ปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดสารแอนโธไซยานินจากข้าวโพดสีม่วง

Factors Affecting Extraction of Anthocyanins from Purple Corn

รัตนา ม่วงรัตน์*, กรวิกา สกุลไกรพีระ, ธัญญารัตน์ บุระคำ และลีลาวดี ชมนาน

สาขาวิชาวิศวกรรมอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ตำบลแม่เหียะ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ 50100

Rattana Muangrat*, Kronwika Sakulkaipeera, Tanyarat Burakhum and Leelawade Chomnan

Department of Food Engineering, Faculty of Agro-Industry, Chiang Mai University,

Mae-Hea, Mueang, Chiang Mai 50100

บทคัดย่อ

ซังสดของข้าวโพดสีม่วงมีสารแอนโธไซยานินมากกว่าไหมสด และเมล็ดสดของข้าวโพดสีม่วง ตามลำดับ (เทียบจากน้ำหนักแห้งเท่ากัน) โดยตัวทำละลายเมทานอลสามารถสกัดสารแอนโธไซยานินได้มากกว่าเอทานอลและน้ำ ตามลำดับ เมื่อสกัดด้วยวิธีการสกัดแบบซอกห์เลต (soxhlet extraction) เมทานอลสามารถสกัดสารแอนโธ-ไซยานินได้สูงกว่าเอทานอล เมื่ออัตราส่วนน้ำหนักซังข้าวโพดสีม่วงต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1:13 ที่ความเข้มข้นของตัวทำละลายเมทานอลเท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก สามารถสกัดสารแอนโธไซยานินจากซังข้าวโพดสีม่วงได้มากที่สุด นอกจากนี้ที่อัตราส่วนน้ำหนักซังข้าวโพดสีม่วงต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1:13 ในทุกระดับความเข้มข้นของตัวทำละลายเอทานอลและเมทานอล (100, 90 และ 70 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก) สามารถสกัดสารแอนโธไซยานินได้มากกว่าที่อัตราส่วนน้ำหนักซังข้าวโพดสีม่วงต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1:17 และ 1:20 ตามลำดับ แต่เมื่ออัตราส่วนน้ำหนักซังข้าวโพดสีม่วงต่อตัวทำละลายเพิ่มขึ้นจะพบว่าที่ความเข้มข้นตัวทำละลาย 70 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก จะสกัดสารแอนโธไซยานินได้ดีกว่าความเข้มข้นของตัวทำละลาย 90 และ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก ตามลำดับ เวลาในการสกัดมีผลต่อปริมาณสารแอนโธไซยานินที่สกัดได้โดยปริมาณสารแอนโธไซยานินจะลดลงเมื่อเวลาสกัดนานขึ้น สภาวะความเป็นกรดและเวลาในการเก็บรักษามีผลต่อความคงตัวของสารแอนโธไซยานิน โดยสภาวะความเป็นกรดสูง (pH ต่ำ) จะมีปริมาณสาร แอนโธไซยานินมากกว่าที่สภาวะความเป็นกรดต่ำ (pH สูง) และปริมาณสารแอนโธไซยานินจะลดลงเมื่อเวลาในการเก็บรักษานานขึ้น สารแอนโธไซยานินที่ถูกสกัดออกมาจากซังข้าวโพดสีม่วงด้วยตัวทำละลายเมทานอลมีความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระได้สูงกว่าสารแอนโธไซยานินที่ถูกสกัดออกมาจากซังข้าวโพดสีม่วงด้วยตัวทำละลายเอทานอล โดยปริมาณความเข้มข้นของสารสกัดแอนโธไซยานินด้วยเมทานอลและเอทานอลมีค่าการยับยั้งสาร DPPH 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 75.5 และ 101.7 กรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

***ผู้รับผิดชอบบทความ :** rattanamuangrat@yahoo.com

คำสำคัญ : แอนโธไซยานิน; ข้าวโพดสีม่วง; เอทานอล; เมทานอล; การยับยั้งสาร DPPH

Abstract

Fresh purple corncobs contained a higher amount of total anthocyanins than purple cornsilks and cornkernels, respectively (dry weight equivalent). Methanol has been generally found to be more efficient in extraction of anthocyanins than ethanol and water, respectively. When soxhlet extraction method was applied, it was found that methanol could extract the greater total anthocyanin contents than ethanol and water, respectively. A 1:13 of fresh purple corncorbs sample to solvent ratio (% w/w) at 90 % w/w of methanol solvent concentration obtained the highest anthocyanin yield. Moreover, this particular ratio of ethanol and methanol solvent concentration (100, 90 and 70 % w/w) achieved the higher total anthocyanin yield than 1:17 and 1:20 sample to solvent ratio, respectively. However when the sample to solvent ratio increased, 70 % w/w of solvent concentration gave the higher content of total anthocyanins than 90 and 100 % w/w of solvent concentration. The extraction time also affected the total anthocyanin contents. As time was increasing, the total anthocyanin contents decreased. Acidic condition and storage time of the extract product has affected an anthocyanin stability. The total anthocyanin contents at high acidic condition (low pH) were higher than at low acidic condition (high pH). Additionally, the total anthocyanin contents decreased for longer time storage. Anthocyanins from purple corncobs extracted in methanol had a higher antioxidant capacity than extraction in ethanol. The 50 % inhibition of the DPPH radical determined in methanol and ethanol extracts of purple corncobs were found to be 75.5 and 101.7 g/mL, respectively.

Keywords: anthocyanins; ethanol, DPPH inhibition; methanol; purple corn

1. บทนำ

ผู้บริโภคให้ความสำคัญกับสุขภาพมากขึ้นในปัจจุบันโดยหันมาบริโภคอาหารที่มีประโยชน์ซึ่งข้าวโพดสีม่วงก็ถูกให้ความสำคัญจากผู้บริโภคเนื่องจากประกอบไปด้วยสารอาหารสำคัญโดยเฉพาะสารแอนโธไซยานินซึ่งมีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) [1-4] ข้าวโพดสีม่วง (purple corn, *Zea mays amylacea*) มีแป้งเป็นองค์ประกอบมากกว่าเมล็ดของข้าวโพดสีเหลืองและข้าวโพดสีขาวและมีปริมาณกรดอะมิโนไลซีนสูงกว่าข้าวโพดสีเหลืองหัวบุบ มีปริมาณโปรตีนและแร่ธาตุสูงกว่าข้าวโพดหัวบุบ ข้าวโพดสีม่วงจึงน่าจะเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญอีกแหล่งหนึ่ง อีกทั้งยังมีเสน่ห์ที่ดึงดูดของสีม่วง มีรสชาติที่แตกต่าง และมีศักยภาพสูงสำหรับอาหารที่มีคุณค่าทางยา (nutraceutical food) สารแอนโธไซยานินเป็นสารประกอบฟีนอล เป็นรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ ไม่เสถียรจึงสลายตัวได้ง่ายด้วยความร้อน ออกซิเจน และแสง นอกจากนั้นยังเป็นสารให้สีตามธรรมชาติที่พบได้ทั่วไปในดอกไม้ ผลไม้บางชนิด ใบ

