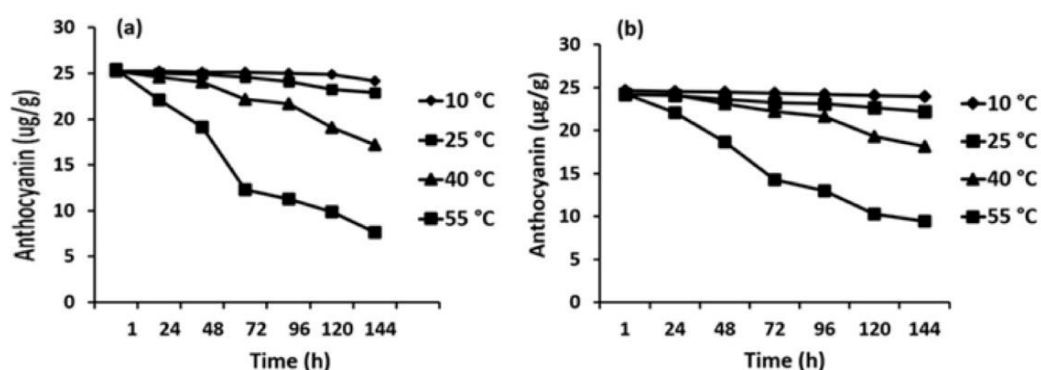
anthocyanin มีเสถียรภาพดีเมื่ออยู่ในสารละลายที่มี pH ต่ำ ๆ โดยค่าความเข้มข้นของสีจะแปรผันตามค่า pH ดังนั้น ความเข้มข้นของสีที่มากที่สุดคือ pH=1.0 และลดลงเมื่อมี pH สูงขึ้น โครงสร้างและสีของ anthocyanin จะเปลี่ยนแปลงดังตารางที่ 2⁽¹²⁾

ตารางที่ 2: ความสำคัญของ pH ที่มีต่อโครงสร้างและสีของ anthocyanin ที่ pH ต่าง ๆ

ช่วง pH	สีของ anthocyanin	ชื่อโครงสร้าง
$\text{pH} \leq 1.0$	แดง	Flavylium salts
$\text{pH} = 4.0-5.0$	ไม่มีสี	Pseudobases
$\text{pH} = 5.0-7.0$	ม่วง	Quinoidal anhydrobases
$\text{pH} = 7.0-8.0$	น้ำเงินเข้ม	Ionization anhydrobases
$\text{pH} \geq 12.0$	น้ำตาล	Chalcones

ที่มา: การสกัดและการทำให้สารแอนโทไซยานินในลูกหว้าบริสุทธิ์ โดย สุวิชา 2555

ปัจจัยอื่นที่มีผลต่อปริมาณ anthocyanin คือ อุณหภูมิและแสงโดยมีผลต่อการสลายตัวของ anthocyanin ปริมาณ anthocyanin จะน้อยลง เมื่อได้รับความร้อนที่อุณหภูมิสูง ๆ หรือโดนแสง ดังแสดงในงานวิจัยของ Marvi Kanwal และคณะ⁽¹¹⁾

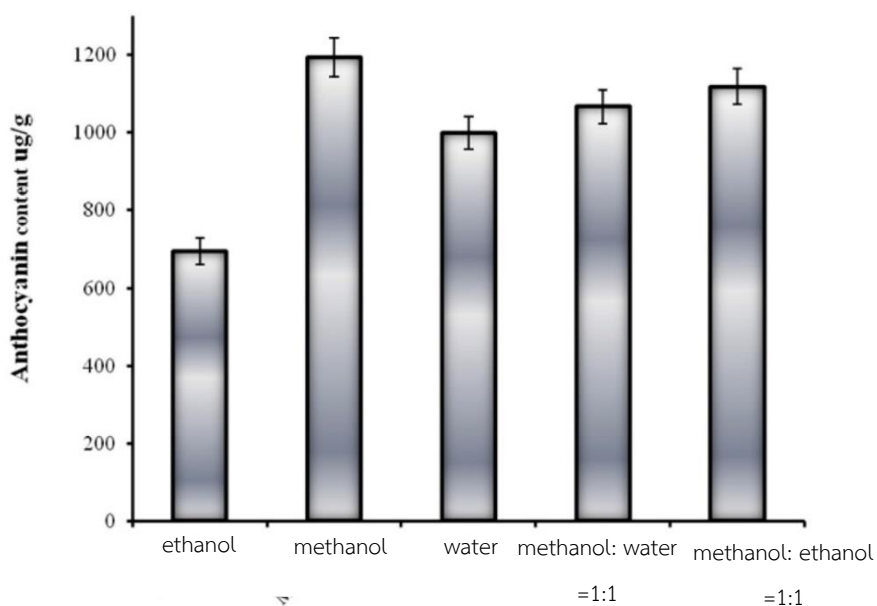


ภาพที่ 3: ความสัมพันธ์ของอุณหภูมิกับเวลาของ anthocyanin กราฟ a คือกรณีที่มีแสง

จากภาพที่ 3 พบว่าเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นและมีแสง ปริมาณของ anthocyanin จะลดลง ในขณะที่เดียวกัน หากอุณหภูมิต่ำและถูกเก็บในที่มืด ปริมาณ anthocyanin จะมีปริมาณมากที่สุด

1.5.2.2 การสกัด anthocyanin จากธรรมชาติ

สารที่นำมาสกัดแต่ละชนิดจะได้ปริมาณ anthocyanin ที่แตกต่างกัน โดยงานส่วนมากนิยมใช้ methanol ในการสกัด anthocyanin เนื่องจาก methanol⁽⁹⁾ เป็นตัวทำละลายที่สกัด anthocyanin ได้ดีที่สุด เมื่อเทียบกับตัวทำละลายตัวอื่น ๆ⁽¹¹⁾ ดังภาพที่ 4



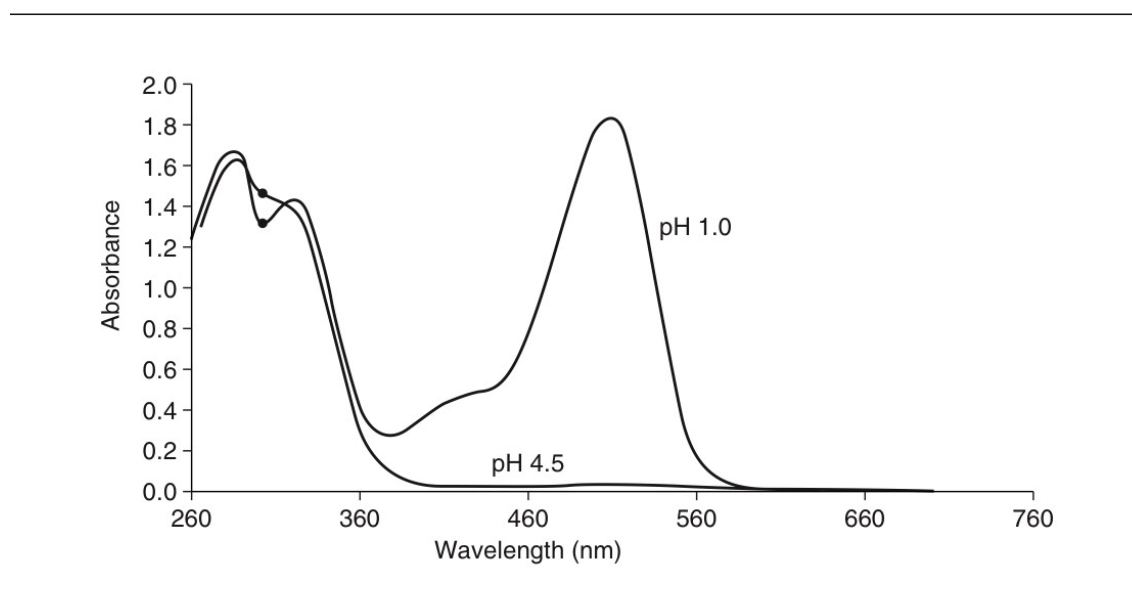
ภาพที่ 4: ผลของตัวทำละลายในการสกัด anthocyanin

ที่มา: Farah Naz (2018)

1.5.3 การวิเคราะห์ anthocyanin

1.5.3.1 เทคนิค pH-differential

UV-vis spectrophotometer เป็นเครื่องมือที่ใช้สำหรับตรวจหาปริมาณสาร โดยอาศัยหลักการของการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่าง ๆ ในช่วง UV และช่วง visible



ภาพที่ 5: การดูดกลืนแสงของ radish anthocyanin ที่ pH 1.0 และ pH 4.5

เทคนิค pH-differential เป็นเทคนิคที่วัดค่าการดูดกลืนแสงของ anthocyanin หรือสารสี โดยวัดความยาวคลื่นที่ pH 1.0 และ 4.5 เนื่องจาก pH 1.0 เป็นช่วงความเป็นกรดเบสที่ทำให้ anthocyanin อยู่ในรูปของ oxonium form ซึ่งเป็นโมเลกุลที่เสถียรที่สุด มีการดูดกลืนแสงได้มากที่สุด ในขณะที่ anthocyanin ช่วง pH 4.5 จะอยู่ในรูป chalcone ซึ่งเป็นโมเลกุลที่ไม่มีสี

จากค่าการดูดกลืนแสง ที่ pH 1.0 และ 4.5 สามารถคำนวณความเข้มข้นของ anthocyanin ได้จากสมการ (1)

$$\text{ปริมาณ anthocyanin(mg/l)} = (A \times MW \times DF \times 1000) / (\epsilon \times l) \quad \text{-----(1)}$$

กำหนดให้ A คือค่าการดูดกลืนแสง, MW คือ มวลโมเลกุลของ anthocyanin, ϵ คือค่า molar absorb, DF คือ dilution factor หรือ ค่าการเจือจางสารตัวอย่าง = (ปริมาณสารตัวอย่าง+ปริมาณบัฟเฟอร์)/ปริมาณสารตัวอย่าง โดยค่าการดูดกลืนแสงตรวจวัดจากเครื่องมือ UV-spectrophotometer ด้วยเทคนิค pH-differential ดังสมการ (2)

$$A = (A_{\max} - A_{700})_{\text{pH}1.0} - (A_{\max} - A_{700})_{\text{pH}4.5} \text{ -----(2)}$$

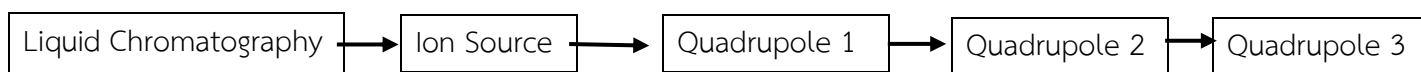
จากสมการคือสมการการดูดกลืนแสงของ anthocyanin ในช่วงความยาวคลื่น 400-700 nm เป็นสมการที่กำหนดตัวรบกวนซึ่งคือสารกลุ่ม melanoidin ที่เกิดมาจากการสลายตัวของ anthocyanin ซึ่งจะมีช่วงการดูดกลืนแสงช่วงเดียวกับ anthocyanin ดังนั้นในสมการจึงวิเคราะห์โครงสร้างของ anthocyanin ที่ pH 1.00 และ 4.5 เนื่องจาก โครงสร้าง anthocyanin ที่ pH 1.0 anthocyanin จะอยู่ในรูปของ oxonium form ซึ่งเป็นโครงสร้างที่เสถียรจึงมีค่าการดูดกลืนแสงของ anthocyanin สูงที่สุด ส่วนช่วงความยาวคลื่น pH 4.5 anthocyanin จะอยู่ในรูป hemiketal form โดยโครงสร้างจะไม่มีสี จึงเป็นเพียงการดูดกลืนแสงของสารกลุ่ม melanoidin เมื่อนำทั้ง 2 ความยาวคลื่นมาหักลบกันจึงเป็นการหักลบความคาดเคลื่อน ส่วนการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น ความยาวคลื่นสูงสุดและ 700 nm เป็นการหักลบตัวรบกวนเช่นเดียวกัน แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงแทนลงในสมการ เพื่อหาปริมาณของ anthocyanin

1.5.3.2 เทคนิค HPLC-UV (High Performance Liquid Chromatography-Ultraviolet)

HPLC คือ เทคนิคการแยกองค์ประกอบของสารผสมของเครื่องมือดังกล่าวอาศัยความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ของแต่ละองค์ประกอบของสารผสมบนเฟสคงที่ ภายใต้การพาของเฟสเคลื่อนที่ สำหรับเทคนิค HPLC เฟสคงที่ จะบรรจุอยู่ในคอลัมน์ ส่วนเฟสเคลื่อนที่ คือ สารละลายที่ไหลผ่านคอลัมน์ สารที่ต้องการวิเคราะห์จะถูกพาเข้าสู่คอลัมน์โดยเฟสเคลื่อนที่ เพื่อให้เกิดการแยกสาร โดยอาศัยอันตรกิริยา ระหว่างสารกับเฟสคงที่ที่อยู่ในคอลัมน์ และความสามารถในการละลายในเฟสเคลื่อนที่

1.5.3.3 เทคนิค LC-MS/MS (Liquid Chromatography-Triple-quadrupole)

LC-MS/MS คือเทคนิคเคมีวิเคราะห์ที่อาศัยหลักการแยกสารผสมในสถานะของเหลวด้วยหลักการโครมาโทกราฟี ร่วมกับความสามารถในการวัดมวลสารของเครื่องแมสสเปคโตรมิเตอร์ สำหรับในงานวิจัยนี้จะนำมาใช้วิเคราะห์แยก anthocyanin แต่ละชนิด เพื่อวิเคราะห์การแตกตัวของโมเลกุลเพื่อวิเคราะห์ชนิดของ anthocyanin ทำให้สามารถยืนยันโมเลกุลของสารได้โดยองค์ประกอบของเทคนิค LC-MS/MS แสดงดังภาพที่ 6



