



## รายงานการวิจัย

การใช้สารแทนนินจากเปลือกผลของมังคุดแทนการใช้  
พะยอมเพื่อชะลอการเน่าเสียของน้ำตาลสด

Application of Extracted Tannin from Mangosteen Peel  
in Comparison with Payom (*Shorea floribunda* Kurz) to  
Delay the Spoilage of Palm Juice

พิชิต สุดตา

มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี  
และ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ  
ปีงบประมาณ พ.ศ. 2557

## สารบัญ

| บทที่    |                                                        | หน้า      |
|----------|--------------------------------------------------------|-----------|
|          | กิตติกรรมประกาศ                                        | ก         |
|          | บทคัดย่อ                                               | ข         |
|          | สารบัญ                                                 |           |
|          | สารบัญตาราง                                            |           |
|          | สารบัญภาพ                                              |           |
| <b>1</b> | <b>บทนำ.....</b>                                       | <b>1</b>  |
|          | 1.1 ความเป็นมาและปัญหา.....                            | 1         |
|          | 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....                       | 3         |
|          | 1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....                     | 3         |
|          | 1.4 ขอบเขตของการวิจัย.....                             | 4         |
|          | 1.5 สมมุติฐานของการวิจัย.....                          | 5         |
|          | 1.6 ตัวแปรที่ใช้ในการวิจัย.....                        | 5         |
| <b>2</b> | <b>เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....</b>             | <b>6</b>  |
|          | 2.1 ต้นตาลโตนด.....                                    | 6         |
|          | 2.2 น้ำตาลโตนด.....                                    | 7         |
|          | 2.3 สารประกอบแทนนิน.....                               | 14        |
|          | 2.4 พะยอม.....                                         | 19        |
|          | 2.5 มังคุด.....                                        | 24        |
|          | 2.6 เทคนิคการวิเคราะห์ condensed tannin.....           | 30        |
| <b>3</b> | <b>วิธีดำเนินการวิจัย.....</b>                         | <b>38</b> |
|          | 3.1 อุปกรณ์/เครื่องมือ และสารเคมี.....                 | 38        |
|          | 3.2 ตัวอย่างพืชและวัตถุดิบสำหรับการวิจัย.....          | 39        |
|          | 3.3 การเตรียมสารสกัดแทนนิน.....                        | 39        |
|          | 3.4 การวิเคราะห์ประเภทและปริมาณแทนนินรวมในสารสกัด..... | 40        |

## สารบัญ (ต่อ)

| บทที่    |                                                                                                | หน้า      |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
|          | 3.5 การวิเคราะห์เบื้องต้นถึงความสามารถของสารสกัดแทนนินใน<br>การชะลอการเน่าเสียของน้ำตาลสด..... | 41        |
|          | 3.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ.....                                                                  | 43        |
| <b>4</b> | <b>ผลและอภิปรายผลการวิจัย.....</b>                                                             | <b>44</b> |
|          | 4.1 การเตรียมสารสกัด.....                                                                      | 44        |
|          | 4.2 การทดสอบประเภทของแทนนิน.....                                                               | 46        |
|          | 4.3 ปริมาณแทนนินทั้งหมดของสารสกัด.....                                                         | 54        |
|          | 4.4 ประสิทธิภาพของแทนนินในการชะลอการเน่าเสียของน้ำตาล<br>สด.....                               | 56        |
| <b>5</b> | <b>สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....</b>                                                        | <b>65</b> |
|          | เอกสารอ้างอิง.....                                                                             | 67        |
|          | ภาคผนวก.....                                                                                   | 72        |

## สารบัญภาพ

| ภาพที่                                                                                                    | หน้า |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1.1 ก) ตาลโตนด ข) พะยอม ค) มังคุด.....                                                                    | 3    |
| 2.1 โครงสร้างของสาร hydrolysable tannins.....                                                             | 15   |
| 2.2 โครงสร้างของสาร condensed tannins .....                                                               | 16   |
| 2.3 ส่วนประกอบของพะยอม ก) ลำต้น ข) ใบ ค) ดอก ง) ผล.....                                                   | 19   |
| 2.4 ตัวอย่างองค์ประกอบทางเคมีในส่วนเปลือกกรากของพะยอม.....                                                | 20   |
| 2.5 ตัวอย่างองค์ประกอบทางเคมีในส่วนเปลือกกรากของพะยอม.....                                                | 21   |
| 2.6 ตัวอย่างองค์ประกอบทางเคมีในส่วนเปลือกลำต้นของพะยอม.....                                               | 22   |
| 2.7 ส่วนประกอบของมังคุด ก) ใบ ข) ดอก ค) ผลอ่อน ง) ผลสุก.....                                              | 25   |
| 2.8 ตัวอย่างสารแซนโทนที่เป็นองค์ประกอบในเปลือกผลมังคุด.....                                               | 27   |
| 2.9 HPLC โครมาโทแกรมของสารสารแทนนินจากเปลือกผลมังคุด.....                                                 | 28   |
| 2.10 โครงสร้างของสารแทนนินจากเปลือกผลมังคุดที่พบใน HPLC<br>โครมาโทแกรม.....                               | 29   |
| 2.11 condensed tannins และโครงสร้างจากปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชัน.....                                      | 30   |
| 2.12 การเกิด anthocyanidin ในเทคนิค acid-butanol assay.....                                               | 31   |
| 2.13 ตัวอย่างกราฟของสารมาตรฐานที่นิยมใช้ในเทคนิค acid-butanol assay.....                                  | 33   |
| 2.14 ปฏิกริยาเคมีในการวิเคราะห์ condensed tannin ด้วย vanillin assay.....                                 | 34   |
| 2.15 ปฏิกริยาเคมีในการวิเคราะห์ condensed tannin; ก) วิธี<br>thiolysis ข) phloroglucinol degradation..... | 36   |
| 3.1 การเปลี่ยนสีของ methylene blue ในสภาวะความเป็นที่<br>แตกต่างกัน.....                                  | 43   |
| 4.1 การเตรียมสารสกัดแทนนินจากเปลือกต้นพะยอม.....                                                          | 44   |

## สารบัญภาพ (ต่อ)

| ภาพที่                                                                                                                                                                                                          | หน้า |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 4.2 การเตรียมสารสกัดแทนนินจากเปลือกผลมังคุด.....                                                                                                                                                                | 45   |
| 4.3 ปฏิกริยาการเกิดสารที่มีสีของ hydrolysable tannin และ<br>condensed tannin ด้วยสารละลาย $\text{FeCl}_3$ .....                                                                                                 | 47   |
| 4.4 ปฏิกริยาการเกิดตะกอนสีขาวของ hydrolysable tannin และ<br>condensed tannin ด้วยสารละลายโปรตีน gelatin.....                                                                                                    | 49   |
| 4.5 ปฏิกริยาการเกิดตะกอนของ hydrolysable tannin และ<br>condensed tannin ด้วยสารละลาย lead acetate.....                                                                                                          | 51   |
| 4.6 ปฏิกริยาการเกิดตะกอนของ hydrolysable tannin และ<br>condensed tannin ด้วยสารละลายน้ำโบรมีน.....                                                                                                              | 52   |
| 4.7 โครงสร้างของหน่วยย่อย flavan-3-ol ที่พบใน condensed<br>tannin.....                                                                                                                                          | 53   |
| 4.8 ปฏิกริยาเคมีใน Vanillin assay.....                                                                                                                                                                          | 54   |
| 4.9 กราฟมาตรฐานของ (+)-catechin จากการวัดค่าการดูดกลืนแสง<br>ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร.....                                                                                                                  | 55   |
| 4.10 ค่า pH (ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD (n=3), $P < 0.05$ เทียบกับ control) ที่<br>ลดลงของน้ำตาลสด(control) และน้ำตาลสดที่เติม tannic acid<br>tannin-SR และ tannin-GM ในปริมาณ 1 มิลลิกรัมที่เวลา 0-32<br>ชั่วโมง.....  | 57   |
| 4.11 ค่า pH (ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD (n=3), $P < 0.05$ เทียบกับ control) ที่<br>ลดลงของน้ำตาลสด (control) และน้ำตาลสดที่เติม tannic acid<br>tannin-SR และ tannin-GM ในปริมาณ 5 มิลลิกรัมที่เวลา 0-32<br>ชั่วโมง..... | 58   |

## สารบัญภาพ (ต่อ)

| ภาพที่                                                                                                                                                                                               | หน้า |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 4.12 ค่า pH (ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD (n=3), $P < 0.05$ เทียบกับ control) ที่ลดลงของน้ำตาสด (control) และน้ำตาสดที่เติม tannic acid tannin-SR และ tannin-GM ในปริมาณ 10 มิลลิกรัมที่เวลา 0-32 ชั่วโมง..... | 59   |
| 4.13 ค่า pH (ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD (n=3), $P < 0.05$ เทียบกับ control) ที่ลดลงของน้ำตาสด (control) และน้ำตาสดที่เติม tannic acid tannin-SR และ tannin-GM ในปริมาณ 20 มิลลิกรัมที่เวลา 0-32 ชั่วโมง..... | 60   |
| 4.14 ค่า pH (ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD (n=3), $P < 0.05$ เทียบกับ control) ที่ลดลงของน้ำตาสด (control) และน้ำตาสดที่เติม tannic acid tannin-SR และ tannin-GM ในปริมาณ 40 มิลลิกรัมที่เวลา 0-32 ชั่วโมง..... | 61   |
| 4.15 ก) การเปลี่ยนสีของน้ำตาสดเมื่อเติมสารละลาย methylene blue โดยการทำงานของแบคทีเรีย ข) สมการแสดงการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของ methylene blue เมื่อแบคทีเรียมีการเจริญเติบโต.....              | 62   |
| 4.16 ระยะเวลา (Mean $\pm$ SD, $P < 0.05$ เทียบกับ control) ในการเปลี่ยนสีของน้ำตาสด (control) เมื่อมีการเติม tannic acid tannin-SR และ tannin-GM ในปริมาณ 1 5 10 20 และ 40 มิลลิกรัม.....            | 63   |

## สารบัญตาราง

| ตารางที่                                                                                                              | หน้า |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 2.1 องค์ประกอบที่สำคัญของน้ำตาลโตนดสด.....                                                                            | 9    |
| 2.2 ชนิดของสารระเหยในน้ำตาลสด.....                                                                                    | 9    |
| 2.3 สมบัติทางเคมีของน้ำตาลโตนดสด.....                                                                                 | 13   |
| 2.4 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของแทนนินบางชนิด.....                                                                  | 18   |
| 4.1 สมบัติทางกายภาพ และร้อยละของสารสกัดจากเปลือกไม้พะยอม                                                              | 45   |
| 4.2 สมบัติทางกายภาพ และร้อยละของสารสกัดเปลือกมังคุด.....                                                              | 46   |
| 4.3 ผลการทำปฏิกิริยากับสารละลาย $FeCl_3$ ของสารสกัดแทนนิน<br>เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน.....                            | 47   |
| 4.4 ผลการทำปฏิกิริยากับสารละลาย gelatin (1% w/v) ของสาร<br>สกัดแทนนินเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน.....                    | 48   |
| 4.5 ผลการทำปฏิกิริยากับสารละลาย lead acetate (1% w/v) ของ<br>สารสกัดแทนนินโดยเทียบกับการทำปฏิกิริยาของสารมาตรฐาน..... | 50   |
| 4.6 ผลการทำปฏิกิริยากับสารละลายน้ำโบรมีนของสารสกัดแทนนิน<br>เทียบกับสารมาตรฐาน.....                                   | 51   |
| 4.7 ค่า maximum wavelength (nm) ของสารสกัดเทียบกับสาร<br>มาตรฐาน.....                                                 | 53   |
| 4.8 ค่าการดูดกลืนแสงของ tannin-SR และ tannin-GM ตามวิธี<br>Vanillin assay .....                                       | 55   |
| 4.9 ปริมาณ condensed tannins ทั้งหมดใน tannin-SR และ<br>tannin-GM.....                                                | 56   |
| 4.10 การละลายของสารสกัดแทนนินในน้ำตาลสดปริมาตร 10<br>มิลลิลิตร.....                                                   | 56   |

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้เนื่องจากได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557 ภายใต้ความร่วมมือของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารีฯ ของมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี และการสนับสนุนวัสดุอุปกรณ์บางชนิดจากหน่วยวิจัยเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

ขอขอบคุณ คุณยุพิน บัวผัน เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเคมีสำหรับการอำนวยความสะดวกเพื่อให้งานวิจัยดำเนินไปด้วยความเรียบร้อย และขอขอบคุณนักศึกษาสาขาวิชาเคมีภายใต้กลุ่มวิจัยที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างพืชและเตรียมสารสกัดแทนนิน

ท้ายนี้คุณค่าและประโยชน์ใดๆ อันเกิดจากงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยขอมอบแต่บิดา มารดา ครู อาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่าน และเป็นเกียรติแก่มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

พิชิต สุดตา

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

การผลิตน้ำตาลโตนดของชุมชนในพื้นที่จังหวัดเพชรบุรียังถือเป็นอาชีพรองจากการทำเกษตรกรรมด้านอื่นๆ เช่น ปลูกข้าว ทำสวนผัก สวนมะนาว หรือแม้แต่การปลูกกล้วยหอมทอง เป็นต้น ซึ่งสามารถสร้างรายได้ให้กับเกษตรกรผู้ทำอาชีพปลูกต้นตาลโตนด (*Borassus flabellifer* Linn., ภาพที่ 1ก) ได้เป็นอย่างดี เนื่องจากความต้องการของตลาดมักเลือกคุณภาพที่โดดเด่นของการมีรสชาติหอมหวานและเก็บไว้ได้นานของน้ำตาลโตนดก่อนที่ผลิตจากจังหวัดเพชรบุรี อีกทางเลือกหนึ่งของการจำหน่ายน้ำตาลโตนดในรูปน้ำตาลก้อนของเกษตรกรคือ การผลิตและจำหน่ายน้ำตาลโตนดในรูปของน้ำตาลสด เนื่องจากสามารถสร้างรายได้ที่ดีกว่าหลายเท่าเมื่อคิดเทียบกับปริมาณน้ำตาลโตนดสดเริ่มต้นที่ต้องใช้ในการแปรรูปเป็นน้ำตาลก้อน แต่ปัญหาการเน่าเสียง่ายของน้ำตาลโตนดสดยังส่งผลกระทบต่อคุณภาพการผลิตและจำหน่ายผลิตภัณฑ์น้ำตาลโตนดสดของชุมชนเป็นอย่างมาก

โดยปกติน้ำตาลสดจากช่อดอกของต้นตาลโตนดจะมีช่วงเวลาก่อนการเน่าเสียและยังคงมีคุณภาพดีอยู่ประมาณ 1-2 ชั่วโมงหลังจากการรองรับโดยมีค่า pH ประมาณ 7.0-7.2 ถ้าหลังจากนั้นประมาณ 5-8 ชั่วโมง น้ำตาลสดจะเริ่มบูดเน่ารุนแรง มีรสเปรี้ยว (pH < 4) สีขาวขุ่น และมีฟองแก๊สจำนวนมาก (เรณูภา แจ่มฟ้า, 2545; สุภารัตน์ เตียไพบูลย์, 2547) เนื่องจากการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์หลากหลายชนิด เช่น ยีสต์ ได้แก่ *Schizosaccharomyces pombe* Pichia sp. และ *Candida mycoderma* แบคทีเรีย ได้แก่ *Lactobacillus* sp. *Leuconostoc* sp. และ *Saccharomyces cerevisiae* และเชื้อราบางชนิด ได้แก่ *Aspergillus flavus* *Mucor* sp. และ *Rhizopus* sp. เป็นต้น ซึ่งจะผลิตสารอินทรีย์ที่มีสมบัติเป็นกรด โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดแลกติก (Atputharajah et al., 1986; Faparsui and Barsir, 1972) อันเป็นสาเหตุของการมีรสชาติเปรี้ยวและหากใช้ระยะเวลาในการร่อนน้ำตาลสดนานจะยิ่งทำให้น้ำตาลสดบูดเน่า

ไม่เหมาะสมสำหรับการผลิตเป็นเครื่องดื่มน้ำตาลสดหรือแม้แต่การนำไปแปรรูปเป็นน้ำตาลโตนดก่อนก็ตาม

ตามภูมิปัญญาดั้งเดิมไทยของการทำอาชีพรองน้ำตาลสดเกษตรกรรมเดิมเปลือกไม้เคี่ยม (*Cotylelobium lanceolatum* Craib) ไม้ตะเคียน (*Hopea odorata* Roxb) ไม้มะเกลือ (*Diospyros mollis* Griff) หรือไม้พะยอม (*Shorea floribunda* Kurz., ภาพที่ 1ข) ลงในกระบอกไม้ไผ่ที่ผ่านการรมควันไฟแล้วประมาณ 3-4 ชิ้นเล็กๆ (หนักประมาณ 4-5 กรัม) เพื่อเป็นการชะลอการเน่าเสียของน้ำตาลสด (ปราโมทย์ธรรมรัตน์, 2521) โดยสามารถยืดอายุการเน่าเสียของน้ำตาลสดให้มีคุณภาพดีอยู่ได้ถึงประมาณ 9-10 ชั่วโมง (Chitravadivu et al., 2009) โดยที่ส่วนเปลือกต้นของพืชเหล่านี้มีสารพอลิฟีนอลที่ละลายน้ำได้ดีโดยเฉพาะอย่างยิ่งสารแทนนินซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักและมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีผลต่อการเน่าเสียของน้ำตาลสด (Akiyama et al., 2001; Subramanian et al., 2013) แต่โดยส่วนใหญ่เกษตรกรในจังหวัดเพชรบูรณ์นิยมใช้เปลือกไม้พะยอมเนื่องจากช่วยเพิ่มกลิ่นหอมให้กับน้ำตาลสดได้ดีกว่าเปลือกไม้ชนิดอื่นๆ แต่ยังประสบกับปัญหาที่สำคัญบางประการคือ การไม่มีต้นพะยอมเป็นพืชในท้องถิ่นจึงจำเป็นต้องหาซื้อเปลือกไม้พะยอมจากแหล่งอื่น อีกทั้งไม้พะยอมจัดเป็นไม้หวงห้าม ซึ่งในอนาคตอาจเป็นการยากที่จะยังคงมีการใช้ไม้พะยอมในการเป็นสารกันบูดจากธรรมชาติสำหรับเกษตรกรผู้มีอาชีพร่อนน้ำตาลสดจากต้นตาลโตนดและเพื่อเป็นการรักษาภูมิปัญญาไทยในการใช้วัสดุธรรมชาติทดแทนการใช้สารเคมีกันบูดที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพผู้บริโภค งานวิจัยนี้จึงมีความสนใจที่จะนำเปลือกผลของมังคุด (*Garcinia mangostana* Linn; ภาพที่ 1ค) ซึ่งเป็นส่วนเหลือใช้จากการบริโภคส่วนเนื้อใน โดยส่วนเปลือกผลมีสารกลุ่มที่ไม่ละลายน้ำซึ่งส่วนใหญ่เป็นสารที่ให้สีเหลืองเรียกว่าสารประกอบแซนโทน และสารกลุ่มที่ละลายน้ำได้ดีเรียกว่าสารประกอบแทนนิน ซึ่งพบว่าสารแทนนินเป็นองค์ประกอบในส่วนเปลือกผลมังคุดอยู่มากถึงร้อยละ 13 (Jung et al., 2006; Fu et al., 2007) โดยงานวิจัยนี้ได้นำส่วนเปลือกผลมาทำการสกัดสารในกลุ่มแทนนินแล้วศึกษาประสิทธิภาพเบื้องต้นในการชะลอการเน่าเสียของน้ำตาลสด โดยมีความคาดหวังว่าเปลือกผลมังคุดอาจเป็นแหล่งธรรมชาติแหล่งใหม่ที่สามารถใช้ทดแทนไม้พะยอมในการรักษาคุณภาพของน้ำตาลโตนดก่อนนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อจำหน่ายทั้งที่เป็นเครื่องดื่มน้ำตาลสด น้ำตาลสดเข้มข้นและน้ำตาลก้อนได้ในอนาคต



ภาพที่ 1 ก) ตาลโตนด (ที่มา; Wee, 2003)

ข) พะยอม (ที่มา; สำนักงานบริหารพื้นที่อนุรักษ์ที่ 6 (สงขลา)

ค) มังคุด (ที่มา; Fruit Warehouse, 2012)

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1.2.1 เพื่อสกัดสารแทนนินที่เป็นองค์ประกอบในส่วนเปลือกผลของมังคุดและเปลือกไม้พะยอม
- 1.2.2 วิเคราะห์ประเภทของสารแทนนินที่เป็นองค์ประกอบหลักในสารสกัดแทนนินจากทั้งเปลือกผลมังคุดและเปลือกไม้พะยอม
- 1.2.3 หาปริมาณแทนนินทั้งหมดของสารสกัดแทนนินจากเปลือกต้นพะยอมและเปลือกผลมังคุด
- 1.2.4 ทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นในการชะลอการเน่าเสียของน้ำตาลสดของสารสกัดแทนนินจากเปลือกผลมังคุดเทียบกับสารสกัดแทนนินจากเปลือกต้นพะยอม

## 1.3 ประโยชน์ที่จะได้รับการวิจัย

- 1.3.1 ได้ข้อมูลเกี่ยวกับประเภทของสารแทนนินที่เป็นองค์ประกอบหลักในเปลือกไม้พะยอมและเปลือกผลมังคุด
- 1.3.2 ได้ทราบถึงความแตกต่างของปริมาณแทนนินรวมที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดเปลือกไม้พะยอม และเปลือกผลมังคุด
- 1.3.3 ผลจากการวิจัยอาจค้นพบสารยับยั้งการเน่าเสียของน้ำตาลสดจากธรรมชาติแหล่งใหม่แทนพะยอม นั่นคือเปลือกผลมังคุด ซึ่งเกษตรกรผู้ทำอาชีพร่อนน้ำตาลสดอาจนำไปประยุกต์ใช้ได้จริงในอนาคต

- 1.3.4 องค์ความรู้จากงานวิจัย อาจสามารถเผยแพร่สู่สาธารณะชน เพื่อส่งเสริมการนำวัสดุเหลือใช้จากธรรมชาติมาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด ในการเป็นสารป้องกันการเน่าเสียจากธรรมชาติ อันเป็นการสนองพระราชดำริภายใต้โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

## 1.4 ขอบเขตของการวิจัย

- 1.4.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย  
เปลือกต้นพะยอมแห้งหนัก 700.19 กรัม เก็บจากจาก ต.บ่อพันขัน อ. สุวรรณภูมิ จ. ร้อยเอ็ดเมื่อ เดือนเมษายน พ.ศ. 2556 เปลือกผลมังคุดสุกแห้ง 1200.45 กรัม เก็บจาก ต.ปังหวาน อ.พะโต๊ะ จ.ชุมพร เมื่อเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2556 น้ำตาลสดที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์เป็นน้ำตาลโตนดได้จากผู้ทำอาชีพขึ้นน้ำตาล ต.โรงเข้ อ.บ้านลาด จ.เพชรบุรีโดยควบคุมให้ไม่มีการเติมเปลือกไม้พะยอมและเก็บที่อุณหภูมิ  $-5^{\circ}\text{C}$  เพื่อใช้สำหรับวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป
- 1.4.2 การเตรียมสารสกัดแทนนินโดยการแช่หมักด้วยแอซิโตน แล้วสกัดด้วยตัวทำละลายผสมของน้ำและเอทานอล (1:1 v/v) ที่อุณหภูมิห้อง ( $27^{\circ}\text{C}$ )
- 1.4.3 การวิเคราะห์ประเภทของแทนนินในสารสกัดใช้วิธีทำปฏิกิริยากับบรีเอเจนต์ที่มีความจำเพาะ และการวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตสูงสุดที่ความยาวคลื่นเหมาะสมด้วยเครื่อง UV-spectrophotometer
- 1.4.4 การวิเคราะห์ความสามารถในการชะลอการเน่าเสียของน้ำตาลสดทำโดยการวัดความเป็นกรด และวัดกิจกรรมของแบคทีเรียทางอ้อมโดยวิธี Methylene blue reduction test (MBRT)

## 1.5 สมมุติฐานของการวิจัย

ถ้าเปลือกผลมังคุดมีสารแทนนินชนิดเดียวกันกับพะยอมเป็นองค์ประกอบหลัก สารสกัดจากเปลือกผลมังคุดจะสามารถชะลอการเน่าเสียของน้ำตาลสดได้เช่นเดียวกับพะยอม

## 1.6 ตัวแปรที่ใช้ในการวิจัย

### 1.6.1 ตัวแปรต้น

สารสกัดแทนนินจากเปลือกต้นพะยอมและจากเปลือกผลมังคุด

### 1.6.2 ตัวแปรตาม

ความสามารถในการชะลอการเน่าเสียของน้ำตาลสด

### 1.6.3 ตัวแปรที่ต้องควบคุม

แหล่งของน้ำตาลสด ปริมาตรของน้ำตาลสด ปริมาณของสารสกัดแทนนินแต่ละชนิด และเวลาในเกิดปฏิกิริยาของน้ำตาลสด

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 ต้นตาลโตนด

ต้นตาลโตนด (*Borassus flabellifer* Linn.) จัดเป็นพืชตระกูลปาล์มที่สามารถขึ้นได้ในเขตร้อน พบทั่วไปในประเทศอินเดีย ไทย พม่า ศรีลังกา และเขมร (กัญหริบูลย์, 2527) ในประเทศไทยสามารถพบต้นตาลได้หลายจังหวัด แต่ที่พบมากได้แก่ จังหวัดสงขลา นครศรีธรรมราช เพชรบุรี นครปฐม ชัยนาท สุพรรณบุรี บุรีรัมย์ และพิษณุโลก (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2544) ตาลโตนดเป็นไม้วงศ์ปาล์มเหมือนมะพร้าว แต่ต้นตาลโตนดมีความแข็งแรง ทนทาน และมีอายุที่ยืนยาวกว่ามะพร้าว กล่าวคือมีอายุยืนยาวประมาณ 80-100 ปี ต้นที่มีอายุมากอาจสูงได้ถึง 90 ฟุต หรือมากกว่า มีเส้นรอบวงของโคนต้นอยู่ระหว่าง 60-120 เซนติเมตร โครงสร้างของใบเป็นรูปพัดขนาดใหญ่ และหนา เป็นพืชที่มีโครงสร้างของระบบรากลึกมากช่วยในการยึดหน้าดิน ป้องกันการพังทลายจากการไหลเซาะของน้ำ เป็นที่อยู่อาศัยของค้างคาวและนกชนิดต่างๆ ตาลโตนดมีลักษณะและส่วนประกอบที่สำคัญดังนี้

**ราก** ผิวของรากอ่อนจะเป็นมัน เมื่อแก่มีลักษณะเป็นเสี้ยน กลมยาวสีน้ำตาล เกาะกลุ่มเป็นกระจุกคล้ายรากของมะพร้าว แต่สามารถหยั่งลึกได้มากกว่า

**ลำต้น** เป็นพืชลำต้นเดี่ยวสีน้ำตาลเข้มถึงสีดำ มีลักษณะสูงชะลูดโดยมีความสูงประมาณ 18-20 เมตร จากส่วนโคนต้นประมาณ 4.0 เมตร ลำต้นจะเรียวลง เปลือกลำต้นขรุขระ ผิวเป็นเสี้ยน เหนียวคงทน ส่วนเนื้อไม้ภายนอกแข็งแรง และค่อยๆ อ่อนเข้าไปสู่ภายในของลำต้น

**ใบ** ใบมีสีเขียวเข้มรูปพัด (fan leaf หรือ palmate) ขนาดใหญ่และหนา ซึ่งแต่ละใบจะมีใบย่อยเรียกว่า segment แตกออกจากจุดเดียวกันที่บริเวณปลายก้าน ยอดตาลแต่ละต้นมักประกอบด้วยใบตาลประมาณ 25-40 ใบ ใบที่แก่จะมีความกว้างของใบประมาณ 50-70 เซนติเมตร ซึ่งจะมีอายุอยู่ได้ประมาณ 3 ปี ส่วนที่เป็นก้านของใบเรียกว่าหางตาล มีความยาวประมาณ 1-2 เมตร มีความหนาโค้งตามความยาว มีหนามคมตามขอบทั้งสองด้าน

**ดอก** ออกดอกเป็นช่อ ดอกตัวผู้และดอกตัวเมียจะแยกกันคนละต้น ช่อดอกของตัวผู้เรียกว่า “งวงตาล” แตกแขนงเป็น 2-4 งวงต่อช่อ งวงแต่ละงวงมีความยาวประมาณ 30-40 เซนติเมตร แต่ละงวงมีดอกขนาดเล็ก ต้นตัวผู้ต้นหนึ่งจะมีช่อดอก 3-9 ช่อ ส่วนช่อดอกของต้นตัวเมียเรียกว่า “ปลีตาล” ซึ่งต้นตัวเมียจะออกช่อหลังต้นตัวผู้ โดยทั้งต้นตัวผู้และต้นตัวเมียจะทยอยออกช่อเรื่อยๆ สามารถเก็บน้ำตาลสดได้ตลอดทั้งปี

**ผล** ผลจะออกในต้นตัวเมียเท่านั้น ระยะเวลาตั้งแต่ออกดอกจนถึงเก็บผลอ่อนใช้เวลาประมาณ 75-80 วัน โดยผลจะออกเวียนรอบต้นตามแนวของก้านใบ ในแต่ละก้านจะออกหนึ่งปลี โดยแต่ละปลีจะให้ช่อดอกประมาณ 3 ช่อ ในหนึ่งช่อดอกจะเกิดผลจำนวน 1 ทะลาย และในแต่ละทะลายมีประมาณ 10-20 ผล