หรือลำต้นของพืชบางชนิดที่มีสีจัด ซึ่งมีสีตั้งแต่สีแดงถึงน้ำเงินเข้ม สารแอนโธไซยานินมีสมบัติเป็นยา และถูกนำมาใช้เป็นยารักษาโรคของมนุษย์ [5-6] นอกจากนี้สารแอนโธไซยานินสามารถช่วยส่งเสริมการทำงานของเม็ดเลือดแดง ช่วยควบคุมระดับน้ำตาลในผู้ป่วยเบาหวาน ช่วยชะลอการเกิดไขมันอุดตันในหลอดเลือด ช่วยลดโอกาสการเกิดมะเร็งและยับยั้งเนื้องอก ช่วยเสริมให้ร่างกายต่อต้านเชื้อโรคและสมานแผล เสริมภูมิคุ้มกันในร่างกายให้ดีขึ้น ลดภาวะเสี่ยงในการเป็นโรคหัวใจ เพิ่มความสามารถในการมองเห็น ชะลอความเสื่อมของดวงตา และชะลอความเสื่อมของเซลล์ เป็นต้น [5,7] นักวิจัยหลายกลุ่มจึงนำเอาสารแอนโธไซยานินมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม [4] การสกัดสารแอนโธไซยานินมีวิธีการสกัดมีอยู่หลายวิธี โดยวิธีการสกัดแบบซอกห์เลต (soxhlet extraction) เป็นวิธีการสกัดที่มีการนำตัวทำละลายที่ผ่านการสกัดมาแล้วไประเหยและควบแน่นกลับลงมาอีกครั้ง ทำให้สามารถหมุนเวียนกลับมาใช้เพื่อการสกัดได้อีกหลาย ๆ ครั้ง จึงเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดจนกระทั่งได้สารที่ต้องการออกมาในปริมาณที่มากพอ ถึงแม้วิธีนี้จะใช้ตัวทำละลายในปริมาณมากและใช้เวลาในการสกัดนาน แต่ก็เป็นวิธีที่ง่าย สะดวก และราคาถูก [8-10] งานวิจัยนี้จึงเลือกใช้การสกัดด้วยวิธีการสกัดแบบซอกห์เลตซึ่งสามารถสกัดสารที่ไม่เสถียรที่สภาวะความร้อนสูง ๆ อย่างสารแอนโธไซยานินได้ อย่างไรก็ตามชนิดของตัวทำละลายในวิธีการสกัดนี้ต้องเหมาะสมกับการสกัดสารที่ต้องการ โดยตัวทำละลายต้องมีความสามารถในการละลายเอาสารที่ต้องการออกมาได้มากที่สุด ปริมาณของตัวทำละลายที่ใช้สกัดต้องมีมากพอเพื่อทำให้การสกัดเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องตลอดเวลา และตัวอย่างจะต้องมีขนาดเล็กที่สุดเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัส ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดด้วยวิธีนี้ เช่น น้ำเป็นของเหลวที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน ไม่มีรสชาติและไม่มีกลิ่น น้ำเป็นตัวทำละลายมีขั้วที่ดี เอทานอล (ethanol) หรือ เอทิล-แอลกอฮอล์ใช้เป็นตัวทำละลายในการสกัด เพื่อผลิตน้ำหอมและยา และเมทานอล (methanol) หรือเมทิลแอลกอฮอล์ (methyl alcohol) เป็นของเหลวใส และระเหยง่าย

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาและเปรียบเทียบปริมาณสารแอนโธไซยานินที่สกัดได้จากส่วนต่าง ๆ ของข้าวโพดสีม่วงได้แก่เมล็ดสด ซังสด และไหมสด (เทียบจากน้ำหนักแห้งเท่ากัน) ด้วยวิธีการสกัดแบบซอกห์เลต และทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดสารแอนโธไซยานินของข้าวโพดสีม่วง ได้แก่ ชนิดของตัวทำละลาย ความเข้มข้นของตัวทำละลาย อัตราส่วนน้ำหนักของตัวอย่างต่อตัวทำละลาย เวลาที่ใช้ในการสกัด และสภาวะความเป็นกรดด่าง (pH)

2. อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาการสกัดสารแอนโธไซยานินจากข้าวโพดสีม่วงประกอบไปด้วย 6 ขั้นตอน ดังนี้

2.1 การศึกษาเปรียบเทียบสารแอนโธไซยานินที่สกัดได้จากส่วนต่าง ๆ ของข้าวโพดสีม่วง ด้วยการแช่ในตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

การศึกษาเปรียบเทียบตัวทำละลาย ได้แก่ น้ำ เอทานอล และเมทานอล ในการสกัดสารแอนโธไซยานินจากเมล็ดสด ซังสด และไหมสดของข้าวโพดสีม่วง (เทียบจากน้ำหนักแห้งเท่ากัน) ปริมาณความชื้นของเมล็ดสด ซังสด และไหมสดของข้าวโพดหาตามวิธี AOAC (2000) [11] ซึ่งปริมาณความชื้นของเมล็ดสด ซังสด และไหมสดของข้าวโพดสีม่วงที่วิเคราะห์ได้เท่ากับ 1.58, 2.34 และ 1.41 กรัมต่อกรัมของตัวอย่างแห้ง ตามลำดับ โดยอัตราส่วนข้าวโพดต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1:3 และ 1:6 และทำการแช่ทิ้งไว้ในตัวทำละลายเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง นำสารที่

สกัดได้ไปกรองด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ (Super Suction Unit, SS200, Sturdy Industrial Co., Ltd., Australia) แล้ววิเคราะห์เพื่อหาปริมาณแอนโธไซยานินทั้งหมด (total anthocyanin) ด้วยวิธี pH differential method โดยดัดแปลงตามวิธีของ Lee และคณะ [12] แสดงดังสมการที่ (2-1)

ปริมาณแอนโธไซยานินทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อลิตร) $= \dfrac{A \times MW \times DF \times 1000}{(\varepsilon \times 1)}$ (2-1)