ภาพที่ 6: ส่วนประกอบหลักของเครื่อง LC-MS/MS

Mass spectrometry ในงานวิจัยนี้ใช้ส่วนผลิตไอออน (Ion source) แบบ Electrospray ionization Source (ESI) ซึ่งเป็นส่วนผลิตไอออนที่เหมาะสมสำหรับเชื่อมต่อกับเทคนิค liquid chromatography และสามารถประยุกต์ใช้กับการวิเคราะห์ตัวอย่างกลุ่มโมเลกุลของสาร โดยมีขั้นตอนคือ สารตัวอย่างจะอยู่ในสถานะของเหลว จะถูกทำให้กลายเป็นละอองพ่นออกจากปลายแคปิลลารี และให้ศักย์ไฟฟ้า เกิดประจุในหยดละออง แล้วหยดประจุจะถูกทำให้เป็นไอด้วยก๊าซไนโตรเจนร้อน แต่ยังคงเหลือประจุไฟฟ้าบนหยดประจุ จะถูกนำไปวิเคราะห์ประจุและส่งต่อในระบบสุญญากาศ ของ mass spectrometer โดย Electrospray Ionization source มี 2 โหมด คือ ไอออนชนิดบวก และ ไอออนชนิดลบ ภายใต้สภาวะปกติ หรือคือการให้พลังงานเพียงเล็กน้อยเพื่อให้เกิดการแตกตัว แต่ข้อเสียคือ ไม่สามารถทำให้สารตัวอย่างที่มีขั้วเป็นกลางหรือมีขั้วน้อย เช่น ไขมัน ให้เกิดการแตกตัวเป็นประจุได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ในส่วนวิเคราะห์มวล (mass analyzer) ในงานวิจัยนี้ใช้แบบ Quadrupole mass analyzer ซึ่งเป็นส่วนที่วิเคราะห์ค่ามวลต่อประจุ (m/z) โดยมีส่วนประกอบของเครื่องมือ ประกอบด้วยแท่งโลหะ 4 แท่งซึ่งเชื่อมต่อกันทางไฟฟ้า และจัดวางตัวขนานกัน 2 คู่ หลักการทำงานคือ ประจุจากส่วนผลิตไอออน จะถูกโฟกัสด้วย ion optic ให้เคลื่อนที่เข้าในบริเวณช่องว่างตรงกลางระหว่างแท่งทั้งสี่ โดยมีกลไกการแยกประจุด้วยการปรับสนามไฟฟ้าในช่องว่างระหว่างแท่งทั้งสี่ ทำให้ค่ามวลต่อประจุมีค่าหนึ่ง ๆ หากมวลต่อประจุไม่สอดคล้องกับสนามไฟฟ้านั้น ๆ จะเคลื่อนที่ไปชนผนังและไปได้ไม่ถึงส่วนที่ตรวจวัด แท่งโลหะทั้งสี่ต่อเชื่อมกันทางไฟฟ้าจากทั้งกระแสตรงและกระแสสลับ สามารถตรวจสอบค่ามวลต่อประจุที่เฉพาะเจาะจงที่ละค่าได้ โดยการปรับค่าศักย์ไฟฟ้า ข้อดีของเทคนิคคือ ทนทานและรวดเร็วในการวิเคราะห์ สามารถสแกนไอออนตลอดช่วงมวลที่ต้องการวิเคราะห์ จึงเหมาะสมสำหรับเทคนิคโครมาโทกราฟี

สำหรับการวิเคราะห์ของ tandem-MS ในงานวิจัยนี้ใช้โหมด Multiple Reaction Monitoring (MRM) ซึ่งทำการปรับหาค่าที่เหมาะสมสำหรับ ประจุมแม่ (precursor ion) และ ประจุลูก (parent ion) ที่ได้จากการแตกตัวของประจุมแม่ ซึ่งเป็นค่าที่ เฉพาะเจาะจงของประจุมแม่กับประจุลูกคู่ นั้น ๆ โดย quadrupole ที่ 1 จะถูกตั้งค่าความต่างศักย์และความถี่ที่เหมาะสม เพื่อส่งประจุมแม่ ผ่านไปยัง quadrupole ที่ 2 หรือที่เรียกว่า collision cell เพื่อ แตกตัวให้ประจุลูกที่เสถียรและเป็นเอกลักษณ์ เฉพาะ ของประจุมแม่นั้น ๆ จากนั้นส่งไป quadrupole ที่ 3 ซึ่งถูกตั้งค่าความต่างศักย์และความถี่ สำหรับ ประจุลูก แต่ละตัว (product ions) ส่วนใหญ่ประจุมแม่ 1 ตัว จะแตกตัวให้ประจุลูกได้มากกว่า 1 ตัว การวิเคราะห์มวลประเภทนี้เป็นวิธีที่มี specificity และ selectivity สูง และตรวจวัดไอออน ประเภท fragment เหมาะกับงานด้าน drug confirmation testing

บทที่ 2

วิธีการทดลอง

2.1 อุปกรณ์

1. LC-MS/MS รุ่น 8030, (Shimadzu, Japan)
2. HPLC รุ่น LC20, (Shimadzu, Japan)
3. Column: Inersil ODS C-18
4. Guard column (250×4.0 mm)
5. Syringe micro filter 0.22micron, (Lab fil part of alesci, China)
6. Syringe micro filter 0.45micron, (SF-NY-1345-UR)
7. Syringe 5 ml
8. เครื่อง Centrifuge, (TG16-II, China)
9. pH meter, (OHAUS Starter3100, Europe)
10. evaporator, (EYELA N-1000, Japan)
11. UV-vis spectrophotometer, (PG INSTRUMENTS T60UV, Thailand)
12. Ultrasonication, (Elma Schmidbauer GmbH, Germany)
13. เตอบ, (MEX, Italy)
14. Micro pipette ขนาด 1000 μ l
15. pipette ขนาด 5 ml
16. เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง, (Mettler Toledo ZB203G, Japan)
17. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง, (Shimadzu ATX224, Japan)

2.2 สารเคมี

1. Hydrochloric acid, (37%,ACI Labscan, Thailand)
2. Methanol, (99.9%, V.S. chem house, Thailand)
3. Formic acid, (98%, Flasher Scientific, UK)
4. Deionized water หรือ น้ำ DI, (Water Quality UF1812-PS, Thailand)
5. Trifluoroacetic acid (TFA), (99.0%, Tokyo Chemical, Japan)
6. Potassium chloride, (99.5%, QREC, New Zealand)
7. Sodium acetic acid (99.9%, ACI Labscan, Thailand)

2.3 การเตรียมสารละลาย

2.3.1 สารละลาย 5% HCOOH ในน้ำ ปริมาตรรวม 600ml

เตรียม 5% HCOOH จาก 98% HCOOH โดย ตวง 98% HCOOH 30.6 ml และตวงน้ำ DI 569.4 ml (ใช้สำหรับเจือจางสารสกัด anthocyanin ก่อนการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS)

2.3.2 สารละลาย 0.1%HCl ใน methanol ปริมาตรรวม 1100 ml

เตรียม 0.1% HCl จาก 37% HCl โดยตวง 37% HCl 3.00 ml และตวง methanol 1097.0 ml (ใช้สำหรับสกัดสาร anthocyanin จาก maqui berry)

2.3.3 สารละลาย 1.0%HCl ใน methanol ปริมาตรรวม 400 ml

เตรียม 1.0% HCl จาก 37% HCl โดยตวง 37% HCl 10.8 ml และตวง methanol 389.2 ml (ใช้สำหรับเจือจางสารสกัด anthocyanin เพื่อนำไปตรวจวัดการดูดกลืนแสงด้วยเทคนิค pH-differential)

2.3.4 สารละลาย 0.3% TFA ในน้ำ ปริมาตรรวม 400 ml

เตรียม 0.3% TFA จาก 100% TFA โดยตวง 100% TFA 1.2 mL และตวง น้ำ DI 389.2 ml (ใช้สำหรับเจือจางสารสกัด anthocyanin ก่อนการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC-UV)

2.3.5 สารละลายบัฟเฟอร์ pH 1.0 และ pH 4.5

การเตรียมบัฟเฟอร์ pH 1.0:

1. ชั่ง KCl 1.86 g ละลายน้ำกลั่น 980 ml
2. วัด pH โดยการปรับ pH ให้เป็น 1.0 ด้วย HCl
3. นำสารละลายที่เตรียมไว้ นำไปใส่ในขวดกำหนดปริมาตร 1 ลิตร และเติมน้ำจนเต็ม

การเตรียมบัฟเฟอร์ pH 4.5:

1. ชั่ง CH_3COOH 54.43 g ละลายด้วยน้ำกลั่น 960 ml
2. วัด pH โดยการปรับ pH ให้เป็น 4.5 ด้วย HCl
3. นำสารละลายที่เตรียมไว้ นำไปใส่ในขวดกำหนดปริมาตร 1 ลิตร และเติมน้ำกลั่นจนเต็ม

2.3.6 สารละลายสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC-UV

-การเตรียม mobile phases

เตรียม mobile phase A คือ 0.3% trifluoroacetic acid ในน้ำ และ mobile phase B คือ acetonitrile และกรอง mobile phase ด้วยกระดาษกรองขนาด 0.22 μm

-การเตรียมสารละลายมาตรฐาน anthocyanin สำหรับกราฟมาตรฐาน

เตรียม standard stock solution ความเข้มข้น 1000 mg/l โดยชั่งสารมาตรฐาน 35% anthocyanin 0.0286 g ในขวดกำหนดปริมาตร ขนาด 10 ml แล้วเติม 0.3% trifluoroacetic acid ในน้ำจนเต็ม และจึงนำ standard มาเจือจาง 6 ความเข้มข้น ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3: การเตรียมสารละลายมาตรฐานของเทคนิค HPLC-UV

ความเข้มข้น (mg/l)	ปริมาตร stock solution 35% anthocyanin (ml)	ปริมาตร 0.3% trifluoroacetic acid ในน้ำ (ml)
50	2.00	8.00
100	1.00	9.00
200	0.50	9.50
300	0.33	9.67
500	0.20	9.80
600	0.17	9.83

กรองสารละลายด้วย Syringe micro filter ขนาด 0.45 micron ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC-UV

-การเตรียมสารตัวอย่าง

นำสารสกัดตัวอย่างปริมาตร 1.00 ml ปิเปตลงในขวดกำหนดปริมาตรขนาด 10 ml และปรับปริมาตรด้วย 0.3% trifluoroacetic acid ในน้ำจนถึงขีดกำหนดปริมาตร

2.3.7 การเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS

-การเตรียม mobile phases

เตรียม mobile phase A คือ 5% formic acid ในน้ำ และ mobile phase B คือ methanol 600 ml และกรอง mobile phase ด้วยกระดาษกรองขนาด 0.22 μm ก่อนนำไปใช้

-การเตรียมสารละลายมาตรฐาน anthocyanin สำหรับกราฟมาตรฐาน

เตรียม standard stock solution ความเข้มข้น 1000 mg/l โดยชั่งสารมาตรฐาน 35% anthocyanin 0.0286 g ในขวดกำหนดปริมาตร ขนาด 10 ml ละลายและปรับปริมาตรด้วย 5% formic acid ในน้ำ และนำ standard มาเจือจาง 5 ความเข้มข้น ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4: การเตรียมสารละลายมาตรฐานของ anthocyanin สำหรับเทคนิค LC-MS/MS

ความเข้มข้น (ppm)	ปริมาณสารมาตรฐาน 35% anthocyanin (ml)	ปริมาณ 5% formic acid ในน้ำ (ml)
50	0.10	9.90
100	0.20	9.80
200	0.40	9.60
300	0.80	9.20
500	1.60	8.40

กรองสารละลายด้วย Syringe micro filter ขนาด 0.22 micron ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS

-การเตรียมสารตัวอย่าง

นำสารสกัดตัวอย่างมาละลายด้วยน้ำ DI ปริมาตร 10 ml และ sonicate 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จนตัวอย่างละลาย แล้วเจือจางสารละลายตัวอย่างโดยปิเปตสารละลายตัวอย่างลงในขวดกำหนดปริมาตรขนาด 10 ml ปรับปริมาตรด้วย 5% formic acid ในน้ำ จนถึงขีดกำหนดปริมาตร ดังตารางที่ 5

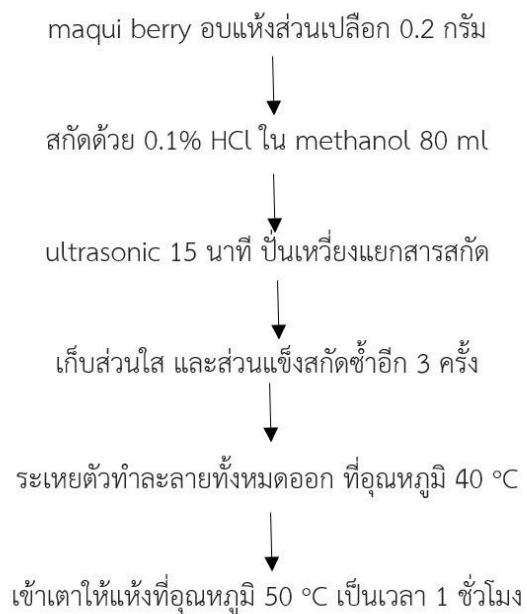
ตารางที่ 5: การหาช่วงความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่เหมาะสม

เจือจาง	สารจาก stock solution (μl)	ปริมาณ 5% formic acid ในน้ำ (ml)
10 เท่า	200	1.800
20 เท่า	100	1.900
50 เท่า	40	1.940
100 เท่า	20	1.980
500 เท่า	4	1.996
1000 เท่า	2	1.998

สาเหตุที่ต้องเจือจางหลายความเข้มข้นเพื่อหาความเข้มข้นของสารสกัด anthocyanin ที่อยู่ในช่วงของกราฟมาตรฐาน

2.4 การสารสกัด anthocyanin จาก maqui berry

นำตัวอย่าง maqui berry ส่วนเปลือกที่อบแห้งแล้ว 0.2 กรัม เติม 0.1% HCl ใน methanol 80 ml ในขวดและปิดฝา นำไปเข้าเครื่องอัลตราโซนิคส์ 15 นาที และเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง ที่ความเร็ว 5000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บสารสกัดของเหลวในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml ส่วนของแข็งนำมาสกัดซ้ำด้วย 0.1% HCl ใน methanol 80 ml อีก 3 ครั้ง รวมสารละลายที่สกัดทั้ง 4 ครั้ง มาระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง evaporator ที่ 40 °C จนแห้งแล้วนำเข้าเตาอบอุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง โดยขั้นตอนการสกัดสรุปได้ดังภาพที่ 7