## 2.2 น้ำตาลโตนด

น้ำตาลโตนดเป็นน้ำหวานที่ได้จากส่วนช่อดอก และสามารถนำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อาหารอื่นๆที่หลากหลายเช่น น้ำตาลสดเข้มข้น น้ำตาลโตนดก้อน น้ำสัสมายชูหมัก และไวน์น้ำตาลโตนด เป็นต้น (สุภารัตน์ เตียไพบูรณ์, 2547) การเก็บเกี่ยวน้ำตาลโตนดในประเทศไทยนิยมเก็บในช่วงเดือนกุมภาพันธ์-ปลายเดือนพฤษภาคม โดยจะเก็บประมาณ 2 ครั้งต่อวัน คือช่วงเช้ามีด และช่วงบ่าย และจะหยุดพักการเก็บน้ำตาลสดในช่วงฤดูฝน น้ำตาลโตนดที่เก็บในช่วงเช้ามีคุณภาพดีกว่าที่เก็บได้ในช่วงเย็น เนื่องจากตอนกลางคืนอากาศจะเย็นและเหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการเน่าบูดของน้ำตาลสด ซึ่งการเก็บเกี่ยวน้ำตาลโตนดสดโดยทั่วไปจะใช้วิธีตามภูมิปัญญาไทยซึ่งมีลักษณะที่คล้ายคลึงกันในเกือบทุกท้องถิ่น แต่การเก็บน้ำตาลจากงวงตาลและจากปลีตาล อาจมีวิธีที่แตกต่างกันเล็กน้อย กล่าวคือการเก็บน้ำตาลสดจากงวงตาลต้องใช้ไม้ขนาดที่แบนกว่าการเก็บจากปลีตาล ซึ่งไม้ที่ใช้นวดเรียกว่า “ไม้คาบตาล” (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2544) ตามภูมิปัญญาชาวบ้านมีวิธีการเก็บน้ำตาลสด 2 รูปแบบดังนี้

### 2.2.1 การเก็บน้ำตาลสดจากต้นตาลตัวผู้

ต้นตาลตัวผู้ที่เหมาะสมต่อการเก็บน้ำตาลสดควรเป็นต้นที่งวงตาลยาวประมาณ 50 เซนติเมตร ดอกเริ่มบานพอประมาณ ผู้เก็บน้ำตาลจะรวบงวงตาลเข้าด้วยกันแล้วใช้ไม้คาบตาล ปีบงวงตาลเบาๆวันละ 1 ครั้ง และทำติดต่อกันประมาณ 3-4 วัน หัก

ปลายงวงตาลทั้งประมาณ 1 นิ้ว ใส่กระบอกล้างน้ำทิ้งไว้ประมาณ 3 คืน วันรุ่งขึ้นเทน้ำในกระบอกล้างและปล่อยไว้ประมาณ 1 คืน ทำการปาดตาลในตอนเช้าถ้ามีน้ำไหลซึมออกมาไม่หยุดถือว่า งวงตาลนั้นสามารถเก็บน้ำตาลสดได้ การเก็บน้ำตาลสดทำโดยใส่เปลือกไม้พะยอม (*Shorea floribunda* Kurz.) หรือไม้เคี่ยม (*Cotylelobiu lanceolatum* Craib.) แห้ง ซึ่งหั่นเป็นชิ้นขนาดเล็กประมาณ 3-4 ชิ้น ลงในกระบอกล้างไม้ไผ่ที่ผ่านการลวกแล้ว จากนั้นนำกระบอกล้างไม้ไผ่ที่เตรียมไว้ไปแขวนเพื่อรองน้ำตาลที่ไหลซึมออกมาจากงวงตาลนั้น ตันตาลตัวผู้จะให้น้ำตาลสดประมาณวันละ 3 ลิตร ต่อ 1 ตัน (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2544; เรณูกา แจ่มฟ้า, 2545)

### 2.2.2 การเก็บน้ำตาลสดจากต้นตาลตัวเมีย

ช่วงอายุของตาลตัวเมียที่เหมาะสมต่อการรองน้ำตาลสดคือ ช่วงที่ช่อดอกของตาลบานเป็นจั่นแล้ว ขนาดเท่ากับลูกมะยมหรือใหญ่กว่าเล็กน้อย เกษตรกรจะนวดบริเวณระหว่างจั่นโดยใช้ไม้คาบตาลนวดติดต่อกันประมาณอย่างน้อย 3 วัน หักปลายจั่นทิ้งประมาณ 1 นิ้ว จากนั้นทดลองปาดจั่น หากมีน้ำไหลออกมาไม่หยุดแสดงว่าช่อดอกตัวเมียของตาลสามารถเก็บน้ำตาลได้แล้ว การเก็บน้ำตาลสดทำโดยใส่เปลือกไม้พะยอม (*Shorea floribunda* Kurz.) หรือไม้เคี่ยม (*Cotylelobiu lanceolatum* Craib.) แห้ง ซึ่งหั่นเป็นชิ้นขนาดเล็กประมาณ 3-4 ชิ้น ลงในกระบอกล้างไม้ไผ่ที่ผ่านการลวกแล้ว จากนั้นนำกระบอกล้างไม้ไผ่ที่เตรียมไว้ไปแขวนเพื่อรองน้ำตาลที่ไหลซึมออกมาจากงวงตาลนั้น ตันตาลตัวเมียจะให้น้ำตาลสดประมาณวันละ 4-5 ลิตร ต่อ 1 ตัน แต่โดยทั่วไปเกษตรกรจะไม่นิยมเก็บจากต้นตัวเมียเนื่องจากจะปล่อยให้ดอกจั่นติดผลเพื่อเก็บผลตาลเป็นทะลาย (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2544; เรณูกา แจ่มฟ้า, 2545)

### 2.2.3 องค์ประกอบทางเคมีในน้ำตาลโตนดสด

มีการศึกษาวิจัยพบว่า น้ำตาลโตนดสดจะประกอบด้วยปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ร้อยละ 11.54 น้ำตาลซูโครสร้อยละ 13-17 น้ำตาลกลูโคสร้อยละ 0.78 โปรตีน ร้อยละ 0.02-0.03 ค่าพีเอชประมาณ 4.69 ปริมาณกรดทั้งหมดประมาณร้อยละ 0.098 และค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเท่ากับ 13.93 °บ릭ซ์ ดังแสดงรายละเอียดโดยสรุปในตารางที่ 2.1

**ตารางที่ 2.1** องค์ประกอบที่สำคัญของน้ำตาลโตนดสด

| องค์ประกอบ                        | น้ำตาลสด (เรณูเกา แจ่มฟ้า, 2545) | น้ำตาลสด (สุภารัตน์ เตียไพบูล, 2547) |
|-----------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|
| pH                                | 5.09                             | 5.76                                 |
| ของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (°Brix) | 13.80                            | 11.20                                |
| ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (%)           | 12.34                            | 10.91                                |
| ความเป็นกรดรวม (% lactic acid)    | 0.036                            | 0.032                                |

จากผลสรุปในตารางที่ 2.1 โดยการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณสารองค์ประกอบในน้ำตาลโตนดสด พบว่ามีค่าที่ใกล้เคียงกัน และนักวิจัยกลุ่มดังกล่าวได้สรุปเกี่ยวกับค่า pH ที่เปลี่ยนไปของน้ำตาลเมื่อระยะเวลาของการร่อนน้ำตาลเปลี่ยนแปลงไป กล่าวคือ ยิ่งเวลาของการร่อนน้ำตาลสดนานมากขึ้น น้ำตาลสดจะมีความเป็นกรดเพิ่มมากขึ้น หรือ ค่า pH ลดต่ำลงมากเนื่องจากแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตและผลิตสารที่มีสมบัติเป็นกรดออกมาจำนวนมากส่งผลถึงการบูดเน่าของน้ำตาลสดนั่นเอง นอกจากนี้ยังมีความวิจัยที่ศึกษาถึงชนิดของสารที่เป็นองค์ประกอบในน้ำตาลโตนดสดซึ่งเป็นสารระเหยง่ายที่ให้กลิ่นหอมในน้ำตาล โดยใช้เทคนิค headspace solid-phase microextraction (HS-SPM) และวิธี gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) ดังตารางที่ 2.2 ซึ่งพบว่าสารที่มีปริมาณสูงที่สุด คือ 3-furfuryl-2,5-dimethyl pyrazine รองลงมา คือ 3-phenyl furan และ geranyl acetone (Lasekan และ Abbas, 2010)

**ตารางที่ 2.2** ชนิดของสารระเหยในน้ำตาลสด (Lasekan และ Abbas, 2010)

| สารที่ | ชื่อของสารประกอบ                            | สารที่ | ชื่อของสารประกอบ                       |
|--------|---------------------------------------------|--------|----------------------------------------|
| 1      | pyrazine                                    | 12     | 2-methyl furan                         |
| 2      | 2-methylpyrazine                            | 13     | 2-methyl tetrahydrofuran-3-one         |
| 3      | 2,5(6)-dimethyl pyrazine                    | 14     | 2-furfural                             |
| 4      | 2-ethyl pyrazine                            | 15     | 2-furan methanol                       |
| 5      | 2,3-dimethyl pyrazine                       | 16     | 5-methyl furfural                      |
| 6      | 2-ethyl methyl pyrazine                     | 17     | 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3-(2H)-furanone |
| 7      | dimethyl-2-vinyl pyrazine                   | 18     | 3-phenyl furan                         |
| 8      | 5-methyl-6,7-dihydro-5H-cyclopenta pyrazine | 19     | benzaldehyde                           |
| 9      | 3-furfuryl-2,5-dimethyl pyrazine            | 20     | phenylacetaldehyde                     |
| 10     | 2-methyl furan                              | 21     | nonanal                                |
| 11     | Geranyl acetone                             | 22     | decanal                                |

#### 2.2.4 จุลินทรีย์ในน้ำตาลโตนดสด

มีงานวิจัยจำนวนมากที่พยายามวิเคราะห์ถึงชนิดของจุลินทรีย์ที่พบในน้ำตาลโตนด และงานวิจัยที่น่าสนใจพอสรุปได้ดังนี้

วรารุณี โกยสมบัติ (2556) ได้ศึกษาชนิดของจุลินทรีย์ในน้ำตาลโตนดสดที่เก็บเกี่ยวโดยวิธีดั้งเดิมของเกษตรกร จากอำเภอสะทิงพระ และอำเภอสิงนคร จังหวัดสงขลา พบว่า ตัวอย่างน้ำตาลสดที่ไม่มีการเติมไม้เคี่ยมและเติมไม้เคี่ยม มีปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้นทั้งหมดเท่ากับ  $10^8$  และ  $10^9$  cfu/mL ตามลำดับ จากการหาปริมาณของแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มพบว่าทั้งน้ำตาลสดที่เติมและไม่เติมไม้เคี่ยมจะมีปริมาณของโคลิฟอร์มสูงถึง  $10^3$  cfu/mL และเมื่อทำการแยกและวิเคราะห์กลุ่มจุลินทรีย์ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่า สามารถแยกกลุ่มจุลินทรีย์ได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มแบคทีเรียมี 8 ลักษณะ กลุ่มยีสต์มี 5 ลักษณะ และกลุ่มเชื้อรามี 2 ลักษณะ

Faparsui และ Barsir (1971) วิเคราะห์การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในน้ำตาลสดที่ปล่อยให้เกิดการหมักเป็นเวลา 7 วัน พบว่าภายในเวลา 24 ชั่วโมงแรกของการหมัก จุลินทรีย์ที่มีบทบาทมาก คือ *Lactobacillus* sp. *Leuconostoc* sp. และ *Saccharomyces cerevisiae* หลังจากการหมักที่เวลา 48 ชั่วโมง ตรวจพบเชื้อ *Acetobacter* sp. และเมื่อถึงเวลา 72 ชั่วโมง จะเริ่มพบเชื้อยีสต์อีกกลุ่มหนึ่ง ได้แก่ *Pichia* sp. *Schizosaccharomyces pombe* และ *Candida mycoderma* และพบเชื้อรา *Aspergillus flavus* *Mucor* sp. และ *Rhizopus* sp. นอกจากนี้กลุ่มผู้วิจัยยังรายงานว่าน้ำตาลสดที่มีค่า pH ในช่วง 7.0-7.2 เป็นช่วงที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของแบคทีเรีย *Lactobacillus* sp. และ *Leuconostoc* sp. และหากเก็บน้ำตาลสดที่อุณหภูมิห้องภายใน 24 ชั่วโมง ค่า pH จะลดลงเหลือเพียงแค่ 4.5 ซึ่งภายใต้สภาวะนี้ *Saccharomyces cerevisiae* จะเจริญได้ดีที่สุดแต่หลังจากหมักไว้ 3 วัน จะมีการสร้างแอลกอฮอล์และแอลกอฮอล์ที่ถูกสร้างขึ้นนี้จะมีผลให้เชื้อ *Acetobacter* sp. เจริญได้ดี

เมื่อปี ค.ศ. 1972 กลุ่มวิจัยของ Okafor ได้ทำการแยกยีสต์จากน้ำหมักที่ได้จากการหมักน้ำตาลสดของปาล์มในสกุล *Elaeis* และ *Raphia* ซึ่งเก็บในสถานที่ที่แตกต่างกัน พบยีสต์ทั้งหมด 17 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นยีสต์ในสกุล *Saccharomyces* 12 สายพันธุ์ *Candida* 4 สายพันธุ์ และ *Endomycopsis* 1 สายพันธุ์ นอกจากนี้ยังพบว่าชนิดของยีสต์ในไวน์ไม่ได้ขึ้นอยู่กับชนิดของปาล์ม และสถานที่เก็บรักษาน้ำตาลสด โดยยีสต์มี

ผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของน้ำตาลสด ในแง่ของคุณสมบัติที่ไม่พึงประสงค์ เช่น มีกลิ่นเหม็น สีขาวขุ่น และเกิดฟองแก๊สจำนวนมาก แต่ถึงอย่างไรก็ตามยีสต์เหล่านี้ก็กลับมีประโยชน์ต่อการทำน้ำตาลเมา ต่อมาในปี ค.ศ. 1975 ผู้วิจัยในกลุ่มเดียวกันรายงานไว้ในน้ำตาลเมาที่ได้จากการหมักน้ำตาลโตนดในประเทศไนจีเรีย มีแบคทีเรียที่พบมากทั้งหมด 5 จีแนส (genus) ได้แก่ *Micrococcus* *Leuconostoc* *Streptococcus* *Lactobacillus* และ *Acetobacter* และพบเชื้อแบคทีเรียบางกลุ่มในปริมาณน้อย เช่น *Serratia* และ *Aerobacter* ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มนี้จะทำให้ค่า pH ของน้ำตาลสดลดลงจาก 7.0 เหลือประมาณ 4.5

### 2.2.5 การป้องกันการเสื่อมสภาพของน้ำตาลโตนดสด

เนื่องจากการรองรับน้ำตาลสดจากช่อดอกของต้นตาลโตนดจะต้องใช้เวลาค่อนข้างนานถึง 8-10 ชั่วโมง เป็นเหตุให้จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนหลายชนิดทั้ง เชื้อรา แบคทีเรีย และเชื้อยีสต์มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ทำให้น้ำตาลสดเสื่อมคุณภาพ มีรสเปรี้ยว เป็นเมือกเหนียว มีฟองแก๊สและมีปริมาณน้ำตาลลดลง วิธีที่ง่ายที่สุดในการป้องกันการเสื่อมสภาพของน้ำตาลสด คือ การทำความสะอาดภาชนะรองรับโดยการรมควัน หรือ ลวกน้ำร้อน ซึ่งการลวกอาจใช้น้ำตาลโตนดสดที่กำลังเคี่ยวเดือดลวกภาชนะก็ได้ แต่ต้องจัดตำแหน่งสำหรับคว่ำภาชนะให้เหมาะสม เพื่อเป็นการป้องกันแมลง หรือมดอีกทางหนึ่ง (ปราโมทย์ ธรรมรัตน์, 2521)

เมื่อปี พ.ศ. 2517 กลุ่มวิจัยของ มาลี สัทกุล และพูนสุข อรรถะสัมปณณะ ได้ศึกษาถึงผลของการทำความสะอาดภาชนะรองรับมีผลต่อการเสื่อมสภาพของน้ำตาลสดจากการใช้กระบอกที่ทำความสะอาดโดยการล้างด้วยน้ำเปล่า และการนึ่งด้วยไอน้ำภายใต้ความดันสูง ไปรองรับน้ำตาลโตนดสดโดยไม่มีการเติมสารอื่นๆ ในกระบอกรองรับ พบว่าน้ำตาลโตนดสดที่รองรับโดยใช้กระบอกที่ผ่านการนึ่งด้วยไอน้ำภายใต้ความดัน ที่อุณหภูมิห้องไม่เกิดกลิ่นบูดเปรี้ยวหลังการเก็บเกี่ยว 9 ชั่วโมง ในขณะที่น้ำตาลสดที่รองรับด้วยกระบอกที่ล้างด้วยน้ำเปล่ามีกลิ่นเหม็นเปรี้ยวเกิดขึ้นตั้งแต่นำลงมาจากต้นตาลโตนด

นอกจากนี้ยังสามารถใช้วัสดุธรรมชาติ เช่น การเติมเปลือกไม้ชนิดต่างๆ ได้แก่ ไม้เคี่ยม (*Cotylelobium lanceolatum* Craib) สับเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ไว้ในกระบอกรองรับน้ำตาลโตนดสดประมาณ 4-5 กรัม ต่อน้ำตาลโตนดสด 1 ลิตร เนื่องจากสารในกลุ่ม

พอลิฟีนอลในไม้เคี่ยมสามารถช่วยป้องกันและยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ (เสาวลักษณ์ จิตรบรรเจิดกุล, 2532; เรณูกา แจ่มฟ้า, 2545.; สุภารัตน์ เตียไพบูล, 2547) ในต่างประเทศยังมีการใช้พืชสมุนไพรในการรักษาคุณภาพของน้ำตาลสด เช่น ประเทศศรีลังกาใช้ส่วนเปลือกต้นของ *Vateria acuminata* Hayne. ในประเทศฟิลิปปินส์ใช้ผงของเปลือกไม้โกงกาง เช่น *Rhizophora mucronata* Lam. หรือ *Ceriops tagal* (Child, 1974) ในประเทศไนจีเรียใช้เปลือกของต้น *Saccoglottis gabonensis* ซึ่งเป็นพืชอยู่ในวงศ์ Humiriaceae โดยเปลือกไม้ชนิดนี้มีขายตามท้องตลาดในลักษณะเป็นแผ่นแห้ง (Faparsui และ Barsir, 1972) สำหรับในประเทศไทยนอกจากไม้เคี่ยมแล้ว ยังมีการใช้ไม้ตะเคียน (*Hopea odorata* Roxb) ไม้มะเกลือ (*Diospyros mollis* Griff) หรือไม้พะยอม (*Shorea floribunda* Kurz)

Faparsui และ Barsir (1972) ได้ศึกษาผลของสารสกัดจากเปลือกไม้ *Saccoglottis gabonensis* ต่อชนิดของจุลินทรีย์ในน้ำตาลสด พบว่าสารสกัดจากส่วนเปลือกไม้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ดี เนื่องจากมีสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดกรด แต่ไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์ ( $p \leq 0.05$ ) นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้สารเคมีในการป้องกันการเสื่อมสภาพของน้ำตาลสด เช่น การใช้กรดเบนโซอิกเข้มข้นร้อยละ 0.2 จะสามารถยับยั้งการหมักแอลกอฮอล์และการเกิดกรดแอซิติกได้อย่างสมบูรณ์ แต่อย่างไรก็ตามพบว่าปริมาณสารเคมีในระดับนี้ไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคในเรื่องความปลอดภัยและรสชาติ (Child, 1974) นอกจากนี้ยังมีการใช้ซัลฟานิลไมด์ 10-60 ส่วนในล้านส่วนระหว่างการเก็บรักษาน้ำตาลสด แต่การใช้สารเคมีชนิดนี้ในเครื่องต้มทำให้เกิดรสขม จึงยังไม่เป็นที่นิยมในการนำมาใช้ (Woodroof, 1979)

เมื่อปี ค.ศ. 1986 กลุ่มวิจัยของ Tirawat และคณะ ศึกษาผลของการใช้สารเคมีผสม ระหว่างโซเดียมเบนโซเอต กับโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ และปูนขาว แล้วเปรียบเทียบกับการใช้ไม้เคี่ยมในการถนอมรักษา คุณภาพของน้ำตาลโตนดสด โดยวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี และจุลินทรีย์ของน้ำตาลโตนด พบว่า คุณภาพทางเคมีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ปูนขาวและสารผสมระหว่างโซเดียมเบนโซเอตกับโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีกว่าการใช้ไม้เคี่ยม อย่างไรก็ตามพบว่าการใช้สารผสมระหว่างระหว่างโซเดียมเบนโซเอตกับกับ

โพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์จะทำให้น้ำตาลโตนดสดมีคุณภาพที่ดีกว่าการใช้ปูนขาว ซึ่งสอดคล้องกับการวิจัยของ เสาวลักษณ์ จิตรบรรเจิดกุล (2532) (ตารางที่ 2.3) พบว่าเมื่อเปรียบเทียบคุณภาพน้ำตาลสดที่ไม่มีการใช้สารกันเสีย กับน้ำตาลสดที่เติมไม้เคี่ยม และน้ำตาลสดที่เติมสารเคมี ได้แก่ การเติมโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ 0.45 กรัม/ลิตร และโซเดียมเบนโซเอต 0.2 กรัม/ลิตร เป็นสารกันเสีย ซึ่งน้ำตาลสดที่รองรับจากต้นตาลเป็นเวลา 2 ชั่วโมง มีค่า pH เท่ากับ 7.55 ปริมาณกรดทั้งหมดเท่ากับ 0.068 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าน้อย ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 13.48 เปอร์เซ็นต์ ส่วนปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเท่ากับ 13.70<sup>0</sup> บริกซ์ น้ำตาลสดที่มีการเติมไม้เคี่ยม และใช้เวลาสำหรับการรองรับเป็น 14 ชั่วโมง มีค่า pH เท่ากับ 4.69 ปริมาณกรดทั้งหมดเท่ากับร้อยละ 0.098 อัตราส่วนของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่อน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับร้อยละ 0.067 และปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเท่ากับ 13.93<sup>0</sup> บริกซ์ ส่วนน้ำตาลโตนดสดที่รองรับจากต้นโดยเติมสารเคมีทั้ง โพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ 0.45 กรัม/ลิตร และโซเดียมเบนโซเอต 0.2 กรัม/ลิตร ที่เว้นระยะเวลาหลังการรองรับนาน 14 ชั่วโมง มีค่าต่างจากการวิเคราะห์ดังนี้ ค่า pH เท่ากับ 5.10 ปริมาณกรดทั้งหมด เท่ากับร้อยละ 0.074 อัตราส่วนของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่อน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับร้อยละ 12.95 และปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเท่ากับ 13.48<sup>0</sup> บริกซ์

**ตารางที่ 2.3** สมบัติทางเคมีของน้ำตาลโตนดสด (เสาวลักษณ์ จิตรบรรเจิดกุล, 2532)

| สมบัติทางเคมี                                 | น้ำตาลโตนดสด |               |                    |
|-----------------------------------------------|--------------|---------------|--------------------|
|                                               | ชุดควบคุม    | เติมไม้เคี่ยม | เติมสารเคมีกันเสีย |
| pH                                            | 7.55±0.35    | 4.69±0.27     | 5.10±0.11          |
| ความเป็นกรดทั้งหมด (%)                        | 0.068±0.003  | 0.098±0.013   | 0.074±0.005        |
| น้ำตาลรีดิวซ์ (%)                             | -            | 0.78±0.04     | 0.67±0.05          |
| น้ำตาลทั้งหมด (%)                             | 13.48±1.31   | 11.54±0.45    | 12.95±0.19         |
| น้ำตาลรีดิวซ์ / น้ำตาลทั้งหมด                 | -            | 0.067±0.013   | 0.053±0.010        |
| ของแข็งที่ละลายทั้งหมด ( <sup>0</sup> บริกซ์) | 13.70±0.99   | 13.93±1.48    | 13.48±0.93         |

จากการรวบรวมข้อมูลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้พืชเพื่อรักษาสภาพของน้ำตาลโตนดสดนั้น พบว่าพืชบางชนิดมีคุณสมบัติที่ดีกว่าการใช้สารเคมีในการยับยั้งจุลินทรีย์ เนื่องจากพืชเหล่านั้นมีสารเคมีกลุ่มพอลิฟีนอลเป็นองค์ประกอบ ซึ่งสารกลุ่มนี้มีรายงานว่า

เป็นสารที่พบในพืชชั้นสูงเกือบทุกชนิดและแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์แบบกว้างนั้น คือ “สารประกอบแทนนิน” ซึ่งจะสรุปสาระและความสำคัญเกี่ยวกับสารประกอบแทนนินดังต่อไปนี้

## 2.3 สารประกอบแทนนิน

แทนนินเป็นสารอินทรีย์โมเลกุลที่สามารถละลายน้ำได้พบในพืชชั้นสูงเกือบทุกชนิด ส่วนใหญ่พบว่าเป็นองค์ประกอบในส่วนเปลือกผล ลำต้น เปลือกต้น ราก เปลือกราก หรือส่วนกิ่ง ของพืช การแบ่งประเภทของแทนนินโดยพิจารณาจากคุณลักษณะเฉพาะด้านโครงสร้างทางเคมีและความสามารถในการทำปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสด้วยกรด หรือในสภาวะที่มีเอนไซม์แทนเนส โดยแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ condensed tannins และ hydrolysable tannins ดังรายละเอียดพอสังเขป

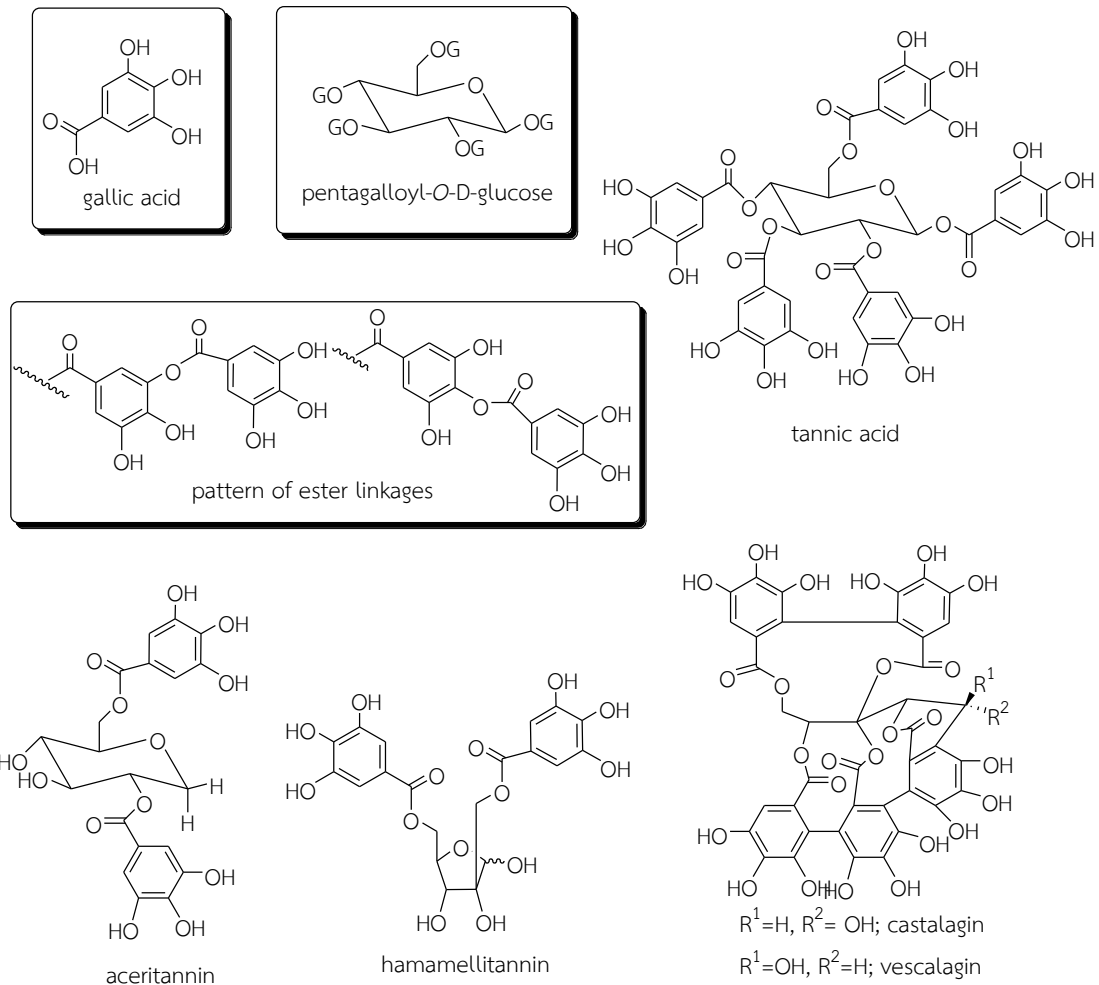
### 2.3.1 Hydrolysable tannins

เป็นสารประกอบที่โครงสร้างมี 2 ส่วนย่อย คือ ส่วนของน้ำตาลกลูโคส หรือสารประกอบ polyols อื่นๆ และส่วนที่เป็น phenolic acid เช่น gallic acid หรือ hexahydroxy-phenic acid (HHDP) หรืออนุพันธ์ของ HHDP ที่มีอยู่ในรูปออกซิไดซ์ โดยในธรรมชาติส่วนใหญ่มักพบ phenolic acid เป็นองค์ประกอบมากกว่าส่วนของน้ำตาลหรือ polyols โดยทั้งสองส่วนจะเชื่อมโยงกันด้วยพันธะเอสเทอร์ (ester linkage) ซึ่งมีชื่อเฉพาะคือ depside linkage โดยตำแหน่งของพันธะเอสเทอร์จะถูกไฮโดรไลซ์ได้ง่ายในสภาวะที่มีน้ำ และกรด ต่างหรือเอนไซม์ tannase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาแล้วเกิดผลิตภัณฑ์เป็น phenolic acid และน้ำตาล หรือ polyols แต่เมื่อนำไปกลั่นแบบ dried distillation สารประกอบ phenolic acid จะสามารถเปลี่ยนเป็น hydrolysable tannins ได้จึงเรียกแทนนินกลุ่มนี้อีกอย่างหนึ่งว่า pyrogallol tannins (Khanbabaee และ Reeb, 2001) ดังแสดงตัวอย่างโครงสร้างในภาพที่ 2.1

### 2.3.2 Condensed tannins

สารประเภท condensed tannin หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า proanthocyanidins เป็นสารประกอบ polyphenols ที่มีความซับซ้อนซึ่งจะ