เมื่อ A เท่ากับผลต่างของค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่นที่ 510 นาโนเมตร และค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่นที่ 700 นาโนเมตร ของตัวอย่างที่ใส่สารละลายบัฟเฟอร์ pH 1.0 ลบด้วยผลต่างของค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่นที่ 510 นาโนเมตร และค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่นที่ 700 นาโนเมตร ของตัวอย่างที่ใส่สารละลายบัฟเฟอร์ pH 4.5 คือน้ำหนักมวลโมเลกุลของไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ (cyanidine-3-glucoside) มีค่าเท่ากับ 499.2 กรัมต่อโมล คือ dilution factor (ถ้าใช้ตัวอย่าง 0.2 มิลลิลิตร เจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์จนมีปริมาตรเป็น 3 มิลลิลิตร ใช้ค่า DF เท่ากับ 15) ε คือ molar extinction coefficient โดยค่านี้มักใช้ค่าของไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ (cyanidin-3-glucoside) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 26900 ลิตรต่อโมลต่อเซนติเมตร คือแฟคเตอร์เปลี่ยนหน่วยจากกรัมเป็นมิลลิกรัม และ 1 คือความกว้างของคิวเวตต์เท่ากับ 1 เซนติเมตร

2.2 การศึกษาเปรียบเทียบอัตราส่วนน้ำหนักของส่วนต่าง ๆ ของข้าวโพดสีม่วงต่อตัวทำละลายที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วยวิธีการสกัดแบบซอกห์เลต (soxhlet extraction)

จากข้อมูลในข้อ 2.1 นำมาใช้เพื่อสกัดสารแอนโธไซยานินจากซังและไหมของข้าวโพดสีม่วงด้วยวิธีการสกัดแบบซอกห์เลต ทำการบรรจุซังและไหมของข้าวโพดสีม่วงที่ปั่นละเอียดแล้วลงในทิมเบิล (thimble) ของเครื่องสกัดแบบซอกห์เลต แล้วทำการปรับอัตราส่วนน้ำหนักซังและไหมต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1:13, 1:17 และ 1:20 โดยตัวทำละลายเอทานอลและเมทานอลมีระดับความเข้มข้นเท่ากับ 100, 90 และ 70 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก จากนั้นทำการสกัดเป็นเวลา 30 นาที หลังการสกัดนำสารละลายที่สกัดได้ไปกรอง แล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณแอนโธไซยานินทั้งหมดตามสมการที่ (2-1)

2.3 การศึกษาเวลาที่มีผลต่อการสกัดสารแอนโธไซยานินจากข้าวโพดสีม่วง

การศึกษาเวลาที่มีผลต่อการสกัดที่อัตราส่วนน้ำหนักซังและไหมของข้าวโพดต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1:13 ที่ความเข้มข้นของตัวทำละลายเท่ากับ 100, 90 และ 70 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ด้วยวิธีการสกัดแบบซอกห์เลตเป็นเวลา 30, 45 และ 60 นาที จากนั้นนำไปกรองเพื่อหาปริมาณแอนโธไซยานินทั้งหมดตามสมการที่ (2-1)

2.4 การศึกษาผลของสภาวะความเป็นกรดด่างที่มีต่อสารแอนโธไซยานินที่สกัดได้

การศึกษาผลของสภาวะความเป็นกรดด่างที่มีต่อสารแอนโธไซยานินจากสารสกัดที่ได้จากข้อ 2.3 ที่เวลาเริ่มต้นและที่เวลา 24 ชั่วโมง โดยการปรับค่าความเป็นกรดด่างทำได้ด้วยการเติมกรดซิตริกจนได้ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 1.5 และ 3.0 แล้วนำสารสกัดที่เตรียมได้นี้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงแบบ double-beam (PerkinElmer Instruments, Lambda 25 UV/VIS Spectrometer, Shelton, USA)

2.5 การศึกษาความสามารถในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ (antioxidant) ของสารแอนโธไซยานินที่สกัดได้

การศึกษาความสามารถในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระของสารสกัดที่ได้จากข้อ 2.3 โดยใช้วิธีดัก

จับอนุมูลอิสระ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical หรือ DPPH radical scavenging ดัดแปลงตามวิธีของ Tananuwong และ Tewaruth [13] โดยทำการเจือจางสารละลายที่สกัดได้ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ปิเปตสารละลายสกัดเจือจางลงในขวดสีชาจำนวน 5 ขวด ขวดละ 0.15 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ ลงไปในปริมาณ 2.85 มิลลิลิตร แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร จากนั้นคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ DPPH (% DPPH inhibition) แสดงดังสมการที่ (2.2)

$$\% \text{ DPPH inhibition} = \frac{A_{control} - A_{sample}}{A_{control}} \times 100 \quad (2.2)$$

เมื่อ $A_{control}$ คือค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างว่างเปล่า (DPPH อย่างเดียว) และ A_{sample} คือค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายของสารสกัดตัวอย่าง โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร จากนั้นหาค่าความเข้มข้นของสารแอนโธไซยานินที่สกัดได้ด้วยตัวทำละลายเอทานอลและเมทานอลที่สามารถลดปริมาณสารอนุมูลอิสระลงได้ 50 เปอร์เซ็นต์

2.6 การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ

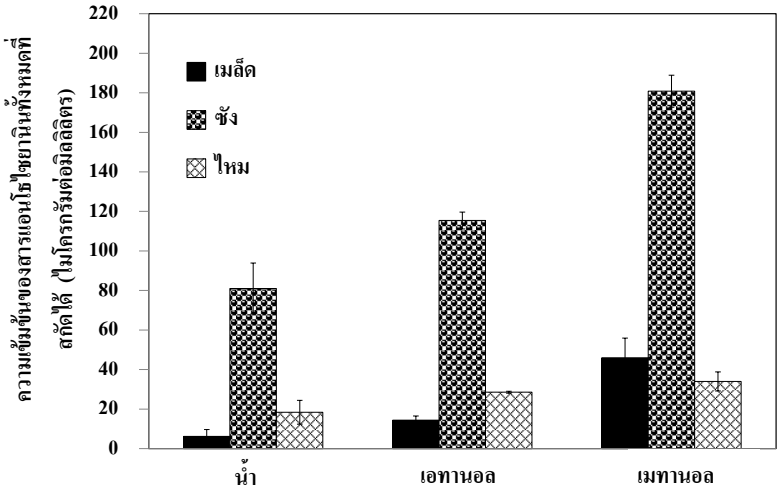
แต่ละขั้นตอนการทดลองทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วทำการวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ วิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 12.0 for Windows

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

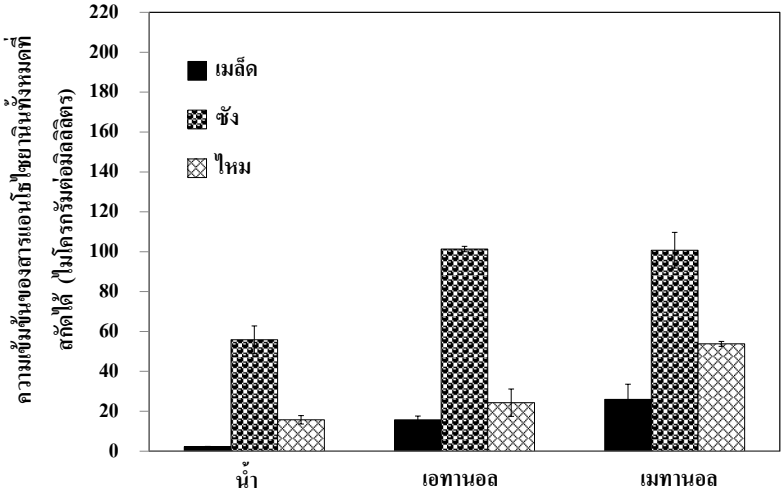
3.1 การศึกษาเปรียบเทียบสารแอนโธไซยานินที่สกัดได้จากส่วนต่าง ๆ ของข้าวโพดสีม่วงด้วยการแช่ในตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

