



บีตาเลน: การสกัดและการวิเคราะห์ Betalain: Extraction and Analysis

ทัตดาว ภาชีผล¹

บทคัดย่อ

บีตาเลนเป็นรงควัตถุให้สีที่พบตามธรรมชาติในพืชบางชนิด แบ่งเป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ คือ บีตาไซยานิน (betacyanin) ที่ให้สีแดงถึงม่วง และบีตาแซนทิน (betaxanthin) ที่ให้สีเหลืองส้ม โครงสร้างพื้นฐานของบีตาเลนเป็นอนุพันธ์อิมโมเนียมของกรดปีตาลามิกที่มี *cyclo-Dopa* และกรดอะมิโนหรือเอมีน บีตาเลนสกัดได้ด้วยตัวทำละลายหลายชนิด เช่น น้ำ อะซิโตน สารละลายเมทานอล และเอทานอล (20-80%) และอาจใช้ร่วมกับกรดเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการสกัด การทำให้สารสกัดบีตาเลนบริสุทธิ์ใช้ทั้งตัวดูดซับของแข็ง เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ และ/หรือเจลฟิลเตรชัน สำหรับการวัดปริมาณและบ่งบอกชนิดของบีตาเลน วิธีการทางสเปกโตรสโกปี ชนิดยูวี-วิสิเบิล (UV-visible spectroscopy) และโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography) เป็นวิธีการที่ใช้กันอย่างแพร่หลายทั้งในอุตสาหกรรมอาหารและการวิจัยทางวิทยาศาสตร์

ABSTRACT

Betalains are natural pigments found in certain plants. They can be divided into two major structural groups i.e. the red-violet betacyanins and the yellow-orange betaxanthins. The basic structure of betalain is immonium derivatives of betalamic acid with *cyclo-dopa* and amino acids or amines. Betalains can be extracted by various solvents such as water, acetone, methanol and ethanol mixture solution (20-80%). Extraction solvent in combination with acids has the potential to achieve complete extraction. Betalain purification has been carried out with solid phase extraction, ion-exchange and/or gel filtration chromatography. For the quantification and identification of unknown betalain, UV-visible spectroscopy and High Performance Liquid Chromatography are widely used in food industry and researches.

¹ ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม อ. กันทรวิชัย จ. มหาสารคาม 44150

E-mail: tatdao_dao@yahoo.com

คำสำคัญ: บีตาเลน บีตาไซยานิน บีตาแซนทิน รงควัตถุ

Keywords: Betalain, Betacyanin, Betaxanthin, Pigment

บทนำ

บีตาเลน (betalains) เป็นกลุ่มของรงควัตถุที่ให้สีแดงและเหลือง ละลายน้ำได้ดี พบเป็นครั้งแรกในบีทรูท (*Beta vulgaris* sp.) ปัจจุบันพบในพืชชนิดอื่น ๆ ในอันดับ *Caryophyllales* (ชื่อเดิม *Centrospermea*) จำนวน 13 สกุล เช่น *Aizoaceae*, *Basellacaceae*, *Cactaceae* *Amaranthaceae* และ *Phytolaccaceae* ทั้งในส่วนผล เช่น แก้วมังกร ผลผักปลังสุกและผลแคคตัส ในดอกไม้ เช่น เฟื่องฟ้า หงอนไก่ บานไม่รู้โรย ดอกแคคตัส และในผัก เช่น ผักโขมแดงและเห็ดในสกุลอะมานิต้า (*Amanita*) เป็นต้น (Strack et al., 2003; Stintzing and Carle, 2004) รงควัตถุประเภทนี้ได้รับความสนใจจากนักวิจัยมาเป็นเวลานาน มีการใช้เป็นสารให้สีในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องสำอางหลายชนิด นอกจากนี้บีตาเลนยังเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ช่วยต้านอนุมูลอิสระ ต้านไวรัส และแบคทีเรีย (Strack et al., 2003; Azeredo, 2009) ในงานวิจัยของ Cai et al. (2003) ได้รายงานประสิทธิภาพของบีตาเลนในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ดีกว่าสารคาเทชิน (catechin) และวิตามินซี และจากการที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระทำให้มีความสามารถยับยั้งการแบ่งเซลล์ของเนื้องอกหลายชนิด