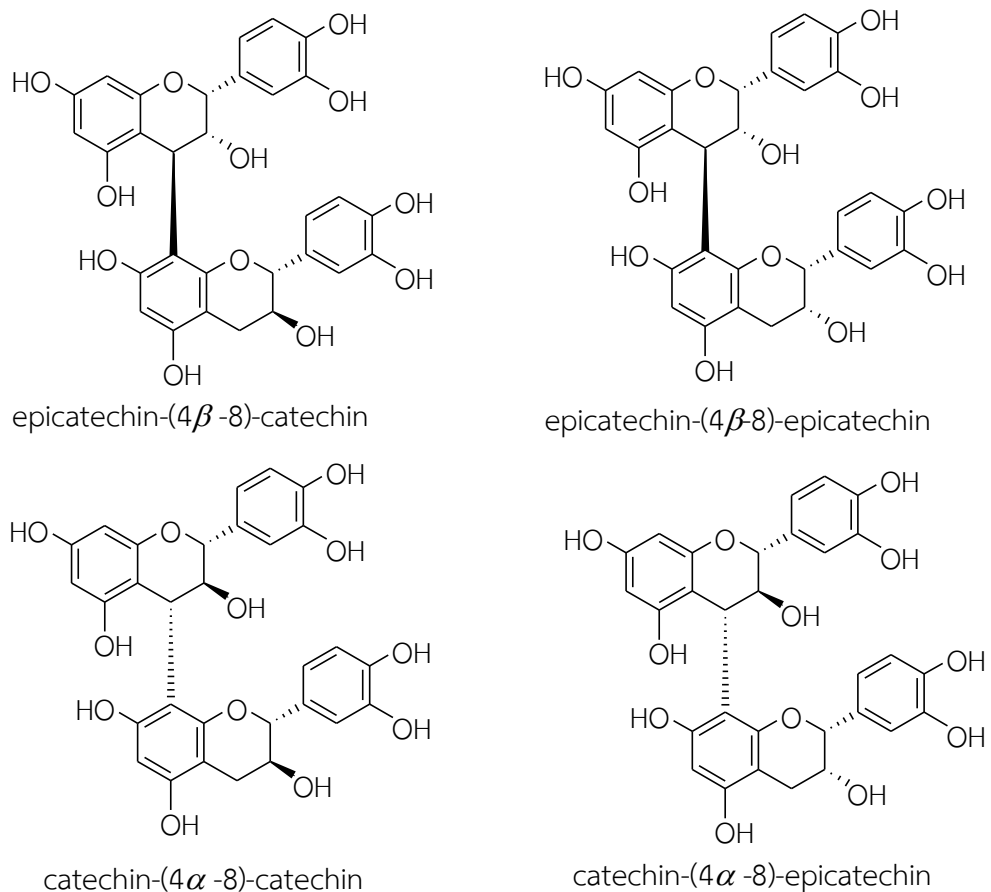
เกิดปฏิกิริยาการสลายตัวด้วยน้ำในกรดได้ยากกว่ากลุ่ม hydrolysable tannins  
โครงสร้างส่วนที่เป็น



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของสาร hydrolysable tannins

polyphenols นั้นจัดเป็นอนุพันธ์ของสารประกอบกลุ่ม flavonoids พบในพืชชั้นสูง  
หลากหลายชนิด ซึ่งตัวอย่างพืชที่เป็นแหล่งของ condensed tannins ได้แก่ เปลือก  
อบเชย เปลือกชินโคนา เปลือกหลิว เปลือกโอ๊ก เปลือกและใบของ hamamelis ราก  
krameria ราก mail fern เปลือกโกโก้ ใบชา เป็นต้น โดยสารประกอบกลุ่มนี้เมื่อนำมาต้ม  
กับกรดเจือจางหรือนำมาทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ จะได้สารประกอบที่เป็น polymer  
รูปอสัณฐานสีแดงไม่ละลายน้ำ ซึ่งเรียกว่า phobaphenes จึงอาจเรียกสารกลุ่มนี้ว่า

phobatanins และเมื่อนำสารประกอบนี้มากลั่นแบบ dried distillation จะได้สารประกอบที่เป็น catechol tannins และสารประกอบกลุ่มนี้จึงถูกเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า catechol tannins โดยทั้ง catechol tannins หรือ condensed tannins จะมีหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl groups) อิสระอยู่ 2 หมู่ บนโครงสร้างพื้นฐาน โดยเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย ferric chloride จะให้สีเขียว (Khanbabaee และ Reeb, 2001) ตัวอย่างโครงสร้างของ condensed tannins ดังแสดงในภาพที่ 2.2



ภาพที่ 2.2 โครงสร้างของสาร condensed tannins

จากประเภทของแทนนินที่กล่าวในข้างต้นนั้นพบว่าในพืชแต่ละชนิดหากมีองค์ประกอบเป็นสารในกลุ่มแทนนินแล้วจะมีโอกาสพบทั้ง hydrolysable tannins หรือ condensed tannin เป็นสารผสม โดยจะมีสารแทนนินกลุ่มไหนเป็นสารหลักก็ขึ้นกับชนิด

ของพืชนั้น สืบเนื่องจากการกล่าวถึงการใช้ไม้พะยอมเป็นสารป้องกันการบูดเน่าของน้ำตาลสดจากธรรมชาติซึ่งมีการใช้ในอาชีพร่อนน้ำตาลสดของเกษตรกรมาเป็นเวลานาน ดังนั้นในรายงานวิจัยนี้จึงขอกกล่าวถึงความสำคัญของต้นพะยอมพอสั่งเขปดังรายละเอียดต่อไปนี้

### 2.3.3 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารแทนนิน

จากการกล่าวถึงประเภทของสารประกอบแทนนินแล้วข้างต้น จะพบว่าไม่ว่าเป็นสารประกอบแทนนินประเภทใดก็ตาม จัดเป็นสารประเภทพอลิฟีนอลที่มีความสามารถในการละลายน้ำได้ดี เนื่องจากโมเลกุลมีหมู่ฟังก์ชันที่แสดงความเป็นขั้ว นั่นคือหมู่ไฮดรอกซิล ซึ่งสารแทนนินบางชนิดถูกนำไปใช้ในภูมิปัญญาดั้งเดิมเช่น ใช้ในการย้อม หรือการตกตะกอนโปรตีนในการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์จากผลไม้ เป็นต้น สารแทนนินมีโครงสร้างที่หลากหลาย โดยน้ำหนักของโมเลกุลอยู่ในช่วง 500-3,000 กรัม/โมล ขึ้นอยู่กับโครงสร้างหน่วยย่อยที่เป็นองค์ประกอบ (Scalbert, 1991) และจากการที่แทนนินพบในพืชเกือบทุกชนิด และพบในปริมาณสูง ทำให้ถูกนำมาใช้ในการศึกษาวิจัยในด้านต่างๆเช่น อุตสาหกรรมด้านอาหาร เครื่องดื่ม สีย้อม หรือแม้แต่ด้านการพัฒนาเป็นโมเลกุลที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งในงานวิจัยนี้จะยกตัวอย่างงานวิจัยที่กล่าวถึงสมบัติของสารแทนนินบางชนิดในแง่ของการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ ดังนี้

จากรายงานการวิจัยที่กล่าวถึงการแสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารแทนนินแสดงในตารางที่ 2.4 ซึ่งจากตารางสามารถสรุปได้ว่า การแสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ไม่ว่าจะเป็นเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และยีสต์ ของสารประกอบแทนนินจะขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น ประเภทของแทนนิน มวลโมเลกุลของแทนนิน และชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่แสดงความไวในการตอบสนองต่อสารแทนนิน แต่ยังไม่มียานวิจัยใดที่สามารถแสดงความชัดเจนในการแสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์อย่างจำเพาะเจาะจงที่สัมพันธ์กับโครงสร้างของสารแทนนิน แต่สามารถแสดงเป็นตัวอย่างกรณีศึกษาได้ เช่น การมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus mutans* *Streptococcus sobrinus* *Clostridium botulinum* *Proteus vulgaris* และ *Proteus vulgaris* ขึ้นอยู่กับความแตกต่างของจำนวนหมู่ไฮดรอกซิลบนวง B ของหน่วยย่อยฟลาโวนอล กล่าวคือ ยังมีจำนวนหมู่ไฮดรอกซิลมากจะเป็นการเพิ่มฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่กล่าวแล้วข้างต้น

## ตารางที่ 2.4 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของแทนนินบางชนิด

| เชื้อจุลินทรีย์                     | ประเภท/แหล่งของแทนนิน                   |
|-------------------------------------|-----------------------------------------|
| <b>เชื้อรา</b>                      |                                         |
| <i>Aspergillus niger</i>            | Myroalan tannin, wattle tannin          |
| <i>Botrytis cinerea</i>             | Strawberry condensed tannin             |
| <i>Coniophora olivacea</i>          | Eucalypt tannin                         |
| <i>Crinipellis perniciososa</i>     | Cocoa extract                           |
| <i>Merullus lacrymans</i>           | Tannic acid                             |
| <i>Penicillium sp.</i>              | Tannic acid                             |
| <i>Poria monticola</i>              | White oak ellagitannin                  |
| <i>Trametes hirsute</i>             | Tannic acid                             |
| <i>Trichoderma viride</i>           | Condensed tannin                        |
| <b>ยีสต์</b>                        |                                         |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i>     | Sorghum grain                           |
| Various yeast species               | Tannic acid, chestnut tannin, quebracho |
| <b>แบคทีเรีย</b>                    |                                         |
| <i>Desulfotomaculum nigrificans</i> | Flavanol และ purified theaflavin        |
| <i>Desulfovibrio</i>                | Tannic acid                             |
| <i>Enterobacter cloacae</i>         | Cotton condensed tannin                 |
| <i>Pseudomonas maltophillic</i>     | Tannic acid                             |
| <i>Nitrosomonas</i>                 | Condensed tannin, tannic acid           |
| <i>Photobacterium phosphoreum</i>   | Tannic acid                             |
| <i>Pseudomonas solanacearum</i>     | Myroalan tannin, wattle tannin          |
| <i>Streptococcus mutans</i>         | Pentagalloylglucose                     |
| <i>Streptococcus sobrinus</i>       | Flavanol, flavonol gallate              |
| Various soil bacteria               | Wattle tannin                           |

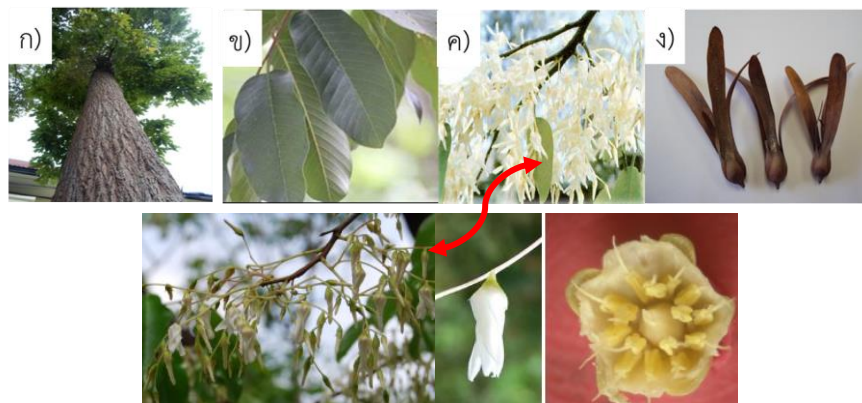
ที่มา; ดัดแปลงจาก Scalbert, 1991

นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่กล่าวถึงความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและการแสดงฤทธิ์ของแทนนินต่อเชื้อแบคทีเรียประเภท methanogenic bacteria เช่น Field และคณะ (1989) ได้รายงานว่าการมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Xanthomonas phaseoli* ของสารแทนนินที่มีมวลโมเลกุลต่ำบางชนิด เช่น catechin โดยจะมีความสัมพันธ์กับสภาวะออกซิเดชัน

ของแทนนิน กล่าวคือ catechin จะแสดงฤทธิ์ได้ดีเมื่อถูกออกซิไดซ์ในสภาวะเบสโดยจะยับยั้งการสร้างสารประเภทมีเทน อย่างไรก็ตามการที่สารแทนนินมีสมบัติในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์อาจเกี่ยวข้องกับกลไกการยับยั้งที่สำคัญได้แก่ แทนนินเหนี่ยวนำการเกิดสารเชิงซ้อนกับสับสเตรทของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์โดยตรง และเกิดสารเชิงซ้อนกับไอออนโลหะที่จำเป็นต่อการมีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ เป็นต้น (Scalbert, 1991)

## 2.4 พะยอม

พะยอม (*Shorea floribunda* Kurz) เป็นต้นไม้ขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ สูง 15-30 เมตร ผลัดใบ ลำต้นตรง เรือนยอดเป็นพุ่มกลมหรือรูปไข่ เปลือกนอกหนา สีน้ำตาลหรือเทา แตกเป็นร่องตามยาวของลำต้นและเป็นสะเก็ดหนา ใบเดี่ยวติดเรียงสลับ ใบรูปขอบขนาน โคนมน ปลายมนหรือหยักเป็นติ่งสั้นๆ ใบค่อนข้างหนาเกลี้ยงเป็นมัน ขอบใบมักเป็นคลื่น ใบอ่อนสีเขียวอ่อนสดใส ใบแก่สีเหลืองก่อนหลุดร่วง ก้านใบยาวมีขนสั้นๆ สีน้ำตาล ดอกสีขาวหรือขาวแกมเหลืองอ่อน ดอกออกเป็นช่อใหญ่ตามปลายกิ่ง ดอกตูมรูปกระสวย ดอกแก่จะร่วงพลูลงดินไ้ร่ม ออกดอกช่วงเดือนธันวาคม – กุมภาพันธ์ ผลรูปกระสวย ช่อนตัวอยู่ใต้กระพุ่มโคนปีก มีปีกยาวรูปขอบขนานแคบๆ 3 ปีก ปลายมนกลม ปีกสั้นมี 2 ปีก ผลแก่สีน้ำตาลแดง เวลาแก่หลุดร่วงแล้วหมุนด้วยปีกไปได้ในระยะทางที่ไกล และออกผลเดือนมีนาคม–เมษายน โดยจะพบมากในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย (Patcharamun et al, 2011) (ภาพที่ 2.3)



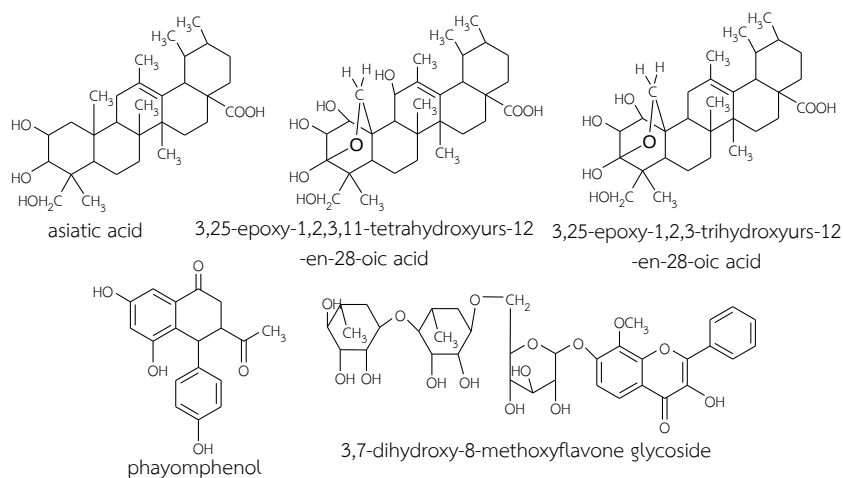
ภาพที่ 2.3 ส่วนประกอบของพะยอม ก) ลำต้น ข) ใบ ค) ดอก ง) ผล

### 2.4.1 ประโยชน์ของไม้พะยอม

**เนื้อไม้** ใช้ในงานก่อสร้างอาคาร บ้านเรือน ถ้ามีการแช่น้ำยาจะใช้ได้ทนทาน นิยมใช้ทำหมอนรางรถไฟ เสาค้ำ รถ ตง คาน ทำเรือขุด ต่อเรือ ซึ่งกล่าวกันว่าทนเปรียงทะเลได้ดี ใช้ทำแจว พาย เสากระโดงเรือ เครื่องมือทางการเกษตร ครก สาก กระเดื่อง ลูกหีบ ทำส่วนประกอบของเกวียน ตัวรถถัง ทำกระเบื้องไม้ **เปลือกต้นใช้ฟอก** หนังและอาจใช้รับประทานกับพืชมะขามของคนแก่ในสมัยก่อน **ส่วนยาง** ใช้ผสมน้ำมันทาไม้ยาเรือ เป็นต้น **ประโยชน์ทางด้านสมุนไพร** เนื้อไม้และเปลือกนำมาต้มกับน้ำใช้ดื่มเป็นยาฟัดสมานแผล แก้ท้องเดินและลำไส้อักเสบ ดอกใช้ปรุงเป็นยาหอมแก้ลม บำรุงหัวใจและลดไข้ ประโยชน์อื่นๆ ทางด้านการเกษตร เช่น เปลือกหรือชิ้นไม้เล็กๆ ใช้ใส่เครื่องหมักดองหรือกระบอกไม้ไผ่สำหรับรองรับน้ำตาลโตนดและมะพร้าวเพื่อป้องกันการเน่าเสีย (กวีดา เลิศกิจสมบูรณ์, 2548)

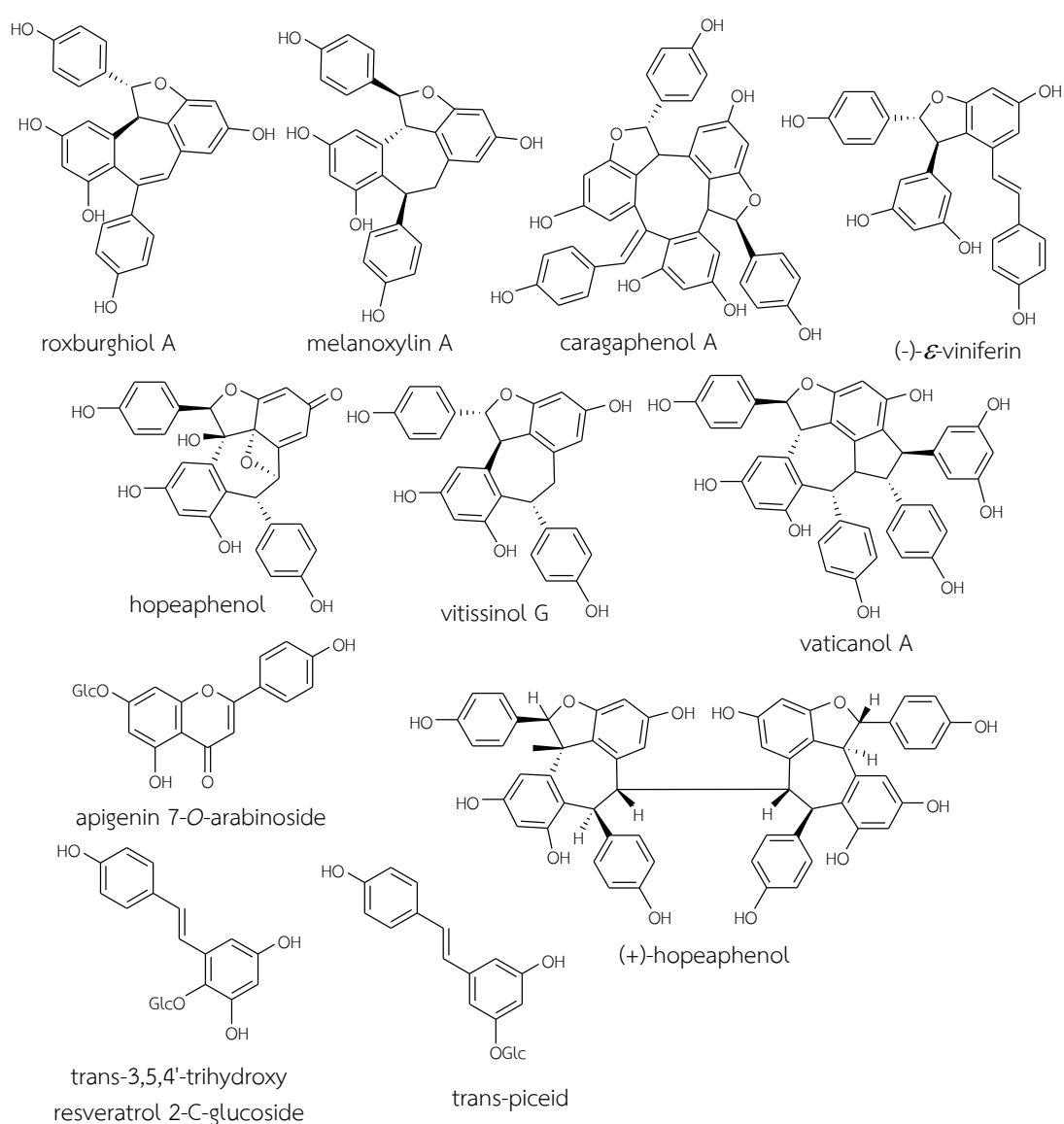
### 2.4.2 องค์ประกอบทางเคมีของพะยอม

เนื่องจากพะยอมเป็นพืชชั้นสูงสามารถสร้างสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิที่เป็นองค์ประกอบเป็นจำนวนมากและมีโครงสร้างทางเคมีที่หลากหลาย เช่น กลุ่มวิจัยของ Sharma และคณะ (2014) สามารถแยกสารองค์ประกอบจากส่วนเปลือกรากพะยอมได้ 5 ชนิด ได้แก่ asiatic acid 2,25-epoxy-1,2,3,11-tetrahydroxyurs-12-en-28-oic acid 3,25-epoxy-1,2,3-trihydroxyurs-12-ene-28-oic acid phayomphenol และสารประกอบไกลโคไซด์ของ 3,7-dihydroxy-8-methoxyflavone (ภาพที่ 2.4)



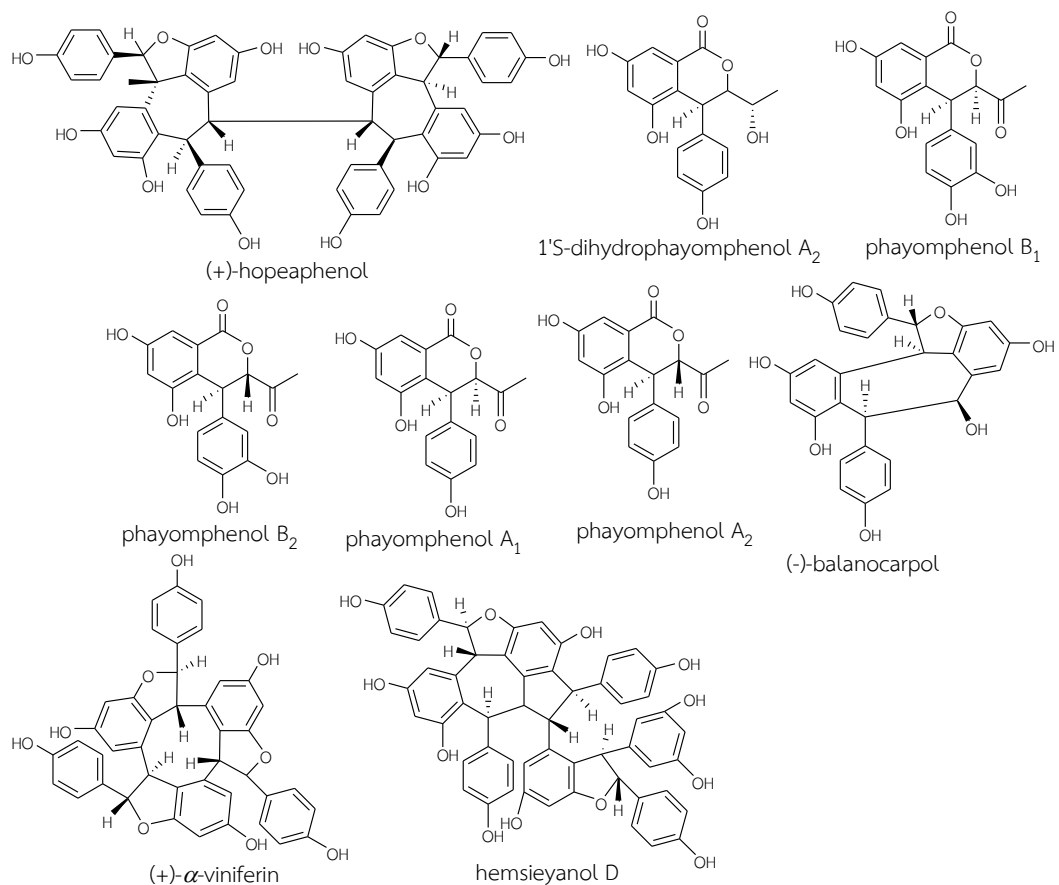
ภาพที่ 2.4 ตัวอย่างองค์ประกอบทางเคมีในส่วนเปลือกรากของพะยอม

และเมื่อปี 2011 กลุ่มวิจัยของ Patcharamun และคณะ (2011) ได้แยกสารองค์ประกอบจากส่วนรากของพะยอมซึ่งเก็บจากจังหวัดมหาสารคาม พบว่าสามารถแยกสารองค์ประกอบประเภท dimeric resveratrol ได้อย่างหลากหลายชนิด ได้แก่ roxburghiol A melanoxylin A caragaphenol A (-)- $\epsilon$ -viniferin hopeaphenol vitissinol G vaticanol A (+)-hopeaphenol isohopeaphenol apigenin 7-O-arabinoside *trans*-piceid และ *trans*-3,5,4'-trihydroxyresveratrol 2-C-glucoside ดังแสดงโครงสร้างในภาพที่ 2.5

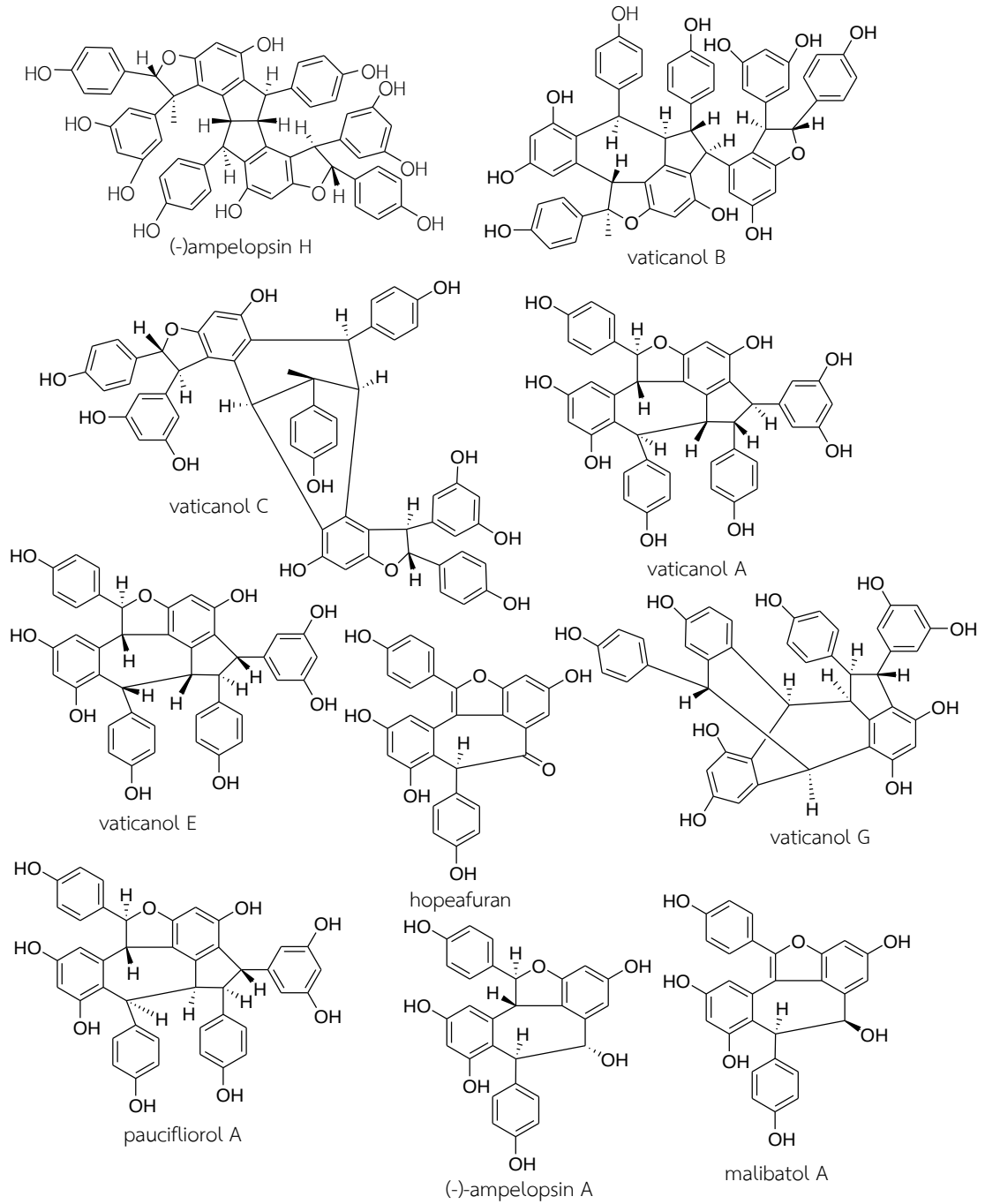


ภาพที่ 2.5 ตัวอย่างองค์ประกอบทางเคมีในส่วนเปลือกกรากของพะยอม

นอกจากนี้ยังมีรายงานการวิจัยถึงสารองค์ประกอบในส่วนเปลือกต้นของพะยอม เช่น กลุ่มวิจัยของ Morikawa และคณะ (2012) ได้ทำการแยกสารองค์ประกอบจากเปลือกลำต้นของพะยอมด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้สารทั้งหมด 27 ชนิด และเป็นสารชนิดใหม่ 3 สาร ได้แก่ 1'S-dihydrophayomphenol A<sub>2</sub> phayomphenol B<sub>1</sub> และ phayomphenol B<sub>2</sub> และได้ทดสอบฤทธิ์ในการลดระดับน้ำตาลในเลือดพบว่า สารที่แสดงฤทธิ์ดี คือ (-)-hopeapenol hemsleyanol D (+)- $\alpha$ -viniferin และ (-)-balanocarpol (โครงสร้างแสดงดังภาพ 2.6) ต่อมา Subramanian และ คณะ (2015) ได้ทำการแยกสาร (-)-hopeaphenol (ภาพที่ 2.6) จากเปลือกต้นพะยอมและศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ฤทธิ์ต้าน superoxide anion และฤทธิ์ยับยั้ง hydrogen peroxide พบว่าแสดงฤทธิ์ดีที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ด้วยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 63.76 64.48 และ 54.64 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