ผลการนำเมล็ดสด ซังสด และไหมสดของข้าวโพดสีม่วง (เทียบจากน้ำหนักแห้งเท่ากัน) มาศึกษาเพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารแอนโธไซยานินที่สกัดได้จากส่วนต่าง ๆ ของข้าวโพดสีม่วง 3 ส่วน ได้แก่ เมล็ดสด ซังสด และไหมสดของข้าวโพดสีม่วงด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ น้ำ เอทานอล และเมทานอล โดยการแช่สารละลายที่อัตราส่วนน้ำหนักของเมล็ดสด ซังสด และไหมสดของข้าวโพดสีม่วงต่อตัวทำละลาย 2 อัตราส่วน คือ 1:3 และ 1:6 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 1 และ 2 โดยพบว่าที่อัตราส่วนน้ำหนักของเมล็ดสด ซังสด และไหมสดของข้าวโพดสีม่วงต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1:3 และ 1:6 ซังสดจะมีปริมาณสารแอนโธไซยานินมากกว่าไหมสดและเมล็ดสดของข้าวโพดสีม่วง ตามลำดับ ส่วนตัวทำละลายที่มีความสามารถในการสกัดสารแอนโธไซยานินได้ดีที่สุดคือเมทานอล เอทานอล และน้ำ ตามลำดับ โดยอัตราส่วนน้ำหนักของเมล็ดสด ซังสด และไหมสดของข้าวโพดสีม่วงต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1:3 สามารถสกัดสารแอนโธไซยานินได้มากกว่าอัตราส่วนน้ำหนักของเมล็ดสด ซังสด และไหมสดของข้าวโพดสีม่วงต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1:6 ตัวทำละลายเมทานอลและเอทานอลสามารถสกัดสารแอนโธไซยานินได้มากกว่าน้ำ จากค่าคงที่ไดอิเล็กตริค (dielectric constant) ซึ่งเป็นค่าที่วัดความมีขั้วของตัวทำละลาย โดยค่าคงที่ไดอิเล็กตริคของน้ำ เอทานอล และเมทานอล เท่ากับ 80, 24 และ 33 ตามลำดับ [14] จากค่าดังกล่าวพบว่าเมทานอลและเอทานอลมีขั้วต่ำกว่าน้ำจึงทำให้สามารถทำลายผนังเซลล์ของพืชซึ่งส่วนใหญ่แล้วจะไม่มีขั้ว เมื่อผนังเซลล์แตกออกทำให้สารจำพวกฟีนอลลิกรวมถึงแอนโธไซยานินที่อยู่ภายในผนังเซลล์สามารถออกมาจากเซลล์ของเมล็ดสด ซังสด และไหมสดของข้าวโพดสีม่วงและละลายอยู่ในตัวทำละลายได้มากขึ้น [15] ผลการทดลองที่ได้ข้างต้นสอดคล้องกับงานวิจัยของ

Metivier และคณะ [16] ที่ทำการศึกษาหาปริมาณสารแอนโธไซยานินที่สกัดจากกากองุ่นหลังการผลิตไวน์ด้วยตัวทำละลายน้ำ เอทานอล และเมทานอล พบว่าตัวทำละลายเมทานอลมีประสิทธิภาพในการสกัดสารแอนโธไซยานินจากพืชได้ดีที่สุด โดยประสิทธิภาพในการสกัดมากกว่าเอทานอลและน้ำเท่ากับ 20 และ 73 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ [15]



รูปที่ 1 ความเข้มข้นของสารแอนโธไซยานินที่สกัดได้จากเมล็ดสด ซังสด และไหมสดของข้าวโพดสีม่วง (เทียบจากน้ำหนักแห้งเท่ากัน) ด้วยตัวทำละลายน้ำ เอทานอล และเมทานอล ที่อัตราส่วนน้ำหนักเมล็ดสด ซังสด และไหมสดของข้าวโพดสีม่วงต่อตัวทำละลาย เท่ากับ 1:3



รูปที่ 2 ความเข้มข้นของสารแอนโธไซยานินที่สกัดได้จากเมล็ดสด ซังสด และไหมสดของข้าวโพดสีม่วง (เทียบจากน้ำหนักแห้งเท่ากัน) ด้วยตัวทำละลายน้ำ เอทานอล และเมทานอล ที่อัตราส่วนน้ำหนักเมล็ดสด ซังสด และไหมสดของข้าวโพดสีม่วงต่อตัวทำละลาย เท่ากับ 1:6

3.2 การศึกษาเปรียบเทียบอัตราส่วนน้ำหนักของซังสดของข้าวโพดสีม่วงต่อตัวทำละลายที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วยวิธีการสกัดแบบซอกห์เลต (soxhlet extraction)