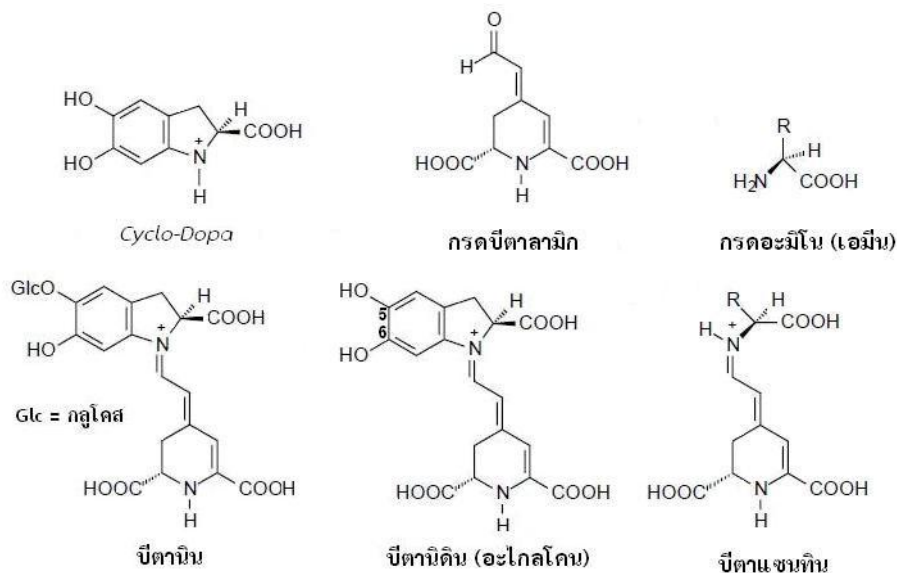
บีตาเลนมักพบในรูปของเกลือที่มีประจุบวกและลบในโมเลกุลเดียวกัน (zwitterions) อยู่ภายในแวคิวโอล ของเซลล์พืช (Stintzing and Carle, 2004) มีโครงสร้างพื้นฐานเป็นอนุพันธ์อิมโมเนียมของกรดบีตาลามิก (betalamic acid) แสดงดังรูปที่ 1 แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม (Strack et al., 2003) บีตาเลนกลุ่มแรก คือ บีตาไซยานิน (betacyanin) ที่ให้สีแดงถึงม่วง

ดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 535-540 nm มี 4 ชนิดที่พบบ่อย ได้แก่ บีตานิน (betanin-type) บูเจนวิลล์ลีน (bougainvillein-type) กอมพรีนิน (gomphrenin-type) และอะมารานทีน (amaranthin-type) บีตาเลนกลุ่มที่ 2 คือ บีตาแซนทิน (betaxanthin) ที่ให้สีเหลืองส้ม ดูดกลืนแสงช่วงความยาวคลื่น 475-480 nm ในธรรมชาติเท่าที่มีรายงาน พบบีตาเลนที่เป็นบีตาไซยานินประมาณ 50 ชนิดและเป็นบีตาแซนทินประมาณ 20 ชนิด (Cai et al., 2005) โดยบีตาเลนทั้งสีแดงและสีเหลืองมักเกิดขึ้นอยู่ร่วมกัน เหมือนที่พบแอนโทไซยานินอยู่ร่วมกับฟลาโวนอยด์ เช่น ในบีทรูทแดง พบบีตาไซยานินและบีตาแซนทิน 0.04-0.21% และ 0.02-0.14% ตามลำดับ แตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ (Nilsson, 1970)

บีตาไซยานิน มีโครงสร้างพื้นฐานประกอบด้วยกรดบีตาลามิกเชื่อมต่อกับ cyclo-3,4-dihydroxyphenyl alanine (cyclo-Dopa) ถ้าไม่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ เรียกว่า อะไกลโคโคน (aglycone) ซึ่งมักอยู่ในรูปของบีตานิดิน (betanidin) และไอโซบีตานิดิน (isobetanidin) เมื่อหมู่ไฮดรอกซิลในตำแหน่งที่ 5 หรือ 6 ของบีตานิดินถูกแทนที่ด้วยน้ำตาล (glycosylation) ที่แตกต่างกันได้บีตาไซยานินชนิดต่าง ๆ เช่น ถ้าน้ำตาลที่เกาะในตำแหน่งที่ 5 เป็นน้ำตาลกลูโคสได้บีตานิน (betanidin-5-O- β -glycoside) และไอโซบีตานิน (isobetanidin-5-O- β -glycoside) ซึ่งพบมากในบีทรูท (Stintzing and Carle, 2004) แต่ถ้าน้ำตาลกลูโคสเกาะในตำแหน่งที่ 6 ได้กอมพรีนิน I (betanidin-6-O- β -glucoside) ซึ่งพบมากในดอกบานไม่รู้โรย และถ้าน้ำตาลที่เกาะในตำแหน่งที่ 5 เป็น 2-กลูโคโรนิกแอซิด-กลูโคสไดอะมา