ภาพที่ 2.6 ตัวอย่างองค์ประกอบทางเคมีในส่วนเปลือกลำต้นของพะยอม



ภาพที่ 2.6 (ต่อ) ตัวอย่างองค์ประกอบทางเคมีในส่วนเปลือกลำต้นของพะยอม

จากการมีคุณสมบัติในการป้องกันการเน่าเสียของน้ำตาลสดของเปลือกต้นพะยอมแสดงให้เห็นว่าเปลือกต้นพะยอมมีสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีผลต่อการเน่าเสียของน้ำตาลสดได้ นั่นคือสารแทนนิน (Akiyama et al., 2001; Subramanian et al., 2013) แต่ยังไม่เคยมีงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ศึกษาเชิงลึกถึงประเภทและโครงสร้างทางเคมีของสารแทนนินที่เป็นองค์ประกอบในพะยอม การเน่าเสียของน้ำตาลสดคงเป็นสาเหตุให้เกษตรกรที่ทำอาชีพร่อนน้ำตาลโตนดสดในจังหวัดเพชรบุรีส่วนใหญ่นิยมใช้เปลือกไม้พะยอมกันมาก แต่ก็ยังประสบกับปัญหาที่สำคัญบางประการคือ การไม่มีต้นพะยอมเป็นพืชในท้องถิ่นจึงจำเป็นต้องหาซื้อเปลือกไม้พะยอมจากแหล่งอื่น อีกทั้งไม้พะยอมจัดเป็นไม้หวงห้าม ซึ่งในอนาคตอาจเป็นการยากที่จะยังคงมีการใช้ไม้พะยอมในการเป็นสารกันบูดจากธรรมชาติสำหรับเกษตรกรผู้มีอาชีพร่อนน้ำตาลสดจากต้นตาลโตนด และเพื่อเป็นการรักษาภูมิปัญญาไทยในการใช้วัสดุธรรมชาติทดแทนการใช้สารเคมีกันบูดที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพผู้บริโภค งานวิจัยนี้จึงมีความสนใจที่จะนำเปลือกผลของมังคุด (*Garcinia mangostana* Linn) ซึ่งเป็นส่วนเหลือใช้และมีสารแทนนินเป็นองค์ประกอบอยู่มากถึงร้อยละ 13 (Jung et al., 2006; Fu et al., 2007) มาทำการสกัดและศึกษาประสิทธิภาพเบื้องต้นในการชะลอการเน่าเสียของน้ำตาลสด โดยจะขอล่าวถึงความสำคัญบางประการของมังคุด ดังนี้

## 2.5 มังคุด

มังคุด (*Garcinia mangostana* Linn.) เป็นไม้ยืนต้น สูงประมาณ 10-12 เมตร ทุกส่วนมียางสีเหลือง ใบเดี่ยว เรียงตรงข้าม รูปไข่หรือรูปวงรีแกมขอบขนาน กว้าง 6-11 ซม. ยาว 15-25 ซม. เนื้อใบหนาและค่อนข้างเหนียวคล้ายหนัง หลังใบสีเขียวเข้มเป็นมัน ท้องใบสีอ่อนกว่า ดอกเดี่ยวหรือเป็นคู่ ออกที่ซอกใบใกล้ปลายกิ่ง สมบูรณ์เพศหรือแยกเพศ กลีบเลี้ยงสีเขียวอมเหลืองติดอยู่จนเป็นผล กลีบดอกสีแดง ฉ่ำน้ำ ผลเป็นผลสดค่อนข้างกลม เปลือกนอกค่อนข้างแข็ง แก่เต็มที่มีสีม่วงแดง ยางสีเหลือง มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 4-6 เซนติเมตร เนื้อในมีสีขาวฉ่ำน้ำ อาจมีเมล็ดอยู่ในเนื้อผลได้ ขึ้นอยู่กับขนาดและอายุของผล จำนวนกลีบของเนื้อจะเท่ากับจำนวนกลีบดอกที่อยู่ด้านล่างของเปลือก เส้นผ่านศูนย์กลาง 3-5 เซนติเมตร เมล็ดไม่สามารถใช้รับประทานได้ ส่วนของเนื้อผลที่กินได้ของมังคุดเป็นชั้นเอนโดคาร์บ ซึ่งพัฒนามาจากเปลือกหุ้มเมล็ดเรียกว่า aril มีสีขาว มี

กลิ่นหอม สารระเหยได้ส่วนใหญ่คือ hexyl acetate hexenol และ  $\alpha$ -copaene ส่วนล่างสุดของผลที่เป็นแถบสีเข้มที่ติดอยู่เรียงเป็นวงพัฒนามาจากปลายยอดเกสรตัวเมีย (stigma) มีจำนวนเท่ากับจำนวนเมล็ดภายในผล เมล็ดมั่งคุดเพาะยากและต้องได้รับความชื้นจนกว่าจะงอก เมล็ดมั่งคุดเกิดจากชั้นนิวเซลลาร์ ไม่ได้มาจากการปฏิสนธิ เมล็ดจะงอกได้ทันทีเมื่อออกจากผลแต่จะตายทันทีที่แห้ง (ภาพที่ 2.7)



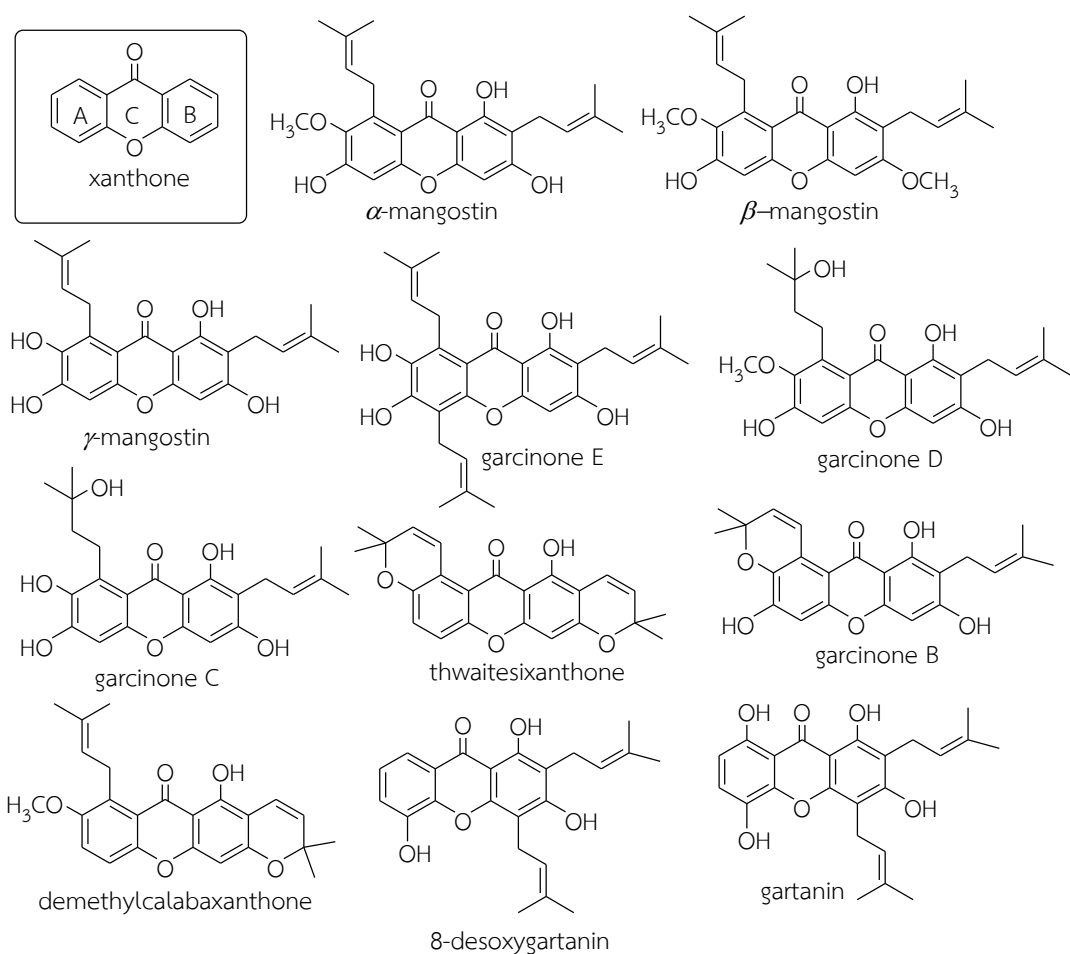
ภาพที่ 2.7 ส่วนประกอบของมั่งคุด ก) ใบ ข) ดอก ค) ผลอ่อน ง) ผลสุก

### 2.5.1 การใช้ประโยชน์ของมั่งคุด

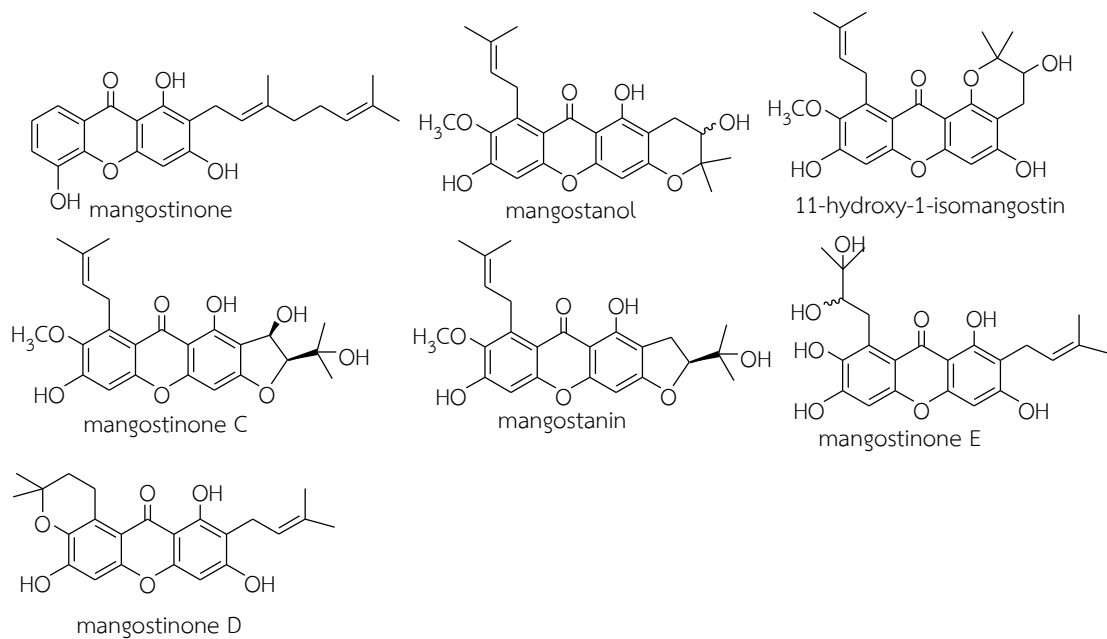
มั่งคุดเป็นผลไม้จากเอเชียที่ได้รับความนิยมมาก มั่งคุดได้รับขนานนามว่าเป็น "ราชินีของผลไม้" อาจเป็นเพราะด้วยลักษณะภายนอกของผลที่มีกลีบเลี้ยงติด อยู่ที่หัวขั้วของผลคล้ายมงกุฎของพระราชินีส่วนเนื้อในก็มีสีขาวสะอาด มีรสชาติที่แสนหวาน อร่อยอย่างยากที่จะหาผลไม้อื่นมาเทียบได้ มีการนำมั่งคุดมาประกอบอาหารบ้างทั้งอาหารคาว เช่น แกง ยำ และอาหารหวาน เช่น มั่งคุดลอยแก้ว แยมมั่งคุด มั่งคุดกวน มั่งคุดแช่อิ่ม ในจังหวัดนครศรีธรรมราชมีการทำมั่งคุดคัต ด้วยการแกะเนื้อมั่งคุดห่ามออกมาเสียบไม้รับประทาน ในขณะที่ส่วนใหญ่จะนิยมรับประทานมั่งคุดสุกเป็นผลไม้ เปลือกของมั่งคุดมีสารให้รสฝาดที่ละลายน้ำได้ คือสารประกอบแทนนิน ซึ่งมีฤทธิ์สมานแผลสดต่างๆได้ และสารที่ไม่ละลายน้ำคือ สารประเภทแซนโทนโดยเฉพาะกลุ่มแมงโกสติน มีฤทธิ์ช่วยลดอาการอักเสบและมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดหนองได้ดี ในทางสมุนไพรนิยมใช้เปลือกมั่งคุดตากแห้งต้มน้ำหรือย่างไฟ ฝนกับน้ำปูนใส แก้กท้องเสีย เปลือกแห้งฝนกับน้ำปูนใส ใช้รักษาอาการน้ำกัดเท้า แผลเปื่อย เปลือกมั่งคุด มีสารป้องกันเชื้อราเหมาะแก่การหมักปุ๋ย (ปราโมทย์ ธรรมรัตน์, 2521)

### 2.5.2 องค์ประกอบทางเคมีของเปลือกผลมังคุด

ส่วนของมังคุดหลายส่วนที่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านสมุนไพร แต่ส่วนเปลือกผลซึ่งเป็นส่วนเหลือจากการรับประทานเนื้อเป็นส่วนที่มีการนำไปใช้มากที่สุด เนื่องจากมีรายงานว่ามีสารองค์ประกอบที่มีโครงสร้างอย่างหลากหลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารในกลุ่มที่เรียกว่า “แซนโทน (xanthone)” สารแซนโทนจัดเป็นสารประกอบไตรไซคลิกแอโรแมติก (tricyclic aromatic) ที่มีโครงสร้างหลักเป็น  $C_6-C_3-C_6$  (ภาพที่ 2.8) โดยโครงสร้างหลักอาจมีหมู่แทนที่ที่แตกต่างกันบนวง A หรือวง B เช่น หมู่อิโซพรีน และ หมูไฮดรอกซิล เป็นต้น โดยสารประกอบกลุ่มนี้จัดเป็นสารที่มีสภาพความเป็นขั้วของโมเลกุลต่ำ และไม่ละลายในน้ำ ตัวอย่างโครงสร้างของสารแซนโทนที่พบในส่วนเปลือกผลของมังคุดแสดงในภาพที่ 2.8 (Suksamrarn et al, 2006)



ภาพที่ 2.8 ตัวอย่างสารแซนโทนที่เป็นองค์ประกอบในเปลือกผลมังคุด



**ภาพที่ 2.8** (ต่อ) ตัวอย่างสารแซนโทนที่เป็นองค์ประกอบในเปลือกผลมังคุด

นอกจากสารกลุ่มแซนโทนซึ่งมีความสามารถในการละลายน้ำต่ำเป็นองค์ประกอบในเปลือกผลมังคุดแล้ว ยังมีสารที่มีความสามารถในการละลายน้ำได้ดีและเป็นกลุ่มสารสำคัญที่ทำให้เปลือกผลมังคุดมีสีม่วงนั่นคือ สารแทนนิน โดยมีงานวิจัยหลายงานที่ได้ศึกษาถึงประเภทและโครงสร้างของแทนนินที่เป็นองค์ประกอบในเปลือกผลมังคุดซึ่งมีงานที่น่าสนใจ ดังนี้

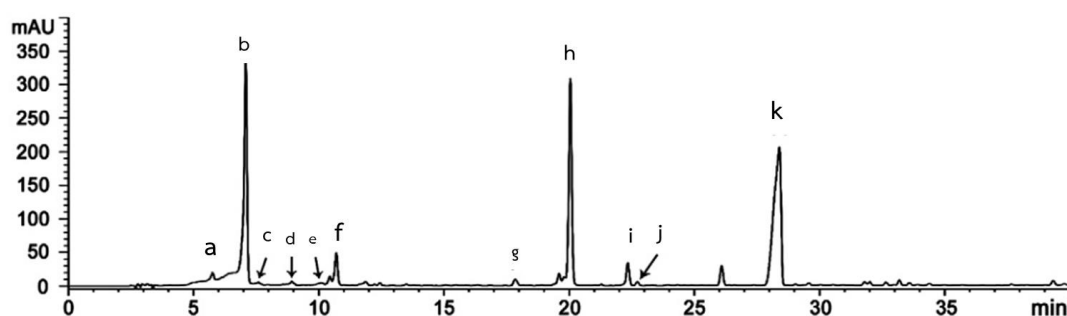
เมื่อปี ค.ศ. 2010 กลุ่มวิจัยของ Moosophon ได้ทำการแยกแทนนินจากสารสกัดเอทานอลของเปลือกผลมังคุดโดยใช้เทคนิค adsorption chromatography โดยใช้ Sephadex LH-20 เพื่อนำแทนนินที่ได้ไปใช้ในการตกตะกอนโปรตีนในเครื่องตีมันวุ้น เมื่อผ่านกระบวนการแยกผู้วิจัยได้ศึกษาประเภทของแทนนินโดยใช้วิธีทางเคมีอย่างง่ายซึ่งเป็นการให้เกิดสีเมื่อทำปฏิกิริยากับรีเอเจนต์ที่มีความจำเพาะ ได้แก่ 1%  $\text{FeCl}_3$  1% gelatin 1% lead acetate และน้ำโบรมีน ตลอดจนการศึกษาค่าความยาวคลื่นสูงสุด (maximum wavelength) ในการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตด้วยเทคนิค UV-spectroscopy เทียบกับสารมาตรฐานประเภท condensed tannin และ hydrolysable tannin ได้แก่ (+)-catechin และ tannic acid ซึ่งได้ผลสรุปดังตารางที่ 2.5

## ตารางที่ 2.5 สมบัติทางเคมีของแทนนินในเปลือกผลมังคุด

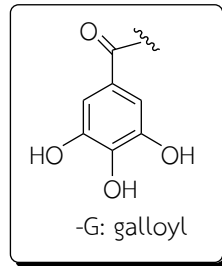
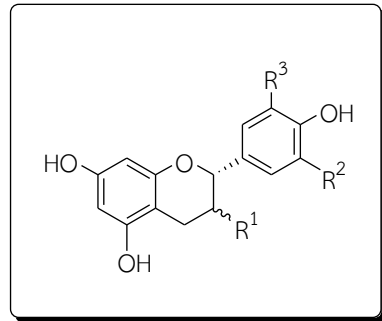
| tannin                               | Maximum wavelength (nm) | การทดสอบ                   |            |                                   |                                |
|--------------------------------------|-------------------------|----------------------------|------------|-----------------------------------|--------------------------------|
|                                      |                         | 1% FeCl <sub>3</sub>       | 1% gelatin | 1% lead acetate                   | Bromine water                  |
| (+)-catechin<br>(condensed tannin)   | 277                     | สารละลายสีเขียว<br>ตกตะกอน | ตกตะกอน    | สารละลายสีน้ำตาลอม<br>แดง ตกตะกอน | สารละลายสีเหลือง<br>และตกตะกอน |
| tannic acid<br>(hydrolysable tannin) | 273                     | สารละลายสีดำ<br>ตกตะกอน    | ตกตะกอน    | สารละลายสีแดงเข้ม<br>และตกตะกอน   | สารละลายสีเหลือง<br>ไม่ตกตะกอน |
| mangosteen tannin                    | 279                     | สารละลายสีเขียว<br>ตกตะกอน | ตกตะกอน    | สารละลายสีแดงอ่อน<br>และตกตะกอน   | สารละลายสีเหลือง<br>ตกตะกอน    |

จากตารางแสดงผลการทดสอบผู้วิจัยได้สรุปว่า สารแทนนินองค์ประกอบหลักที่แยกได้จากเปลือกผลของมังคุดจัดเป็นประเภท condensed tannin เนื่องจากผลการทดสอบกับรีเอเจนต์จำเพาะและค่า maximum wavelength มีความสอดคล้องกับผลการทดสอบของ (+)-catechin ซึ่งเป็นสารมาตรฐานประเภท condensed tannin

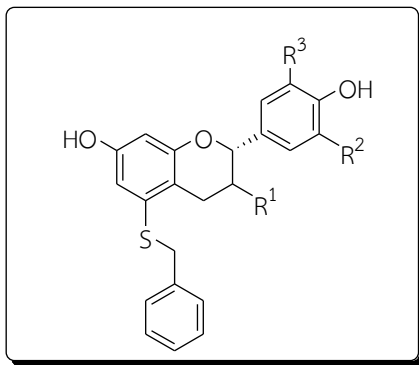
เมื่อปี ค.ศ. 2011 Zhou และคณะ นักวิจัยชาวจีนได้ศึกษาโครงสร้างของสารแทนนินที่แยกได้จากเปลือกผลของมังคุด โดยใช้เทคนิค reversed-phase HPLC-ESI-MS ควบคู่กับการทำปฏิกิริยา thiolysis พบว่าสารแทนนินที่เป็นองค์ประกอบจากทุก fractions เป็นประเภท condensed tannin ที่มีโครงสร้างหลักเป็น flavan-3-ol ซึ่งสอดคล้องกับการวิจัยโดยใช้เทคนิคอย่างง่ายของ Moosophon และคณะ (2010) โดย HPLC โครมาโทแกรมของสารแทนนินหลักแสดงในภาพที่ 2.9 และโครงสร้างของแทนนินที่ได้จากการวิเคราะห์สรุปดังภาพที่ 2.10



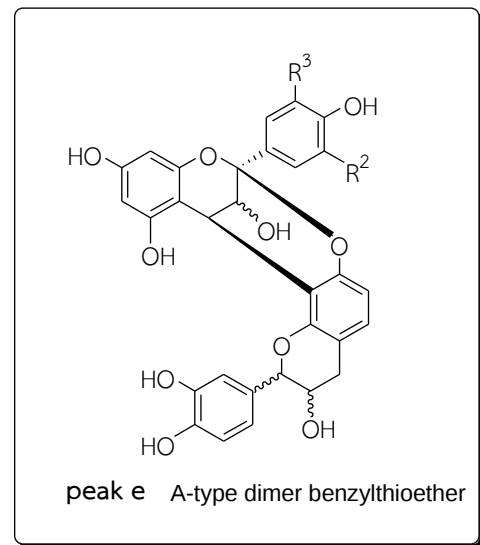
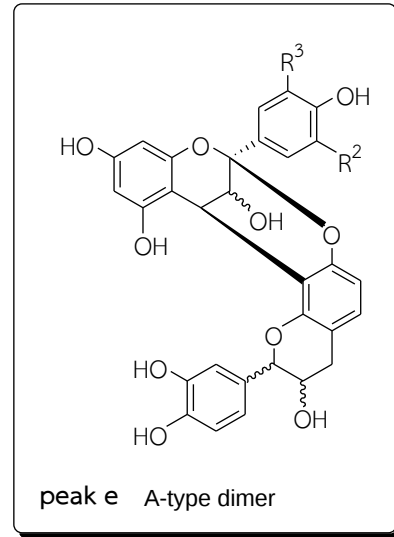
ภาพที่ 2.9 HPLC โครมาโทแกรมของสารแทนนินจากเปลือกผลมังคุด



|        | R <sup>1</sup> | R <sup>2</sup> | R <sup>3</sup> | compound               |
|--------|----------------|----------------|----------------|------------------------|
| peak a |                | H              | OH             | catechin               |
| peak b |                | H              | OH             | epicatechin            |
| peak c |                | OH             | OH             | galloicatechin gallate |
| peak c |                | H              | H              | (epi)afzetechin        |
| peak d |                | H              | OH             | (epicatechin gallate   |



|        | R <sup>1</sup> | R <sup>2</sup> | R <sup>3</sup> | compound                            |
|--------|----------------|----------------|----------------|-------------------------------------|
| peak f |                | OH             | OH             | (epi)galloicatechin benzylthioester |
| peak g |                | H              | OH             | epicatechin benzylthioester         |
| peak h |                | OH             | OH             | (epi)afzetechin bwnzylthioester     |



ภาพที่ 2.10 โครงสร้างของสารแทนนินจากเปลือกผลมังคุดที่พบใน HPLC โครมาโทแกรม

การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบแทนนินนั้นอาจทำได้ยาก เนื่องจากต้องใช้เครื่องมือที่มีความทันสมัยสูง ดังนั้นงานวิจัยส่วนใหญ่มักเน้นการวิเคราะห์เชิงปริมาณโดยวิเคราะห์เป็นปริมาณแทนนินรวม (total tannins) ซึ่งเป็นองค์ประกอบในสารสกัดแทนที่จะระบุโครงสร้างของแทนนิน จากรายงานการวิจัยที่เคยศึกษาไว้แล้ว พบว่ามีหลากหลายวิธีซึ่งมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับทั้งประเภทของแทนนินหลักที่ต้องการวิเคราะห์ ความถูกต้องแม่นยำของแต่ละวิธี หรือแม้แต่ชนิดของสารเคมี วัสดุและอุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์ของแต่ละเทคนิค condensed tannin เท่านั้น เนื่องจากทั้งเปลือกผลมังคุดและเปลือกไม้พะยอมมีแทนนินประเภท condensed tannin เป็นองค์ประกอบหลัก โดยมีรายละเอียดซึ่งพอสรุปได้ดังต่อไปนี้

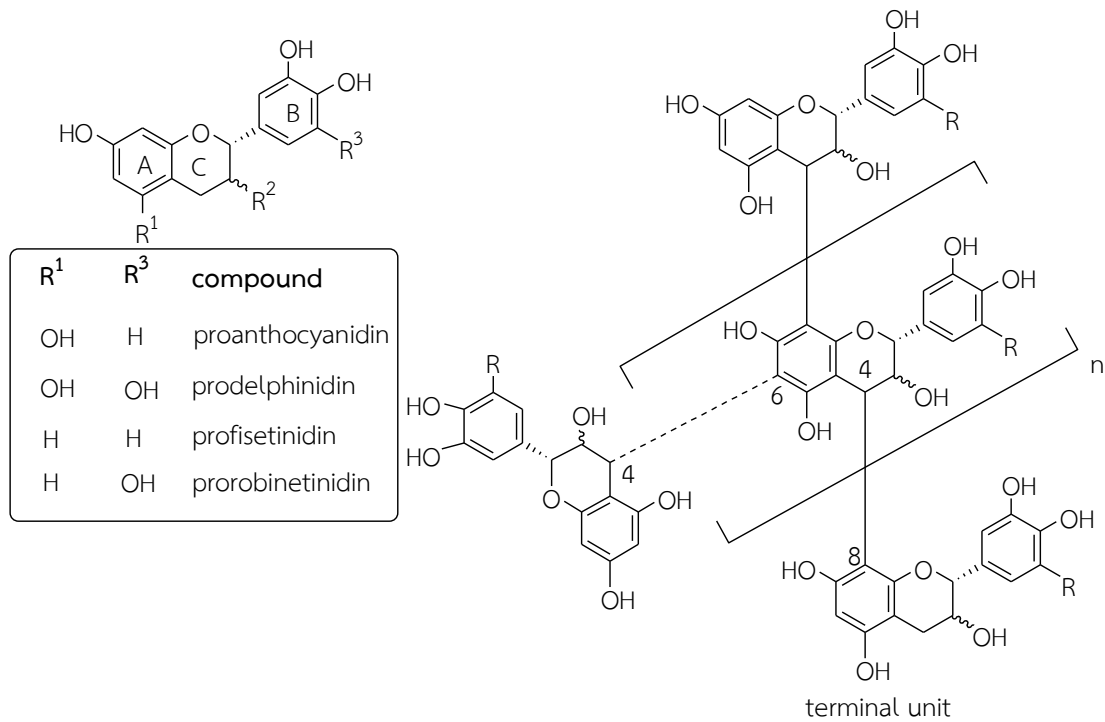
## 2.6 เทคนิคการวิเคราะห์ condensed แทนนิน

สารประกอบ condensed tannin จัดเป็นสารพอลิเมอร์ของหน่วยย่อยฟลาวานอล โดยหน่วย catechin มอนอเมอร์จะมีความไม่สมมาตรตรงตำแหน่ง C-2 และ C-3 (ภาพที่ 2.11) และสามารถมีหมู่แทนที่บนโครงสร้างหลักได้หลายตำแหน่งซึ่งส่งผลถึงความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาเคมีของแทนนินเหล่านี้ เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างพบว่า หากหมู่แทนที่  $R^2$  เป็นหมู่  $-OH$  จะเกิดปฏิกิริยากับกรดแกลลิก เกิดเป็นแทนนินที่เรียกว่า epigallocatechin gallate ซึ่งสารนี้จะพบเป็นองค์ประกอบหลักในใบชา และเมื่อหมู่  $R^1$  หรือ  $R^3$  เป็นหมู่  $-OH$  หรือ  $-H$  อย่างใดอย่างหนึ่งจะทำให้ได้โครงสร้างของฟลาวานอลพอลิเมอร์ที่มีความหลากหลายมากยิ่งขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งหากมีการเกิดปฏิกิริยา oxidative coupling กับหน่วยย่อยฟลาวานอลมอนอเมอร์ ตรงตำแหน่ง C-4 และ C-6 จะยิ่งทำให้เกิดสารประกอบ condensed tannin มีโครงสร้างซับซ้อนมากยิ่งขึ้น จึงมีการศึกษาวิธีในการวิเคราะห์เชิงปริมาณสำหรับ condensed tannin ไว้อย่างกว้างขวาง เพื่อเป็นทางเลือกในการวิเคราะห์ที่เหมาะสมกับ condensed tannin ที่พบในธรรมชาติ ซึ่งมีโครงสร้างที่แตกต่างกันไป ดังจะยกตัวอย่างเทคนิคที่น่าสนใจดังต่อไปนี้

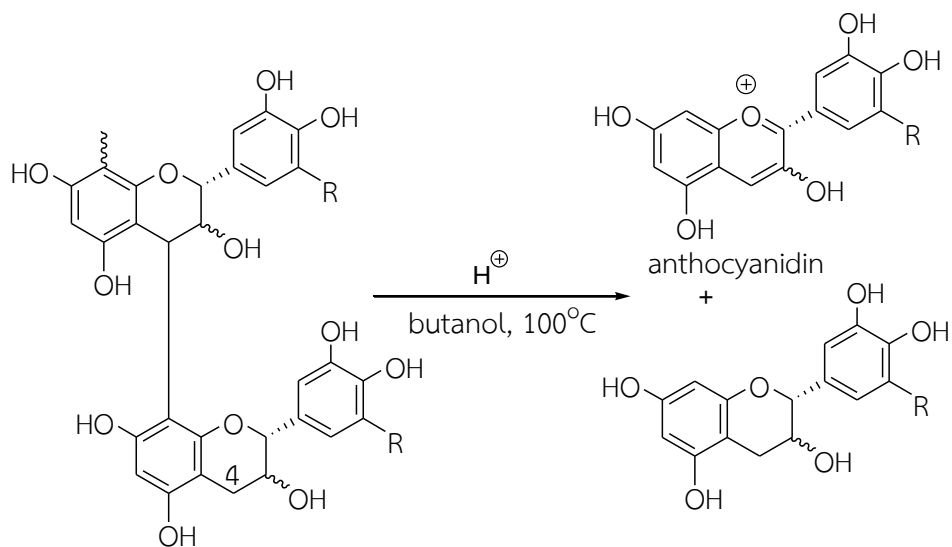
### 2.6.1 การวิเคราะห์ด้วยวิธี acid-butanol assay