ภาพที่ 7: ขั้นตอนการสกัด anthocyanin จาก maqui berry

หมายเหตุ: รูปแบบการสกัดอ้างอิงจาก Johanna Elisabeth Brauch และคณะ (2017)

2.5 การตรวจหา delphinidin-3, 5-diglucoside ในสารสกัด anthocyanin

2.5.1 วิธี pH-differential

การเตรียมสารตัวอย่างและวิธีการวิเคราะห์

นำสารสกัดสกัด มาเจือจางด้วย 1.0% HCl ใน methanol ให้มีความเข้มข้น 2000 mg/L โดยปิเปตสารละลายตัวอย่างมา 3.1 ml ลงในขวดกำหนดปริมาตรขนาด 25 ml และปรับปริมาตรด้วย 1.0% HCl ใน methanol จนถึงขีดกำหนดปริมาตร แล้วจึงเจือจางด้วยบัฟเฟอร์ pH 1.0 และ pH 4.5 10 เท่า ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450-700 nm นำค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 และ 700 nm คำนวณหาปริมาณ anthocyanin ตามสมการที่ 1

$$\text{ปริมาณ anthocyanin(mg/L)} = (A \times MW \times DF \times 1000) / (\epsilon \times l)$$

MW คือ มวลโมเลกุลของ anthocyanin

(delphinidin-3,5-diglucoside มีมวลโมเลกุล 627.5 g/mol)

ϵ คือ ค่า molar absorb (delphinidin-3,5-diglucoside มี 40368 L/mol cm)

DF คือ dilution factor หรือ ค่าการเจือจางสารตัวอย่าง

โดย DF = (ปริมาณสารตัวอย่าง + ปริมาตรบัฟเฟอร์) / ปริมาตรสารตัวอย่าง

โดยในการทดลองนี้ใช้สารตัวอย่างปริมาณ 0.3 ml และ ปริมาตรบัฟเฟอร์ 2.7 ml ดังนั้นค่าการเจือจางสารตัวอย่าง = $(0.3 + 2.7) / 0.3 = 10$ เท่า

$$A = (A_{\max} - A_{700})_{\text{pH}1.0} - (A_{\max} - A_{700})_{\text{pH}4.5}$$

A_{\max} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ anthocyanin แต่ละชนิดที่สูงที่สุดที่ความยาวคลื่นต่าง ๆ

2.5.2 HPLC-UV (High Performance Liquid Chromatography-Ultraviolet)

2.5.2.1 ภาวะในการวิเคราะห์

column: C18 BDS (100 mm × 4.6 mm, 2.4 mm)

flowrate: 0.7 mL/min

temperature: 30 °C

injection volume: 20 μ L

mobile phase:

mobile phases A: 0.3% trifluoroacetic acid (TFA)

mobile phases B: acetonitrile (ACN)

detector: UV-visible ที่ความยาวคลื่น 520 nm

ตารางที่ 6: สภาวะการวิเคราะห์ของเทคนิค HPLC (high performance liquid chromatography)

ช่วงเวลา (นาที)	% mobile phase B
0-4	0-5%
4-27	5-15%
27-47	15-55%
47-48	55-90%
48-50	90% คงที่
50-51	90-95%
51-60	95% คงที่

2.5.2.2 การคำนวณความเข้มข้นของ delphinidin-3, 5-diglucoside

คำนวณหาปริมาณของ delphinidin-3,5-diglucoside จากพื้นที่ใต้กราฟของ delphinidin-3,5-glucoside แทนลงในสมการของ กราฟมาตรฐานโดยกำหนดให้ แกน y คือ พื้นที่ใต้กราฟ และแกน x คือความเข้มข้นของสารละลาย delphinidin-3,5-diglucoside

2.5.3 LC-MS/MS (Liquid Chromatography-Triple-quadrupole)

2.5.3.1 condition ที่เหมาะสม

column: linersil ODS C-18 (100 mm \times 4.6 mm, 2.4 mm)

flowrate: 0.2 mL/min

temperature: 30 $^{\circ}$ C

injection volume: 0.5 μ L

mobile phases A: 5% formic acid ในน้ำ

mobile phases B: methanol

detector: mass spectrometer

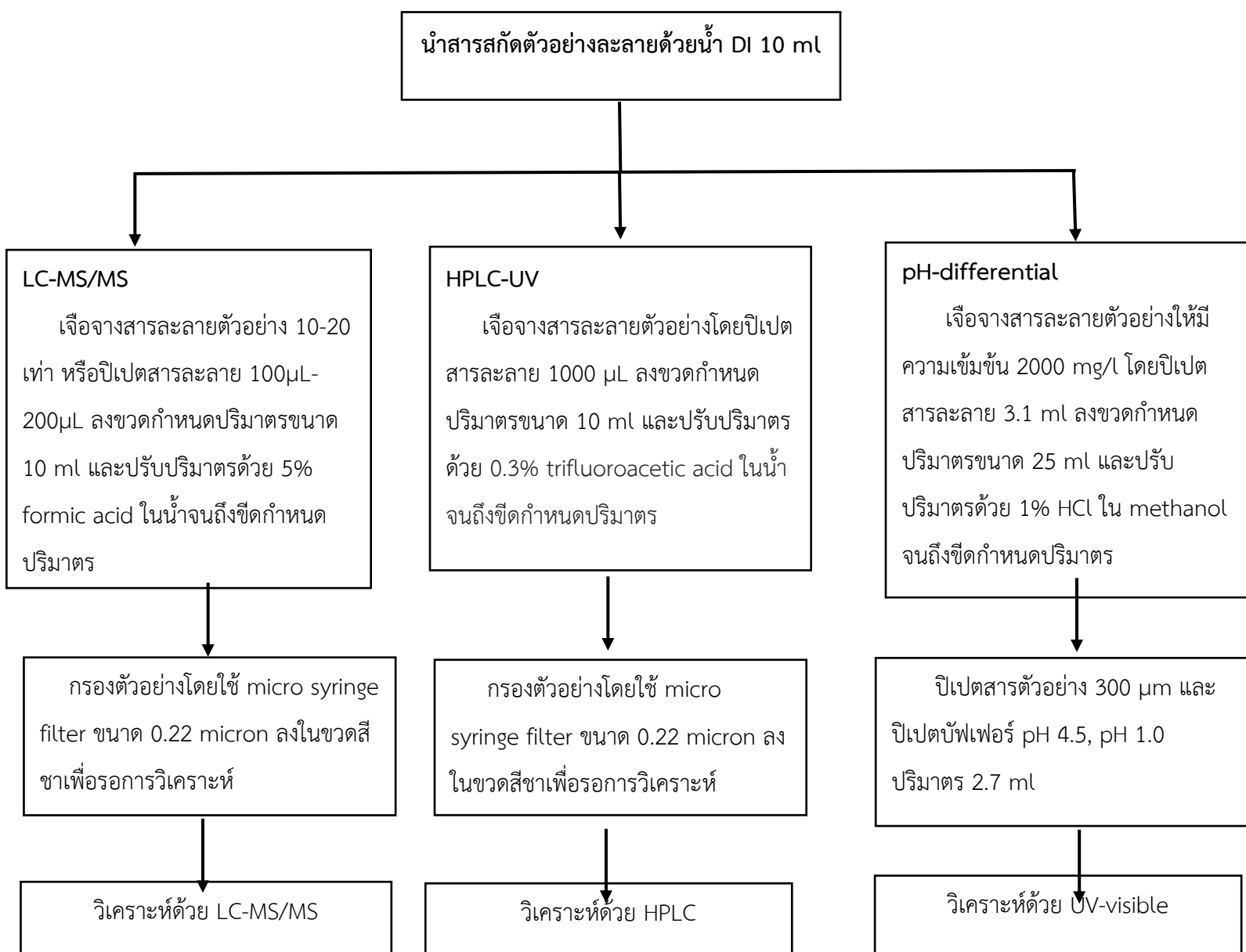
MS mode: (+) positive ion ESI scan 100-1500 m/Z

ตารางที่ 7: condition ของ เทคนิค HPLC (high performance liquid chromatography)

ช่วงเวลา (นาที)	% mobile phase B
0-12	15-30%
12-20	30% คงที่

2.5.3.2 การคำนวณความเข้มข้นของ delphinidin-3, 5-diglucoside

คำนวณหาปริมาณของ delphinidin-3,5-diglucoside จาก พื้นที่ใต้กราฟของ delphinidin-3,5-glucoside แทนลงในสมการของ calibration curve โดยกำหนดให้ แกน y คือ พื้นที่ใต้กราฟ และแกน x คือความเข้มข้นของสารละลาย delphinidin-3,5-diglucoside



ภาพที่ 8: ขั้นตอนการวิเคราะห์ delphinidin-3, 5-diglucoside ด้วยเทคนิค LC-MS/MS, HPLC-UV และ pH-differential

บทที่ 3

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

3.1 การสกัด anthocyanin จาก maqui berry

ในการสกัด anthocyanin จากส่วนเปลือกของ maqui berry ด้วย 0.1% HCl ใน methanol พบว่าได้ น้ำหนักของสารสกัด เฉลี่ย 1.55 คิดเป็น 77.3% โดยผลน้ำหนักที่ได้มีค่ามากกว่าที่มีการรายงานในงานวิจัยของ Johanna Elisabeth Brauch และคณะ สาเหตุเนื่องจากสารที่สกัดยังคงมีความชื้น เพราะใช้ระยะเวลาในการอบ ส่วนสกัดที่ระเหยแห้งแล้วเพียง 1 ชั่วโมง เพราะความไม่คงตัวของสารจากความร้อน หากใช้ระยะเวลาในอบมากเกินไปจะทำให้ anthocyanin สลายตัวได้

ตารางที่ 8: น้ำหนักของสารสกัด anthocyanin

ตัวอย่างที่	น้ำหนัก anthocyanin ที่ได้ (g)	%recovery
1	0.155	77.5%
2	0.148	74.0%
3	0.161	80.5%

3.2 การหาปริมาณ delphinidin-3, 5-diglucoside ด้วยเทคนิค pH-differential

3.2.1 ค่าการดูดกลืนแสงของ anthocyanin ที่ pH 1.0 และ pH 4.5

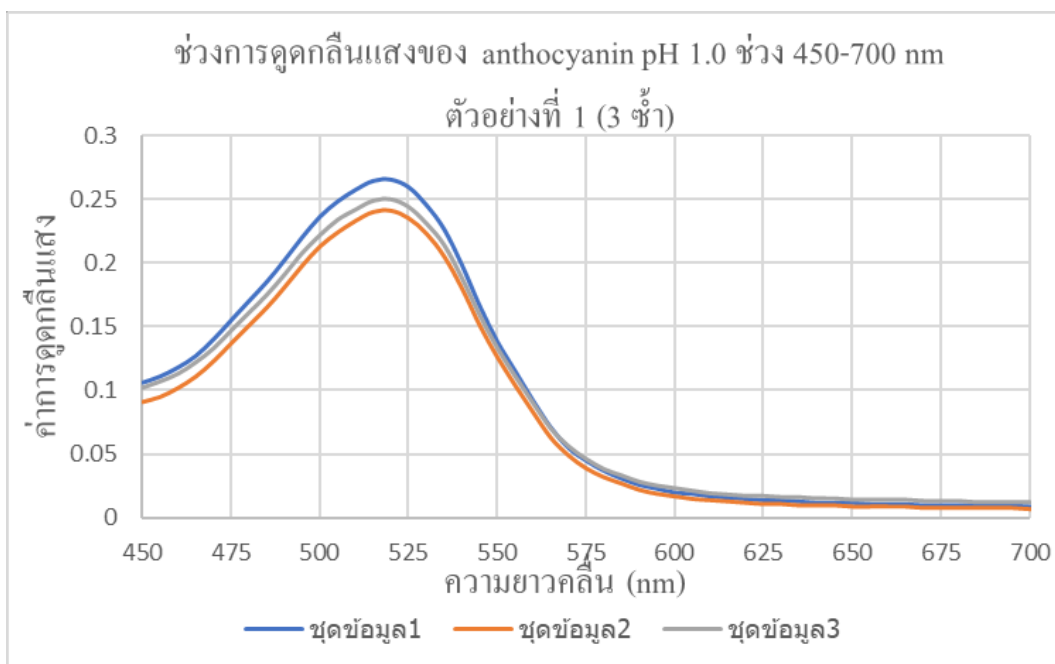
การวิเคราะห์ปริมาณ delphinidin-3,5-diglucoside⁽¹⁷⁾ อ้างอิงตาม Manuela Cristina Pessanha de Araujo SANTIAGO และคณะ ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9: : ค่าการดูดกลืนแสงของ anthocyanin ด้วยเทคนิค UV-vis spectrophotometer

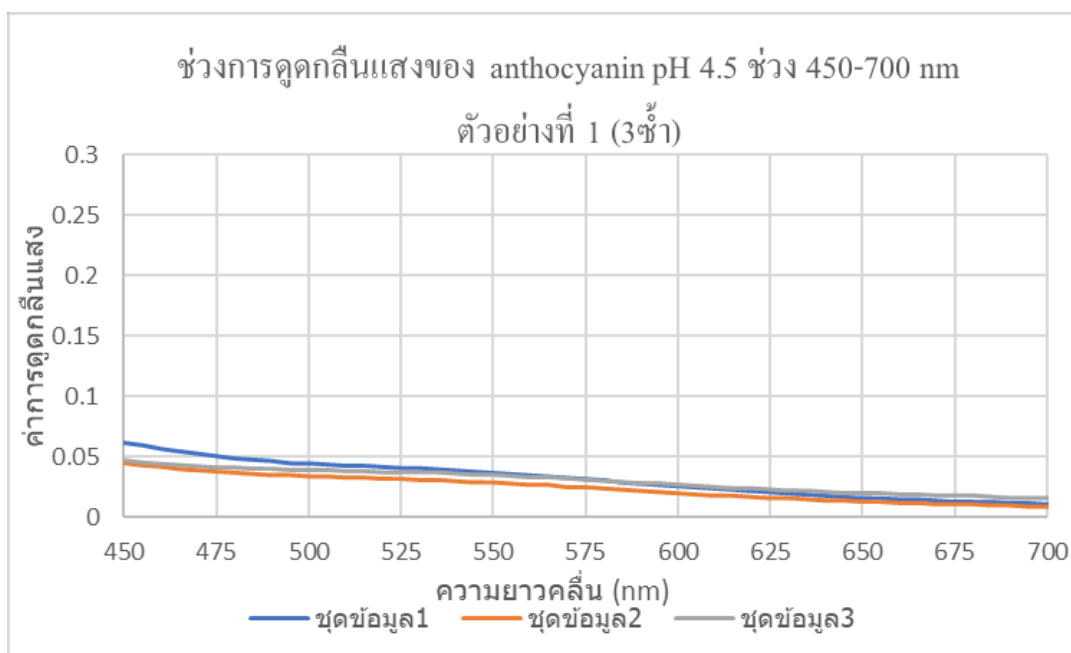
Anthocyanins	λ (nm)	Specific solution	Molar Absorptivity
Delphinidin-3,5-diglucoside	520	1% HCl in MeOH	40368*
Cyanidin-3,5-diglucoside	508.5	1% HCl in MeOH	35000**
Delphinidin-3-glucoside	543	1% HCl in MeOH	29000**
Pelargonidin-3,5-Diglucoside diglucoside	510	1% HCl in MeOH	32360**
Cyanidin-3-glucoside	530	1% HCl in MeOH	34300**
Pelargonidin-3-glucoside	496	1% HCl in H ₂ O	31620**

*Molar absorptivity calculated by spectrophotometry using a commercial analytical standard of the anthocyanin, purchased from Chromadex (USA). **Source: Giusti et al. (1999).

จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดที่ pH 1.0 และ 4.5 ได้ UV Spectrum ดังภาพที่ 9 และ 10 ตามลำดับ



ภาพที่ 9: UV-Vis spectroscopy ของ anthocyanin จากผล maqui berry ในตัวอย่างที่ 1 pH1.0 (3 ซ้ำ)



ภาพที่ 10: UV-Vis spectroscopy ของ anthocyanin จากผล maqui berry ในตัวอย่างที่ 1 pH 4.5 (3 ซ้ำ)

จากตารางที่ 9 ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัด anthocyanin ที่ความยาวคลื่น 530 และ 700 nm เนื่องจากต้องการเปรียบเทียบข้อมูลของ anthocyanin แต่ละชนิดมีแนวโน้มเดียวกันหรือไม่ ได้ผลดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10: ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัด anthocyanin ที่ pH 1.0 และ pH 4.5 ตัวอย่างเฉลี่ย

สารตัวอย่าง	ค่าการดูดกลืนแสงของสาร			
	pH 1.0		pH 4.5	
	530 nm	700 nm	530 nm	700 nm
ครั้งที่ 1	0.283	0.006	0.033	0.009
ครั้งที่ 2	0.281	0.009	0.035	0.01
ครั้งที่ 3	0.289	0.011	0.028	0.015

3.2.2 การคำนวณหาปริมาณ delphinidin-3 ,5-diglucoside โดยวิธี pH-differential

เนื่องจาก anthocyanin แต่ละชนิดจะมีช่วงการดูดกลืนแสงสูงสุดไม่เท่ากัน อีกทั้งช่วงการดูดกลืนแสงของ anthocyanin สามารถเปลี่ยนแปลงได้เมื่อเปลี่ยนตัวทำละลายในการวัด เช่น หากใช้ 1% HCl ใน methanol ในการละลาย delphinidin-3,5-diglucoside จะมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 520 nm แต่ cyanidin-3-glucoside จะมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 530 nm และหากเปลี่ยนตัวทำละลายเป็นบัฟเฟอร์ pH 1.0 ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดจะเปลี่ยนไปเป็น 510 nm เป็นต้น

เหตุผลที่ใช้ pH1.00 และ pH 4.50 เนื่องจาก pH 1.00 เป็น pH ที่ anthocyanin เสถียรที่สุด สารละลายมีลักษณะสีเป็นสีชมพูแดง จึงเป็นช่วงที่มีการดูดกลืนแสงมากที่สุด ในขณะที่ในช่วง pH 4.50 เป็นช่วงที่ anthocyanin เปลี่ยนเป็นสารละลายไม่มีสี ดังนั้นเมื่อวัดการดูดกลืนแสงของ anthocyanin ช่วง pH 4.50 จะเป็นการวัดการดูดกลืนแสงของตัวรบกวนที่ไม่ใช่ส่วนที่ต้องการวัด เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ pH 1.00 และ pH 4.50 มาหักลบกัน จะได้ค่าการดูดกลืนแสงของ anthocyanin ที่ต้องการวัดเพียงอย่างเดียว และเพื่อลดความคลาดเคลื่อนในด้านการวัด จึงวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 2 ค่า คือ ช่วงที่ anthocyanin มีการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) และช่วงที่ anthocyanin ไม่มีการดูดกลืนแสงที่ 700 nm เมื่อนำความยาวคลื่นทั้งสองมาหักลบกัน จะเป็นการวัดความยาวคลื่นของ anthocyanin เพียงอย่างเดียว

$$\text{สูตรการหาค่าการดูดกลืนแสงคือ } A = (A_{\lambda_{\max}} - A_{\lambda_{700\text{nm}}})_{\text{pH}1.00} - (A_{\lambda_{\max}} - A_{\lambda_{700\text{nm}}})_{\text{pH}4.50}$$

เมื่อได้

ค่าการดูดกลืนแสงของ delphinidin-3,5-diglucoside จะสามารถคำนวณความเข้มข้นของสารได้ จากสมการ

$$\text{ปริมาณ anthocyanin (mg/L)} = \frac{(A \times MW \times DF \times 1000)}{(\epsilon \times l)}$$

A คือค่าการดูดกลืนแสงของ anthocyanin ที่ต้องการวิเคราะห์

MW คือ มวลโมเลกุลของ anthocyanin ที่ต้องการวิเคราะห์

เช่น delphinidin-3,5-diglucoside คือ 627.5 g/mol

DF ย่อมาจาก dilution factor คือค่าการเจือจางของสารตัวอย่าง คำนวณจาก $\frac{\text{ปริมาณของสารละลาย}}{\text{ปริมาณของสารตัวอย่าง}}$

ดังนั้นค่า dilution factor คือ $\frac{3.0 \text{ ml}}{0.3 \text{ ml}} = 10$ เท่า

ϵ คือ ค่า molar absorptivity หรือคือ เป็นสมบัติจำเพาะของสารที่ดูดกลืน และวัดที่ความยาวค่าหนึ่ง โดย anthocyanin แต่ละประเภทจะมีค่าไม่เท่ากัน

เช่น delphinidin-3,5-diglucoside มีค่า $40368 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

ส่วน เลข 1 ในส่วนของสมการ คือ ความกว้างของคิวเวท 1 cm

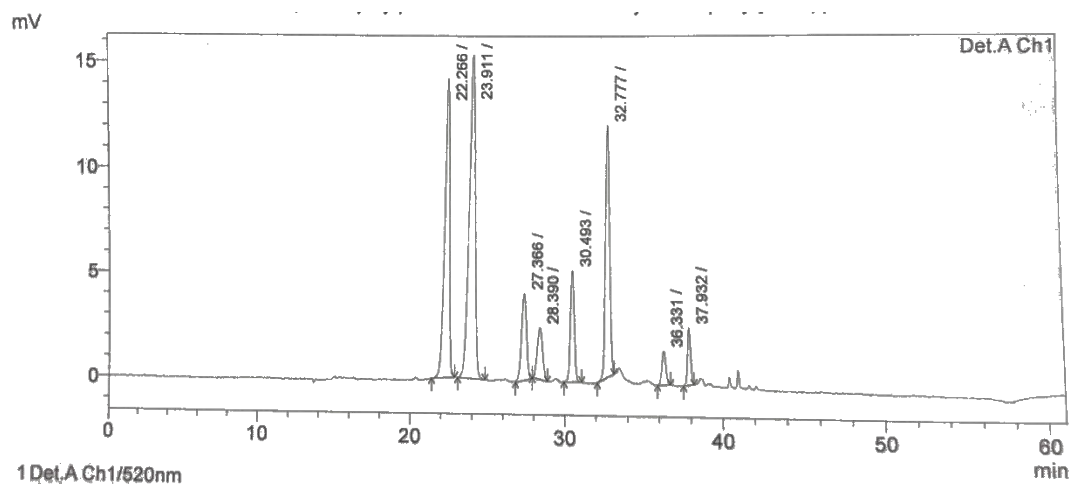
จากค่าการดูดกลืนแสงของสารในตารางที่ 10 คำนวณปริมาณ delphinidin-3, 5-diglucoside ในสารสกัดได้ดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11: ปริมาณ delphinidin-3, 5-diglucoside ด้วยเทคนิค pH-differential

ตัวอย่างที่	ปริมาณ delphinidin-3, 5-diglucoside (%w/w)
1	1.337
2	1.788
3	1.733
เฉลี่ย	1.621 ± 0.244

3.3 การหาปริมาณ delphinidin-3, 5-diglucoside ด้วยเทคนิค HPLC-UV

จากการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน 35% anthocyanin ได้โครมาโทแกรมดังภาพที่ 11 ลำดับการแยกสาร และ retention time ของ anthocyanin 8 ชนิด ดังตารางที่ 12



ภาพที่ 11: โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน 35% anthocyanin ใน 0.3% trifluoro acetate acid ในน้ำ

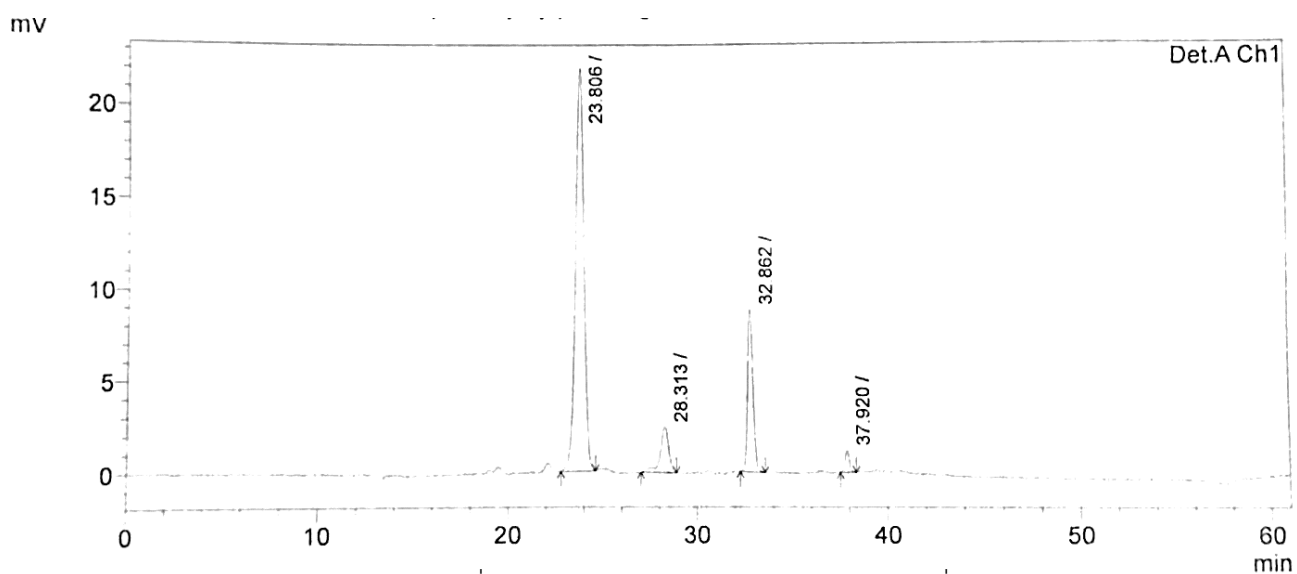
ตารางที่ 12: ลำดับการแยกของสารสกัด 35% anthocyanin

peak	name	Retention time (นาที)
1	Delphinidin-3-sambubioside-5-glucoside	22.3
2	Delphinidin-3,5-diglucoside	23.9
3	Cyanidin-3-sambubioside-5-glucoside	27.4
4	Cyanidin-3,5-diglucoside	28.4
5	Delphinidin-3-sambubioside	30.5
6	Delphinidin-3-glucoside	32.8
7	Cyanidin-3-sambubioside	36.3
8	Cyanidin-3-glucoside	37.9

น้ำมีลำดับการแยกของ anthocyanin แต่ละชนิด ขึ้นกับความมีขั้วของโมเลกุล โมเลกุลที่มีขั้วมากกว่าจะออกมาก่อนโมเลกุลที่มีขั้วน้อยกว่า ดังนั้นสามารถเรียงตามลำดับความมีขั้วจากมากไปน้อยคือ Delphinidin-3-sambubioside-5-glucoside, Delphinidin-3,5-diglucoside, Cyanidin-3-sambubioside-5-glucoside,

Cyanidin-3,5-diglucoside, Delphinidin-3-sambubioside, Delphinidin-3-glucoside, Cyanidin-3-sambubioside และ Cyanidin-3-glucoside ตามลำดับ

เมื่อนำสารสกัด anthocyanin จาก maqui berry มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC-UV ได้โครมาโทแกรม ดังภาพที่ 12 และค่า retention time และพื้นที่ใต้พีคดังตารางที่ 13