รานทิน ที่พบในผักโขม เป็นต้น ปีตาไซยานินยังอาจมีกรดเป็นองค์ประกอบ โดยเกิดเอซิเลชันกับหมู่ น้ำตาล เช่น celosianin I (4-coumaroyl amaranthin) ที่พบใน *Chenopodium rubrum* และ *Lampranthus sociorum* และ phyllocactin (6-O malonyl-betanin) ที่พบในแคคตัส (Strack et al., 2003) และผลของการเกิดไกลโคซิเลชัน ทำให้เกิดค่าความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงสูงสุด (maximum absorption wavelength; $\lambda_{\max}$) ลดต่ำลงประมาณ 6 nm ส่วนการเกิดเอซิเลชันด้วยกรดไฮดรอกซีซินนามิก

(hydroxycinnamic acids) เช่น กรดเฟอร์ริก (ferulic acid) และกรดพารา-คูมาริก (*para*-coumaric acid) ทำให้พบค่า $\lambda_{\max}$ เพิ่มขึ้นอีก 1 ค่า ในช่วง 300-330 nm (Stintzing and Carle, 2004) นอกเหนือจากที่พบในช่วงความยาวคลื่น 270-280 nm และ 535-538 nm (Azeredo, 2009) แต่ถ้าเกิดเอซิเลชันด้วยกรดอะลิฟาติก เช่น กรดมาโลนิก (malonic acid) และกรด 3-ไฮดรอกซี-3-เมทิลกลูตาริก (3-hydroxy-3-methylglutaric acid) ซึ่งไม่มีผลต่อค่าสเปกตรัม



รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของรงควัตถุให้สีในกลุ่มบีตาเลนและโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบ

สำหรับบีตาแซนทินมีโครงสร้างโมเลกุลคล้ายกับปีตาไซยานิน แตกต่างตรงหมู่อินโดลของกรดปีตาลามิกที่มีปฏิกิริยาการควบแน่น (condensation) ด้วยเอมีนหรือกรดอะมิโนมากกว่า 200 ชนิด ทำให้มีโครงสร้างที่หลากหลาย (Delgado-Vargas et al., 2000) เช่น อินดิคาแซนทิน (indicaxanthin) มีกรดอะมิโนโพรลีน พบมากในแคคตัส และวัลกาแซนทิน I และ II (vulgaxanthin I and II) มีกรดอะมิโนกลูตามีนหรือกรดกลูตามิก ตามลำดับ พบมากในบีทรูท

ในการวิเคราะห์บีตาเลนเชิงปริมาณและคุณภาพ ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลัก ได้แก่ การสกัด การทำให้บริสุทธิ์/การแยกองค์ประกอบ และการวิเคราะห์ ดังมีรายละเอียดต่อไปนี้

การสกัดบีตาเลน

การสกัด (extraction) เป็นขั้นตอนแรกของการวิเคราะห์ปริมาณบีตาเลนทั้งหมดและบีตาเลนแต่ละชนิด วิธีการสกัดที่ดีควรสกัดเอาบีตาเลนออกมาจาก