เป็นวิธีที่อาศัยปฏิกิริยาการทำให้เกิดสีซึ่งเคยใช้ในการศึกษาปริมาณ condensed tannins มาเป็นเวลายาวนาน ค้นพบโดย Waterman และ Mole (1994)

ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเรียกว่า acid-catalyzed oxidative depolymerization แล้วเกิดเป็น สารผลิตภัณฑ์ที่มีสีแดงของ anthocyanidins (ภาพที่ 2.12)



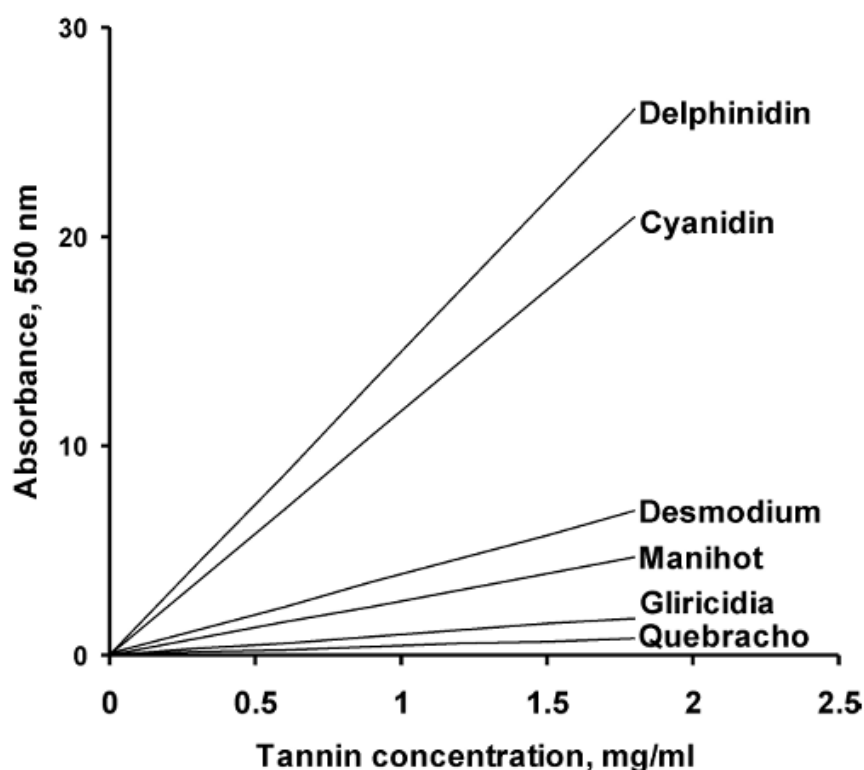
ภาพที่ 2.11 condensed tannins และโครงสร้างจากปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชัน



ภาพที่ 2.12 การเกิด anthocyanidin ในเทคนิค acid-butanol assay

เทคนิคนี้เป็นการวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ maximum wavelength 550 นาโนเมตร ซึ่งเป็นคุณสมบัติการดูดกลืนแสงของโครโมฟอร์ anthocyanidin โดยส่วนใหญ่นิยมใช้น้ำเป็นตัวทำละลายเนื่องจากไม่รวมเป็นเนื้อเดียวกับ บิวทานอล โดยปริมาณของน้ำที่เหมาะสมต่อการมีสีแดงที่เพียงพอต่อการวัด anthocyanidin ได้คือประมาณ 6% v/v ทั้งนี้และทั้งนั้นสีของสารสกัดจากพืชแต่ละชนิด ก็ยังส่งผลต่อสารสีแดงที่เกิดจากปฏิกิริยานี้ด้วย นอกจากนี้การที่หน่วยย่อย flavan-3-ol ที่มีหมู่ -OH บนวง A และ B จำนวนที่แตกต่างกันก็อาจมีผลต่อความสามารถในการ ดูดกลืนคลื่นแสงอัลตราไวโอเล็ตได้ เช่น หากมีหมู่ -OH บนวง B จำนวน 2 หมู่ ใน ผลิตภัณฑ์ที่เป็น cyanidin ค่า maximum wavelength จะปรากฏที่ 545 นาโนเมตร แต่ถ้ามีหมู่ -OH จำนวน 3 หมู่ ซึ่งพบในผลิตภัณฑ์ที่เป็น delphinidin จะมีค่า maximum wavelength ที่ 557 นาโนเมตร เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีข้อควรระวังซึ่งส่งผลต่อสีที่เกิดขึ้นและทำให้การวิเคราะห์เชิงปริมาณคลาดเคลื่อนไปได้ เช่น การมีไอออนของโลหะ บางชนิดในสารละลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งไอออนของ  $Fe^{3+}$  ถ้ามีความเข้มข้นมากถึง 15 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จะทำให้ปฏิกิริยา depolymerization ของแทนนินถูกยับยั้งทำให้ค่า การดูดกลืนแสงลดลงแล้วส่งผลถึงการวิเคราะห์เชิงปริมาณที่น้อยกว่าความเป็นจริง

พบว่า การวิเคราะห์ condensed tannin ด้วยวิธี acid-butanol assay มี ข้อควรระวังหลายประการเพื่อให้ปริมาณที่วิเคราะห์ได้มีความถูกต้องมากที่สุด เมื่อปี ค.ศ. 1998 กลุ่มวิจัยของ Dalzell และ Kerven ได้ค้นพบว่าการมีอัตราส่วนของกรดและ บิวทานอลที่เหมาะสมมีผลต่อการเกิดสีของสารผลิตภัณฑ์ในปฏิกิริยา โดยอัตราส่วนควร เป็น 4:1 (acid : butanol; v/v) ซึ่งกรดที่นิยมใช้คือกรดไฮโดรคลอริก (HCl) เนื่องจากการ วิเคราะห์ด้วยวิธีนี้เป็นการวิเคราะห์เชิงปริมาณแต่ไม่สามารถบอกปริมาณของ condensed tannin ได้โดยตรงจึงนิยมวิเคราะห์เป็นปริมาณ condensed tannin ทั้งหมดที่มีปริมาณสมมูลกับสารมาตรฐาน โดยสารมาตรฐานที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์ เทคนิคนี้คือ delphinidin cyanidins desmodium manihot gliricidia และ quebracho (Hagerman, 1997) ดังแสดงตัวอย่างกราฟมาตรฐานในภาพที่ 2.13

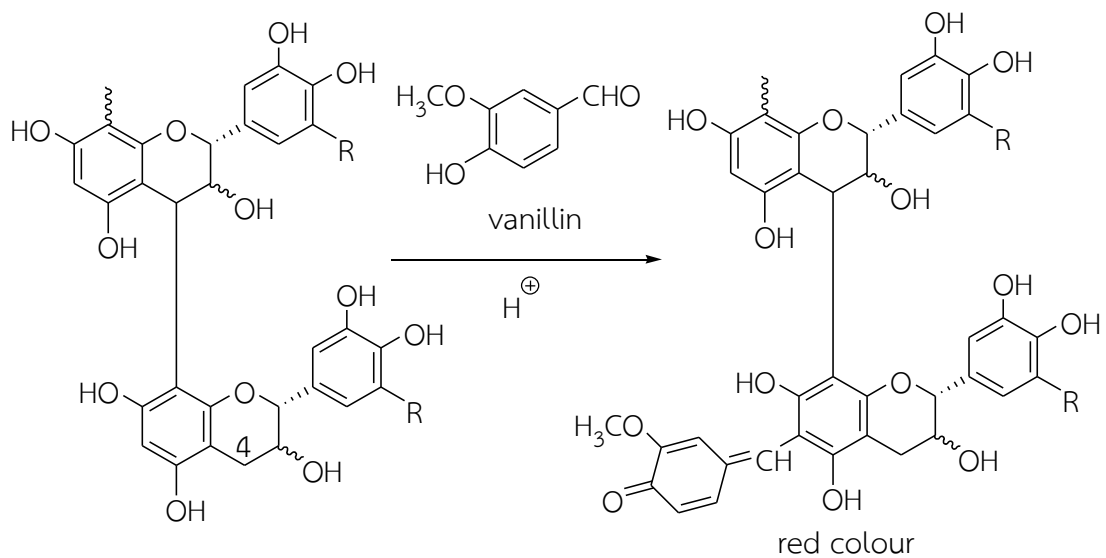


ภาพที่ 2.13 ตัวอย่างกราฟของสารมาตรฐานที่นิยมใช้ในเทคนิค acid-butanol assay (ที่มา; Schofield et al, 2001)

#### 2.6.4 เทคนิค vanillin assay

เทคนิคนี้ยังคงเป็นการประยุกต์ใช้การวัดการดูดกลืนคลื่นแสงอัลตราไวโอเล็ตของสารสีที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง vanillin และ condensed tannins ในสภาวะกรด (ภาพที่ 2.14) ซึ่งสารเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นเป็นสารสีแดงสามารถดูดกลืนคลื่นแสงอัลตราไวโอเล็ตได้ดีที่ maximum wavelength 500 นาโนเมตร ( $A_{500}$ ) ทั้งนี้ก็ยังขึ้นอยู่กับ ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ เวลา อุณหภูมิ และความเข้มข้นของกรด ตลอดทั้งชนิดของสารมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณหาเป็นปริมาณสมมูล จากการวิจัยของ Scalbert (1998) พบว่าการใช้กรดซัลฟิวริกจะให้ผลการทดสอบที่ดีกว่ากรดไฮโดรคลอริก ที่ความเข้มข้นในหน่วยนอร์มัลเท่ากัน แต่ถ้าหากเพิ่มความเข้มข้นของกรดทั้งสองชนิดให้สูงขึ้นพบว่าค่า  $A_{500}$  จะเพิ่มขึ้นด้วยแนวโน้มในทิศทางเดียวกัน หรือแม้แต่การเพิ่มปริมาณของน้ำให้มากขึ้นค่า  $A_{500}$  จะลดลงอย่างรวดเร็ว ในเรื่องอิทธิพลของกรดที่มีต่อการ

วิเคราะห์เชิงปริมาณในเทคนิคนี้ Scalbert (1998) ยังพบอีกว่าการใช้กรดไฮโดรคลอริก ทำให้ได้ผลการทดลองที่ทำซ้ำได้ยากกว่า ในกรณีของอุณหภูมิสำหรับการวิเคราะห์มี รายงานของ Waterman และ Mole (1994) ซึ่งกล่าวว่าการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิสำหรับการทดลองเพียงแค่  $1.4^{\circ}\text{C}$  ทำให้ผลที่วิเคราะห์ได้มีความคลาดเคลื่อนไปมากถึง 11% โดย อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์อยู่ในช่วง  $25-30^{\circ}\text{C}$  จึงจะได้ผลการทดลองที่มีค่า  $A_{500}$  ที่ยอมรับได้ ส่วนสารมาตรฐานที่นิยมใช้คือสารประกอบ catechin



ภาพที่ 2.14 ปฏิกริยาเคมีในการวิเคราะห์ condensed tannin ด้วย vanillin assay

ส่วนปัญหาหลักที่พบบ่อยมากในเทคนิคนี้คือความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาของหน่วยย่อย flavan-3-ol ที่เป็นองค์ประกอบในโครงสร้างหลักที่แตกต่างกัน มีงานวิจัยบางงานที่ใช้กรดแอสติคเป็นสารทำให้เกิดการแตกออกของหน่วยย่อย (Butler et al, 1982) แต่พบว่ามีสารละลายพิษของเฉพาะส่วนปลายของสายพอลิเมอร์เท่านั้น ซึ่งทำให้สีของสารละลายที่เกิดขึ้นไม่สอดคล้องกับปริมาณของแทนนินที่ต้องการวิเคราะห์ ดังนั้นกรดที่นิยมใช้อาจเป็นกรดซัลฟิวริกหรือกรดไฮโดรคลอริกทั้งนี้และทั้งนั้นอาจขึ้นอยู่กับชนิดของหน่วยย่อยในสายพอลิเมอร์ของ condensed tannins ที่พบในพืชแต่ละชนิดนั่นเอง

### 2.6.5 เทคนิค acid cleavage reaction

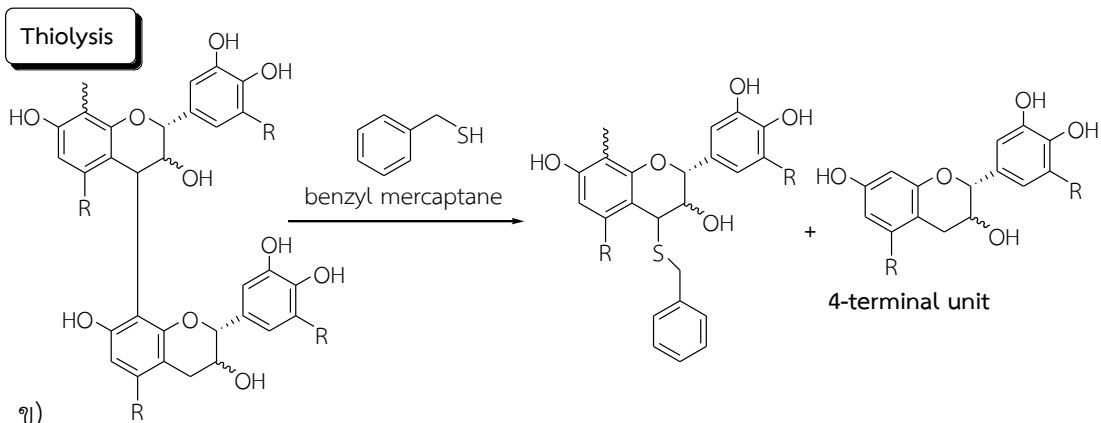
ตามที่ทราบถึงธรรมชาติของการมีพันธะเชื่อมต่อกันในโมเลกุลของสาร condensed tannins เป็นพันธะที่เรียกว่า interflavan links ซึ่งสามารถแตกสลายได้โดยง่ายในสภาวะกรด เมื่อนำหน่วยย่อยที่แตกสลายมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC) จะสามารถวิเคราะห์โครงสร้างของ condensed tannin ได้ ซึ่งการทำให้โมเลกุลแทนนินแตกสลายอาจทำได้ 2 วิธีคือ วิธี thiolysis และวิธี phloroglucinol degradation ซึ่งพอสรุปความแตกต่างของแต่ละวิธีดังนี้

วิธี thiolysis ทำได้โดยการนำสาร condensed tannins ไปให้ความร้อนกับ benzyl mercaptan (toluene- $\alpha$ -thiol) ในสภาวะที่มีกรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ดังแสดงในภาพที่ 2.15ก ผลที่เกิดขึ้นคือ จะเกิดการแตกสลายพันธะของหน่วยย่อย flavan-3-ol ตรงส่วนปลายของสายพอลิเมอร์ แล้วเกิดเป็น unsubstituted flavanol ในขณะที่โครงสร้างหลักจะเปลี่ยนเป็น benzyl thioethers ซึ่งเมื่อใช้เทคนิค HPLC ในการวิเคราะห์จะสามารถบอกถึงโครงสร้างทางเคมีของหน่วยย่อย และความยาวของสายพอลิเมอร์ใน condensed tannins ได้ แต่วิธีนี้จะเกิดปัญหาเมื่อสารแทนนินไม่รวมเป็นเนื้อเดียวกันในระหว่างการวิเคราะห์ และปฏิกิริยา thiolysis เกิดไม่สมบูรณ์ มีงานวิจัยที่กล่าวถึงการใช้วิธีนี้เช่น Matthews และคณะ (1997) วิเคราะห์ปริมาณ condensed tannin จากเปลือกต้นของ *Picea sitchensis* โดยทำปฏิกิริยา thiolysis ที่อุณหภูมิ 105 °C เป็นเวลา 4.5 ชั่วโมง โดยใช้กรดแอสติติกเข้มข้น 1.4% v/v พบว่าเกิดปฏิกิริยา thiolysis เพียงแค่ 63% และงานวิจัยของ Labarbe และคณะ (1999) ซึ่งทำการวิเคราะห์ปริมาณของ condensed tannin ในเมล็ดขององุ่น โดยใช้กรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.1 mol/L อุณหภูมิ 90 °C เพียงแค่ 2 นาที พบว่าเกิดปฏิกิริยา thiolysis ถึง 88%

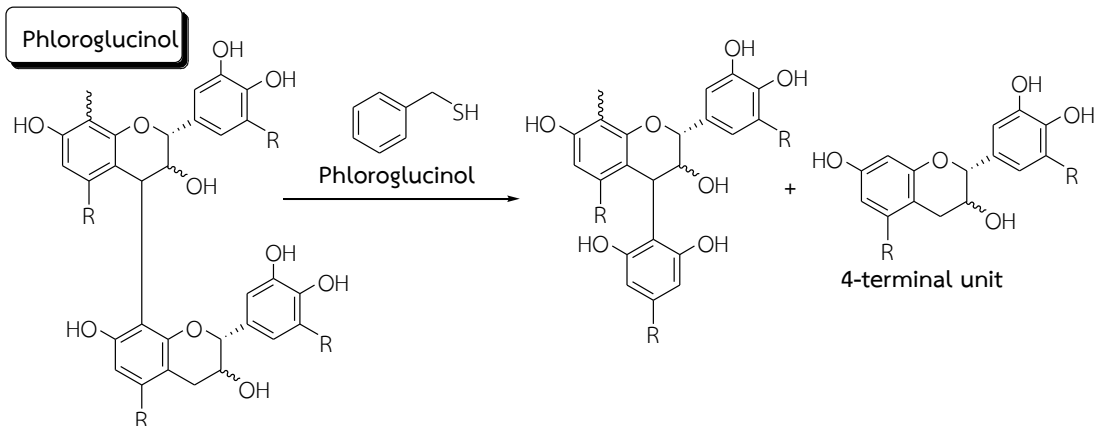
วิธี phloroglucinol degradation (ภาพที่ 2.15ข) ทำได้โดยการนำสาร condensed tannin ทำปฏิกิริยากับ phloroglucinol (Matthews et al, 1997) โดยจะเกิดได้ดีในกรณีที่โครงสร้างไม่ซับซ้อนเท่านั้น แต่หาก condensed tannin นั้นมีโครงสร้างซับซ้อนการเกิดปฏิกิริยากับ phloroglucinol จะเกิดขึ้นได้ยากมากและปฏิกิริยาจะไม่สมบูรณ์ โดยเกิดสารผลิตภัณฑ์ได้เพียง 3-10% เท่านั้น ทำให้เกิดความคาด

เคลื่อนในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ ดังนั้นวิธีนี้จึงไม่ค่อยนิยมนำมาใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณของ condensed tannin เมื่อเทียบกับวิธี thiolysis

ก)



ข)



ภาพที่ 2.15 ปฏิกริยาเคมีในการวิเคราะห์ condensed tannin; ก) วิธี thiolysis

ข) phloroglucinol degradation

จากปัญหาของการไม่มีไม้พะยอมเป็นพืชประจำถิ่นของจังหวัดเพชรบุรี และต่อไปในอนาคตคงเป็นการยากที่จะมีการตัดไม้พะยอมเพื่อจำหน่ายเป็นสินค้า เนื่องจากถูกประกาศให้เป็นไม้หวงห้าม ประกอบกับองค์ความรู้ที่ได้จากการสืบค้นข้อมูล การวิจัยที่ผ่านกระบวนการทางวิทยาศาสตร์มาเป็นอย่างดีในการระบุประเภทของสาร ออกฤทธิ์ชะลอการเน่าเสียของน้ำตาลสด โดยการยับยั้งการทำงานของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆว่า เป็นสารประกอบในกลุ่ม “แทนนิน” ผนวกกับข้อมูลของการมีสารแทนนินเป็น

องค์ประกอบหลักในส่วนเปลือกผลสุกของมังคุด ผู้วิจัยจึงได้วางแผนการวิจัยเพื่อสกัดแทนนินจากส่วนเปลือกผลของมังคุด และศึกษาประสิทธิภาพเบื้องต้นในการชะลอการเน่าเสียของน้ำตาลสดโดยคาดหวังว่าเปลือกผลมังคุดอาจเป็นแหล่งธรรมชาติแหล่งใหม่ที่สามารถใช้ทดแทนไม้พะยอมในการรักษาคุณภาพของน้ำตาลโตนดก่อนนำไปแปรรูปเพื่อจำหน่ายทั้งเป็นเครื่องดื่มน้ำตาลสด น้ำตาลสดเข้มข้น หรือ ผลิตภัณฑ์น้ำตาลก้อนที่มีคุณภาพสูงได้ในอนาคต

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 อุปกรณ์/เครื่องมือ และสารเคมี

อุปกรณ์และเครื่องมือที่สำคัญในการวิจัยนี้ได้แก่ เครื่องระเหยแบบลดความดัน (EYELA, Japan) เครื่องอัลตราไวโอเลตสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (DU730, Germany) เครื่องวัดค่าพีเอช (Metrohm744, Switzerland) เครื่องซึ่งสารความละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง (OAAA250L, Japan) เครื่องอบลมร้อน (UN110, USA) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Memmert OB10, USA) หลอดทดลองขนาดกลาง พร้อมสำลีก้อนที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อ

และในส่วนของสารเคมีที่สำคัญได้แก่ ตัวทำละลายอินทรีย์สำหรับการเตรียมสารสกัดใช้ชนิด commercial grade ที่ผ่านการกลั่น ได้แก่ แอซิโตน และเอทานอล ส่วนตัวทำละลายสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปี เช่น เอทานอล เมทานอล ใช้เกรดสำหรับวิเคราะห์ สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ประเภทของแทนนินที่เป็นองค์ประกอบหลักในสารสกัดที่สำคัญ ได้แก่ (+)-catechin (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) tannic acid (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) 1% ferric chloride (Merck, Darmstadt, Germany) 1% gelatin (Fluka, New York, USA) 1% lead acetate (Merck, Darmstadt, Germany) และสารละลายน้ำโบรมีน (Merck, Darmstadt, Germany) สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณแทนนินรวมของสารสกัด ที่สำคัญ ได้แก่ sodium carbonate (Merck, Darmstadt, Germany) sodium tungstate (Merck, Darmstadt, Germany) sodium molybdate (Merck, Darmstadt, Germany) 85% phosphoric acid (Fluka, New York, USA) 37%

hydrochloric acid (Fluka, New York, USA) lithium sulfate (Merck, Darmstadt, Germany) Bromine (Merck, Darmstadt, Germany) และ tannic acid (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany )

สารเคมีสำหรับทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดแทนนินในการชะลอการเน่าเสียของน้ำตาลสดคือ สารละลายเมทิลีนบลู จะต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนนำไปใช้ ซึ่งสามารถเตรียมได้โดย ต้มน้ำกลั่นปริมาตร 150 มิลลิลิตร จนเดือดจากนั้นเติมเมทิลีนบลูชนิดเม็ด (Sigma-Aldrich) จำนวน 2 เม็ด คนจนละลายหมดตั้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องจะได้สารละลายสีน้ำเงินม่วง เก็บสารละลายในขวดสีชาเพื่อเลี่ยงการสัมผัสแสง

### 3.2 ตัวอย่างพืชและวัตถุดิบสำหรับการวิจัย

เปลือกต้นพะยอมแห้งหนัก 700.19 กรัม เก็บจากจากต.บ่อพันขัน อ.สุวรรณภูมิ จ. ร้อยเอ็ดเมื่อเดือนเมษายน พ.ศ. 2556 เปลือกผลมังคุดสุกแห้ง 1200.45 กรัม เก็บจาก ต.ปังหวาน อ.พะโต๊ะ จ.ชุมพร เมื่อเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2556 น้ำตาลสดที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์เป็นน้ำตาลโตนดได้จากผู้ทำอาชีพขึ้นน้ำตาล ต.โรงเข้ อ.บ้านลาด จ.เพชรบุรีโดยควบคุมให้ไม่มีการเติมเปลือกไม้พะยอมและเก็บที่อุณหภูมิ  $-5^{\circ}\text{C}$  เพื่อใช้สำหรับวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

### 3.3 การเตรียมสารสกัดแทนนิน

#### 3.3.1 สารสกัดแทนนินจากเปลือกต้นพะยอม

นำเปลือกต้นพะยอมแห้งที่บดละเอียดจำนวน 500 กรัมแช่ในตัวทำละลายแอซิโตนปริมาตร 4 ลิตรเป็นเวลา 7 วัน (x12 ครั้ง) เพื่อกำจัดสารประเภท non-tannins จากนั้นกรองสารละลายด้วยกระดาษกรองและระเหยแอซิโตนออกด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดันทำซ้ำทั้งหมด 7 ครั้งจนสารละลายใส รวมสารสกัดแอซิโตนทั้งหมดที่ได้และ

เรียกสารสกัดนี้ว่า สารสกัด **non-tannin-SR** จากนั้นนำกากเปลือกต้นพะยอมที่เหลือจากการแช่ด้วยเอซีโตน มาทำการแช่ในตัวทำละลายผสมระหว่าง 95% เอทานอล : น้ำ (1:1 v/v) ปริมาณ 5 ลิตร เป็นเวลา 7 วัน กรองสารละลาย ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน ทำซ้ำทั้งหมด 10 ครั้ง จนสารละลายใส จากนั้นรวมสารสกัดหยาบที่ได้และทำให้แห้งโดยการอบที่อุณหภูมิ 60 ° C ด้วยเครื่องอบลมร้อนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้สารสกัดเปลือกต้นพะยอมที่มีแทนนินเป็นองค์ประกอบและเรียกว่าสารสกัดนี้ว่า สารสกัด **tannin-SR**

### 3.3.2 สารสกัดแทนนินจากเปลือกผลมังคุด

นำเปลือกผลมังคุดที่บดละเอียดน้ำหนัก 500 กรัม แช่ในตัวทำละลายเอซีโตน 6 ลิตร เป็นเวลา 7 วันเพื่อกำจัดสารประเภท non-tannins จากนั้นกรองสารละลายด้วยกระดาษกรองและระเหยเอซีโตนออกด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน ทำซ้ำทั้งหมด 7 ครั้ง จนสารละลายใส รวมสารสกัดเอซีโตนทั้งหมดที่ได้และเรียกสารสกัดนี้ว่า สารสกัด **non-tannin-GM** ส่วนกากเปลือกผลมังคุดที่เหลือจากการแช่ด้วยเอซีโตนนำมาทำการแช่ในตัวทำละลายผสมระหว่าง 95% เอทานอล : น้ำ (1:1 v/v) ปริมาณ 5 ลิตร เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นกรองสารละลายด้วยกระดาษกรองแล้วระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน ทำซ้ำทั้งหมด 14 ครั้งจนสารละลายใส รวมสารสกัดหยาบที่ได้ และผ่านการทำให้แห้งโดยการอบที่อุณหภูมิ 60 ° C ด้วยเครื่องอบลมร้อน จะได้สารสกัดเปลือกผลมังคุดที่มีแทนนินเป็นองค์ประกอบโดยเรียกว่า สารสกัดนี้ว่า **tannin-GM**

## 3.4 การวิเคราะห์ประเภทและปริมาณแทนนินรวมในสารสกัด

### 3.4.1 การวิเคราะห์ประเภทของแทนนินในสารสกัด

การวิเคราะห์ประเภทของแทนนินเบื้องต้นทำโดย การนำเฉพาะสารสกัด tannin-SR และ tannin-GM ซึ่งได้จากการสกัดจากส่วนเปลือกต้นพะยอมและเปลือกผลมังคุด ตามลำดับ มาศึกษาประเภทของแทนนินโดยใช้ปฏิกิริยาเคมีที่มีการดัดแปลงจากวิธีของ Moosophon และคณะ (2010) โดยมีวิธีการโดยสรุปดังนี้ การวิเคราะห์อาศัยหลักการเกิดสีและการเกิดตะกอนเมื่อทำปฏิกิริยากับน้ำยาทดสอบที่แตกต่างกัน ซึ่งน้ำยาที่ใช้ในการทดสอบได้แก่ สารละลาย  $\text{FeCl}_3$  (1% w/v) gelatin (1% w/v) lead acetate (1% w/v) และสารละลายน้ำโบรมีน เทียบกับการเกิดสีของสารมาตรฐาน condensed tannin และ hydrolysable tannin กับน้ำยาทดสอบดังกล่าว โดยการวิจัยนี้ใช้ (+)-catechin เป็นสารมาตรฐานของสาร condensed tannin และใช้กรดแทนนิกเป็นสารมาตรฐานของ hydrolysable tannin ทำโดยการละลายสารสกัดแทนนิน 0.25 กรัม ในน้ำกลั่นให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 50 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 4.0 กรัม/ลิตร) นำสารละลายแต่ละชนิดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (maximum absorbance) ด้วย UV spectrophotometer และบันทึกค่า maximum wavelength ในหน่วยนาโนเมตร จากนั้นแบ่งสารละลายที่เหลือใส่ในหลอดทดลองขนาดกลางจำนวน 4 หลอด ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร แต่ละหลอดเติมสารละลาย  $\text{FeCl}_3$  (1% v/v) จำนวน 2-3 หยด สารละลาย gelatin (1% v/v) 1.0 มิลลิลิตร สารละลาย lead acetate (1% v/v) 1.0 มิลลิลิตรและสารละลายน้ำโบรมีน 1.0 มิลลิลิตร ตามลำดับ แล้วเปรียบเทียบผลจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด และผลของการทำปฏิกิริยาของสารมาตรฐาน (+)-catechin และ tannic acid ซึ่งเป็นสารมาตรฐาน condensed และ hydrolysable tannins ตามลำดับ ทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง

### 3.4.2 การวิเคราะห์ปริมาณแทนนินทั้งหมดในสารสกัด

การวิเคราะห์ปริมาณแทนนินทั้งหมด (total tannins) ของสารสกัด tannin-SR และ tannin-GM ใช้วิธีทางสเปกโตรสโกปีซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ

Broadhurst และคณะ Jones (1978) โดยใช้สาร (+)-catechin เป็นสารมาตรฐาน ซึ่งมีวิธีโดยสรุปดังนี้ นำสารละลายแทนนินเข้มข้น 10.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาดกลาง เติม 3.0 มิลลิลิตร ของสารละลาย vanillin (4% v/v ในเอทานอล) และ 1.5 มิลลิลิตร ของกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น เขย่าให้รวมเป็นเนื้อเดียวกันและเก็บสารละลายในที่มืดประมาณ 20 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย UV-spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตรคำนวณหาปริมาณของแทนนินทั้งหมดในรูปของ total condensed tannin จากกราฟมาตรฐานของ (+)-catechin โดยรายงานผลเป็นปริมาณกรัมสมมูลของ (+)-catechin ต่อสารสกัดแทนนิน 100 กรัม (g eq. catechin/100 g TE) ทำซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง

### 3.5 การวิเคราะห์เบื้องต้นถึงความสามารถของสารสกัดแทนนินในการชะลอการเน่าเสียของน้ำตาลสด

การวิเคราะห์เบื้องต้นนี้ใช้ tannic acid เป็นสารแทนนินมาตรฐานเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ tannin-SR และ tannin-GM เนื่องจากมีราคาถูกและมีสมบัติที่ดีในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (Scalbert, 1991; Chung et al., 1998) โดยแบ่งการทดสอบเป็น 3 ขั้นตอนย่อยดังนี้

#### 3.5.1 การทดสอบการละลายของแทนนิน

เนื่องจากน้ำตาลสดมีองค์ประกอบเป็นโปรตีนร้อยละ 0.02-0.03 (เรณู กาแจ่มฟ้า, 2545) ซึ่งสามารถตกตะกอนได้เมื่อทำปฏิกิริยากับแทนนินตัวอย่าง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างปริมาณน้ำตาลสดและปริมาณของแทนนินที่ละลายได้ดีและไม่ตกตะกอน โดยควบคุมให้ปริมาตรของน้ำตาลสดเท่ากับ 10.0 มิลลิลิตร

แล้วเติมลงในหลอดทดลองที่มีสารแทนนินตัวอย่างหลอดละ 1 5 10 20 40 และ 80 มิลลิกรัม ตามลำดับ แล้วเขย่าสารละลายด้วยเครื่อง Vortex เป็นเวลา 1-2 นาที สังเกตการละลายเทียบกับสารมาตรฐาน tannic acid

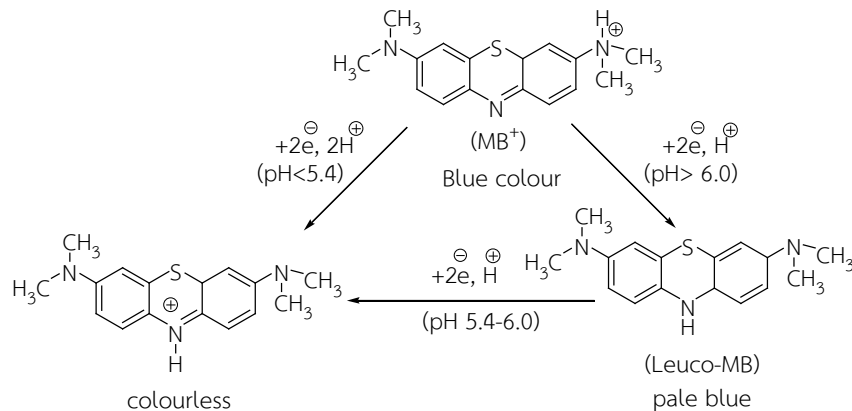
### 3.5.2 การวัดความเป็นกรดของน้ำตาลสด

เมื่อเชื้อจุลินทรีย์มีการเจริญได้ดีในน้ำตาลสดจะทำให้น้ำตาลสดเกิดการเน่าเสีย โดยจะมีการผลิตกรดแลคติกขึ้นในปริมาณมากส่งผลให้น้ำตาลสดมีความเป็นกรด (Atputharajah et al., 1986) ดังนั้นการวัดค่า pH ที่ลดลงสามารถระบุการเน่าเสียของน้ำตาลสดในเบื้องต้นได้ ซึ่งมีวิธีการทดลองโดยสรุปดังนี้ เตรียมสารละลายน้ำตาลสด ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อและมี tannin-SR และ tannin-GM ในปริมาณ 1 5 10 20 และ 40 มิลลิกรัมตามลำดับ แล้วเขย่าสารละลายด้วยเครื่อง Vortex เป็นเวลา 1-2 นาที ปิดจุกหลอดทดลอง อุณหภูมิใน water bath โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 37 °C แล้ววัดค่า pH ของสารละลายที่เวลา 0 4 8 12 16 20 24 28 และ 32 ชั่วโมงตามลำดับ ทำซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง โดยใช้น้ำตาลสดที่ไม่เติมสารแทนนินเป็น negative control และ น้ำตาลสดที่เติม tannic acid เป็น positive control โดยใช้เงื่อนไขของความเป็นกรดที่ค่า  $\text{pH} \leq 4.0$  (มีกลิ่นเหม็น มีฟองแก๊ส) แสดงถึงสารตัวอย่างน้ำตาลสดเกิดการเน่าเสียแล้ว

### 3.5.3 การตรวจหาจำนวนของแบคทีเรียทางอ้อมโดยวิธี Methylene blue reduction test (MBRT)

การวิเคราะห์ประสิทธิภาพเบื้องต้นของ tannin-SR เทียบกับ tannin-GM ในการชะลอการเน่าเสียของน้ำตาลสดด้วยวิธี MBRT นี้ดัดแปลงมาจากการวัดคุณภาพของน้ำนมและอาหารเหลวต่างๆ (Impert et al., 2002) ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานการวิจัยอย่างชัดเจนสำหรับการใช้วิเคราะห์คุณภาพของน้ำตาลสด โดยวิธีนี้จะวัดเวลาที่ใช้ในการเปลี่ยนสีของ methylene blue จากสีน้ำเงินเป็นไม่มีสี โดยเวลาที่ใช้ในการจางลงของสีจะเป็น

สัดส่วนผกผันกับจำนวนแบคทีเรียที่มีในน้ำตาลสด (ภาพที่ 3.1) ซึ่งมีวิธีการโดยสรุปดังนี้ เตรียมสารละลายน้ำตาลสดปริมาตร 10 มิลลิลิตรในหลอดทดลองที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อและมี tannin-SR และ tannin-GM ในปริมาณ 1 5 10 20 และ 40 มิลลิลิตร ตามลำดับ แล้วเขย่าสารละลายด้วยเครื่อง Vortex เป็นเวลา 1-2 นาที ใช้ปิเปตต์ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อดูดสารละลายสีม่วงของ methylene blue (sterile methylene blue solution; ละลาย methylene blue tablet 2 เม็ดในน้ำกลั่นที่ต้มเดือดปริมาตร 200 มิลลิลิตร ในขวดรูปกรวยป้อยให้เย็นที่อุณหภูมิปกติปิดด้วยจุกและเก็บในที่พ้นแสง) ใส่ลงในหลอดทดลองหลอดละ 1.0 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกแล้วเขย่าหลอดทดลองเบาๆ อุ่นหลอดทดลองใน water bath ที่ปิดฝาป้องกันแสงโดยควบคุมอุณหภูมิที่ 37 °C บันทึกเวลาในเปลี่ยนจากสารละลายสีน้ำเงินเป็นไม่มีสี ที่ 0 4 8 12 16 20 24 28 และ 32 ชั่วโมง ตามลำดับ ทำซ้ำทั้งหมด 3 ครั้งโดยใช้น้ำตาลสดที่ไม่เติมสารแทนนินเป็น negative control และน้ำตาลสดที่เติม tannic acid เป็น positive control



ภาพที่ 3.1 การเปลี่ยนสีของ methylene blue ในสภาวะความเป็นที่แตกต่างกัน

### 3.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ใช้โปรแกรม Excel (2007) คำนวณค่าเฉลี่ย (mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วย one-way ANOWA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่  $P \leq 0.05$  ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS Statistic version 23 (USA)

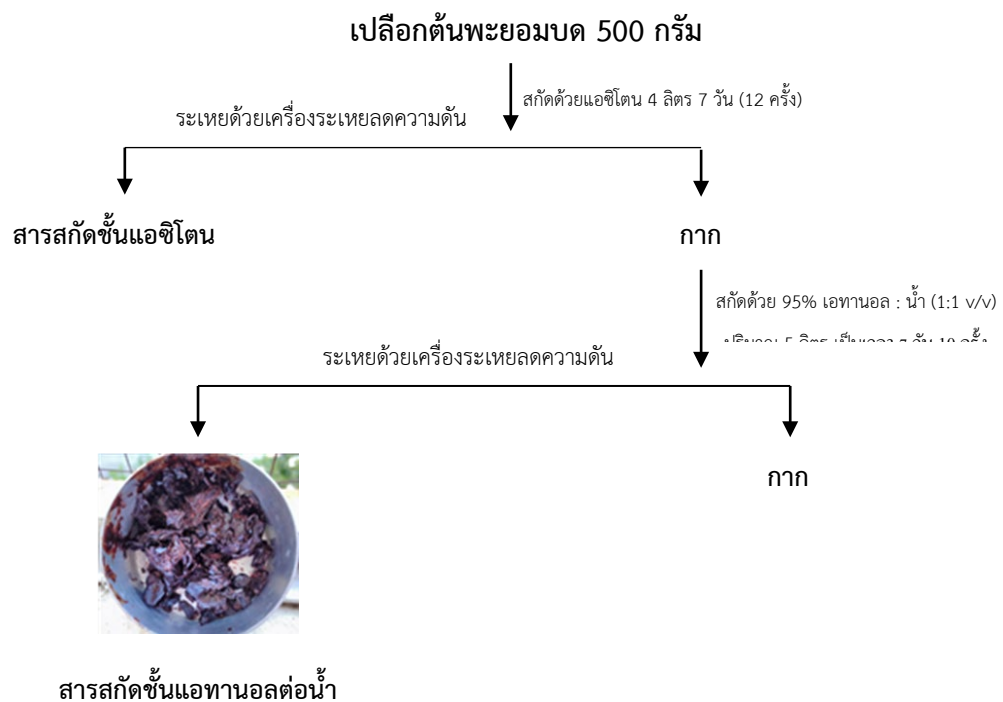
## บทที่ 4

### ผลและอภิปรายผลการวิจัย

#### 4.1 การเตรียมสารสกัด

##### 4.1.1 การเตรียมสารสกัดแทนนินจากเปลือกพะยอม

เมื่อนำเปลือกต้นพะยอมมาทำการสกัดด้วยตัวทำละลายได้แก่ แอซิโตนเพื่อสกัดสารองค์ประกอบขั้วต่ำในกลุ่มที่เรียกว่า non-tannin และสกัดด้วย สารละลายผสมของน้ำและเอทานอล (1:1 v/v) เพื่อสกัดสารที่มีสภาพความเป็นขั้วสูงซึ่งเป็นสารในกลุ่ม tannin โดยมีขั้นตอนของการสกัดแสดงในภาพที่ 4.1 ผลของเตรียมสารสกัดทั้งในแง่ของปริมาณ และลักษณะทางกายภาพของสารสกัดแสดงในตารางที่ 4.1



#### ภาพที่ 4.1 การเตรียมสารสกัดแทนนินจากเปลือกต้นพะยอม

จากตารางที่ 4.1 พบว่าสารสกัดแอซิโตน มีลักษณะเป็นของแข็งสีน้ำตาลมีปริมาณ 33.61 กรัม (6.72 %w/w) เรียกว่าสารสกัด non-tannin-SR ส่วนสารสกัดจากตัวทำละลายผสมของเอทานอลในน้ำพบว่าสกัดได้ในปริมาณมากกว่าสารสกัด non-tannin-SR ประมาณ 5 เท่า โดยมีลักษณะเป็นของแข็งสีน้ำตาล ปริมาณ 174.55 กรัม คิดเป็น 34.91 %w/w และเรียกว่าสารสกัดนี้ว่า tannin-SR

ตารางที่ 4.1 สมบัติทางกายภาพ และร้อยละของสารสกัดจากเปลือกไม้พะยอม

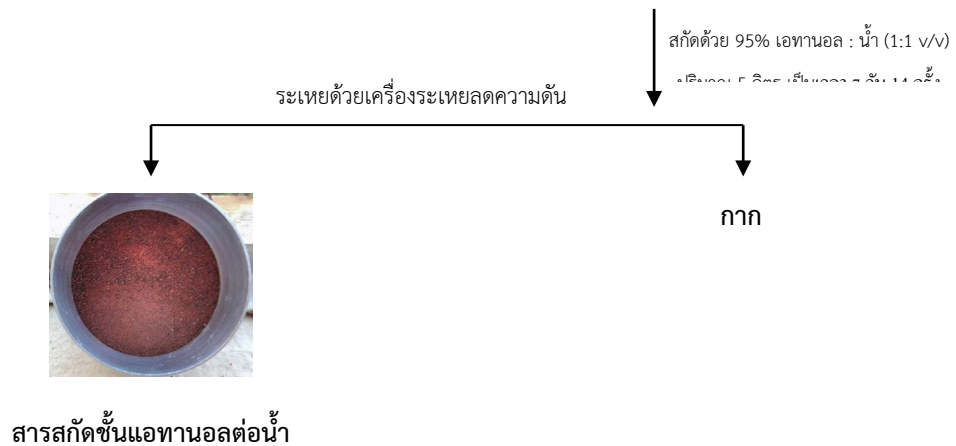
| ชนิดของแทนนิน                | สีของสารสกัด | ลักษณะ  | น้ำหนักสารสกัด (g) | ร้อยละโดยน้ำหนัก <sup>a</sup><br>%w/w |
|------------------------------|--------------|---------|--------------------|---------------------------------------|
| แอซิโตน<br>(non-tannin-SR)   | น้ำตาล       | ของแข็ง | 33.61              | 6.72                                  |
| เอทานอลต่อน้ำ<br>(tannin-SR) | น้ำตาล       | ของแข็ง | 174.55             | 34.91                                 |

a หมายถึง ร้อยละโดยน้ำหนักของสารสกัดเทียบกับน้ำหนักพืชแห้งเริ่มต้น 500 กรัม

#### 4.1.2 การเตรียมสารสกัดแทนนินจากเปลือกผลมังคุด

เมื่อนำเปลือกมังคุดมาทำการสกัดด้วยตัวทำละลายได้แก่ แอซิโตนเพื่อสกัดสารองค์ประกอบขั้วต่ำในกลุ่มที่เรียกว่า non-tannin และสกัดด้วยสารละลายผสมของน้ำและเอทานอล (1:1 v/v) เพื่อสกัดสารที่มีสภาพความเป็นขั้วสูงซึ่งเป็นสารในกลุ่ม tannin โดยมีขั้นตอนของการสกัดโดยสรุปแสดงในภาพที่ 4.2 และผลของการสกัดทั้งในแง่ของของปริมาณ และลักษณะทางกายภาพ แสดงในตารางที่ 4.2





ภาพที่ 4.2 การเตรียมสารสกัดแทนนินจากเปลือกผลมังคุด

ตารางที่ 4.2 สมบัติทางกายภาพ และร้อยละของสารสกัดเปลือกมังคุด

| ตัวทำละลาย      | สีของสารสกัด | ลักษณะ  | น้ำหนักสารสกัด (g) | ร้อยละโดยน้ำหนัก <sup>a</sup><br>%w/w |
|-----------------|--------------|---------|--------------------|---------------------------------------|
| แอสิตอน         | น้ำตาล       | ของแข็ง | 25.29              | 5.06                                  |
| (non-tannin-GM) |              |         |                    |                                       |
| เอทานอล:น้ำ     | น้ำตาล       | ของแข็ง | 138.20             | 27.60                                 |
| (tannin-GM)     |              |         |                    |                                       |

a หมายถึง ร้อยละโดยน้ำหนักของสารสกัดเทียบกับน้ำหนักพืชแห้งเริ่มต้น 500 กรัม

จากตารางที่ 4.2 พบว่าสารสกัดแอสิตอน มีลักษณะเป็นของแข็งสีน้ำตาล ปริมาณ 25.29 กรัม คิดเป็น 5.06 %w/w โดยเรียกว่าสารสกัดนี้ว่า non-tannin-GM ส่วนสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลายผสมของเอทานอลในน้ำมีลักษณะเป็นของแข็งสีน้ำตาล มีน้ำหนัก 138.20 กรัม (27.60 %w/w) โดยมีปริมาณมากกว่าสารสกัด non-tannin ประมาณ 5.5 เท่า และเรียกว่าสารสกัด tannin-GM

จากข้อมูลทั้งตารางที่ 4.1 และ 4.2 พบว่าสารสกัดส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นของแข็งสีน้ำตาล และสารสกัดที่ถูกนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไปในงานวิจัยนี้คือ สาร

สกัด tannin-SR จากเปลือกต้นพะยอมหนัก 174.55 กรัม (34.91 % w/w) และสารสกัด tannin-GM หนัก 138.20 กรัม (27.60 % w/w) ตามลำดับ

## 4.2 การทดสอบประเภทของแทนนิน

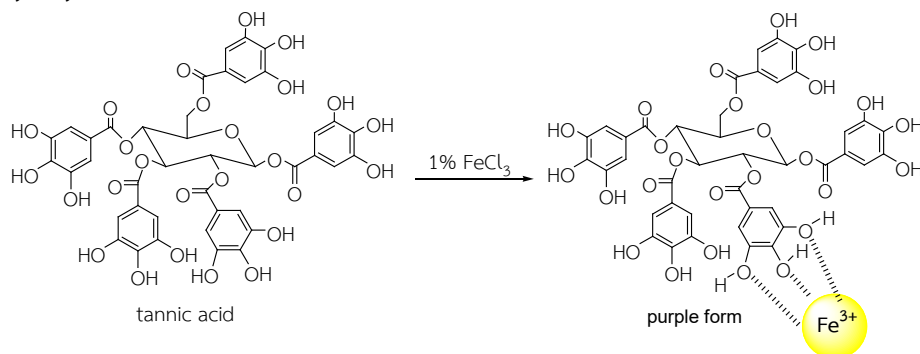
เมื่อนำสารสกัด tannin-SR และ tannin-GM ซึ่งได้จากการสกัดเปลือกต้นพะยอม และเปลือกผลมังคุด ตามลำดับ มาศึกษาประเภทของแทนนินโดยให้ทำปฏิกิริยาเคมีกับ สารละลาย  $\text{FeCl}_3$  (1% w/v) gelatin (1% w/v) lead acetate (1% w/v) และ สารละลายน้ำโบรมีน แล้วเปรียบเทียบกับปฏิกิริยาของสารมาตรฐาน condensed tannin และ hydrolysable tannin ซึ่งคือ (+)-catechin และ tannic acid ตามลำดับ ซึ่งได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.3-4.6

**ตารางที่ 4.3** ผลการทำปฏิกิริยากับสารละลาย  $\text{FeCl}_3$  ของสารสกัดแทนนินเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน

| catechin<br>(condensed tannin)                                                      | tannic acid<br>(hydrolysable tannin)                                                | tannin-GM                                                                            | tannin-SR                                                                             |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
|  |  |  |  |
| สารละลายสีเขียว<br>มีตะกอน                                                          | สารละลายสีม่วงเข้ม<br>มีตะกอน                                                       | สารละลายสีเหลืองอมเขียว<br>ตกตะกอน                                                   | สารละลายสีเหลืองอม<br>เขียว ตกตะกอน                                                   |

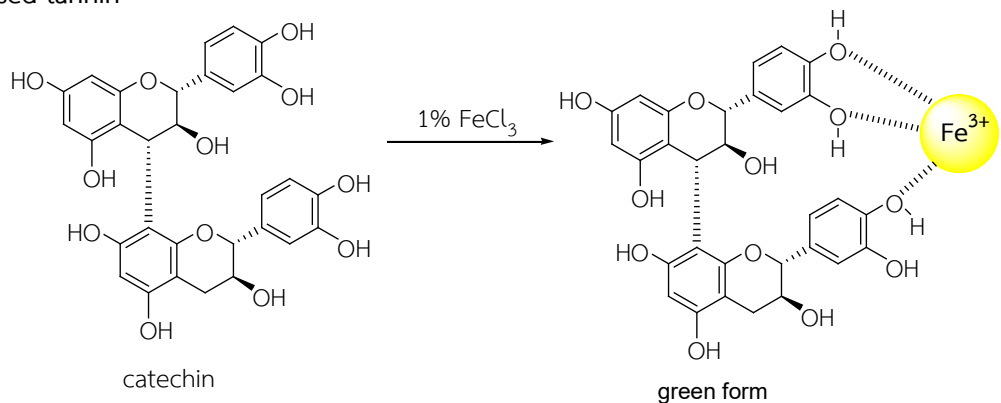
จากตารางที่ 4.3 พบว่าเมื่อสารสกัด tannin-GM และสารสกัด tannin-SR ทำปฏิกิริยากับสารละลาย  $\text{FeCl}_3$  สารละลายจะมีสีเหลืองอมเขียวและตกตะกอน ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการทำปฏิกิริยากับสารมาตรฐาน condensed tannin และ hydrolysable tannin พบว่าทั้งสารสกัด tannin-GM และสารสกัด tannin-SR ให้ผลการทดสอบสอดคล้องกับผลการทดสอบของ (+)-catechin ซึ่งเป็นตัวแทนของสาร condensed tannin ดังนั้นจากการทดสอบด้วยการทำปฏิกิริยากับสารละลาย  $\text{FeCl}_3$  สามารถกล่าวในเบื้องต้นได้ว่าทั้งสารสกัด tannin-GM และสารสกัด tannin-SR มีสารในกลุ่ม condensed tannin เป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งการเกิดปฏิกิริยาให้สารที่มีสีเขียวของ condensed tannin แสดงในภาพที่ 4.3

Hydrolysable tannin



ภาพที่ 4.3 ปฏิกิริยาการเกิดสารที่มีสีของ hydrolysable tannin และ condensed tannin ด้วยสารละลาย  $\text{FeCl}_3$

Condensed tannin



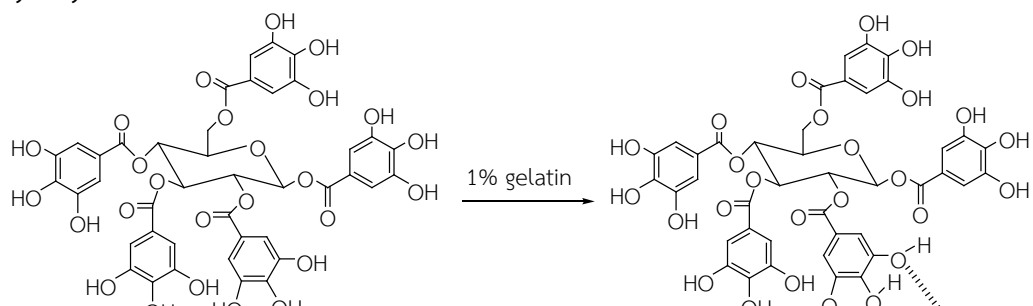
**ภาพที่ 4.3** ปฏิกริยาการเกิดสารที่มีสีของ hydrolysable tannin และ condensed tannin ด้วยสารละลาย  $\text{FeCl}_3$  (ต่อ)

ส่วนการทดสอบกับสารละลาย gelatin (1% w/v) ได้ผลดังตารางที่ 4.4 ซึ่งจะเห็นได้ว่า เมื่อให้สารสกัดทั้ง tannin-GM และ tannin-SR ทำปฏิกริยากับสารละลาย gelatin ซึ่งเป็นสารในกลุ่มโปรตีน ผลการทดลองที่ได้คือสารละลายขุ่นและเกิดตะกอนสีขาว ซึ่งสอดคล้องกับการทำปฏิกริยาของสารมาตรฐานทั้ง condensed tannin และ hydrolysable tannin ซึ่งวิธีนี้เป็นที่ยืนยันได้เพียงแค่ว่าสารสกัดที่เตรียมได้มีสารแทนนินเป็นองค์ประกอบหลัก แต่ไม่สามารถบอกได้ว่าสารสกัดใดมีองค์ประกอบเป็น condensed tannin หรือ hydrolysable tannin สมการของการเกิดปฏิกริยาแสดงดังภาพที่ 4.4

**ตารางที่ 4.4** ผลการทำปฏิกริยากับสารละลาย gelatin (1% w/v) ของสารสกัดแทนนินเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน

| catechin<br>(condensed tannin)                                                      | tannic acid<br>(hydrolysable tannin)                                                | tannin-GM                                                                            | tannin-SR                                                                             |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
|  |  |  |  |
| ตกตะกอนสีขาว                                                                        | ตกตะกอนสีขาว                                                                        | ตกตะกอนสีขาว                                                                         | ตกตะกอนสีขาว                                                                          |

**Hydrolysable tannin**



**ภาพที่ 4.4** ปฏิกริยาการเกิดตะกอนสีขาวของ hydrolysable tannin และ condensed tannin ด้วยสารละลายโปรตีน gelatin

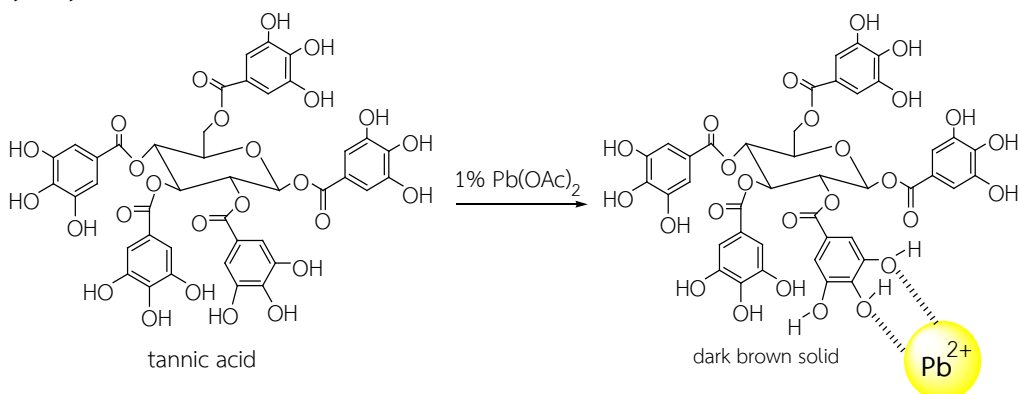
ผลการทดสอบสารแทนนินด้วยสารละลาย lead acetate ดังแสดงในตารางที่ 4.5 และจากตารางที่ 4.5 พบว่าสารสกัดแทนนินทั้ง tannin-GM และ tannin-SR ให้ตะกอนที่มีสีน้ำตาลเข้มและสีน้ำตาลอ่อนตามลำดับ เมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย lead acetate (1% w/v) ซึ่งถือว่ามีเอนสีในช่วงสีน้ำตาลใกล้เคียงกับการมีสีของตะกอนสารมาตรฐาน (+)-catechin เมื่อทำปฏิกิริยากับ lead acetate ในขณะที่สารมาตรฐาน tannic acid เกิดตะกอนสีเหลืองอ่อน จากการทดสอบการเกิดตะกอนด้วย

สารละลาย lead acetate ทำให้สามารถสรุปในเบื้องต้นได้ว่าสารสกัดแทนนินทั้ง tannin-GM และ tannin-SR ประกอบด้วย condensed tannin เป็นองค์ประกอบหลัก สมการการเกิดปฏิกิริยาแสดงในภาพที่ 4.5

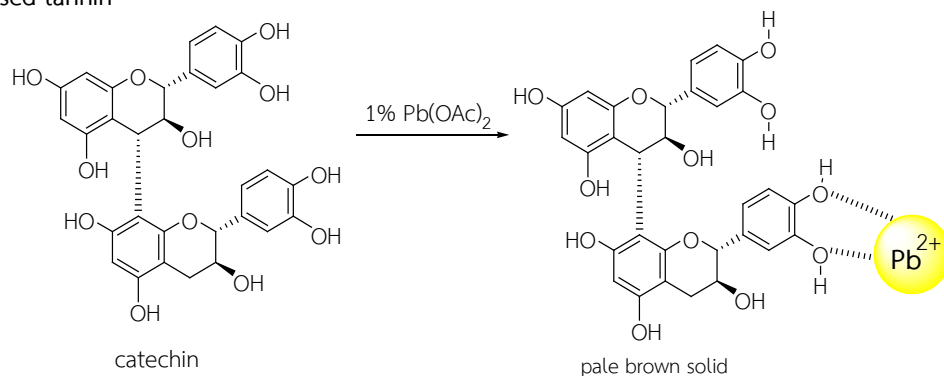
**ตารางที่ 4.5** ผลการทำปฏิกิริยากับสารละลาย lead acetate (1% w/v) ของสารสกัดแทนนินโดยเทียบกับการทำปฏิกิริยาของสารมาตรฐาน

| catechin<br>(condensed tannin)                                                     | tannic acid<br>(hydrolysable tannin)                                               | tannin-GM                                                                           | tannin-SR                                                                            |
|------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
|  |  |  |  |
| ตกตะกอนสีน้ำตาล                                                                    | ตกตะกอนสีเหลืองอ่อน                                                                | ตกตะกอนสีน้ำตาลเข้ม                                                                 | ตกตะกอนสีน้ำตาลอ่อน                                                                  |

#### Hydrolysable tannin



#### Condensed tannin



**ภาพที่ 4.5** ปฏิบัติการเกิดตะกอนของ hydrolysable tannin และ condensed tannin ด้วยสารละลาย lead acetate

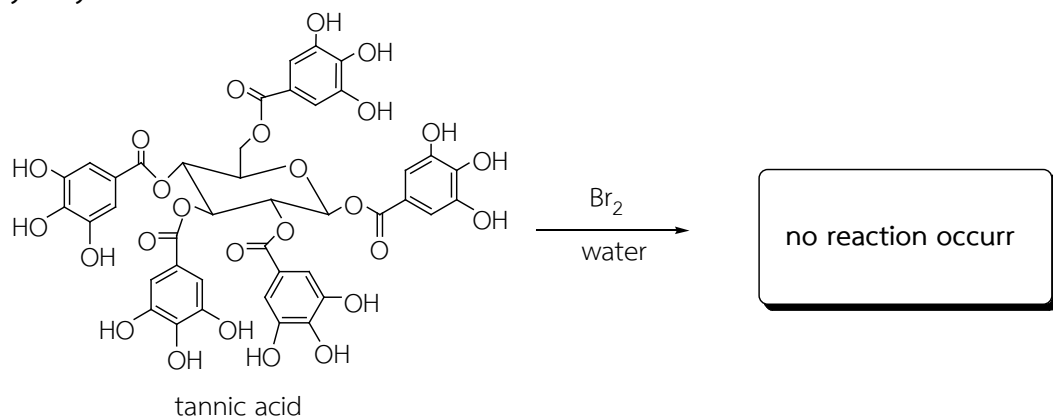
และเมื่อให้สารสกัดแทนนินทั้ง 2 ชนิด ทำปฏิกิริยากับสารละลายน้ำโบรมีนพบว่า สารสกัดแทนนินทั้ง tannin-GM และ tannin-SR เกิดตะกอนสีน้ำตาลเข้ม และตะกอนสีน้ำตาลอ่อนตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการเกิดตะกอนสีน้ำตาลอ่อนของสารมาตรฐาน (+)-catechin ในขณะที่ การทำปฏิกิริยาของสารมาตรฐาน tannic acid ให้สารละลายใสสีเหลืองไม่มีตะกอน ซึ่งการทดสอบนี้สามารถสรุปเบื้องต้นได้อีกว่าสารสกัดแทนนินทั้ง tannin-GM และ tannin-SR มีองค์ประกอบหลักเป็นแทนนินประเภท condensed tannin เช่นเดียวกันกับ (+)-catechin ดังแสดงผลการทดลองในตารางที่ 4.6 และผลการเกิดปฏิกิริยาแสดงในภาพที่ 4.6