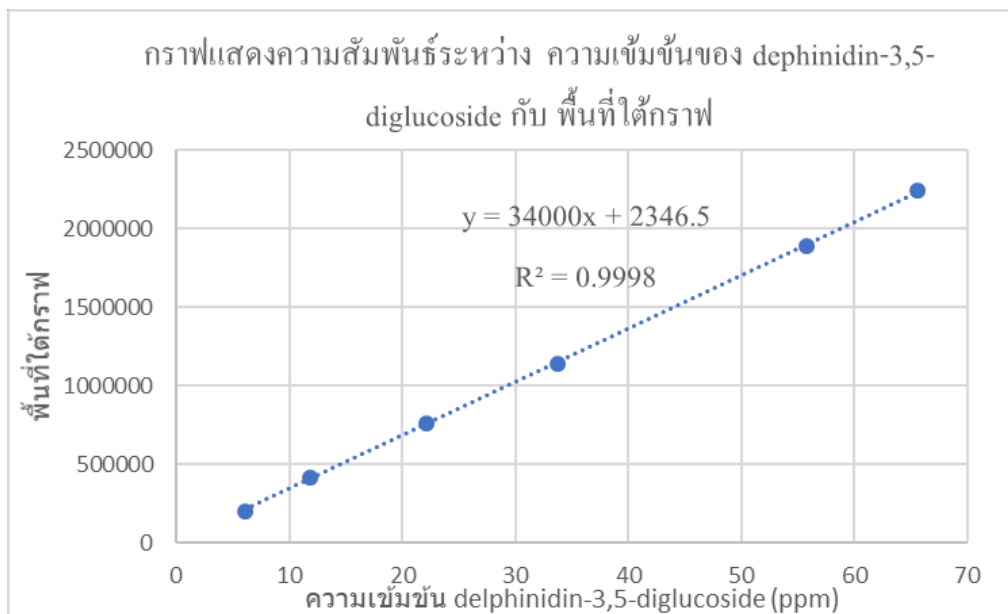
ภาพที่ 12: โครมาโทแกรมของสารสกัดตัวอย่างที่ 1

ตารางที่ 13: ผลการวิเคราะห์โครมาโทแกรมของตัวอย่างเฉลี่ย

peak	name	Retention time (นาที)	Area (m ²)
1	Delphinidin-3,5-diglucoside	23.8	804537
2	Cyanidin-3,5-diglucoside	28.3	62009
3	Delphinidin-3-glucoside	32.8	164089
4	Cyanidin-3-glucoside	39.3	16705
Total	Total anthocyanins	-	1047340

จากโครมาโทแกรมของสารสกัด anthocyanin ของ anthocyanin ทั้งหมด 4 ชนิด คือ Delphinidin-3,5-diglucoside, Cyanidin-3,5-diglucoside, Delphinidin-3-glucoside และ Cyanidin-3-glucoside

กราฟมาตรฐานของ delphinidin-3, 5-diglucoside



ภาพที่ 13: Calibration cure ของ standard 35% anthocyanin ชนิด delphinidin-3, 5-diglucoside

calibration cure ของ delphinidin-3,5-diglucoside เป็นการพล็อตระหว่างความเข้มข้นของ standard 35% anthocyanin ชนิด delphinidin-3,5-diglucoside โดยคำนวณความเข้มข้น delphinidin-3,5-diglucoside จากการเตรียม standard ความเข้มข้น 6.1, 11.8, 22.2, 33.8, 55.8 และ 65.6 $\mu\text{g/ml}$ จะได้กราฟมาตรฐานดังภาพที่ 13 และสมการของกราฟมาตรฐานคือ $Y=34000X+2346.5$, $R^2 = 0.998$ เมื่อกำหนดหาปริมาณ delphinidin-3, 5-diglucoside ในสารสกัดตัวอย่างได้ผลดังตารางที่ 14

ตารางที่ 14: การวิเคราะห์ปริมาณ delphinidin-3, 5-diglucoside ด้วยเทคนิค HPLC

ตัวอย่างที่	Delphinidin-3, 5-diglucoside (%w/w)
1	0.997
2	1.265
3	1.278
เฉลี่ย	1.180

3.4 การเปรียบเทียบการหาปริมาณ delphinidin-3, 5-diglucoside ด้วยเทคนิค pH-differential กับ HPLC UV

3.4.1 การเปรียบเทียบความเที่ยงของการวิเคราะห์ด้วย F-test

ตารางที่ 15: เปรียบเทียบความเที่ยงของการวิเคราะห์ delphinidin-3, 5-diglucoside ด้วยวิธี F-test

ตัวอย่างที่	ปริมาณ delphinidin-3, 5-diglucoside (%w/w)	
	วิธี HPLC	วิธี pH-differential
1	0.997	1.337
2	1.265	1.790
3	1.278	1.730
เฉลี่ย	1.18	1.62

$$S_1^2 = \frac{\sum(X_{i1} - \bar{X})^2}{N_1 - 1} = \frac{(0.997 - 1.18)^2 + (1.27 - 1.18)^2 + (1.28 - 1.18)^2}{3 - 1}$$

$$= 0.0258$$

$$S_2^2 = \frac{\sum(X_{i2} - \bar{X})^2}{N_2 - 1} = \frac{(1.34 - 1.62)^2 + (1.79 - 1.62)^2 + (1.73 - 1.62)^2}{3 - 1}$$

$$= 0.0597$$

$$S_1^2 / S_2^2 = \frac{0.0258}{0.0597} = 0.432$$

ค่าการคำนวณ < ค่าในตาราง คือ $0.432 < 19.0$

ดังนั้นสรุปได้ว่าความเที่ยงของการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC และ pH-differential ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

3.4.2 การเปรียบเทียบความเที่ยงของการวิเคราะห์ด้วย T- test

ตารางที่ 16: เปรียบเทียบ %w/w delphinidin-3, 5-diglucoside ด้วยวิธี T-test

ตัวอย่างที่	ปริมาณ delphinidin-3, 5-diglucoside (%w/w)		
	HPLC	pH-differential	D
1	0.997	1.337	-0.340
2	1.265	1.79	-0.523
3	1.278	1.73	-0.455
\bar{D}			-0.439

$$\begin{aligned}
 SD &= \sqrt{\frac{\Sigma(X-\bar{X})^2}{N-1}} \\
 &= \sqrt{\frac{(-0.340+0.439)^2+(-0.523+0.439)^2+(-0.455+0.439)^2}{3-1}} \\
 &= 0.093 \\
 t &= \frac{\bar{D}\sqrt{N}}{SD} = \frac{-0.439 \times \sqrt{3}}{0.093} \\
 &= -8.18
 \end{aligned}$$

$|t|$ (8.18) เทียบกับ $t_{0.050,2}$

$$8.18 > 2.919986$$

ดังนั้นสรุปได้ว่าผลการวิเคราะห์ปริมาณ delphinidin-3, 5-diglucoside ด้วยวิธี HPLC-UV และ pH-differential แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

จากผลการเปรียบเทียบความแตกต่างของ 2 เทคนิคด้วยวิธี F-test พบว่าทั้ง 2 เทคนิคไม่มีความแตกต่างในระดับความเชื่อมั่นที่ 95% แสดงว่าข้อมูลมีความแม่นยำในการวิเคราะห์เท่ากัน แต่เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างด้วยวิธี T-test พบว่าทั้ง 2 เทคนิคมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในระดับความเชื่อมั่น 95% สาเหตุมาจากความจำกัดของเทคนิค anthocyanin ของ maqui berry มีหลายตัว แต่ละตัวมีช่วงการดูดกลืนแสงสูงสุดในช่วงที่ใกล้เคียงกันหากอ้างอิงตามงานวิจัยของ Araujo SANTIAGO และคณะ พบว่า หากใช้ 1%HCl ใน methanol เป็นตัวทำละลาย Delphinidin-3,5-diglucoside จะดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุดที่ 520 nm, Cyanidin-3,5-diglucoside ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุดที่ 508.5 nm, Delphinidin-3-glucoside ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุดที่ 543 nm, Cyanidin-3-glucoside ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุดที่ 530 nm จะเห็นว่า anthocyanin แต่ละตัวดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุดใกล้เคียงกัน จึงทำให้เมื่อวัดการดูดกลืนแสงของ delphinidin-3,5-diglucoside อาจวัดการดูดกลืนแสงของ anthocyanin ตัวอื่นไปด้วย ทำให้ผลการทดลองเป็น positive หรือได้ ปริมาณ anthocyanin มากกว่าความเป็นจริง แต่เนื่องการวัดด้วยเทคนิค pH-different เป็นเทคนิคที่วิเคราะห์ง่ายและใช้เวลาในการวัดไม่นาน จึงเป็นที่นิยมมากในการวิเคราะห์หาปริมาณโดยประมาณ

3.5 การวิเคราะห์ delphinidin-3, 5-diglucoside ด้วยเทคนิค LC-MS/MS

3.5.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมของการวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS

การทดลองมีการเปรียบเทียบ condition เพื่อหา condition ที่เหมาะสม รวม 5 สภาวะดังตารางที่ 17 และได้โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์แต่ละสภาวะดังภาพที่ 14 และค่า retention time ของ anthocyanin แต่ละชนิดดังตารางที่ 18

ตารางที่ 17: สภาวะการวิเคราะห์ anthocyanin ด้วยเทคนิค LC-MS/MS

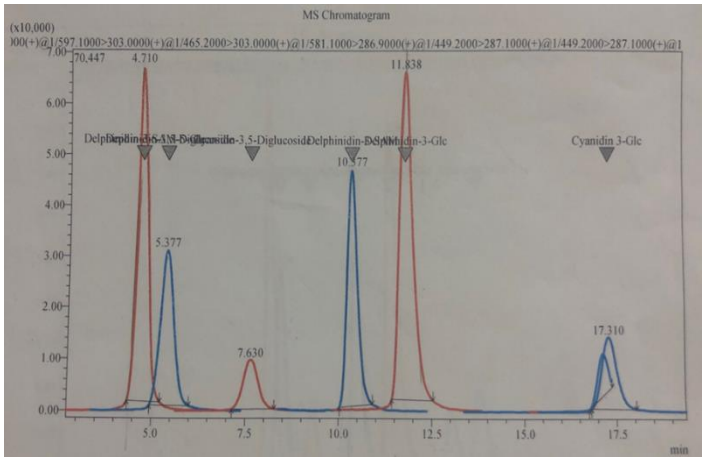
Mobile phases A: 5% formic acid ในน้ำ

Mobile phases B: methanol

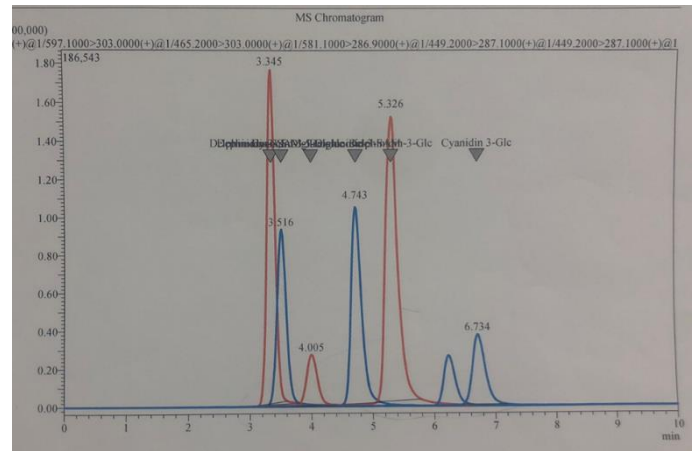
สภาวะที่	ลักษณะสภาวะการวิเคราะห์
1	Time (min): 0-30 min: 18%B Flowrate: 0.3 ml/min
2	Time (min): 0-8 min: 30%B Flowrate: 0.3 ml/min
3	Time (min): 0-8 min: 18-30%B 8-20 min: 30%B คงที่ Flowrate: 0.3 ml/min
4	Time (min): 0-12 min: 15-30%B 12-20 min: 30%B คงที่ Flowrate: 0.3 ml/min
5	Time (min): 0-12 min: 15-30%B 12-20 min: 30%B คงที่ Flowrate: 0.2 ml/min

ตารางที่ 18: ค่า retention time ของ anthocyanin ที่สภาวะการวิเคราะห์ต่าง ๆ

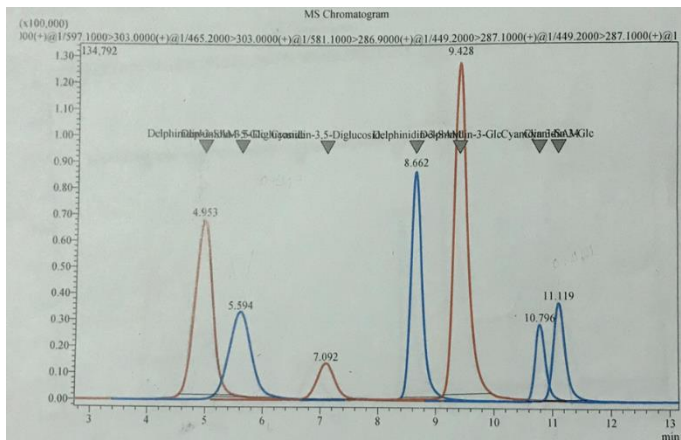
พีค	Compound name	Retention time				
		condition1	condition2	condition3	condition4	condition5
1	Delphinidin-3-sambubioside- 5-glucoside	4.710	3.345	4.953	7.143	8.751
2	Delphinidin-3,5-Diglucoside	5.377	3.516	5.594	7.899	9.821
3	Cyanidin-3,5-Diglucoside	7.630	4.005	7.092	9.407	11.980
4	Delphinidin-3-sambubioside	10.377	4.743	8.662	10.920	14.035
5	Delphinidin-3-glucoside	11.838	5.326	9.428	11.713	15.038
6	Cyanidin-3-sambubioside	-	-	10.796	12.977	16.782
7	Cyanidin-3-glucoside	17.310	6.734	11.119	13.475	17.227



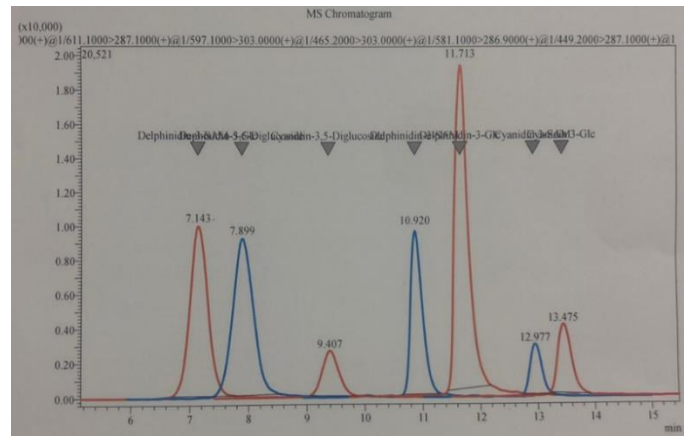
(a) Condition 1



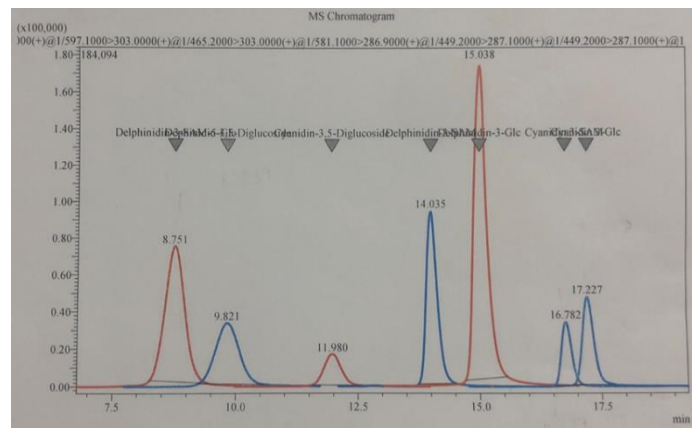
(b) Condition 2



(c) Condition 3



(d) Condition 4



(e) Condition 5

ภาพที่ 14: โครมาโทแกรมของการแยก anthocyanin ที่สภาวะการวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MSต่าง ๆ ตามตารางที่ 18 (a) สภาวะ 1 (b) สภาวะ 2 (c) สภาวะ 3 (d) สภาวะ 4 (e) สภาวะ 5