เซลล์ของพืชได้ในปริมาณสูงสุด โดยเกิดการเปลี่ยนแปลงของบีตาเลนและการปนเปื้อนของสารอื่นน้อยที่สุด และต้องเป็นวิธีการที่ไม่ซับซ้อน ไม่อันตราย มีค่าใช้จ่ายต่ำหรือใช้เวลาสกัดไม่นาน โดยทั่วไปเริ่มจากนำพืชมาบดหรือปั่นให้มีขนาดเล็กลง แล้วนำไปสกัดด้วยตัวทำละลาย ซึ่งใช้ได้หลายชนิดขึ้นอยู่กับจุดประสงค์ของการสกัด ดังแสดงในตารางที่ 1 ทั้งนี้ เมทานอลเป็นตัวทำละลายที่นิยมมากที่สุด เนื่องจากสกัดปริมาณบีตาเลนได้มากกว่าการใช้ น้ำและช่วยแยกโปรตีนที่ละลายน้ำได้ออกได้ดี สารสกัดที่ได้จึงมีความบริสุทธิ์มากขึ้น สำหรับเมทานอลและน้ำมีความเหมาะสมสำหรับการนำสารสกัดมาใช้ในการอาหาร การเติมเมทานอลช่วยลดความหนืดจากมิวซิเลจและช่วยตกตะกอนเพคติน ออกจากสารสกัด (Stintzing et al., 2002; Herbatch et al., 2006) ส่วนการสกัดบีตาเลนด้วยน้ำ ทำได้ทั้งน้ำเย็นหรือน้ำที่อุณหภูมิห้อง จัดเป็นวิธีที่ง่าย มีประสิทธิภาพสูงและมีต้นทุนต่ำ (Cai et al., 2005)

การสกัดด้วยตัวทำละลายร่วมกับกรด เช่น กรดไฮโดรคลอริก กรดแอสคอร์บิก และกรดซิตริก นับเป็นแนวทางหนึ่งที่มีความนิยม เนื่องจากช่วยรักษาเสถียรภาพของบีตาเลน โดยป้องกันปฏิกิริยาออกซิเดชันจากเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส (Strack et al., 2003) อย่างไรก็ตาม กรดอาจทำให้พันธะในโมเลกุลของแอซิด-อะซิเลตเทต บีตาไซยานิน (acid-acylated betacyanin) เกิดการสลายได้ (Strack et al., 1993) ดังนั้นการสกัดจึงควรใช้กรดอ่อนหรือใช้กรดในปริมาณเล็กน้อย

นอกจากชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด ปริมาณของบีตาเลนที่สกัดได้ยังขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น อัตราส่วนของวัตถุดิบต่อตัวทำละลายที่ใช้

สกัด เวลาในการสกัด วิธีที่ใช้สกัดและวิธีการปฏิบัติเบื้องต้นในการสกัด เป็นต้น Pourrat et al. (1988) นำสารสกัดจากบีทรูทมาหมักในสภาวะที่มีออกซิเจนด้วยเชื้อ *Aspergillus niger* และ *Saccharomyces cerevisiae* เพื่อลดปริมาณน้ำตาลอิสระ ซึ่งทำให้บีตาไซยานินที่สกัดได้มีปริมาณเพิ่มขึ้น Delgado-Vargas et al. (2000) รายงานว่า การให้ความร้อนเบื้องต้นแก่สารสกัดจากพืชที่ 70 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที ก่อนนำมาสกัด ลดการสลายตัวของบีตาเลนจากกิจกรรมของเอนไซม์บีตา-กลูโคซิเดส เพอร์ออกซิเดส และพอลิฟีนอลออกซิเดสในเนื้อเยื่อพืช แม้ว่าอาจทำให้บีตาเลนบางส่วนถูกทำลายไปจากความร้อน นอกจากนี้ มีงานวิจัยที่ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดบีตาเลนจากพืชโดยใช้สนามไฟฟ้าแรงสูงแบบเป็นจังหวะ (pulsed electric field) (Fincan et al., 2004) การใช้อัลตราซาวด์ร่วมกับความร้อนที่ 45 องศาเซลเซียส (Guesmi et al., 2012) หรือการฉายรังสีแกมมาก่อนการสกัด (Nayak et al., 2006) ซึ่งทั้งสามวิธีนี้มีผลเพิ่มขนาดและจำนวนของรูพรุนในชั้นเซลล์เมมเบรนของพืช จึงสามารถเพิ่มความสามารถการซึมผ่านของตัวทำละลายเข้าไปถึงภายในเซลล์พืชได้ และทำให้บีตาเลนสกัดออกมาได้ดีขึ้น (Azeredo, 2009)

การทำให้บริสุทธิ์ และการแยกองค์ประกอบ

เมื่อสกัดบีตาเลนออกจากวัตถุดิบแล้ว สารสกัดหยาบที่ได้ นำมาทำการแยกให้ได้บีตาเลน และทำให้บริสุทธิ์เพื่อกำจัดสิ่งรบกวนอื่น จากนั้นนำบีตาเลนที่แยกได้ไปวิเคราะห์เอกลักษณ์หรือศึกษาโครงสร้างต่อไป อย่างไรก็ตาม ถ้าสารอื่น ๆ ที่ปนเปื้อนในสารละลายไม่ได้มีผลรบกวนการวิเคราะห์ ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ก็ไม่จำเป็นแต่อย่างใด