**ตารางที่ 4.6** ผลการทำปฏิกิริยากับสารละลายน้ำโบรมีนของสารสกัดแทนนินเทียบกับสารมาตรฐาน

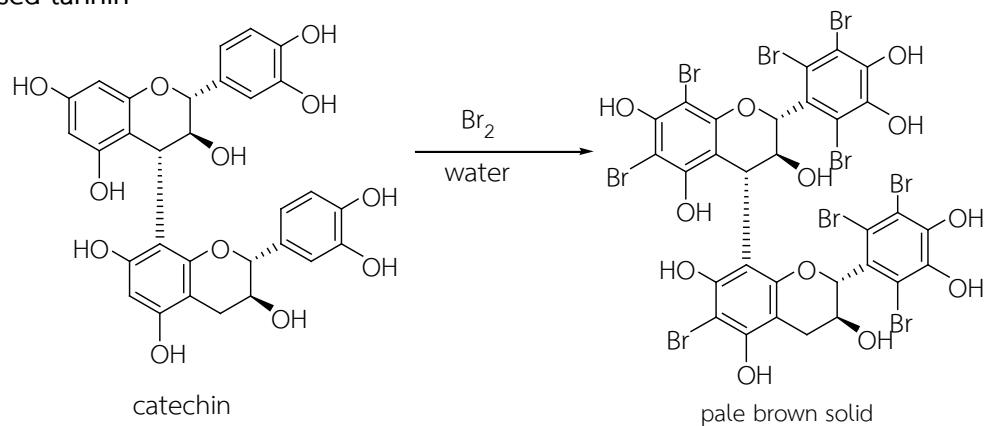
| catechin<br>(condensed tannin)                                                      | tannic acid<br>(hydrolysable tannin)                                                | tannin-GM                                                                            | tannin-SR                                                                             |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
|  |  |  |  |
| ตกตะกอนสีน้ำตาลอ่อน                                                                 | สารละลายสีเหลือง                                                                    | ตกตะกอนสีน้ำตาลเข้ม                                                                  | ตกตะกอนสีน้ำตาลอ่อน                                                                   |

นอกจากการทดสอบประเภทของแทนนินด้วยการให้ทำปฏิกิริยากับรีเอเจนต์ที่จำเพาะแล้ว ยังทำการศึกษาโดยการวัดค่า maximum wavelength ด้วยเทคนิคอัลตราไวโอเลตสเปกโตรสโกปีของสารสกัดเทียบกับสารมาตรฐานทั้ง tannic acid และ (+)-catechin และได้ผลดังตารางที่ 4.7 ซึ่งจะเห็นได้ว่าสารมาตรฐาน (+)-catechin มีค่า maximum wavelength 282 นาโนเมตร ในขณะที่ tannic acid มีค่า maximum wavelength น้อยกว่าที่ 270 นาโนเมตร และเมื่อศึกษาค่า maximum wavelength ของสารสกัดแทนนินทั้ง tannin-GM และ tannin-SR พบว่ามีค่าเท่ากับ 284 และ 281 นาโนเมตร ตามลำดับ

#### Hydrolysable tannin



#### Condensed tannin

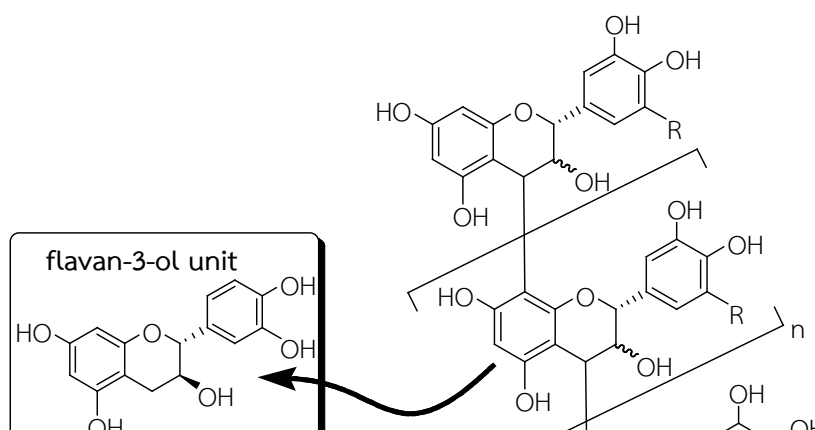


**ภาพที่ 4.6** ปฏิกริยาการเกิดตะกอนของ hydrolysable tannin และ condensed tannin ด้วยสารละลายน้ำโบรมีน

ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับค่า maximum wavelength ของสาร (+)-catechin อาจเนื่องมาจากอิทธิพลที่โดดเด่นของหน่วยย่อย flavan-3-ol ซึ่งเป็นโครโมฟอร์ที่ประกอบขึ้นเป็นพอลิเมอร์ของ condensed tannin (ภาพที่ 4.7) ดังนั้นเมื่อพิจารณาผลการทดลองจากทั้งการศึกษาการทำปฏิกริยากับรีเอเจนต์ที่จำเพาะและการวัด maximum wavelength ของสารสกัดเทียบกับสารมาตรฐาน จึงสามารถยืนยันได้ว่าสารองค์ประกอบหลักในทั้ง tannin-GM และ tannin-SR มีโครงสร้างเป็นแทนนินประเภท condensed tannin

**ตารางที่ 4.7** ค่า maximum wavelength (nm) ของสารสกัดเทียบกับสารมาตรฐาน

| ค่าที่วัด          | ชนิดของสารแทนนิน               |                                      |           |           |
|--------------------|--------------------------------|--------------------------------------|-----------|-----------|
|                    | Catechin<br>(condensed tannin) | Tannic acid<br>(hydrolysable tannin) | Tannin-GM | Tannin-SR |
| maximum wavelength | 282 nm                         | 270 nm                               | 281 nm    | 284 nm    |

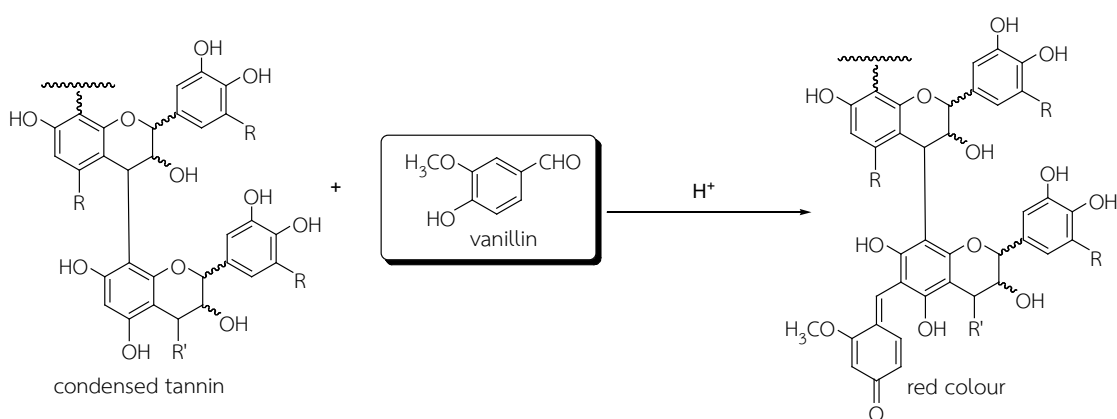


ภาพที่ 4.7 โครงสร้างของหน่วยย่อย flavan-3-ol ที่พบใน condensed tannin  
(ที่มา; ดัดแปลงบางส่วนจาก Schofield และคณะ (2001))

#### 4.3 ปริมาณแทนนินทั้งหมดของสารสกัด

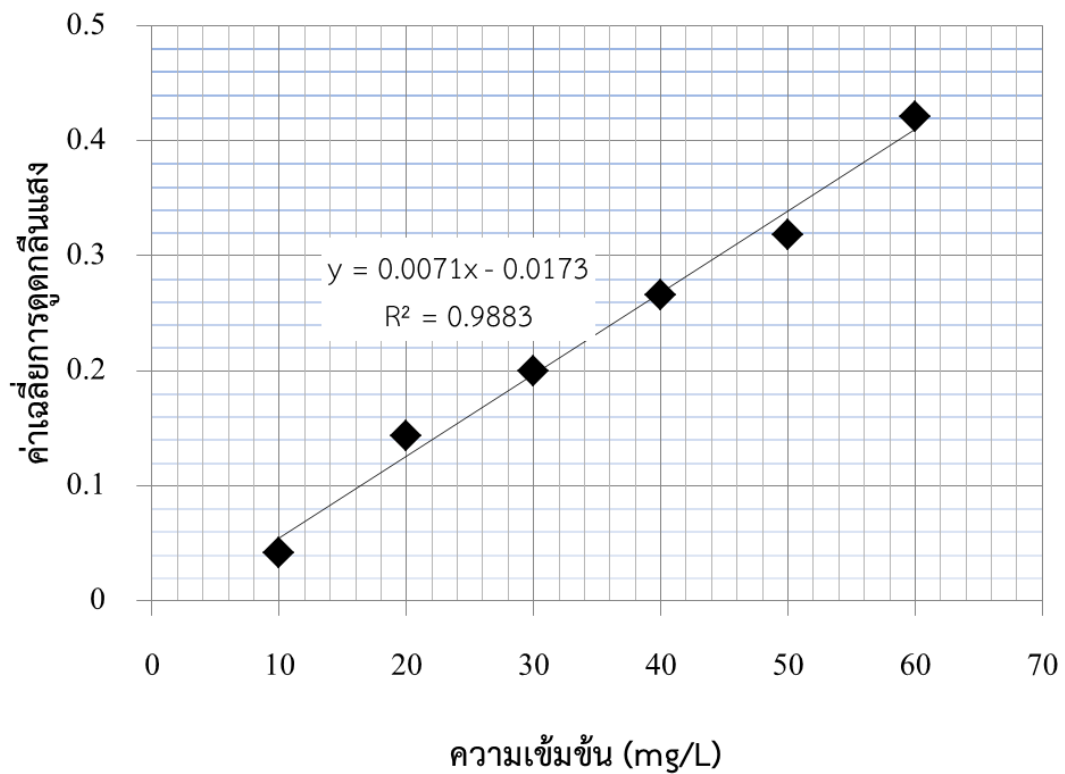
จากการพิสูจน์ในเบื้องต้นพบว่าสารองค์ประกอบหลักในแทนนินทั้ง tannin-SR และ tannin-GM เป็นสารประเภท condensed tannins ดังนั้นการวิจัยเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณแทนนินทั้งหมด จึงใช้วิธีที่มีความเฉพาะต่อสารแทนนินในกลุ่ม condensed tannins ที่มีการศึกษาวิจัยมาก่อนและเป็นที่นิยม

กันมากนั่นคือ วิธี Vanillin assay ซึ่งเป็นการวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตของสารสีแดงที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาเคมีของสารประกอบ condensed tannin กับ vanillin ในสภาวะกรด (ภาพที่ 4.8) ซึ่งวิเคราะห์ปริมาณโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของ (+)-catechin (ภาพที่ 4.9) และผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.9-4.10



ภาพที่ 4.8 ปฏิกิริยาเคมีใน Vanillin assay  
(ที่มา; ดัดแปลงบางส่วนจาก Schofield และคณะ (2001))

จากการสร้างกราฟมาตรฐานในภาพที่ 4.9 พบว่าได้กราฟเส้นตรงโดยมีสมการของเส้นตรง คือ  $y = 0.0071x - 0.0173$  และมีค่าสัมประสิทธิ์ตัวกำหนด ( $R^2$ ) เท่ากับ 0.9883 จากการศึกษ ปริมาณ condensed ทั้งหมดในสารสกัด tannin-GM และ tannin-SR โดยหาช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมเพื่อนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ (+)-catechin ได้ผลดังตารางที่ 4.8



ภาพที่ 4.9 กราฟมาตรฐานของ (+)-catechin จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร

ตารางที่ 4.8 ค่าการดูดกลืนแสงของ tannin-SR และ tannin-GM ตามวิธี Vanillin assay

| ความเข้มข้น (mg/L) | ค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 นาโนเมตร |          |          | เฉลี่ย |
|--------------------|----------------------------------|----------|----------|--------|
|                    | หลอดที่1                         | หลอดที่2 | หลอดที่3 |        |
| tannin-SR          |                                  |          |          |        |
| 500                | 0.389                            | 0.382    | 0.391    | 0.387  |
| Tannin-GM          |                                  |          |          |        |
| 500                | 0.156                            | 0.157    | 0.155    | 0.156  |

จากข้อมูลในตารางที่ 4.8 เมื่อนำไปคำนวณหาปริมาณของ condensed tanninทั้งหมดที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัด tannin-SR และ tannin-GM และรายงาน

ผลเป็นปริมาณกรัมสมมูลของ (+)-catechin ต่อสารสกัดแทนนิน 100 กรัม (g eq. catechin/100 g TE) ได้ผลสรุปในตารางที่ 4.9 โดยพบว่าสารสกัด tannin-SR จากเปลือกไม้พะยอม ( $10.41 \pm 0.20$  g eq. catechin/100 g TE) มีปริมาณ condensed tannin ทั้งหมดที่สูงกว่าสารสกัด tannin-GM ( $8.90 \pm 0.54$  g eq. catechin/100 g TE) ซึ่งได้จากเปลือกผลมังคุดประมาณ 1.16 เท่า ซึ่งถือว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ )

**ตารางที่ 4.9** ปริมาณ condensed tannins ทั้งหมดใน tannin-SR และ tannin-GM

| สมการของกราฟมาตรฐาน                        | สารแทนนิน | Total tannins<br>(g eq. catechin / 100 g TE) |
|--------------------------------------------|-----------|----------------------------------------------|
| $y = 0.0071x - 0.0173$ ;<br>$R^2 = 0.9883$ | Tannin-SR | $10.41 \pm 0.20^a$                           |
|                                            | Tannin-GM | $8.90 \pm 0.54^a$                            |

<sup>a</sup>Mean  $\pm$  SD (n= 3), ตัวเลขที่อยู่ภายใต้ตัวอักษร a แสดงถึงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ )

#### 4.4 ประสิทธิภาพของแทนนินในการชะลอการเน่าเสียของน้ำตาลสด

ก่อนการวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการชะลอการเน่าเสียของน้ำตาลสด งานวิจัยนี้ได้มีการศึกษาการละลายได้ของ tannic acid tannin-SR และ tannin-GM ในปริมาณ 1 5 10 20 40 และ 80 มิลลิกรัมตามลำดับ ในน้ำตาลสดที่ควบคุมให้มีปริมาตรสำหรับการวิเคราะห์เท่ากับ 10 มิลลิลิตร เท่ากัน พบว่าน้ำตาลสดที่มีการเติมทั้ง tannic acid tannin-SR และ tannin-GM ในปริมาณ 80 มิลลิกรัมเท่านั้นที่ไม่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ในขั้นต่อไปเพราะเกิดตะกอนสีน้ำตาลเป็นจำนวนมาก อาจเนื่องมาจากการตกตะกอนของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในน้ำตาลโตนดสด ดังแสดงข้อมูลในตารางที่ 4.10 ดังนั้นการศึกษถึงประสิทธิภาพในการชะลอการเน่าเสียของน้ำตาลสดในขั้นตอนต่อไปจึงใช้แทนนินตัวอย่างต่อน้ำตาลสดปริมาตร 10 มิลลิลิตรเท่ากับ 1 5 10 20 และ 40 มิลลิกรัมตามลำดับ

**ตารางที่ 4.10** การละลายของสารสกัดแทนนินในน้ำตาลสดปริมาตร 10 มิลลิลิตร

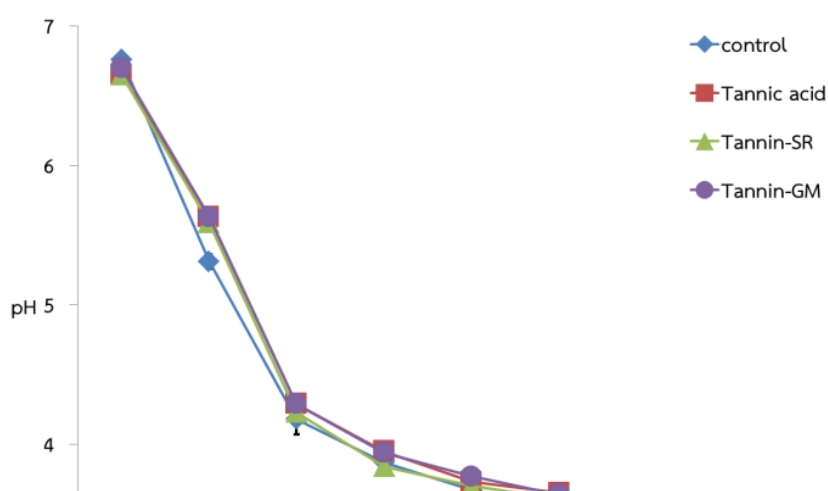
| แทนนิน      | ปริมาณแทนนิน (มิลลิกรัม) |     |      |      |      |      |
|-------------|--------------------------|-----|------|------|------|------|
|             | 1.0                      | 5.0 | 10.0 | 20.0 | 40.0 | 80.0 |
| tannic acid | +++                      | +++ | +++  | +++  | +++  | ++   |
| tannin-SR   | +++                      | +++ | +++  | +++  | +++  | +    |
| tannin-GM   | +++                      | +++ | +++  | +++  | +++  | +    |

+++ คือ ละลายได้ทั้งหมด; ++ คือ ละลายได้มีตะกอนเล็กน้อย;

+ คือ ละลายได้น้อยมีตะกอนจำนวนมาก

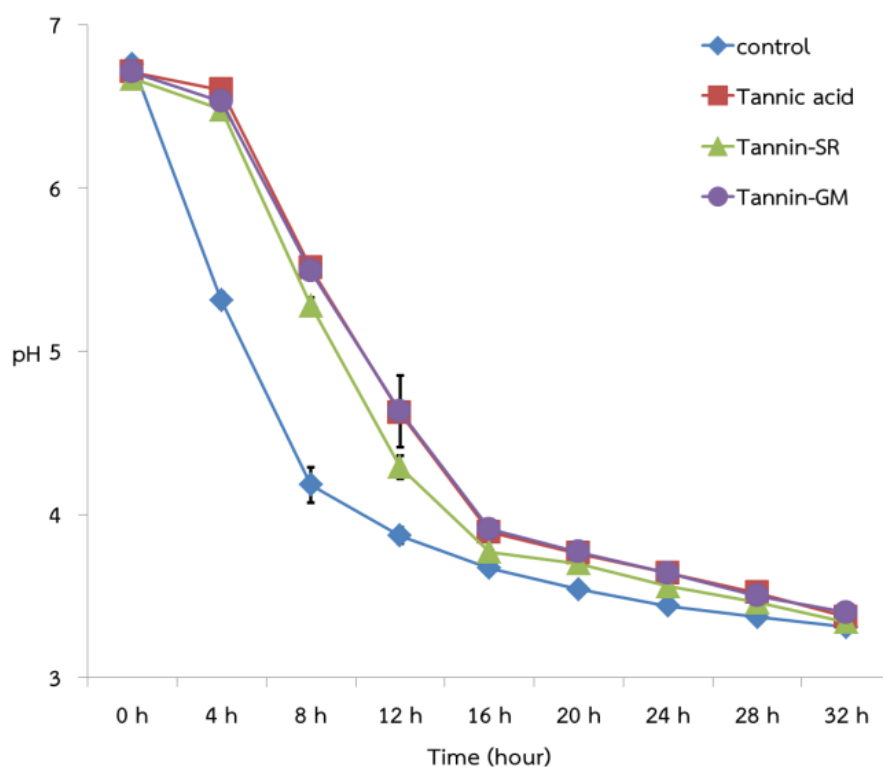
#### 4.4.1 การวัดความเป็นกรดของน้ำตาลสด

จากการทดสอบความสามารถในการชะลอการเน่าเสียของน้ำตาลสดที่มีการเติมสารสกัดแทนนินในปริมาณต่างๆ ได้แก่ 1 5 10 20 และ 40 มิลลิกรัม โดยการวัดค่า pH ที่ลดลงทุกๆ 4 ชั่วโมง จนกระทั่งถึงเวลา 32 ชั่วโมง ผลการวิเคราะห์ความเป็นกรดพบว่าน้ำตาลสดที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ (control) มีค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ  $6.76 \pm 0.03$  และเมื่อเวลาผ่านไปทุกๆ 4 ชั่วโมงจนกระทั่งถึงเวลาที่ 32 ชั่วโมงน้ำตาลสดจะมีความเป็นกรดเพิ่มมากขึ้นโดยค่า pH จะลดลงถึง  $3.31 \pm 0.01$  พร้อมกับการมีกลิ่นเหม็นบูดและเกิดฟองแก๊สบนผิวหน้าของสารละลายจำนวนมากแสดงถึงการเน่าเสียอย่างรุนแรง จากการวิจัยพบว่าหลอดทดลองที่มีน้ำตาลสดโดยปราศจากการเติมสารแทนนินจะเริ่มเกิดการเน่าเสียมีกลิ่นเหม็นบูดและเกิดฟองแก๊สที่เวลา 8 ชั่วโมงโดยมีค่า pH เท่ากับ  $4.17 \pm 0.11$  ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงกำหนดให้น้ำตาลสดทั้งที่เติมหรือไม่เติมสารสกัดแทนนินที่มีค่า pH ต่ำกว่า  $4.17 \pm 0.11$  ณ เวลาใดๆ เป็นน้ำตาลสดที่เกิดการเน่าเสียแล้ว โดยแยกแสดงผลและอภิปรายผลการวิเคราะห์ในแต่ละความเข้มข้นของแทนนินที่ใช้ดังแสดงในภาพที่ 4.10-4.14



ภาพที่ 4.10 ค่า pH (ค่าเฉลี่ย  $\pm$ SD (n=3),  $P < 0.05$  เทียบกับ control) ที่ลดลงของ น้ำตาลสด(control) และน้ำตาลสดที่เติม tannic acid tannin-SR และ tannin-GM ใน ปริมาณ 1 มิลลิกรัมที่เวลา 0-32 ชั่วโมง

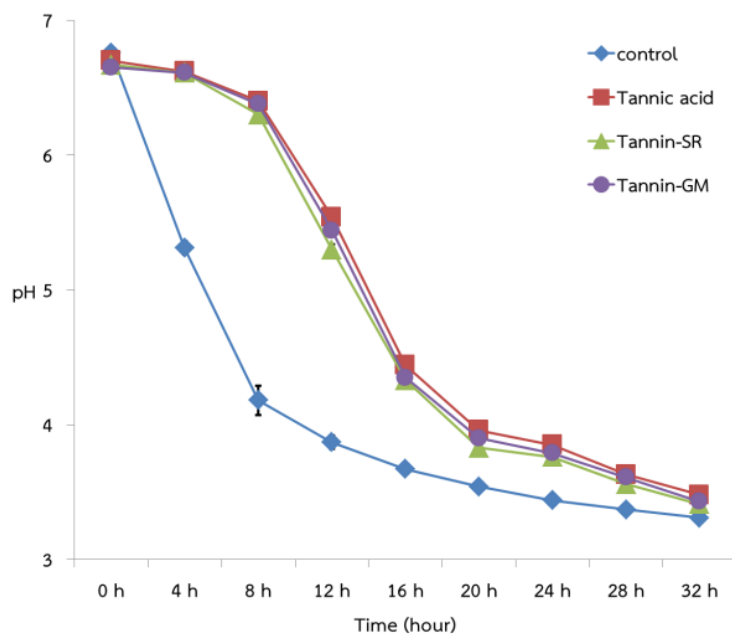
ผลจากการวัดค่า pH ของน้ำตาลสดที่มีการเติม tannic acid ( $\text{pH } 4.29 \pm 0.32$ ) tannin-SR ( $\text{pH } 4.29 \pm 0.32$ ) และ tannin-GM ( $\text{pH } 4.28 \pm 0.15$ ) ในปริมาณ 1 มิลลิกรัม (ภาพที่ 4.10) พบว่าสามารถชะลอการเน่าเสียของน้ำตาลสดได้เพียงแค่ 8 ชั่วโมง ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับน้ำตาลสดที่ไม่เติม สารแทนนิน และจะเกิดการเน่าเสียที่เวลา 12 ชั่วโมง (tannic acid;  $\text{pH } 3.94 \pm 0.04$ ,



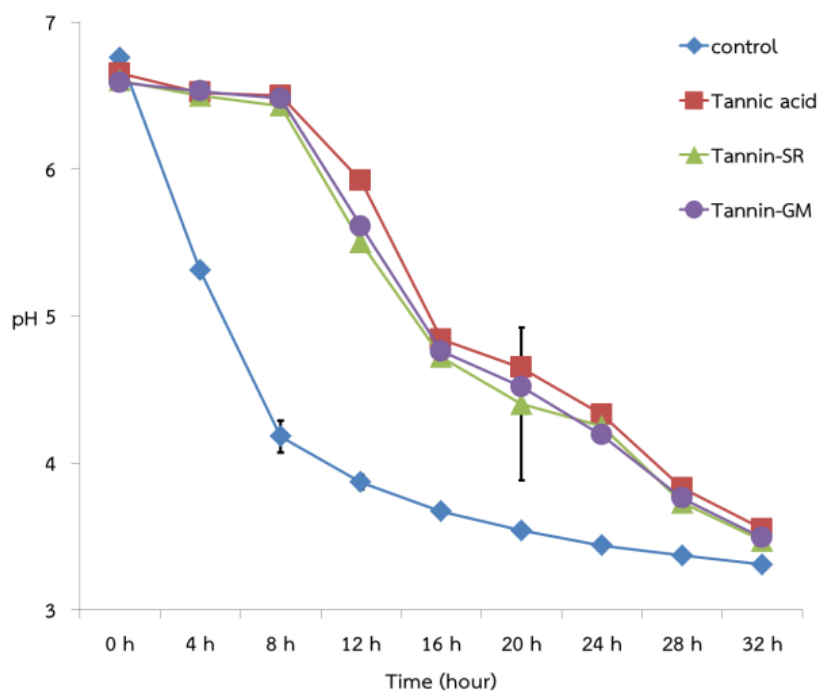
tannin-SR;  $\text{pH } 3.83 \pm 0.02$ , tannin-GM;  $\text{pH } 3.94 \pm 0.06$ ) และเมื่อมีการเติมสารแทนนินทั้ง 3 ชนิดในน้ำตาลสดเพิ่มมากขึ้นเป็น 5 มิลลิกรัม ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.11 โดยพบว่าทั้งการเติม tannic acid tannin-SR และ tannin-GM สามารถชะลอการเน่าเสียของน้ำตาลสดได้นานถึง 12 ชั่วโมง ซึ่งมีค่า pH เท่ากับ  $4.62 \pm 0.04$   $4.28 \pm 0.07$  และ  $4.63 \pm 0.21$  ตามลำดับ และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับน้ำตาลสด ( $\text{pH } 3.87 \pm 0.04$ , ที่เวลา 12 ชั่วโมง) ที่ไม่เติมสารแทนนินชนิดใดเลย

**ภาพที่ 4.11** ค่า pH (ค่าเฉลี่ย  $\pm$ SD ( $n=3$ ),  $P < 0.05$  เทียบกับ control) ที่ลดลงของน้ำตาลสด (control) และน้ำตาลสดที่เติม tannic acid tannin-SR และ tannin-GM ในปริมาณ 5 มิลลิกรัมที่เวลา 0-32 ชั่วโมง

จากการเพิ่มปริมาณแทนนินเป็น 2 เท่า จาก 5 มิลลิกรัมให้เป็น 10 มิลลิกรัม (ภาพที่ 4.12) พบว่าแนวโน้มในการชะลอการเน่าเสียของน้ำตาลดีขึ้น โดยที่น้ำตาลสดซึ่งเติม tannic acid ( $\text{pH } 4.44 \pm 0.02$ ) tannin-SR ( $\text{pH } 4.32 \pm 0.03$ ) และ tannin-GM ( $\text{pH } 4.35 \pm 0.03$ ) ในปริมาณ 10 มิลลิกรัม สามารถคงอยู่ได้โดยไม่เน่าเสียถึง 16 ชั่วโมง และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับ control ( $\text{pH } 3.66 \pm 0.02$ ) เมื่อเพิ่มปริมาณของสารแทนนินชนิดต่างๆขึ้นเป็น 20 มิลลิกรัม ผลการวัดความเป็นกรดแสดงดังภาพที่ 4.13 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า การเติม tannic acid ( $\text{pH } 4.33 \pm 0.02$ ) tannin-SR ( $\text{pH } 4.25 \pm 0.01$ ) และ tannin-GM ( $4.18 \pm 0.02$ ) สามารถชะลอการเน่าเสียของน้ำตาลสดได้เพิ่มขึ้นเป็น 24 ชั่วโมง ในขณะที่น้ำตาลสดที่ปราศจากการเติมสารแทนนินมีค่าความเป็นกรดสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ที่ค่า  $\text{pH } 3.44 \pm 0.03$  และเมื่อวิเคราะห์และเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารแทนนินทั้ง 3 ชนิด ต่อการยืดอายุของน้ำตาลสดได้นานถึง 24 ชั่วโมงพบว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าสารประเภท condensed tannins ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในเปลือกไม้พะยอมและเปลือกผลมังคุดมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากันในแง่ของการยับยั้งการสร้างกรดแลคติกของเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในน้ำตาลสด