จากผลการทดลองในข้อ 3.1 ทำการศึกษาและเปรียบเทียบปริมาณสารแอนโธไซยานินจากการสกัดซังสดของข้าวโพดสีม่วงที่อัตราส่วนน้ำหนักซังข้าวโพดต่อตัวทำละลาย (เอทานอลและเมทานอล) เท่ากับ 1:13, 1:17 และ 1:20 โดยมีระดับความเข้มข้นของตัวทำละลายละลาย (เอทานอลและเมทานอล) เท่ากับ 100, 90 และ 70 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ด้วยวิธีการสกัดแบบซอกห์เลต และใช้เวลาในการสกัดเท่ากับ 30 นาที ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 1 ผลการทดลองพบว่าตัวทำละลายเมทานอลสามารถสกัดแอนโธไซยานินได้สูงกว่าตัวทำละลายเอทานอลในทุก ๆ อัตราส่วนของซังข้าวโพดต่อตัวทำละลายและความเข้มข้นของตัวทำละลาย โดยที่อัตราส่วนน้ำหนักของซังข้าวโพดต่อตัวทำละลายเอทานอลและเมทานอล เท่ากับ 1:13 ที่ทุกระดับความเข้มข้นของตัวทำละลายทั้งเอทานอลและเมทานอลสามารถสกัดสารแอนโธไซยานินได้มากที่สุดและมากกว่าที่อัตราส่วนน้ำหนักของซังข้าวโพดต่อตัวทำละลายเอทานอลและเมทานอล เท่ากับ 1:17 และ 1:20 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าตัวทำละลายเมทานอลและเอทานอลที่ความเข้มข้นของตัวทำละลายเมทานอลและเอทานอล 90 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก สามารถสกัดสารแอนโธไซยานินได้มากที่สุดเมื่ออัตราส่วนน้ำหนักของซังข้าวโพดต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1:13 จากตารางที่ 1 เมื่ออัตราส่วนน้ำหนักของซังข้าวโพดต่อตัวทำละลายเอทานอลและ เมทานอลเพิ่มสูงขึ้นเป็น 1:17 และ 1:20 ความเข้มข้นตัวทำละลายเอทานอลและเมทานอลที่ 70 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก สามารถสกัดสารแอนโธไซยานินได้สูงขึ้นและมากกว่าการใช้ตัวทำละลายบริสุทธิ์หรือความเข้มข้นของตัวทำละลาย 100 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก เนื่องจากน้ำที่ผสมลงไปในตัวทำละลายเพื่อปรับความเข้มข้นของตัวทำละลายนั้นจะไปช่วยเพิ่มความแข็งแรงของพันธะไฮโดรเจนที่หมู่ไฮดรอกซิลทำให้ความเป็นขั้วของตัวทำละลายสูงมากขึ้นส่งผลให้สารแอนโธไซยานินซึ่งเป็นสารที่มีขั้วละลายออกมาอยู่ในตัวทำละลายได้ดีขึ้นและดีกว่าการใช้ตัวทำละลายบริสุทธิ์หรือตัวทำละลายความเข้มข้นสูง [17-18]

3.3 การศึกษาเวลาในการสกัดสารแอนโธ-ไซยานินจากซังสดของข้าวโพดสีม่วง

จากการศึกษาและทดลองเปรียบเทียบเวลาในการสกัดสารแอนโธไซยานินจากซังสดของข้าวโพดสีม่วง โดยระยะเวลาสกัดเท่ากับ 30, 45 และ 60 นาที เมื่อสภาวะการสกัดที่อัตราส่วนน้ำหนักซังสดข้าวโพดสีม่วงต่อตัวทำละลายเอทานอลและเมทานอลเท่ากับ 1:13 ที่ระดับความเข้มข้นตัวทำละลาย 90 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ด้วยวิธีการสกัดแบบซอกห์เลต และอุณหภูมิการสกัดของตัวทำละลายเอทานอล และเมทานอล (พิจารณาจากจุดเดือดของตัวทำละลาย) ประมาณ 80.1 และ 65.7 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3 โดยพบว่าเวลาที่ใช้ในการสกัดมีผลต่อปริมาณสารแอนโธไซยานินที่สกัดได้ โดยเมื่อเวลาในการสกัดสารแอนโธไซนินด้วยตัวทำละลายเอทานอลและเมทานอลเพิ่มขึ้นสามารถสกัดสารแอนโธไซยานินได้มากขึ้น แต่เมื่อเพิ่มเวลาในการสกัดนานขึ้น (มากกว่า 45 นาที) มีผลทำให้ปริมาณแอนโธไซยานินทั้งหมดลดลง หรือความเข้มข้นของสารแอนโธไซยานินที่สกัดได้ก็จะลดลง ซึ่งการลดลงของปริมาณแอนโธไซยานินทั้งหมด หรือความเข้มข้นของสารแอนโธไซยานินเนื่องมาจากเวลาในการสกัดที่นานขึ้นมีโอกาสที่จะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารแอนโธไซยานินส่งผลให้คุณภาพและปริมาณของสารแอนโธไซยานินลดลงอย่างรวดเร็ว [19]

ตารางที่ 1 ความเข้มข้นของสารแอนโธไซยานินทั้งหมดที่สกัดได้จากซังสดของข้าวโพดสีม่วงด้วยตัวทำละลาย (เอทานอลและเมทานอล) เมื่ออัตราส่วนน้ำหนักของซังข้าวโพดต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1:13, 1:17 และ 1:20 ที่ระดับความเข้มข้นตัวทำละลายเท่ากับ 100, 90 และ 70 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก

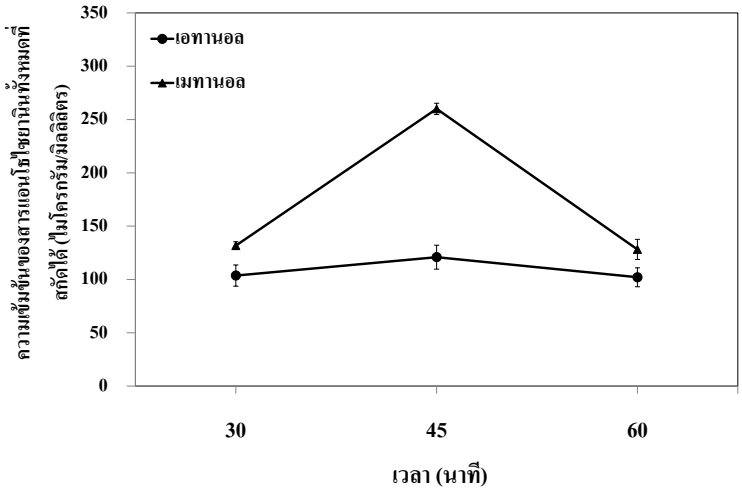
ตัวทำละลาย	อัตราส่วนของน้ำหนักซังข้าวโพดสีม่วงต่อตัวทำละลาย	ความเข้มข้นตัวทำละลาย (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)	ความเข้มข้นของสารแอนโธไซยานินทั้งหมดที่สกัดได้ (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
เอทานอล	1 : 13	100	38.96 ± 1.33^{DEF}
		90	103.65 ± 9.97^{B}
		70	86.80 ± 17.05^{B}
	1 : 17	100	27.55 ± 4.37^{F}
		90	43.98 ± 3.45^{DEF}
		70	68.72 ± 5.55^{C}
	1 : 20	100	27.55 ± 4.37^{F}
		90	43.98 ± 3.45^{DEF}
		70	68.72 ± 5.55^{C}
เมทานอล	1 : 13	100	50.50 ± 11.36^{DE}
		90	142.16 ± 19.41^{A}
		70	98.58 ± 21.21^{B}
	1 : 17	100	48.85 ± 6.58^{DE}
		90	103.10 ± 6.82^{B}
		70	96.93 ± 7.50^{B}
	1 : 20	100	35.38 ± 2.22^{EF}
		90	54.37 ± 11.48^{CD}
		70	87.81 ± 14.79^{B}

หมายเหตุ : อักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์หมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของข้อมูลที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p \leq 0.05$)