ตารางที่ 1 ตัวอย่างการสกัดปีตาเลนจากพืชชนิดต่าง ๆ และการทำให้บริสุทธิ์

ตัวสกัด	การทำให้บริสุทธิ์	ชนิดพืช	อ้างอิง
50% MeOH	Sephadex LH-20	<i>Phytolacca americana</i> L.	Schliemann et al., 1996
น้ำ 80 องศาเซลเซียส 5 นาที	Sephadex G-25 และ G-50	<i>Amaranthus</i> species	Cai et al., 1998
80% MeOH ที่มี 50 mM แอสคอร์เบต	-	<i>Beta vulgaris</i> L.	Schliemann et al., 1999
		<i>Schlumbergera x buckleyi</i>	Kobayashi et al., 2000
80% MeOH	Sephadex LH-20-100	<i>Amaranthus</i> species	Cai et al., 2001
น้ำ และเติม 96% EtOH ลงในน้ำสกัด 2:1	C18- RP cartridge	<i>Hylocereus polyrhizus</i>	Stintzing et al. 2002
น้ำ 100% EtOH และ 60% EtOH	-	<i>Opuntia ficus-indica</i> L.	Fernandez-López et al., 2002
96% EtOH ต่อน้ำสกัด 2:1	Amberlite XAD-16HP resin	<i>Opuntia ficus-indica</i>	Moßhammer et al., 2005
		<i>Hylocereus polyrhizus</i>	
10 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 6) ที่มี 10 mM แอสคอร์บิก	-	<i>Portulaca grandiflora</i>	Gandia-Herrero et al., 2005
		<i>Lampranthus productus</i>	
80% MeOH	DEAE-Sephadex A25 C18 cartridge	<i>Hylocereus</i> species	Wybraniec et al., 2007
น้ำที่มี 0.2% ซิตริก/0.15% แอสคอร์บิก หรือ 20% EtOH ที่มี 0.5% แอสคอร์บิก	-	<i>Beta vulgaris</i>	Sturzoiu et al., 2011
50% MeOH	C18 cartridge	<i>Myrtillocactus geometrizans</i>	Herrera-Hernández et al., 2011
70% MeOH ร่วมกับการโซนิเคต 5 นาที	-	<i>Opuntia macrorhiza</i>	Moussa-Ayoub et al. 2011
70% อะซิโตน ตามด้วยคลอโรฟอร์ม	C18 cartridge	<i>Opuntia joconostle</i>	Osorio-Esquivel et al., 2011
น้ำที่มี 1% HCl และใช้อัลตราซาวด์ ที่ 45 องศาเซลเซียส	-	<i>Opuntia ficus-indica</i> s	Guesmi et al., 2012
50% EtOH	-	<i>Beta vulgaris</i>	Ravichandran et al., 2013
80% MeOH	Sephadex LH-20	<i>Amaranthus tricolor</i> L.	Biswas et al., 2013

หมายเหตุ: MeOH = เมทานอล; EtOH = เอทานอล

การทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (ion-exchange chromatography) นิยมใช้คู่กันกับเทคนิคเจลฟิเตรชันโครมาโทกราฟี (gel filtration chromatography) โดยการผ่านสารละลายตัวอย่างไปบนคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุหรืออาจเติมเรซินลงไปในส่วนสกัดที่ต้องการทำให้บริสุทธิ์โดยตรง (Delgado-Vargas et

al., 2000) ชนิดของเรซินทางการค้าที่เป็นนิยม เช่น Dowex 50W-X2, Dowex 1X8, DEAE-Sephadex A25 ซึ่งปีตาเลนดูดซับกับเรซิน สารกลุ่มอื่นที่ไม่ต้องการจะไหลผ่านออกไปจากคอลัมน์พร้อมกับสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.1% หรือกรดฟอร์มิก (Strack et al., 2003) จากนั้นชะเอาปีตาเลนออกด้วยน้ำ สารละลายที่แยกได้นำมาผ่านคอลัมน์โครมาโท-