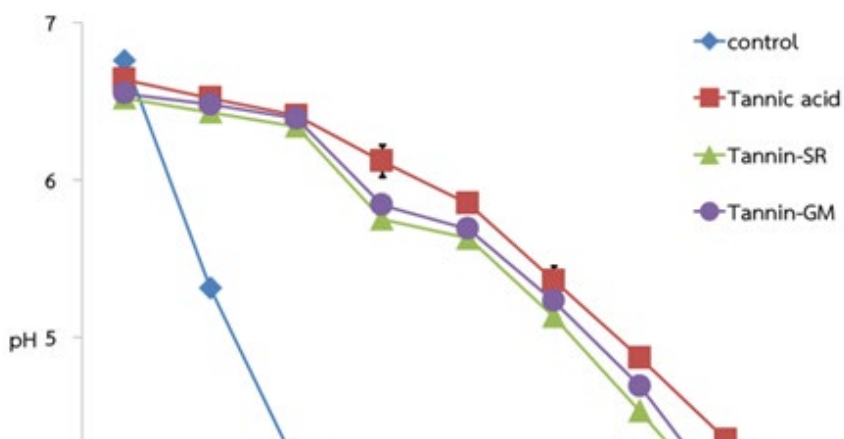


ภาพที่ 4.12 ค่า pH (ค่าเฉลี่ย  $\pm$ SD (n=3),  $P < 0.05$  เทียบกับ control) ที่ลดลงของ น้ำตาลสด (control) และน้ำตาลสดที่เติม tannic acid tannin-SR และ tannin-GM ใน ปริมาณ 10 มิลลิกรัมที่เวลา 0-32 ชั่วโมง



**ภาพที่ 4.13** ค่า pH (ค่าเฉลี่ย  $\pm$ SD (n=3),  $P<0.05$  เทียบกับ control) ที่ลดลงของน้ำตาลสด (control) และน้ำตาลสดที่เติม tannic acid tannin-SR และ tannin-GM ในปริมาณ 20 มิลลิกรัมที่เวลา 0-32 ชั่วโมง

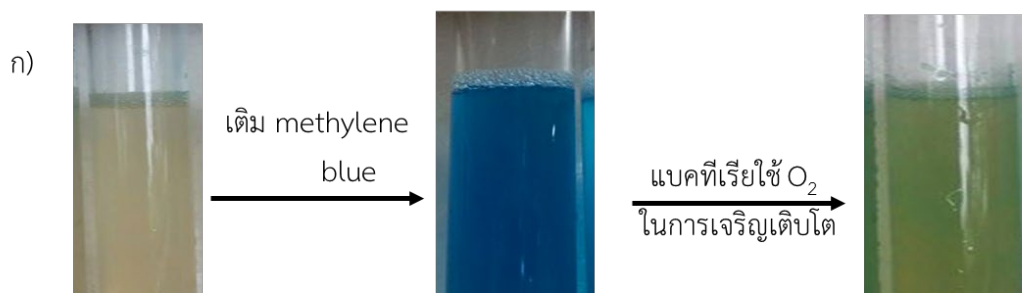
แต่หากเพิ่มปริมาณของสารแทนนินให้สูงถึง 40 มิลลิกรัม ซึ่งเป็นปริมาณสูงสุดที่ใช้ในงานวิจัยนี้ (ภาพที่ 4.14) พบว่าน้ำตาลสดที่เติม tannin-SR (pH  $4.52 \pm 0.02$ ) และ tannin-GM (pH  $4.69 \pm 0.15$ ) ยังคงชะลอการเน่าเสียของน้ำตาลสดได้เพียง 24 ชั่วโมงในขณะที่การเติม tannic acid 40 มิลลิกรัม ทำให้น้ำตาลสดคงอยู่โดยไม่เน่าเสียได้นานถึง 28 ชั่วโมง ซึ่งมีค่า pH  $4.34 \pm 0.01$  แสดงให้เห็นว่าสารมาตรฐาน tannic acid ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม hydrolysable tannins มีประสิทธิภาพในการชะลอการสลายกรดแลคติกของแบคทีเรียได้ดีกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับแทนนินจากเปลือกไม้พะยอม (tannin-SR; pH  $3.90 \pm 0.01$ ) และแทนนินจากเปลือกผลมังคุด (tannin-GM; pH  $3.97 \pm 0.04$ ) ซึ่งมีสารแทนนินกลุ่มหลักประเภท condensed tannins ผลการวิจัยในเบื้องต้นนี้แสดงให้เห็นว่าการเติม tannin-SR และ tannin-GM ในปริมาณ 20 หรือ 40 มิลลิกรัม สามารถชะลอการเน่าเสียของน้ำตาลสดได้ในระยะเวลาสูงสุดเท่ากับ 24 และ 28 ชั่วโมง ตามลำดับ ดังนั้นการยืดอายุของน้ำตาลสดปริมาตร 10 มิลลิลิตร ให้ได้นานถึง 28 ชั่วโมง อาจใช้สารสกัดแทนนินจากเปลือกไม้พะยอมหรือเปลือกผลมังคุดเพียงแค่ 40 มิลลิกรัม นอกจากนี้พบว่าน้ำตาลสดที่เติมสารแทนนินทั้ง 3 ชนิด ในทุกๆปริมาณที่เติมจะไม่สามารถคงอยู่โดยไม่เน่าเสียได้ถึง 32 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.14 ค่า pH (ค่าเฉลี่ย  $\pm$ SD (n=3),  $P < 0.05$  เทียบกับ control) ที่ลดลงของน้ำตาลสด (control) และน้ำตาลสดที่เติม tannic acid tannin-SR และ tannin-GM ในปริมาณ 40 มิลลิกรัมที่เวลา 0-32 ชั่วโมง

#### 4.4.2 การตรวจหาจำนวนของแบคทีเรียทางอ้อมโดยวิธี Methylene blue reduction test (MBRT)

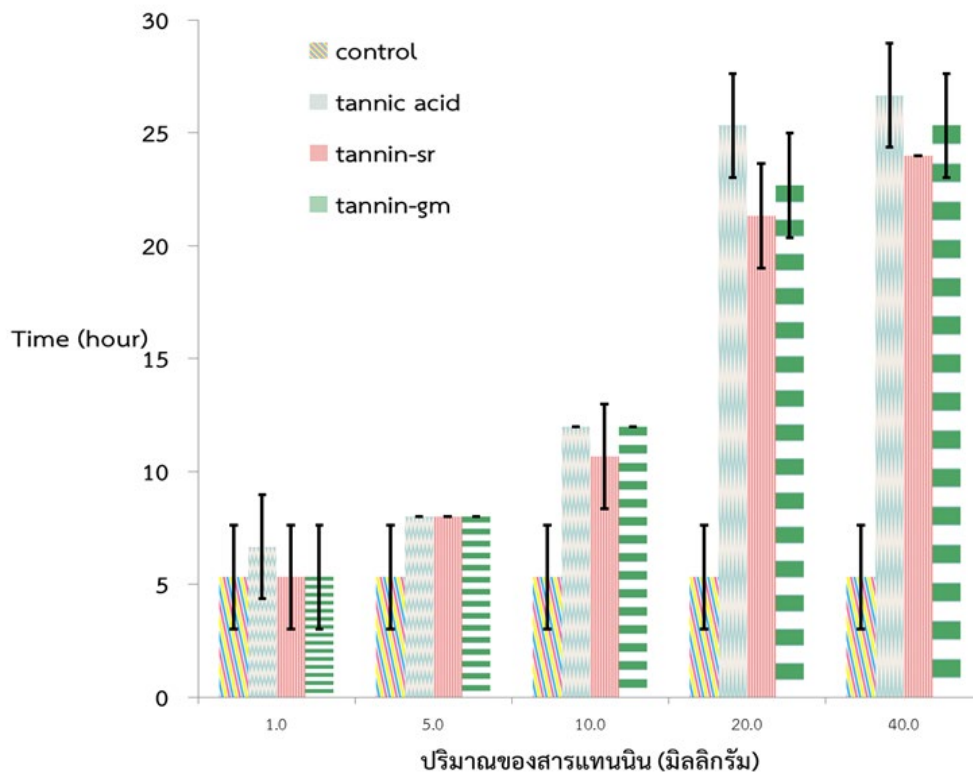
นอกจากการประเมินประสิทธิภาพเบื้องต้นในการชะลอการเน่าเสียของน้ำตาลสดที่มีการเติมสารสกัดแทนนินด้วยการวัดค่าความเป็นกรดที่เปลี่ยนแปลงไปตามที่กล่าวแล้วในเบื้องต้นนั้น งานวิจัยนี้ได้ประยุกต์ใช้วิธี MBRT เพื่อเป็นการยืนยันผลการประเมินเพิ่มเติม ซึ่งวิธีนี้อาศัยหลักการเปลี่ยนสีของ methylene blue เมื่ออยู่ในสภาวะที่จุลินทรีย์ในน้ำตาลสดมีการเจริญเติบโตโดยใช้แก๊สออกซิเจน โดยจะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นไม่มีสี (ภาพที่ 4.15) และเวลาที่ใช้ในการจางลงของสีน้ำเงินมากแสดงว่าสารแทนนินนั้นมีประสิทธิภาพสูงในการชะลอการเน่าเสียของน้ำตาลสดด้วยการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์โดยรวมซึ่งผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.16



ภาพที่ 4.15 ก) การเปลี่ยนสีของน้ำตาลสดเมื่อเติมสารละลาย methylene blue โดยการทำงานของแบคทีเรีย (ที่มา; ภาพถ่ายโดยนักวิจัย); ข) สมการแสดงการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของ methylene blue เมื่อแบคทีเรียมีการเจริญเติบโต (ที่มา; ดัดแปลงบางส่วนจากงานของ นวพร ลำเลิศกุล (2549))

จากภาพที่ 4.16 แสดงให้เห็นว่าน้ำตาลสดที่ปราศจากการเติมสารแทนนิน (control) จะเกิดการเน่าเสียเนื่องจากจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตได้ดีโดยใช้เวลาเฉลี่ยในการเปลี่ยนสีของ methylene blue เท่ากับ  $5.33 \pm 2.30$  ชั่วโมง และพบว่าน้ำตาลสดที่มีการเติม tannic acid tannin-SR และ tannin-GM ในปริมาณเพิ่มมากขึ้นมีแนวโน้มของการใช้เวลาเพื่อเปลี่ยนสีของ methylene blue มากขึ้น หรือมีแนวโน้มในการชะลอการเน่าเสียของน้ำตาลสดได้ดีขึ้นนั่นเอง โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเติมสารแทนนินที่ 20 และ 40 มิลลิกรัม สามารถชะลอการเน่าเสียของน้ำตาลสดได้ดีกว่าอย่างมีนัยสำคัญทาง

สถิติ ( $P < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับ control โดยที่การเติม tannic acid tannin-SR และ tannin-GM ปริมาณ 20 มิลลิกรัม สามารถยืดอายุของน้ำตาลสดได้นานถึง  $25.33 \pm 2.30$   $21.33 \pm 2.30$  และ  $22.67 \pm 2.30$  ชั่วโมง ตามลำดับ



ภาพที่ 4.16 ระยะเวลา (Mean  $\pm$  SD,  $P < 0.05$  เทียบกับ control) ในการเปลี่ยนสีของน้ำตาลสด (control) เมื่อมีการเติม tannic acid tannin-SR และ tannin-GM ในปริมาณ 1 5 10 20 และ 40 มิลลิกรัม

และ การเติม tannic acid tannin-SR และ tannin-GM ปริมาณ 40 มิลลิกรัม ทำให้น้ำตาลสดอยู่ได้โดยไม่เน่าเสียที่เวลา  $26.27 \pm 2.30$   $24.00 \pm 0.00$   $25.33 \pm 2.30$  ชั่วโมง ตามลำดับ แต่ถึงอย่างไรก็ตามประสิทธิภาพการชะลอการเน่าเสียของน้ำตาลสด

ด้วยวิธี MBRT ด้วยการเติม tannin-SR และ tannin-GM ในทุกๆ ปริมาณที่ใช้ในการศึกษาไม่เทียบเท่าสารมาตรฐาน tannic acid

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการเติม tannin-SR และ tannin-GM ในทุกๆ ความเข้มข้น ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) จากการพิจารณาภาพรวมของการวิเคราะห์ทั้งวิธีวัดความเป็นกรดและวิธี MBRT พบว่ามีแนวโน้มของประสิทธิภาพในการชะลอการเน่าเสียของน้ำตาลสดไปในทิศทางเดียวกันกล่าวคือ ประสิทธิภาพของการชะลอการเน่าเสียจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับการเพิ่มขึ้นของปริมาณสารแทนนิน โดยที่การเติม tannic acid สามารถชะลอการเน่าเสียของน้ำตาลสดได้ดีกว่า tannin-SR และ tannin-GM และที่สำคัญคือการมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากันเมื่อใช้ tannin-SR และ tannin-GM เพื่อชะลอการเน่าเสียของน้ำตาลสดในปริมาณ 20 หรือ 40 มิลลิกรัม ซึ่งสามารถยืดอายุของน้ำตาลสดได้ไม่ถึง 28 ชั่วโมง และอยู่ได้ประมาณ  $21.33 \pm 2.30 - 25.33 \pm 2.30$  ชั่วโมงจากวิธี MBRT และไม่เกิน 28 ชั่วโมง จากวิธีการวัดค่าความเป็นกรด ซึ่งคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของจุลินทรีย์ในน้ำตาลสดที่เทียบเท่ากันของ tannin-SR และ tannin-GM นี้ อาจเป็นผลมาจากการมีสารองค์ประกอบหลักประเภท condensed tannin ในปริมาณที่ใกล้เคียงกันนั่นเอง

อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าผลการวิจัยจะแสดงให้เห็นถึงผลเชิงบวกในแง่ของความสามารถในการชะลอการเน่าเสียของน้ำตาลสดของสารแทนนินจากเปลือกผลมังคุดได้ แต่คงต้องมีการวิจัยเพิ่มเติมถึงผลกระทบของสารสกัดแทนนินต่อคุณภาพบางประการของน้ำตาลสด เช่น สี กลิ่น และรสชาติ ซึ่งอาจเปลี่ยนแปลงไปเมื่อเทียบกับน้ำตาลสดตามธรรมชาติ และที่สำคัญเป็นอย่างยิ่งคือ สารสกัดแทนนินในระดับความเข้มข้นที่เติมในน้ำตาลสดควรมีการวิจัยเพิ่มเติมเพื่อพิสูจน์ความเป็นพิษต่อร่างกายของมนุษย์

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากภูมิปัญญาชาวบ้านในพื้นที่จังหวัดเพชรบุรีหรือพื้นที่อื่นๆของผู้ที่ประกอบอาชีพการร่อนน้ำตาลโตนดสดเป็นอารีพร่องจากการทำเกษตรกรรมด้านอื่นๆ ในแง่ของการใช้วัสดุจากธรรมชาติเพื่อเป็นสารป้องกันการเน่าเสียของน้ำตาลโตนดสด เช่น ไม้เคี่ยม หรือ ไม้พะยอม เป็นต้น แต่โดยส่วนมากนิยมใช้ไม้พะยอมเพราะนอกจากจะสามารถยืดอายุของน้ำตาลสดให้คงสภาพดีอยู่ตามความต้องการของเกษตรกรแล้ว ยังสามารถช่วยเพิ่มกลิ่นหอมของน้ำตาลสดให้มีความน่ารับประทานมากยิ่งขึ้น แต่ปัญหาของการใช้ไม้พะยอมยังมีอยู่บางประการ คือ การที่จังหวัดเพชรบุรีไม่มีไม้พะยอมเป็นพืชประจำถิ่นทำให้ต้องหาซื้อจากแหล่งอื่น และไม้พะยอมเป็นไม้หวงห้ามซึ่งในอนาคตอาจไม่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ตามภูมิปัญญาดั้งเดิมได้ ประกอบกับการที่ไม้พะยอมสามารถยืดอายุน้ำตาลโตนดสดให้คงสภาพดีอยู่ได้ภายในระยะเวลาไม่เกิน 24 ชั่วโมง จึงเป็นสาเหตุให้งานวิจัยนี้ได้คิดค้นการนำเปลือกผลมังคุดที่เป็นส่วนเหลือทิ้งจากการรับประทานส่วนเนื้อ แต่มีคุณสมบัติโดดเด่นในแง่ของการมีองค์ประกอบทางเคมีที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้อย่างหลากหลายชนิด ซึ่งสารองค์ประกอบนั้นเป็นสารชนิดเดียวกันกับที่เป็นองค์ประกอบในไม้พะยอม นั่นคือ **สารแทนนิน** จากการวิจัยโดยใช้กระบวนการทางวิทยาศาสตร์อย่างเป็นลำดับขั้นตอน ประกอบกับการใช้เทคนิค และเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ที่มีประสิทธิภาพและเชื่อถือได้ ทำให้งานวิจัยนี้ได้ค้นพบองค์ความรู้ซึ่งอาจสามารถนำไปพัฒนาต่อยอดและประยุกต์ใช้ได้จริงในอนาคต และองค์ความรู้ที่ค้นพบในงานวิจัยนี้สามารถสรุปเป็นประเด็นที่สำคัญซึ่งมีความสอดคล้องกับวัตถุประสงค์ของการวิจัยได้ดังนี้

1. สาร tannin-SR และ tannin-GM ซึ่งสกัดได้จากส่วนเปลือกต้นพะยอม และเปลือกผลมังคุดด้วยวิธีการสกัดที่ไม่ซับซ้อนตามลำดับ จากการให้สารแทนนินทั้ง 2 ชนิดทำปฏิกิริยากับรีเอเจนต์จำเพาะที่ก่อให้เกิดสารผลิตภัณฑ์ที่เป็นตะกอนและมีสีที่แตกต่างกันตามวิธีการทดสอบที่เคยมีการวิจัยมาก่อนหน้านี้ สามารถสรุปได้ว่าทั้ง tannin-

SR และ tannin-GM มีสารแทนนินองค์ประกอบหลักประเภทเดียวกันคือสาร condensed tannin และเมื่อวิเคราะห์ประมาณ condensed tannin ทั้งหมดด้วยวิธี Vanillin assay พบว่ามีปริมาณของ condensed tannin ทั้งหมดที่เป็นองค์ประกอบหลักในปริมาณที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) โดย tannin-SR มีปริมาณเท่ากับ  $10.41 \pm 0.20$  g eq. catechin/100 g TE ในขณะที่ tannin-GM มีปริมาณของ condensed tannin ทั้งหมดเท่ากับ  $8.90 \pm 0.54$  g eq. catechin/100 g TE

2. การศึกษาความสามารถในการชะลอการเน่าเสียของน้ำตาลสดของทั้ง tannin-SR และ tannin-GM จากทั้งการวัดความเป็นกรดและการวิเคราะห์ด้วยวิธี methylene blue reduction test (MBRT) พบว่าการเติมสารสกัดแทนนินทั้ง 2 ชนิด ในปริมาณสูงสุด 40 มิลลิกรัม สามารถยืดอายุของน้ำตาลสดไม่ให้เกิดการเน่าเสียได้ดีที่สุด แต่ประสิทธิภาพยังไม่เทียบเท่าสารมาตรฐาน tannic acid โดยสามารถชะลอการเน่าเสียของน้ำตาลสดได้มากกว่า 24 ชั่วโมง แต่อาจไม่ถึง 32 ชั่วโมง และประสิทธิภาพในการชะลอการเน่าเสียของน้ำตาลสดของสารสกัดแทนนินทั้ง 2 ชนิดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ในเบื้องต้นผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าเปลือกผลมังคุดอาจเป็นแหล่งของสารป้องกันการบูดเน่าจากธรรมชาติแหล่งใหม่ที่สามารถใช้ในการชะลอการเน่าเสียของน้ำตาลสดของเกษตรกรแทนการใช้ไม้พะยอมตามภูมิปัญญาชาวบ้านในระหว่างรอน้ำตาลสดจากช่อดอกของต้นตาลโตนดเพื่อรักษาคุณภาพของน้ำตาลสดก่อนนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อื่นๆที่มีคุณภาพ และเกษตรกรอาจไม่จำเป็นต้องมีความกังวลต่อการประกอบอาชีพขึ้นน้ำตาลโตนดโดยปราศจากไม้พะยอมอีกต่อไปในอนาคต

### ข้อเสนอแนะ

เพื่อให้งานวิจัยนี้มีผลกระทบเชิงประจักษ์ต่อการนำไปใช้ประโยชน์ได้จริงในอนาคต คงยังต้องมีการวิจัยเพิ่มเติมในประเด็นที่สำคัญดังนี้

1. หากเปลือกผลของมังคุดสามารถใช้แทนไม้พะยอมได้จริง ควรศึกษาต่อถึงปริมาณน้อยสุดที่นำมาใช้แล้วยังคงทำให้น้ำตาลสดมีคุณภาพที่สอดคล้องกับมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน เช่น สี กลิ่น และรสชาติ ซึ่งควรเหมาะแก่การนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น เครื่องดื่มน้ำตาลสด น้ำตาลสดเข้มข้น หรือแม้แต่น้ำตาลก้อน เป็นต้น

2. ควรศึกษาการเตรียมเป็นสารสกัดผง และทดลองใช้จริงแทนการใช้พะยอมตามวิธีของภูมิปัญญาชาวบ้าน

## เอกสารอ้างอิง

- กวิดา เลิศกิจสมบุญ. (2548). **ผลของการใช้เมมเบรนและความร้อนต่อคุณภาพของน้ำตาลโตนด**. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- กี๊ เทรบุญ. (2527). ประเพณีและกลไกการทำงานของระบบการลิตทางการเกษตรของ  
สะทิงพระในปัจจุบัน. โครงการวิจัยระบบการผลิตทางการเกษตร. คณะ  
ทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- กรมส่งเสริมการเกษตร. (2544). **ตาลโตนดผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปแบบโรงผลิต**. กรม  
ส่งเสริมการเกษตร. กรุงเทพฯ.
- นวมกรณ์ ลำเลิศกุล. (2549). **จุลชีววิทยาทางอาหาร**. เชียงใหม่: พิกซ์การพิมพ์.
- ปราโมทย์ ธรรมรัตน์. (2521). **การศึกษายีสต์ในน้ำตาลสด น้ำตาลเมา และการคัดเลือก  
สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงเพื่อการหมักแอลกอฮอล์**. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร  
มหาบัณฑิต: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- มาลี สันทกุล, พูนสุข อรรถะสัมปณณะ. (2517). การศึกษาเรื่องการเก็บรักษาน้ำตาล  
มะพร้าว. *วารสารสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ*. 7: 1-9.
- เรณูกา แจ่มฟ้า. (2545). **การผลิตไซรัปจากน้ำตาลสด**. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร  
มหาบัณฑิต: มหาวิทยาลัยนเรศวร.
- วรารุณี โกยสมบัติ. (2536). **ศึกษาจุลินทรีย์ในน้ำตาลโตนดสด**. วิทยานิพนธ์ ภาควิชา  
อุตสาหกรรมเกษตร คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- สุภารัตน์ เตี้ยไพบูล. (2547). **ผลของการใช้ความดันสูงและความร้อนต่อคุณภาพของ  
น้ำตาลโตนด**. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต: มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- เสาวลักษณ์ จิตรบรรเจิดกุล (2532). ผลของวัตถุดิบเสียต่อคุณภาพผลิตภัณฑ์จากน้ำตาล  
โตนด. *วารสารสงขลาครินทร์*. 11: 161-165.
- สำนักงานบริหารพื้นที่อนุรักษ์ที่ 6 (สงขลา). (2559). **พันธุ์ไม้พระราชทานจังหวัดพัทลุง**.  
สืบค้นเมื่อวันที่ 1 กรกฎาคม 2559, จาก [http://paro6.dnp.go.th/paro6\\_dipterocarpacea.html](http://paro6.dnp.go.th/paro6_dipterocarpacea.html).
- Akiyama, A., Fuji, K., Yamasaki, O., Oono, T., Iwatsuki, K. (2001). Antibacterial  
action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. *Journal of  
Antimicrobial Chemotherapy*. 48: 487-491.
- Atputharajah, J.D., Widanapathirana, S., Samarajeewa, U. (1986).  
Microbiology and biochemistry of natural fermentation of palm sap.  
*Food Microbiology*. 3: 273-280.

- Broadhurst, R.B., Jones, W.T. (1978). Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 48(3): 788-794
- Butler, L.G., Price, M.L., Brotherton, J.E. (1982). Vanilin assay for proanthocyanidins (condensed tannins): modification of the solvent for estimation of the degree of polymerization. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*. 30: 1087-1089.
- Child, R. (1974). **Coconuts**. Longman group Ltd. London.
- Chitravadivu, C., Bhoopathi, M., Balakrishnan, V., Elavazhagan, T., Jayakumar, S. (2009). Antimicrobial activity of Laehiums prepared by herbal venders. *American-Eurasian of Scientific Research*. 4: 142-147.
- Chung, K.T., Wong, T.Y., Wei, C.I., Huang, Y.W., Lin, Y. (1998). Tannins and human health: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 38: 421-464.
- Dalzell, S.A., Kerven, G.L. (1998). A rapid method for the measurement of Leucaena spp. proanthocyanidins by the proanthocyanidin (butanol/HCl) assay. *Journal of The Science of Food Agricultural*. 78: 405-416.
- Faparusi, S.I., Bassir, O. (1971). Effect of extracts of the bark of *Saccoglottis gabonensis* on the microflora of palm wine. *Journal of Applied Microbiology*. 24: 853-856.
- Field, J.A., Kortekaas, S., Lettinga, G. (1989). The tannin theory of methanogenic toxicity. *Biological Wastes*. 29: 241-262.
- Fruit Warehouse. (2012). Mangosteen. สืบค้นเมื่อวันที่ 1 กรกฎาคม 2559, จาก <http://fruitwarehouse.blogspot.com/2012/02/mangosteen>.
- Fu, C., Loo, A.E.K., Chia, F.P.P., Huang, D. (2007). Oligomeric proantrocyanidins from mangosteen pericarps. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55(19): 7689-7694.
- Hagermann, A.E. (1987). Radial diffusion method for determining tannin in plant extracts. *Journal of Chemical Ecology*. 13: 437-499.
- Impert, O., Katafias, A., Kita, P., Mills, A. Pietkiewicz-Graczyk, A., Wrzeszcz, G. (2002). **Kinetics and mechanism of fast leuco-methylene blue**

oxidation by copper (II)-halide species in acidic aqueous media. *Dalton Trans.* pp. 348-353.

Jung, H.A., Su, B.N., Keller, W.J., Mehta, R.G., Kinghorn, A.D. (2006). Antioxidant xanthonenes from the pericarp of *Garcinia mangostana* (mangosteen). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54(6): 2077-2082.

Khanbabaee, K., Ree, T.V. (2001). Tannin: classification and definition. *Natural Product Report*. 18: 641-649.

Lababe, L., Cheynier, V., Broussard, F., Souquet, J-M., Moutounet, M. (1999). Quantitative fractionation of grape proanthocyanidins according to their degree of polymerization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47: 2719-2723.

Lasekan, O., Abbas, K.A. (2010). Flavor chemistry of palm toddy and palm juice: a review. *Trends in Food Science & Technology*. 21: 494-501.

Matthews, S., Mila, I., Scalbert, A., Pollet, B., Lapierre, C., Herve, D.P.C.L.M., Rolando, C., Donnelly, D.M.X. (1997). Method for estimation of proanthocyanidins based on their acid depolymerization in the presence of nucleophiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45: 1195-1201.

Moosophin, K., Wetthaisong, T., Seeratchakot, L.O., Kokluecha, W. (2010). Tannin extraction from mangosteen peel for protein precipitation in wine. *KKU Research Journal*. 15(5): 377-385.

Morikawa, T., Chaipech, S., Matsuda, H., Hamao, M., Umeda, Y., Sato, H., Tamura, H., Kon, H., Ninomiya, K., Yoshikawa, M., Pongpiriyadacha, Y., Hayakawa, T., Muraoka, O. (2012). Antidiabetogenic oligostilbenoids and 3-ethyl-4-phenyl-3,4-dihydroisocoumarins from the bark of *Shorea roxburghii*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 20: 832-840.

Okafor, N. (1972). Palm-wine yeasts from parts of Nigeria. *Journal of The Science of Food and Agriculture*. 23: 1399-1407.

Okfor, N. (1975). Preliminary microbiological studies on the preservative of palm wine. *Journal of Applied Bacteriology*. 38: 1-7.

- Patcharamun, W., Sichaem, J., Siripong, P., Khumkratok, S., Jong-A.J., Tip-P.S. (2011). A new dimeric resveratrol from the roots of *Shorea roxburghii*. *Fitoterapia*. 82: 489-492.
- Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30: 3875-3883.
- Schofield, P., Mbugua, D.M., Pell, A.N. (2001). Analysis of condensed tannin: a review. *Animal Feed Science and Technology*. 91: 21-40.
- Sharma, T.C., Sharma, A.K., Sharma, K.K., Payal, P., Sharma, M.C., Dobhal, M.P. (2014). Phytoconstituents: Isolation and Characterization from root bark of *Shorea robusta* plant. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*. 6(4): 991-995.
- Subramanian, R., Subbramaniyan, P., Raj, V. (2013). Antioxidant activity of the stem bark of *Shorea roxburghii* and its silver reducing power. *SpringerPlus*. 2(8): 1-11.
- Suksamrarn, S., Komutiban, O., Ratananukul, P., Chimnoi, N., Lartpornmatulee, N., Suksamrarn, A. (2006). Cytotoxic prenylated xanthenes from the young fruit of *Garcinia mangostana*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 54(3): 301-305.
- Tirawat, K., Chanthachum, S., Jitbunjerdkul, S., Pichitwarapanit, P. (1986). Study of the effect of preservative on the quality of sugar palm sap. A report on the improvement of palm sugar processing in Sathing Phra area, southern Thailand. A Thai-French Farming System Research Project. Pub. No. 5. Faculty of Natural Resources. Prince of Songkhla University.
- Waterman, P.G., Mole, S. (1994). **Analysis of phenolic plant metabolites**. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Wee, Y.C. (2003). **Tropical Trees and Shrubs: A Selection for Urban Planting**. USA. Sun Tree Publishing. pp 392.
- Woodroof, J.G. (1979). **Coconuts: Production processing product**. The AVI Publishing Company. Westport, Connecticut.

Zhou, H.C., Lin, Y.M., Wei, S.D. & Tam, N.F.Y. (2011). Structural diversity and antioxidant activity of condensed tannins fractionated from mangosteen pericarp. *Food Chemistry*. 129: 1710-1720.