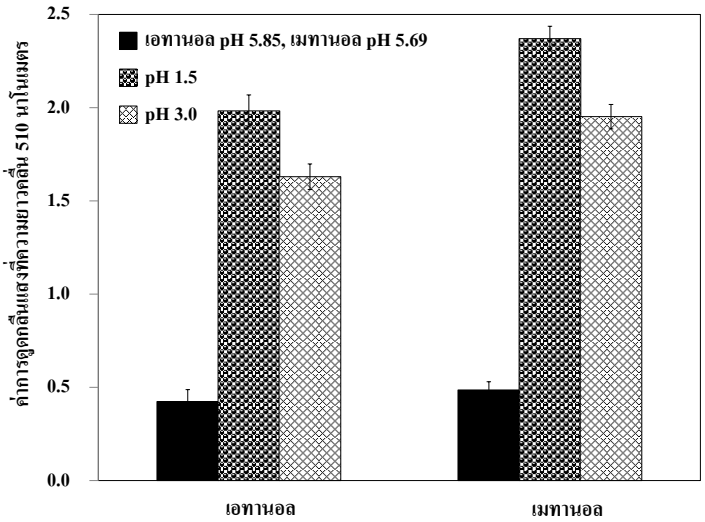
3.4 การศึกษาผลของสภาวะความเป็นกรดด่าง (pH) ที่มีผลต่อความคงตัวของสารแอนโธไซยานินที่สกัดได้จากซังสดของข้าวโพดสีม่วงด้วยตัวทำละลายเอทานอลและเมทานอล

จากการทดลองศึกษาผลของสภาวะความเป็นกรดด่าง (pH) เท่ากับ 1.5, 3 และค่าความเป็นกรดด่างปกติของตัวทำละลายเอทานอลและเมทานอลเท่ากับ 5.85 และ 5.69 ตามลำดับ ที่มีผลต่อความคงตัวของสารแอนโธไซยานินที่สกัดจากซังสดของข้าวโพดสีม่วงด้วยตัวทำละลายเอทานอลและเมทานอล เมื่ออัตราส่วนน้ำหนักของซังข้าวโพดต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1:13 ที่ระดับความเข้มข้นตัวทำละลายเท่ากับ

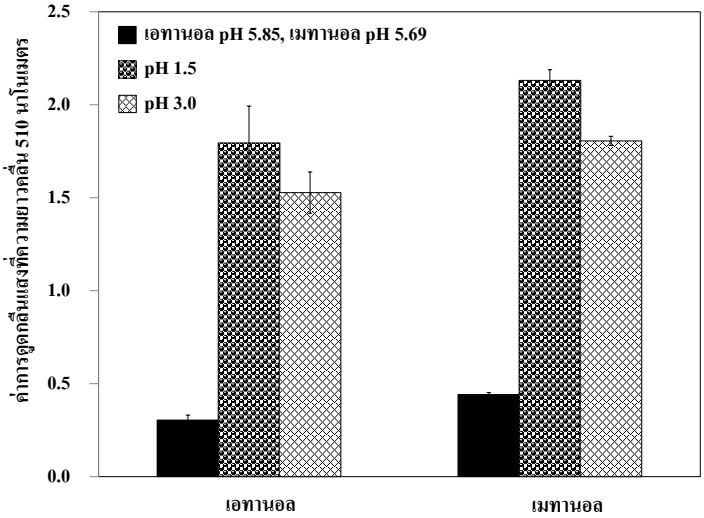
90 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และเวลาที่ใช้ในการสกัด 45 นาที โดยพิจารณาค่าการดูดกลืนแสงที่ระดับความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ผลการศึกษาแสดงดังรูปที่ 4 และ 5



รูปที่ 3 การเปรียบเทียบเวลาในการสกัดที่มีผลต่อการสกัดสารแอนโธไซยานินจากซังสดของข้าวโพดสีม่วงด้วยตัวทำละลายเอทานอลและเมทานอล เมื่ออัตราส่วนน้ำหนักซังข้าวโพดต่อตัวทำละลายเอทานอลและเมทานอลเท่ากับ 1:13 ที่ระดับความเข้มข้นตัวทำละลาย 90 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ด้วยวิธีการสกัดแบบซอกห์เลต (soxhlet extraction)



รูปที่ 4 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ของสารสกัดที่ได้จากซังสดของข้าวโพดสีม่วงด้วยตัวทำละลายเอทานอลและเมทานอล ที่เวลาเริ่มต้นของการเก็บรักษา เมื่อสภาวะการสกัดที่อัตราส่วนซังข้าวโพดต่อตัวทำละลายเท่ากับ1:13 ระดับความเข้มข้นตัวทำละลาย 90 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และเวลาในการสกัด 45 นาที



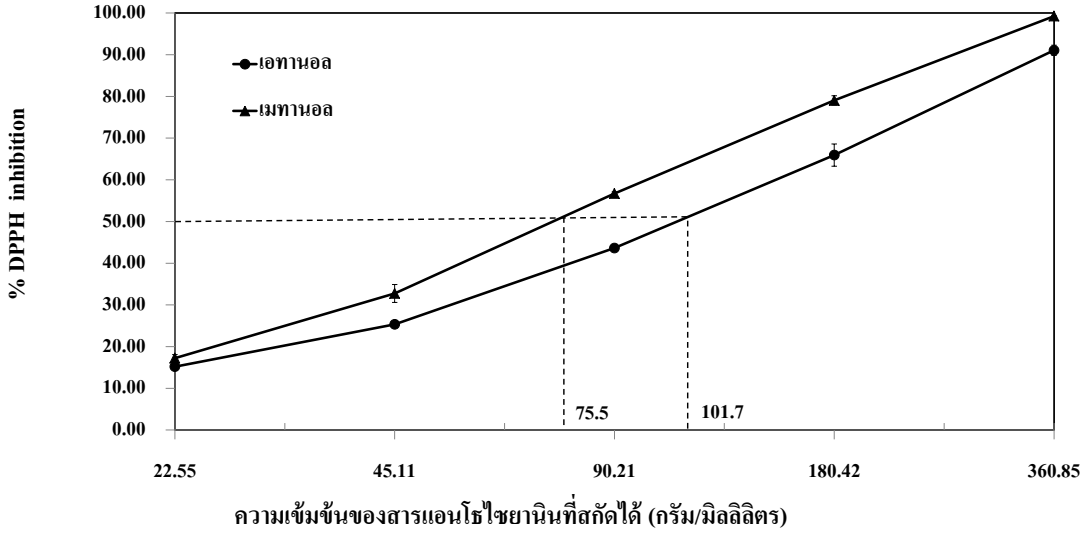
รูปที่ 5 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ของสารสกัดที่ได้จากซังสดของข้าวโพดสีม่วงด้วยตัวทำละลายเอทานอลและเมทานอล ที่เวลาการเก็บสารสกัดท่ากับ 24 ชั่วโมง เมื่อสภาวะการสกัดที่อัตราส่วนซังข้าวโพดต่อตัวทำละลาย 1:13 ระดับความเข้มข้นตัวทำละลายเท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และเวลาในการสกัด 45 นาที