จากผลการเปรียบเทียบ 5 สภาวะ พบว่า สภาวะที่ 5 เหมาะสมที่สุด เนื่องจาก mobile phases A คือ 5% formic ในน้ำ ซึ่งเป็นสารละลายที่มีขี้้วมากกว่า mobile phase B คือ methanol โดย ชนิดของ anthocyanin ที่แยกออกมาจะเป็นสารที่มีขี้้วมากที่สุด เพราะคอลัมน์ที่ใช้ในการทดลองเป็นคอลัมน์แบบไม่มีขี้้ว ดังนั้นสารที่มีขี้้วจะอยู่ในคอลัมน์ได้น้อยกว่าสารที่ไม่มีขี้้ว ซึ่งจากสภาวะที่ 1-3 เป็นสภาวะที่ช่วงแรกให้ปริมาณของสารละลายไม่มีขี้้วมากเกินไป เป็นผลทำให้ สารที่มีขี้้วน้อยเคลื่อนที่ออกมาจากคอลัมน์ได้เร็วขึ้น จึงทับซ้อนกับสารที่มีขี้้วมาก ดังนั้นการลดปริมาณ methanol ลงในช่วงแรกจะแก้ปัญหาที่ทับซ้อนกันได้ดี หลังจากการแก้ไขพบว่าในสภาวะที่ 4 มีสารสองตัวแรก คือ Delphinidin-3-sambubioside-5-glucoside และ Delphinidin-3,5-Diglucoside มีค่า resolution ที่น้อยกว่า 1 จึงลด Flowrate ของเครื่องลงจาก 3 ml/min เป็น 2 ml/min ผลที่ได้คือ จะได้พีคที่แยกกันได้ดีมากขึ้น ค่า resolution มีค่ามากกว่า 1 ซึ่งแสดงว่า Delphinidin-3,5-Diglucoside แยกออกจาก Delphinidin-3-sambubioside-5-glucoside ได้ดี แต่พีคที่ได้จะมีลักษณะที่บอดลง

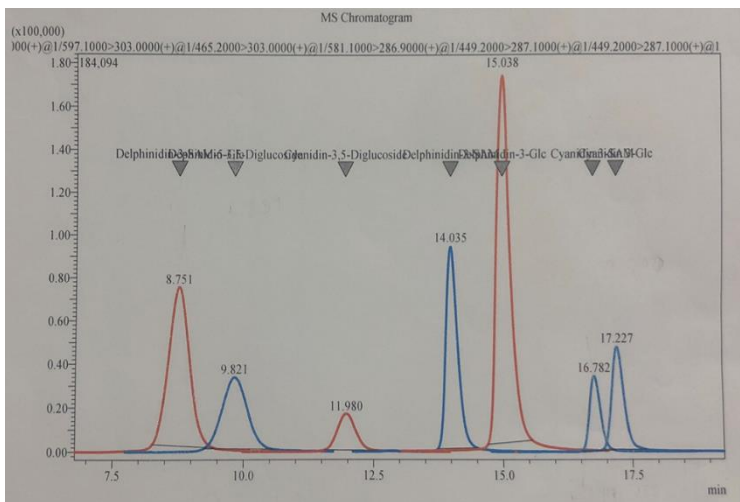
3.5.2 การหาสารละลายเจือจางที่เหมาะสม

ตารางที่ 19: การเปรียบเทียบตัวทำละลายในการวิเคราะห์สารมาตรฐานและสารสกัด anthocyanin

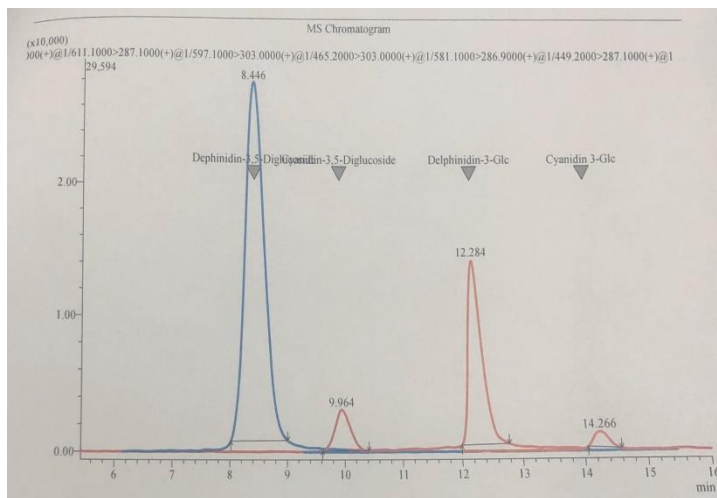
พีค	Compound name	Retention time (นาที)			
		DI water		5% formic acid in water	
		maqui berry extract	35% anthocyanin standard	maqui berry extract	35% anthocyanin standard
1	Delphinidin-3-sambubioside-5-glucoside	-	8.751	-	7.724
2	Delphinidin-3,5-Diglucoside	8.214	9.821	8.446	8.429
3	Cyanidin-3,5-Diglucoside	9.758	11.980	9.964	9.942
4	Delphinidin-3-sambubioside	-	14.035	-	11.433
5	Delphinidin-3-glucoside	12.098	15.038	12.284	12.211
6	Cyanidin-3-sambubioside	-	16.782	-	13.636
7	Cyanidin-3-glucoside	14.012	17.227	14.266	14.207

จากผลการทดลองเปรียบเทียบตัวทำละลายเจือจางสาร anthocyanin ก่อนจะนำฉีดเข้าเครื่องวิเคราะห์ พบว่าตัวทำละลาย 5% formic acid ในน้ำมีคุณสมบัติที่ดีกว่า เนื่องจาก หากเปรียบเทียบตัวทำละลายซึ่งคือน้ำที่เจือจางสารสกัด anthocyanin กับ สารมาตรฐาน anthocyanin พบว่าระยะเวลาการออกจากคอลัมน์

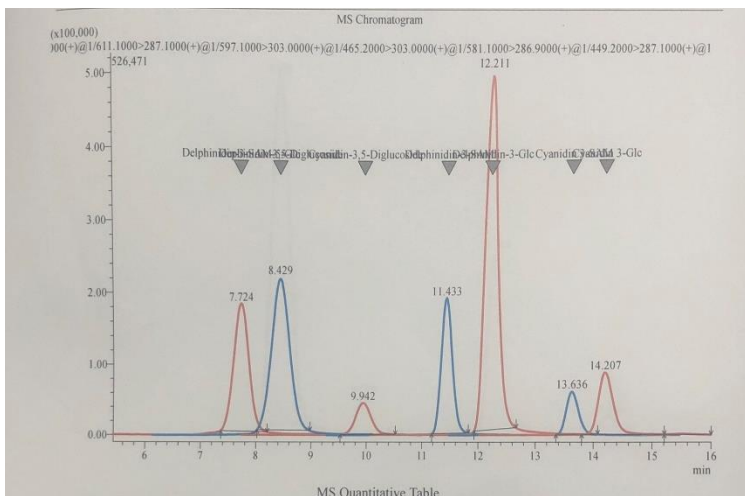
ของสารสกัด anthocyanin กับสารมาตรฐานมีระยะเวลาการออกมาแตกต่างกัน ในขณะที่ ตัวทำละลาย 5% formic acid สารสกัด และสารมาตรฐานออกมาใกล้เคียงกัน ในการทดลองนี้จึงเลือก 5% formic acid ในน้ำ เจือจางสารสกัด anthocyanin ก่อนฉีดเข้าคอลัมน์



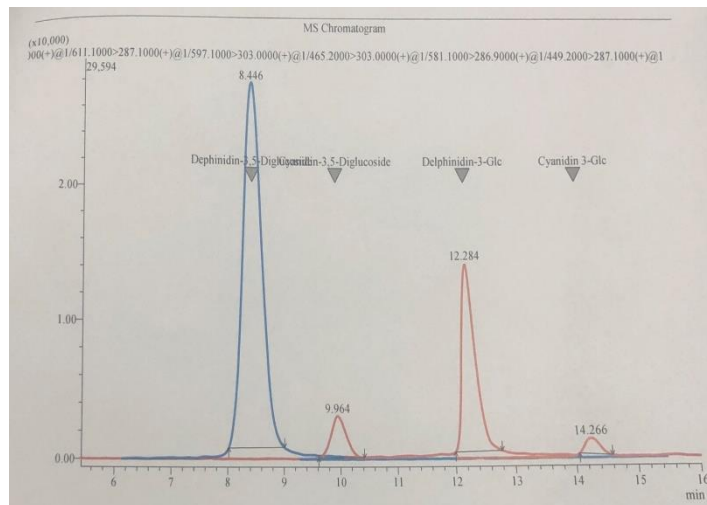
(a) สารมาตรฐาน 35% anthocyanin เจือจางด้วยน้ำ



(b) สารสกัด anthocyanin เจือจางด้วยน้ำ



(c) สารมาตรฐาน 35% anthocyanin เจือจางด้วย 5% formic acid ในน้ำ



(d) สารสกัด anthocyanin เจือจางด้วย 5% formic ในน้ำ

ภาพที่ 15: โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์ (a) สารมาตรฐาน 35% anthocyanin เจือจางด้วยน้ำ

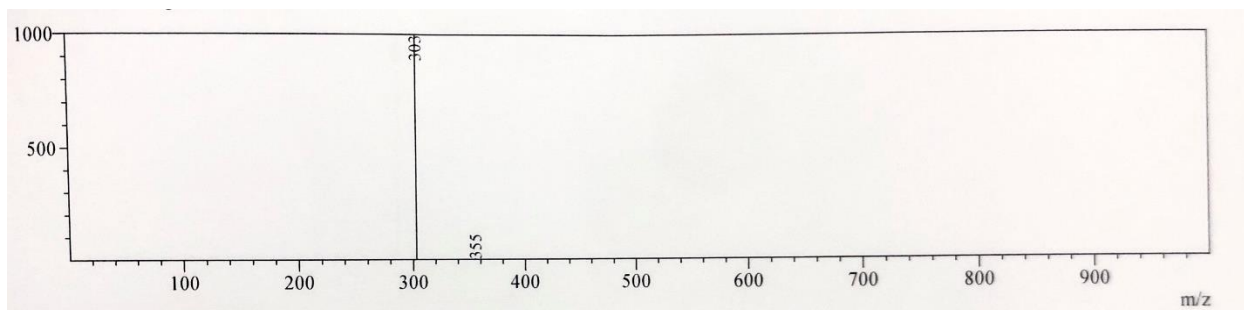
(b) สารสกัด anthocyanin เจือจางด้วยน้ำ

(c) สารมาตรฐาน 35% anthocyanin เจือจางด้วย 5% formic acid ในน้ำ

(d) สารสกัด anthocyanin เจือจางด้วย 5% formic ในน้ำ

3.5.3 ผลการวิเคราะห์เชิงคุณภาพของ anthocyanin

Mass spectroscopy ของ Delphinidin-3, 5-diglucoside



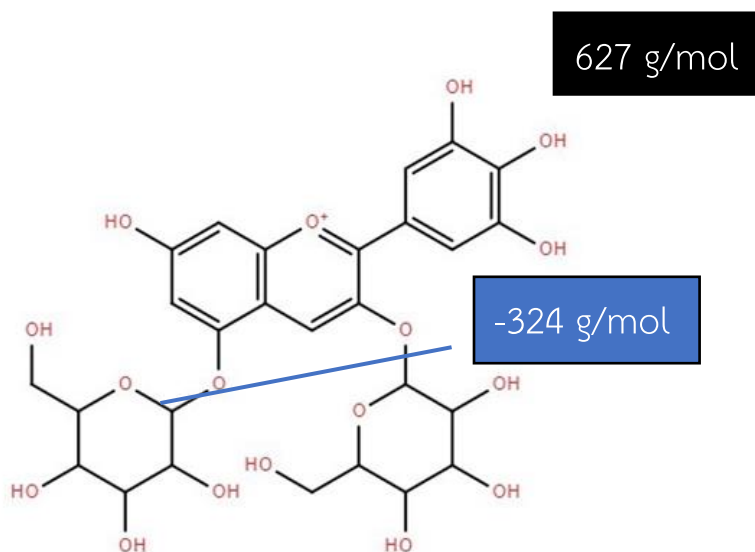
ภาพที่ 16: ผลการทดลอง mass spectroscopy ของ delphinidin-3,5-diglucoside

ตารางที่ 20: ค่า retention time, m/z และพื้นที่ใต้พีคของการวิเคราะห์สารสกัด 35% anthocyanin ด้วยเทคนิค LC-MS/MS

peak	Compound Name	Retention time	m/z	Peak Area
1	Delphinidin-3-Sambubioside-5-glucoside	-	759.30>303.10	-
2	Delphinidin-3,5-diglucoside	8.263	627.10>303.10	389534
3	Cyanidin-3,5-diglucoside	9.838	611.10>287.10	57581
4	Delphinidin-3-sambubioside	-	597.10>303.00	-
5	Delphinidin-3-glucoside	12.181	465.20>303.00	222477
6	Cyanidin-3-sambubioside	-	581.10>286.90	-
7	Cyanidin-3-glucoside	14.280	449.20>287.10	24552
total				694144