กราฟที่มีเจลดูดซับชนิดต่าง ๆ เช่น พอลิเอไมด์ พอลิไวนิลไพโรลิโดน เจลชนิดเซฟาเดกซ์ G-25 หรือ G-50 และใช้น้ำที่ปรับค่าพีเอชให้ได้ 5-6 ด้วยกรดฟอร์มิกเป็นตัวชะ (Cai et al., 1998) หรือใช้เจลชนิดเซฟาเดกซ์ LH-20 ที่มีการปรับสภาพด้วยน้ำบริสุทธิ์ โดยมี 100% เมทานอล เป็นตัวชะแยกเอาสารประกอบฟีนอลิก ออกจากสารสกัด จากนั้นชะแยกเอาบีตาเลนออกมาด้วยน้ำ (Herbatch et al., 2006)

การทำให้บริสุทธิ์และแยกองค์ประกอบของบีตาเลนด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี อาจใช้คอลัมน์หรือตลับ (cartridge) ขนาดเล็กที่บรรจุตัวดูดซับของแข็งไว้ภายใน ซึ่งนิยมใช้ซิลิกา C18 ชนิดรีเวอร์สเฟส (reversed phase) ที่มีขนาดอนุภาค 10 ไมครอน โดยควรปรับสภาพคอลัมน์ด้วย 100% เมทานอล ตามด้วยน้ำที่มีค่าพีเอช 3 สำหรับสารสกัดตัวอย่างที่นำมาแยกต้องปรับสภาพให้เป็นกรด ($\text{pH} = 3$) ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 0.1 N หรือกรดไตรฟลูออโรแอซิดิก ซึ่งเมื่อนำไปแยกผ่านคอลัมน์ บีตาเลนถูกดูดซับกับตัวดูดซับ ในขณะที่องค์ประกอบอื่นๆ ที่ไม่เป็นที่ต้องการจะถูกชะออกจากคอลัมน์ไปพร้อมกับตัวชะที่เป็นน้ำที่มีค่าพีเอช 3 จากนั้นชะแยกเอาบีตาเลนออก โดยถ้าต้องการบีตาเลนกลุ่มบีตาไซยานินให้ใช้เมทานอลหรือเอทานอลผสมกับน้ำที่มีสภาพเป็นกรด ($\text{pH} = 2$ ถึง 3) ในอัตราส่วน 95 ต่อ 5 เป็นตัวชะและถ้าต้องการแยกเอากลุ่มบีตาแซนทินให้ชะด้วย 100% เมทานอล (Stintzing et al., 2002; Wybraniec et al., 2007)

ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin Layer Chromatography; TLC) เป็นวิธีหนึ่งที่ใช้แยกองค์ประกอบแต่ละชนิดของบีตาเลนได้ แม้ว่าไม่เป็นที่นิยมนัก เพราะมีค่า R_f ต่ำและใช้เวลานาน อย่างไรก็ตาม Bilyk (1981) ศึกษาการแยกบีตาเลนจากบิทรูทบนแผ่น TLC ชนิดเซลลูโลส โดยได้แยกบีตาเลนครั้งที่ 1 และ 2 ด้วยสารละลายผสมของไอโซโพรพานอล-

เอทานอล-น้ำ-แอซิดิกในอัตราส่วน 55:20:20:5 (v/v) และ 30:35:30:5 (v/v) ตามลำดับ ซึ่งการเติมกรดผสมลงไปในเฟสเคลื่อนที่ด้วยทำให้การเคลื่อนที่ของบีตาไซยานินเกิดได้ดีขึ้น ส่วนการแยกบีตาแซนทินเกิดขึ้นได้ดีเมื่อใช้แผ่น TLC ชนิด diethylaminoethyl cellulose และใช้สารละลายผสมของไอโซโพรพานอล-น้ำ-แอซิดิกในอัตราส่วน 72:22:6 (v/v) เป็นเฟสเคลื่อนที่ (Strack et al., 1993)

การวิเคราะห์บีตาเลน

วิธีและเครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์บีตาเลน มีทั้งวิธีการทางสเปกโทรสโกปี (spectroscopy) โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography; HPLC) แมสสเปกโตรเมตรี (mass spectrometry; MS) และนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (nuclear magnetic resonance; NMR) (Cai et al., 2005; Azeredo, 2009)