ผลการศึกษาพบว่าสภาวะความเป็นกรดด่าง (pH) มีผลต่อความเข้มข้นและความคงตัวของสารแอนโธไซยานินที่สกัดได้ และที่สภาวะความเป็นกรดสูงกว่า (pH ต่ำ) จะมีค่าการดูดกลืนแสงที่สูงกว่า และเมื่อเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดที่ปรับระดับค่าความเป็นกรดด่างต่าง ๆ ที่เวลาเริ่มต้น และเมื่อเวลาการเก็บสารสกัดนาน 24 ชั่วโมง พบว่าค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลและเมทานอลจะลดต่ำลงเมื่อเวลาเก็บรักษาสารสกัดนานขึ้นหรือเมื่อเวลาการเก็บเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สารสกัดที่ได้มีค่าการดูดกลืนแสงที่มากกว่าเมื่อเวลาเริ่มต้น ค่าการดูดกลืนแสงที่ลดต่ำลงแสดงถึงปริมาณสารแอนโธไซยานินที่ลดต่ำลงนั้นเอง โดยที่สภาวะความเป็นกรดสูงกว่าสารสกัดที่ได้จะมีสีแดงเข้มมากกว่า ส่งผลให้ค่าการดูดกลืนแสงมากกว่า ซึ่งเป็นไปตามหลักโครงสร้างของแอนโธไซยานิที่ว่าเมื่อความเป็นกรดสูงสารแอนโธไซยานินอยู่ในรูปของ flavylium cation (สีแดง) และมีความเสถียรมากกว่า แต่เมื่อเวลาในการเก็บรักษาการสกัดนานขึ้นจะเร่งการสลายตัวของสารแอนโธไซยานินและทำให้โครงสร้างของแอนโธไซยานินเปลี่ยนจาก flavylium cation (สีแดง) เป็น chalcone (ไม่มีสี) ส่งผลให้ปริมาณแอนโธไซยานินและความเป็นสีแดงของสารลดลง [20-21]

3.5 การศึกษาความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารแอนโธไซยานินที่ได้จากการสกัดซังสดของข้าวโพดสีม่วงด้วยตัวทำละลายเอทานอลและเมทานอล

จากผลการทดลองความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH เพื่อหาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากซังสดของข้าวโพดสีม่วงด้วยตัวทำละลายเอทานอลและเมทานอล อัตราส่วนซังข้าวโพดต่อตัวทำละลาย (เอทานอลหรือเมทานอล) เท่ากับ 1:13 ความเข้มข้นตัวทำละลาย(เอทานอลหรือเมทานอล) เท่ากับ 90

เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และเวลาที่ใช้ในการสกัด 45 นาที โดยงานวิจัยนี้จะแสดงความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารแอนโธไซยานินที่สกัดได้จากซังข้าวโพดสีม่วงด้วยตัวทำละลายเอทานอลและเมทานอลเป็นค่า 50 % effective concentration (EC_{50}) ซึ่งหมายถึงค่าความเข้มข้นของสารสกัดแอนโธไซยานินจากซังข้าวโพดสีม่วงที่นำมาทดสอบสามารถลดปริมาณอนุมูลอิสระเริ่มต้นลงได้ร้อยละ 50 แสดงความสัมพันธ์ของสารสกัดแอนโธไซยานินจากซังข้าวโพดสีม่วงด้วยเอทานอลและเมทานอลแสดงดังรูปที่ 6



รูปที่ 6 การยับยั้งสารอนุมูลอิสระของสารสกัดแอนโธไซยานินจากซังสดของข้าวโพดสีม่วงด้วยเอทานอลและเมทานอล เมื่ออัตราส่วนซังข้าวโพดต่อตัวทำละลาย 1:13 ความเข้มข้นเอทานอลและเมทานอล 90 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ที่เวลาในการสกัด 45 นาที (ค่าความเข้มข้นของสารสกัดซังข้าวโพดสีม่วงด้วยเอทานอลและเมทานอลที่สามารถลดปริมาณสารอนุมูลอิสระลงได้ 50 เปอร์เซ็นต์)

จากการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดแอนโธไซยานินจากซังสดของข้าวโพดสีม่วงด้วยตัวทำละลายเอทานอลและเมทานอล พบว่าปริมาณความเข้มข้นสารสกัดแอนโธไซยานินด้วยเอทานอลและเมทานอลจะมีค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระที่ 50 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 101.7 และ 75.5 กรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังนั้นสารแอนโธไซยานินที่สกัดได้จากซังสดของข้าวโพดสีม่วงด้วยตัวทำละลายเมทานอลมีความเข้มข้นต่ำกว่าสารสกัดแอนโธไซยานินที่สกัดได้จากซังสดของข้าวโพดสีม่วงโดยตัวทำละลายเอทานอลในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระลงได้ 50 เปอร์เซ็นต์ จึงสรุปได้ว่าสารสกัดแอนโธไซยานินจากซังสดของข้าวโพดสีโดยเมทานอลมีความสามารถต้านสารอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารสกัดจากซังสดของข้าวโพดสีม่วงโดยเอทานอล

4. สรุป

เมล็ดสด ซังสด และไหมสดของข้าวโพดสีม่วง (เทียบจากน้ำหนักแห้งเท่ากัน) ที่นำมาสกัดสารแอนโธไซยานินด้วยการแช่ตัวทำละลายเมทานอล เอทานอล

และน้ำ พบว่าซังสดของข้าวโพดมีปริมาณสารแอนโธ-ไซยานินในปริมาณมากกว่าไหมสด และเมล็ดสดของข้าวโพด ตามลำดับ ตัวทำละลายเมทานอลสามารถสกัดสารแอนโธไซยานินได้มากที่สุดและมากกว่าเอทานอล และน้ำ ตามลำดับ วิธีการสกัดแบบซอกห์เลต (soxhlet extraction) นำมาสกัดสารแอนโธไซยานินจากซังสดของข้าวโพดสีม่วงด้วยตัวทำละลายเมทานอลและเอทานอล โดยพบว่าตัวทำละลายเมทานอลสามารถสกัดสารแอนโธไซยานินได้สูงกว่าตัวทำละลายเอทานอล การสกัดสารแอนโธไซยานินจากซังข้าวโพดสีม่วงได้มากที่สุดเมื่ออัตราส่วนน้ำหนักซังข้าวโพดต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1:13 ที่ความเข้มข้นของตัวทำละลายเมทานอลเท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก นอกจากนี้ที่อัตราส่วนน้ำหนักซังข้าวโพดต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1:13 ในทุกระดับความเข้มข้นของตัวทำละลาย (100, 90 และ 70 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) สามารถสกัดสารแอนโธไซยานินได้มากกว่าที่อัตราส่วนน้ำหนักซังข้าวโพดต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1:17 และ 1:20 ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม เมื่ออัตราส่วนน้ำหนักซังข้าวโพดต่อตัวทำละลายเพิ่มขึ้นจะพบว่าที่ความเข้มข้นตัวทำละลาย 70 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก จะสกัดสารแอนโธไซยานินได้ดีกว่าความเข้มข้นของตัวทำละลาย 90 และ 100 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ตามลำดับ เวลาในการสกัดมีผลต่อปริมาณสารแอนโธไซยานินที่สกัดได้ โดยเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นจะสามารถสกัดสารแอนโธไซยานินได้มากขึ้น อย่างไรก็ตาม เมื่อเวลาการสกัดมากขึ้น (มากกว่า 45 นาที) ปริมาณสารแอนโธไซยานินที่สกัดได้จะลดลง สภาวะความเป็นกรดด่าง (pH) และเวลาในการเก็บรักษามีผลต่อปริมาณสารแอนโธไซยานิน โดยสภาวะความเป็นกรดสูง (pH ต่ำ) จะมีปริมาณสารแอนโธไซยานินมากกว่าที่สภาวะความเป็นกรดต่ำ (pH สูง) และปริมาณสารแอนโธไซยานินจะลดลงเมื่อเวลาในการเก็บรักษานานขึ้น

การศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารแอนโธไซยานินที่สกัดได้จากซังสดของข้าวโพดสีม่วงด้วยตัวทำละลายเอทานอลและเมทานอล พบว่าสารแอนโธไซยานินที่ถูกสกัดออกมาจากซังข้าวโพดสีม่วงด้วยตัวทำละลายเมทานอลมีความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารแอนโธไซยานินที่ถูกสกัดออกมาจากซังข้าวโพดสีม่วงด้วยตัวทำละลายเอทานอล โดยปริมาณสารสกัดแอนโธไซยานินจากซังสดของข้าวโพดสีม่วงด้วยตัวทำละลายเอทานอลและเมทานอลที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระที่ 50 ปอร์เซ็นต์เท่ากับ 101.7 และ 75.5 กรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

อย่างไรก็ตามข้อเสียของเมทานอลคือมีราคาแพง สามารถดูดซึมได้ทางผิวหนัง ลมหายใจ และดูดซึมได้เร็วในระบบทางเดินอาหาร แล้วจะกระจายเข้าสู่กระแสเลือด เมทานอลเป็นตัวทำละลายที่มีความเป็นพิษสูงกว่าเอทานอลมาก เมทานอลไม่สามารถระเหยออกจากสารละลายสกัดได้หมดจึงก่อให้เกิดสารพิษตกค้างในอาหารเป็นอันตรายต่อระบบประสาทและทางเดินหายใจของผู้บริโภค ดังนั้นในอุตสาหกรรมอาหารและยาจึงใช้เอทานอลหรือน้ำเป็นตัวทำละลายเพราะมีความปลอดภัยต่อการบริโภคสารสกัดที่ได้จากพืชและผักผลไม้ [17,19]

5. เอกสารอ้างอิง

[1] Yang, Z. and Zhai, W., 2010, Identification and antioxidant activity of anthocyanins extracted from the seed and cob of purple corn (*Zea mays* L.), Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 11: 169-176.

[2] Pedreschi, R. and Cisneros-Zevallos, L., 2007, Phenolic profiles of Andean purple corn (*Zea mays* L.), Food Chem. 100: 956-963.

[3] Pascual-Teresa, S., Santos-Buelga, C. and Rivas-Gonzalo, J.C., 2002, LCMS analysis of anthocyanins from purple corn cob, J. Sci. Food Agric. 82: 1003-1006.

[4] Ramos-Escudero, F., Gonzalez-Miret, M.L. and Garcia-Asuero, A., 2012, Effect of various extraction systems on the antioxidant activity kinetic and color of extracts from purple corn, VITAE-COLUMBIA. 19: 41-48.

[5] Lila, M.A., 2004, Anthocyanins and human health: An *in vitro* investigative approach, J. Biomed. Biotechnol. 5: 306-313.

[6] Yang, Z. and Zhai, W., 2010, Optimization of microwave-assisted extraction of anthocyanins from purple corn (*Zea mays* L.) cob and identification with HPLC–MS, Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 11: 470-476.

[7] Shipp, J. and Abdel-Aal, E.S.M., 2010, Food applications and physiological effects of anthocyanins as functional food ingredients, Open Food Sci. J. 4: 7-22.

[8] Wang, L. and Weller, C.L., 2006, Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants, Trends Food Sci. Technol. 17: 300-312.

[9] Veigas, J.M., Narayan, M.S., Laxman, P.M. and Neelwarne, B., 2007, Chemical nature, stability and bioefficacies of anthocyanins from fruit peel of *Syzygium cumini* Skeels, Food Chem. 105: 619-627.

[10] Faria, A.F., Marques, M.C. and Mercadante, A.Z., 2011, Identification of bioactive compounds from jambolão (*Syzygium cumini*) and antioxidant capacity evaluation in different pH conditions, Food Chem. 126: 1571-1578.

[11] AOAC, 2000, Official methods of analysis (17th ed.), Association of Official Analytical Chemists, Arlington.

[12] Lee, J., Durst, R.W. and 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: 1269-1278.

[13] Tananuwong, K. and Tewaruth, W., 2010, Extraction and application of antioxidants from black glutinous rice, LWT. Food Sci. Technol. 43: 476-481.

[14] Wang, Z., Pan, Z., Ma, H. and Atungulu, G.G., 2011, Extract of phenolics from pomegranate peels, Open Food Sci. J. 5: 17-25.

[15] Lapornik, B., Prošek, M. and Golc Wondra, A., 2005, Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time, J. Food Eng. 71: 214-222.

[16] Metivier, R.P., Francis, F.J. and Clydesdale, F.M., 1980, Solvent extraction of

anthocyanins from wine pomace, J. Food Sci. 45: 1099-1100.

[17] Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G. and Kaur, H., 2011, Phytochemical screening and extraction: a review, Int. Pharma. Sci. 1: 98-106.

[18] Bimakr, M., Rahman, R.A., Taip, F.S., Ganjloo, A., Salleh, L.M., Selamat, J., Hamid, A. and Zaidul, I.S.M., 2011, Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves, Food Bioprod. Process. 89: 67-72.

[19] Dai, J. and Mumper, R.J., 2010, Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties, Molecules 15: 7313-7352.

[20] Kırca, A., Özkan, M. and Cemeroglu, B., 2007, Effects of temperature, solid content and pH on the stability of black carrot anthocyanins, Food Chem. 101: 212-218.

[21] Laleh, G.H., Frydoonfar, H., Heidary, R., Jameei, R. and Zare, S., 2006, The effect of light, temperature, pH and species on stability of anthocyanin pigments in four berberis species, Pak. J. Nutr. 5: 90-92.