จากผลการแยก anthocyanin แต่ละชนิดด้วยเทคนิค LC-MS/MS พบว่ามี anthocyanin 4 ชนิด ซึ่งยังไม่สามารถทราบได้ว่ามี anthocyanin ชนิด delphinidin-3, 5-diglucoside หรือไม่ จึงวิเคราะห์ต่อในส่วน mass spectroscopy เพื่อหา m/z ของ anthocyanin แต่ละชนิด จากมวลโมเลกุลหลัก และ parent ion ซึ่งทำให้สามารถทราบว่า anthocyanin ที่วิเคราะห์ได้ มี anthocyanin ชนิด delphinidin-3, 5-diglucoside เพราะจากการวิเคราะห์พบว่ามีมวลโมเลกุล 627 g/mol และ parent ion คือ 303 g/mol จึงสามารถยืนยันได้ว่าสามารถสกัด delphinidin-3, 5-diglucoside จาก maqui berry ได้

3.6 อภิปรายผลการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ



ภาพที่ 17: การแตกโมเลกุล ของ delphinidin-3, 5-diglucoside

ในงานวิจัยนี้ ใช้เครื่องมือ LC-MS/MS ในส่วนของ mass spectrometer โดยมี ESI เป็น ionization source โหมดไอออนบวก ในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ

ESI เป็นส่วนที่ทำให้โมเลกุลแตกตัวเป็นไอออน โดยมี mass spectrometer ตัวที่ 1 เป็นตัววิเคราะห์การแตกไอออนหลัก และ mass spectrometer ตัวที่ 2 จะวิเคราะห์การแตกไอออนครั้งที่สอง ทำให้ทราบว่าโมเลกุลนั้นคืออะไร ผลการทดลองที่ได้คือโมเลกุล 303.0 g/mol ซึ่งเหตุผลที่มีเพียงโมเลกุลเดียว เนื่องจากใช้โหมดการวิเคราะห์ คือ Multiple Reaction Monitoring (MRM) เพราะเครื่องมือจะแสดง mass ของสารจาก mass spectrometer ตัวที่ 2 เท่านั้น โดยมีการหลุดน้ำตาล glucoside น้ำหนัก 162 g/mol 2 โมเลกุลออกจากโมเลกุลหลักหรือ delphinidin-3, 5-diglucoside น้ำหนักโมเลกุล 627.5 g/mol สุดท้ายจะได้โมเลกุล 303 g/mol เนื่องจากเป็นโมเลกุลที่มีความเสถียรจึงไม่มีการแตก fragment อีก

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ได้สกัด anthocyanin จาก maqui berry ด้วยตัวทำละลาย 0.1% HCl ใน methanol เพื่อตรวจหาปริมาณ delphinidin-3, 5-diglucoside เนื่องจาก anthocyanin ชนิด delphinidin-3, 5-diglucoside มีคุณสมบัติในการยับยั้งโรคตาแห้งได้ดี เมื่อเทียบกับ anthocyanin ชนิดอื่น อีกทั้งมีคุณสมบัติในการต้านสารอนุมูลอิสระเท่ากับ anthocyanin ชนิด delphinidin ตัวอื่น ๆ สำหรับในการทดลองนี้ใช้เทคนิค pH-differential, HPLC ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ delphinidin-3, 5-diglucoside และ LC-MS/MS ใช้วิเคราะห์เชิงคุณภาพ

ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณเทคนิค pH-differential ได้ปริมาณ delphinidin-3, 5-diglucoside เฉลี่ย 1.62 ± 0.244 และ HPLC ได้ปริมาณ delphinidin-3, 5-diglucoside เฉลี่ย 1.18 ± 0.161 เมื่อเปรียบเทียบด้วย T-test พบว่าทั้งสองเทคนิคมีปริมาณ delphinidin-3, 5-diglucoside ที่แตกต่างกัน สาเหตุเนื่องจากข้อจำกัดของเทคนิค pH-differential ที่เกิดการทับซ้อนกันของพีค ส่วนในเชิงคุณภาพเทคนิค LC-MS/MS จากการวิเคราะห์ delphinidin-3, 5-diglucoside พบว่า parent ion คือ 303 g/mol และโมเลกุล คือ 627 g/mol

เอกสารอ้างอิง

- [1] ชูชาติ อารีจิตรานุสรณ์, โครมาโทกราฟฟีเหลวความดันสูง, เครื่องมือวิทยาศาสตร์, 2544, 1(3), 352-364.
- [2] ณัฐธิดา ศรีบุญวรกุล, การประยุกต์ใช้แมสสเปกโตรเมทรี ในห้องปฏิบัติการวิจัยทางคลินิก, บทความปริทัศน์, 2560, 45(3), 6125-6139.
- [3] สุวิชา ดีหะสิงห์, การสกัดและทำให้สารแอนโทไซยานินในลูกหว่าบรีสุทธี, คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2550, 1(1), 1-58.
- [4] อรุษา เขาวนลิขิต, การสกัดและวิธีการวิเคราะห์แอนโทไซยานิน, วารสารมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ (สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี), 2554, 3(6), 26-36.
- [5] A. Aboonabi, R.R. Meyer, A. Gaiz, I. Singh, Anthocyanins in berries exhibited anti-atherogenicity and antiplatelet activities in a metabolic syndrome population, Nutrition Research, 2020, 3(1), 82-93.
- [6] A. Castañeda-Ovando, O. Sedo, J. Havel, L. Pacheco, C.A. Galán-Vidal, E.C. López1, Identification of Anthocyanins in Red Grape, Plum and Capulin by MALDI-ToF MS, J. mex. Chem. Soc., 2012, 56(4), 378-383.
- [7] D.T. Silva, R. Pauletto, S.C. Silva, V.C. Bochi, E. Rodrigues, J. Weber, C.B. Silva, F.D. Pont Morisso, M.T. Barcia, T. Emanuelli, Natural deep eutectic solvents as a biocompatible tool for the extraction of blueberry anthocyanins, Food Composition and Analysis, 2020, 3(1), 1-10.
- [8] Kanjana kantakapun, UV-Vis Spectrophotometer, 2017, Retrived September 28, 2020, from file:///C:/Users/USER/Downloads/UV-Vis%20Spectrometer%20(1).pdf
- [9] J.E. Brauch, L. Reuter, J. Conrad, H. Vogel, R.M. Schweiggert, R. Carle, Characterization of anthocyanins in novel Chilean maqui berry clones by HPLC-DAD-ESI/MSn and NMR-spectroscopy, Food Composition and Analysis, 2017, 3(1), 16-22.
- [10] J. HIDALGO, C. FLORES, M. A. HIDALGO, M. PEREZ, A. YAÑEZ, L. QUIÑONES, D. D. CACERES, R. A. BURGOS, Delphinol® standardized maqui berry extract reduces postprandial blood glucose

increase in individuals with impaired glucose regulation by novel mechanism of sodium glucose cotransporter inhibition, PANMINERVA MED, 2014, 3(2), 1-7.

[11] M.K. Talpur, F.N. Talpur, A. Balouch, S.M. Nizamani, M.A. Surhio, M.R. Shah, M.I. Bhanger, H.I. Afridi, Analysis and characterization of anthocyanin from phalsa (*grewia asiatica*), MOJ Food Processing & Technology, 2017, 5(3),299-305.

[12] M.M. Giusti, R.E. Wrolstad, Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy, Food Analytical Chemistry, 2001, 1(1), F1.2.1-F1.2.13

[13] ORYZA OIL&FAT CHEMICAL CO. , LTD, MAQUI BERRY EXTRACT, Oryza, 2012, 1(1), 1-40

[14] R. Patricio, H. Raul, M.A. Moya-León, Anthocyanins: food sources and benefits to consumer's health, Handbook of anthocyanin, 2014, 1(1), 373-394.

[15] Y. Guo, P. Zhang, Y. Liu, L. Zha, W. Ling, A dose-response evaluation of purified anthocyanins on inflammatory and oxidative biomarkers and metabolic risk factors in healthy young adults: A randomized controlled trial, Nutrition, 2020, 3(1), 1-7.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การสกัด maqui berry



ภาพ ก-1: ลักษณะของ maqui berry ส่วนเปลือกแบบแห้ง



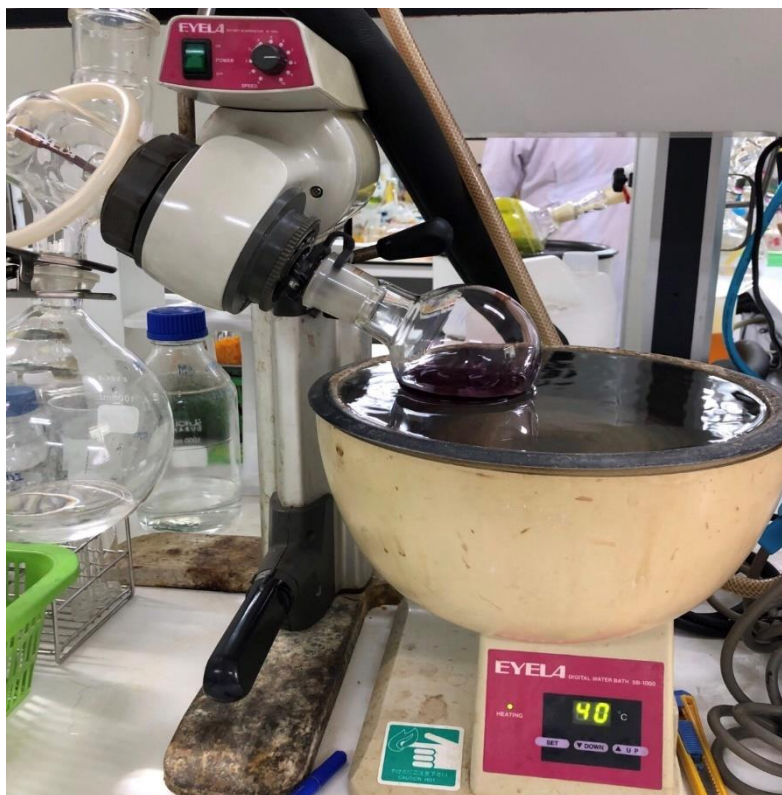
ภาพ ก-2: การสั่นสะเทือนของคลื่นอัลตราโซนิกตัวอย่าง maqui berry



ภาพ ก-3: แยกส่วนของแข็งและของเหลวด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง



ภาพที่ ก-4: สารละลายหลังจากการสกัด



ภาพที่ ก-5: การระเหยตัวทำละลายให้กลายเป็นไอ



ภาพที่ ก-6: ขุดของสารสกัด maqui berry หลังจากกระบวนการระเหยและอบ

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารละลายในการวิเคราะห์



ภาพ ข-1: การกรอง mobile phase



ภาพ ข-2: การปรับ pH ของบัฟเฟอร์สำหรับตรวจวัด pH-differential

ภาคผนวก ค

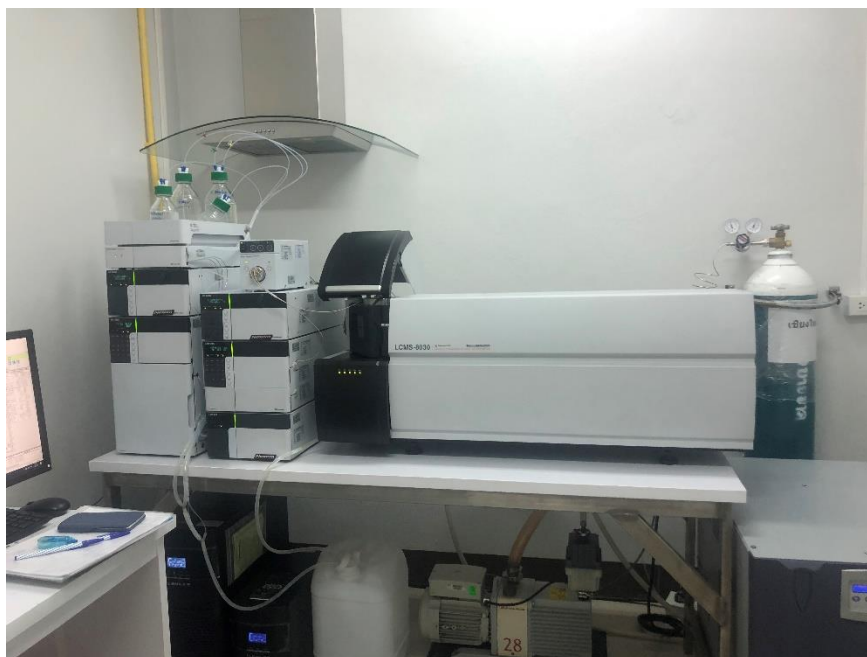
การวิเคราะห์ anthocyanin ด้วยเทคนิค LC-MS/MS



ภาพ ค-1: การเตรียม calibration curve ที่ความเข้มข้น 10, 20, 40, 80, 160 ppm



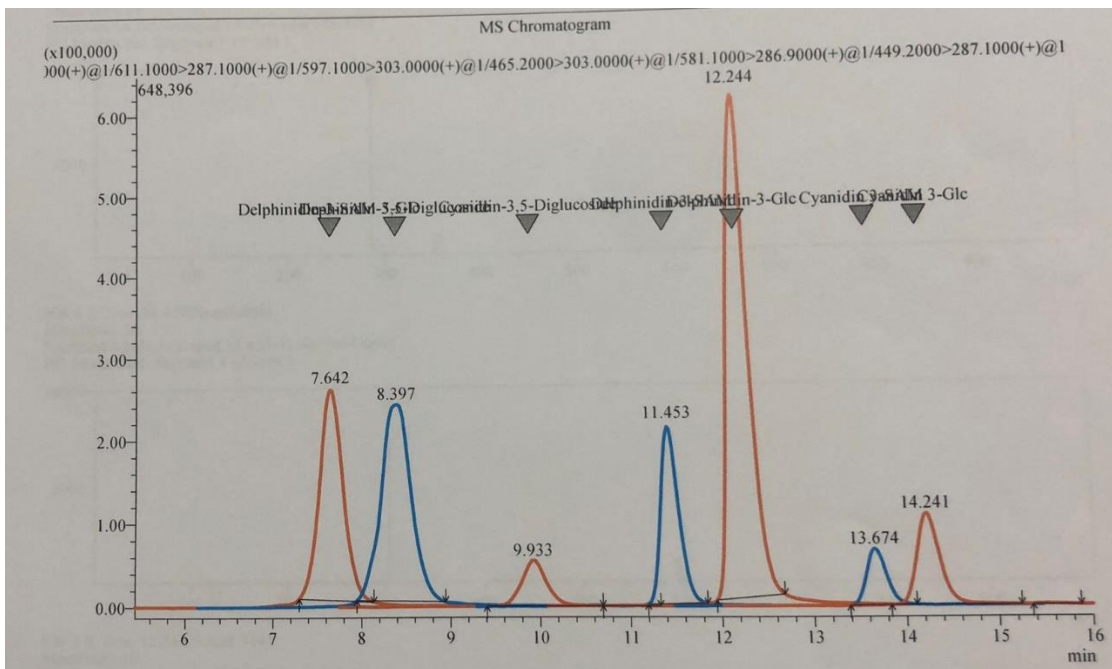
ภาพ ค-2: การเตรียมสารตัวอย่างที่ 1-3 ก่อนการวิเคราะห์