การวิเคราะห์บีตาเลนโดยใช้วิธีสเปกโทรสโกปี

ปัจจุบันวิธีทางสเปกโทรสโกปี เป็นวิธีการวัดปริมาณบีตาเลนที่ได้รับความนิยมมาก และเป็นทางเลือกหนึ่งเมื่อไม่มีเครื่อง HPLC หลักการของเทคนิคนี้ คือ การนำสารสกัดไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่นในช่วงวิสิเบิล ซึ่งบีตาไซยานินและบีตาแซนทินดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่นแตกต่างกัน คือ 540 และ 480 nm ตามลำดับ ค่าในช่วงดังกล่าวมีความใกล้เคียงกับแอนโทไซยานินที่สามารถดูดกลืนได้ในช่วง 490-550 nm แต่โดยทั่วไปแอนโทไซยานินและบีตาเลน ไม่เกิดขึ้นด้วยกันในธรรมชาติ ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้นำไปคำนวณตาม Beer-Lambert's Law และรายงานความเข้มข้นของบีตาไซยานินและบีตาแซนทิน หรืออาจรายงานเป็นปริมาณบีตาเลนทั้งหมด (total betalain content)

เครื่อง HPLC และแคปิลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส แต่ปริมาณบีตาเลนที่วัดจากเครื่อง HPLC อาจมีความแตกต่างมากจากค่าที่วิเคราะห์ด้วยวิธีการทางสเปกโทรสโกปี

คอลัมน์ที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์ ได้แก่ คอลัมน์ C8 และ C18 ที่อนุภาคบรรจุเป็นซิลิกาขนาด 3-10 ไมครอน ตัวทำละลายที่พาสารเข้าไปในคอลัมน์มีหลายชนิด เช่น น้ำ เมทานอล แอซีโตนไนไตรท์ (acetonitrile) ทั้งนี้อาจเติมกรดบางชนิดลงไปด้วย โดยนิยมแยกแบบเกรเดียนต์ ตัวตรวจวัดสัญญาณที่นิยมใช้ ได้แก่ Diode array ที่ความยาวคลื่น 535-540 nm สำหรับบีตาไฮยานิน และ 475-484 nm สำหรับบีตาแซนทิน แสดงในตารางที่ 3 ทั้งนี้เทคนิค reversed

phase-HPLC ใช้แยกองค์ประกอบของบีตาเลนตามความมีขั้วจากมากไปน้อย ซึ่งโดยทั่วไปบีตาแซนทินถูกออกมาก่อนบีตาไฮยานิน (Fernandez-Lopez et al., 2002) และยังแยกตามสเตอริโอเคมี ซึ่ง Pourrat et al. (1988) รายงานการเคลื่อนที่ของบีตาไฮยานินของสารสกัดปืทรูที่ผ่านการหมักตามลำดับดังนี้ บีตานิน (betanin) ไอโซบีตานิน (isobetanin) บีตานิดิน (betanidin) ไอโซบีตานิดิน (isobetanidin) และพรีบีตานิน (prebetanin; betanin-6'-O-sulphate) สอดคล้องกับ Ravichandran et al. (2013) ส่วนบีตาแซนทินมีลำดับการเคลื่อนที่เป็นอัลกาแซนทิน I และ II (vulgaxanthin I and II)

ตารางที่ 2 ค่าแอมพลิจูดดูดกลืน โมลาร์แอมพลิจูดดูดกลืนและมวลโมเลกุลของบีตาเลนชนิดต่าง ๆ

ชนิดบีตาเลน	A ^{1%}	ϵ (L/mol cm)	มวลโมเลกุล (g/mol)	ความยาวคลื่น (nm)	อ้างอิง
บีตาไฮยานิน	1120	-	-	535	Fernandez-Lopez and Almela, 2001
	-	65,000	-	536	Gandia-Herrero et al., 2005
บีตานิน	-	60,000	550	538	Stintzing et al., 2003
	1120	61,600	550	536	Cai et al., 2005
กอมพรีนิน I	920	50,600	550	540	Cai et al., 2005
อะมารานทีน	779	56,600	726.6	536	Cai et al., 2005
บีตาแซนทิน	-	48,000	-	480	Gandia-Herrero et al., 2005
	650	-	-	480	Fernandez-Lopez and Almela, 2001
อินดิคาแซนทิน	-	48,000	308	480	Stintzing et al., 2003
อัลกาแซนทิน	750	-	-	476	Von Elbe, 2005