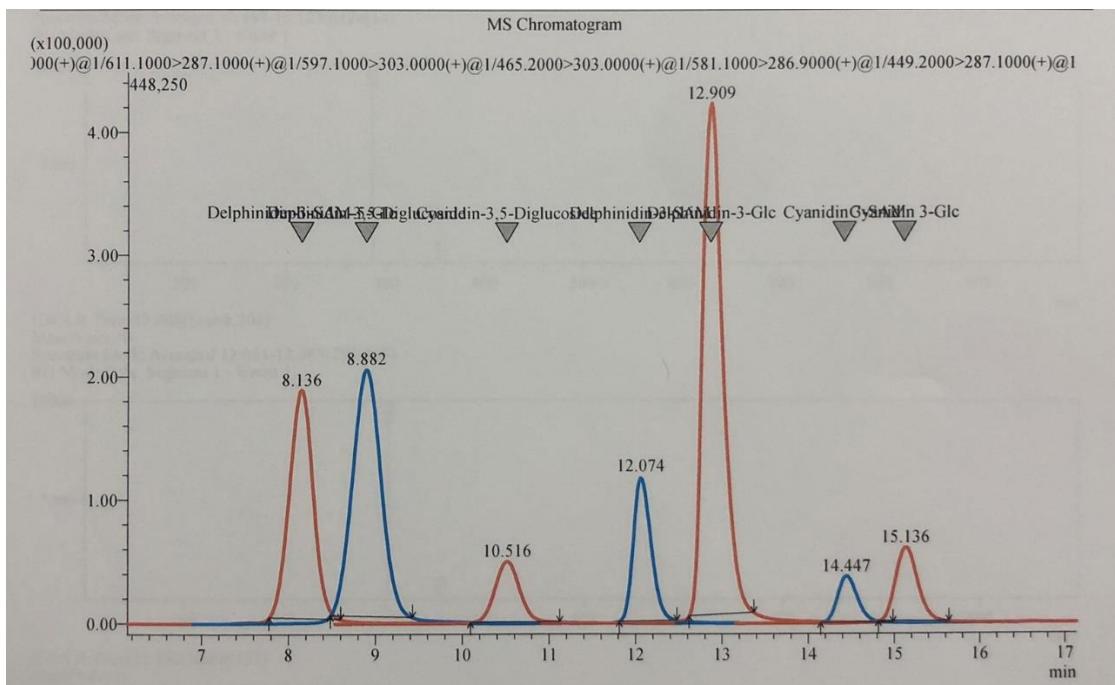
ภาพ ค-3: เครื่อง LC-MS/MS (liquid chromatography Tandem Mass spectrometry)

ภาคผนวก ง

การเปรียบเทียบ peak ของ standard ก่อนช่วงเครื่องมีปัญหาและและช่วงเครื่องมีปัญหา



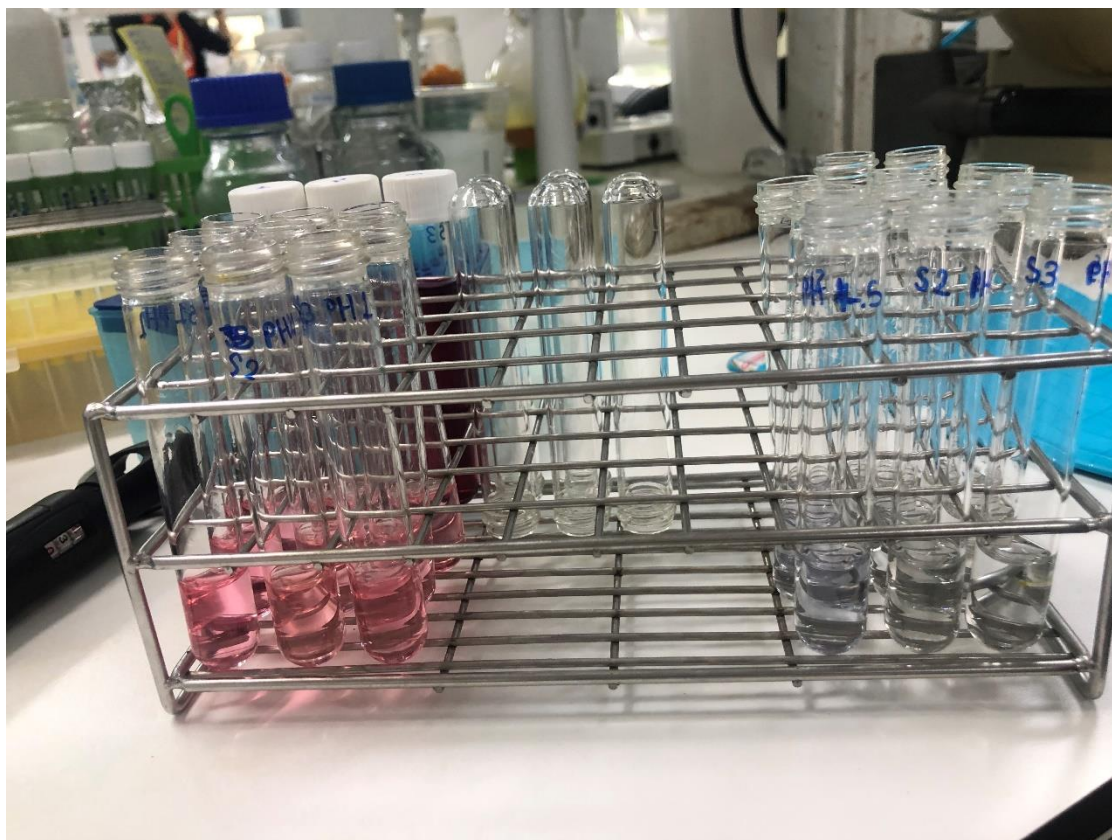
ภาพ ง-1: ลำดับการวิเคราะห์ของ anthocyanin ก่อนเครื่องมีปัญหา



ภาพ ง-2: ลำดับการวิเคราะห์ของ anthocyanin เมื่อเครื่องมีปัญหา

ภาคผนวก จ

การวิเคราะห์ anthocyanin ด้วยเทคนิค pH-differential



ภาพ จ-1: การเตรียมสารละลายตัวอย่างวิเคราะห์ pH1.0 และ pH 4.5

ภาคผนวก ฉ

การคำนวณการสร้าง calibration curve ของ LC-MS/MS

1. คำนวณความเข้มข้นของ 18% delphinidin ใน standard

$$\text{standard ความเข้มข้น } 10 \text{ ppm มี } 18\% \text{ anthocyanin คือ } 10 \times \frac{18}{100} = 1.8 \text{ ppm}$$

$$\text{standard ความเข้มข้น } 20 \text{ ppm มี } 18\% \text{ anthocyanin คือ } 20 \times \frac{18}{100} = 3.6 \text{ ppm}$$

$$\text{standard ความเข้มข้น } 40 \text{ ppm มี } 18\% \text{ anthocyanin คือ } 40 \times \frac{18}{100} = 7.2 \text{ ppm}$$

$$\text{standard ความเข้มข้น } 80 \text{ ppm มี } 18\% \text{ anthocyanin คือ } 80 \times \frac{18}{100} = 14.4 \text{ ppm}$$

$$\text{standard ความเข้มข้น } 160 \text{ ppm มี } 18\% \text{ anthocyanin คือ } 160 \times \frac{18}{100} = 28.8 \text{ ppm}$$

2. การคำนวณหาปริมาณ delphinidin-3,5-diglucoside ของ standard

10 ppm:

$$\text{พื้นที่ใต้กราฟของ delphinidin ทั้งหมดคือ } 865080 \text{ มี anthocyanin ทั้งหมด } 1.8 \text{ ppm}$$

$$\begin{aligned} \text{พื้นที่ใต้กราฟ delphinidin-3,5-diglucoside } 270703 \text{ มี delphinidin-3,5-diglucoside } & \frac{270703}{865080} \times 1.8 \text{ ppm} \\ & = 0.6 \text{ ppm} \end{aligned}$$

20 ppm:

$$\text{พื้นที่ใต้กราฟของ delphinidin ทั้งหมดคือ } 1822234 \text{ มี anthocyanin ทั้งหมด } 3.6 \text{ ppm}$$

$$\begin{aligned} \text{พื้นที่ใต้กราฟ delphinidin-3,5-diglucoside } 553430 \text{ มี delphinidin-3,5-diglucoside } & \frac{553430}{1822234} \times 3.6 \text{ ppm} \\ & = 1.1 \text{ ppm} \end{aligned}$$

40 ppm:

$$\text{พื้นที่ใต้กราฟของ delphinidin ทั้งหมดคือ } 3750699 \text{ มี anthocyanin ทั้งหมด } 7.2 \text{ ppm}$$

$$\begin{aligned} \text{พื้นที่ใต้กราฟ delphinidin-3,5-diglucoside } 1099713 \text{ มี delphinidin-3,5-diglucoside } & \frac{1099713}{3750699} \times 7.2 \text{ ppm} \\ & = 2.1 \text{ ppm} \end{aligned}$$

80 ppm:

พื้นที่ใต้กราฟของ delphinidin ทั้งหมดคือ 7818692 มี anthocyanin ทั้งหมด 14.4 ppm

พื้นที่ใต้กราฟ delphinidin-3,5-diglucoside 2286871 มี delphinidin-3,5-diglucoside $\frac{2286871}{7818692} \times 14.4 \text{ ppm}$
 $= 4.2 \text{ ppm}$

160 ppm:

พื้นที่ใต้กราฟของ delphinidin ทั้งหมดคือ 16385473 มี anthocyanin ทั้งหมด 28.8 ppm

พื้นที่ใต้กราฟ delphinidin-3,5-diglucoside 4535072 มี delphinidin-3,5-diglucoside $\frac{4535072}{19056163} \times 28.8 \text{ ppm}$
 $= 8.0 \text{ ppm}$

การคำนวณการสร้าง calibration curve ของ HPLC

1. คำนวณความเข้มข้นของ 35% anthocyanin ใน standard

standard ความเข้มข้น 50 ppm มี 35% anthocyanin คือ $50 \times \frac{35}{100} = 17.5$ ppm

standard ความเข้มข้น 100 ppm มี 35% anthocyanin คือ $100 \times \frac{35}{100} = 35.0$ ppm

standard ความเข้มข้น 200 ppm มี 35% anthocyanin คือ $200 \times \frac{35}{100} = 70.0$ ppm

standard ความเข้มข้น 300 ppm มี 35% anthocyanin คือ $300 \times \frac{35}{100} = 105.0$ ppm

standard ความเข้มข้น 500 ppm มี 35% anthocyanin คือ $500 \times \frac{35}{100} = 175.0$ ppm

standard ความเข้มข้น 600 ppm มี 35% anthocyanin คือ $600 \times \frac{35}{100} = 210.0$ ppm

2. การคำนวณหาปริมาณ delphinidin-3,5-diglucoside ของ standard

50 ppm:

พื้นที่ใต้กราฟทั้งหมดคือ 582936 มี anthocyanin ทั้งหมด 17.5 ppm

พื้นที่ใต้กราฟ delphinidin-3,5-diglucoside 203114 มี delphinidin-3,5-diglucoside $\frac{203114}{582936} \times 17.5$ ppm
= 6.1 ppm

100 ppm:

พื้นที่ใต้กราฟทั้งหมดคือ 1240961 มี anthocyanin ทั้งหมด 35.0 ppm

พื้นที่ใต้กราฟ delphinidin-3,5-diglucoside 417817 มี delphinidin-3,5-diglucoside $\frac{417817}{1240961} \times 35.0$ ppm
= 11.8 ppm

200 ppm:

พื้นที่ใต้กราฟทั้งหมดคือ 2389244 มี anthocyanin ทั้งหมด 70.0 ppm

พื้นที่ใต้กราฟ delphinidin-3,5-diglucoside 759364 มี delphinidin-3,5-diglucoside $\frac{759364}{2389244} \times 70.0$ ppm
= 22.2 ppm

300 ppm:

พื้นที่ใต้กราฟทั้งหมดคือ 3545139 มี anthocyanin ทั้งหมด 105.0 ppm

พื้นที่ใต้กราฟ delphinidin-3,5-diglucoside 1140268 มี delphinidin-3,5-diglucoside $\frac{1140268}{3545139} \times 105.0 \text{ ppm}$
= 33.8 ppm

500 ppm:

พื้นที่ใต้กราฟทั้งหมดคือ 5917457 มี anthocyanin ทั้งหมด 175.0 ppm

พื้นที่ใต้กราฟ delphinidin-3,5-diglucoside 1888198 มี delphinidin-3,5-diglucoside $\frac{1888198}{5917457} \times 175.0 \text{ ppm}$
= 55.8 ppm

600 ppm:

พื้นที่ใต้กราฟทั้งหมดคือ 7186393 มี anthocyanin ทั้งหมด 210.0 ppm

พื้นที่ใต้กราฟ delphinidin-3,5-diglucoside 2245490 มี delphinidin-3,5-diglucoside $\frac{2245490}{7186393} \times 210.0 \text{ ppm}$
= 65.6 ppm