ในการวิเคราะห์ว่าบีตาไฮยานินชนิดนั้นเป็นชนิดใด อาจใช้เทคนิคการย่อยด้วยกรด (acid hydrolysis) เอนไซม์ (enzyme-catalyzed hydrolysis) และด่าง (alkaline hydrolysis) การย่อยด้วยกรด ทำได้โดยเติม 2 N HCl ลงไปในสารสกัดพร้อมกับให้ความร้อนในอ่างน้ำเดือด (100 องศาเซลเซียส) นาน 1 ชั่วโมง (Wybraniec et al., 2007) ถ้าย่อยด้วยกรดแก่ กรดแก่สามารถตัดพันธะไกลโคซิดิก

ในโมเลกุลของบีตานินได้โมเลกุลของน้ำตาลและสารผสมของบีตานิดินที่เป็นอะไกลโคโคนและไอโซบีตานิดินที่เป็นอีพิเมอร์ของบีตานิดิน ถ้าใช้กรดอ่อนทำให้ได้บีตานิดินชนิดเดียว และถ้ามีระยะเวลาในระหว่างการย่อยด้วยกรดนาน ทำให้เกิดการแตกตัวของบีตานินไปเป็นกรดปีตาลามิกและ cyclo-DOPA 5-O-glycoside (Delgado-Vargas et al., 2000) สำหรับการย่อยด้วยเอนไซม์ ทำได้โดยเติมเอนไซม์บีตา-กลูคูโรนิเดส (β -

glucuronidase) ที่พีเอช 5 ลงไปในสารสกัดและบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที ซึ่งทำให้ปีตา-ไฮยานินแตกตัวอยู่ในรูปอะไคโคน ดังผลการศึกษาของ Cai et al. (1998) ที่รายงานลำดับการเคลื่อนที่

ของสารสกัดจากผักโขมที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เป็นอะมารานทีน ไอโซอะมารานทีน ปีตานิน และไอโซปีตานิน

ตารางที่ 3 ตัวอย่างสภาวะการวิเคราะห์ปีตาเลนด้วยเทคนิค HPLC-Diode array

ชนิดคอลัมน์	เฟสเคลื่อนที่	ความยาวคลื่น (nm)	ชนิดพืช	อ้างอิง
Nucleosil C18 (250×4 mm, 5 μ m)	A: 1.5% ortho-phosphoric acid ในน้ำ; B: 80% ACN	475 (ปีตาแซนทิน) 540 (ปีตาไฮยานิน)	<i>Beta vulgaris</i> L.	Schliemann et al., 1999
Nucleosil C18 (250×4 mm, 5 μ m)	A: 1.5% phosphoric acid; B: ACN	475, 540	<i>Schlumbergera x buckleyi</i>	Kobayashi et al., 2000
Kromasil 100 C-18 (250×4.6 mm, 5 μ m)	A: 1% acetic acid ในน้ำ; B: 1% ACN ในน้ำ	484 (อินดิกาแซนทิน); 535 (ปีตานิน)	<i>Opuntia ficus-indica</i>	Fernandez-Lopez and Almela, 2001
Nucleosil 100 C18 (250×4 mm, 5 μ m)	A: 1.5% phosphoric acid; B: 1.5% phosphoric acid, 20% acetic acid, 25% ACN ในน้ำ	540 (ปีตาไฮยานิน)	<i>Amaranthus species</i>	Cai et al., 2001, 2005
Atlantis dC18 (250 × 4.6 mm, 5 μ m)	A: 175 mM acetic acid ในน้ำ; B: 175 mM acetic acid ใน ACN	470 (ปีตาแซนทิน)	<i>Opuntia ficus-indica</i> L.	Fernandez-López et al., 2002
LUNA C18-RP (250×3 mm, 5 μ m)	A: 0.2% formic acid ในน้ำ; B: 80% ACN ในน้ำ	475 (ปีตาแซนทิน) 538 (ปีตาไฮยานิน)	<i>Hylocereus polyrhizus</i>	Stintzing et al., 2002, 2003
LUNA C18-RP (250×3 mm, 5 μ m)	A: 0.2% TFA + 10% formic acid (65:35 v/v); B: ACN + 10% formic acid (80:20 v/v)	470 (ปีตาแซนทิน) 538 (ปีตาไฮยานิน)	<i>Opuntia ficus-indica</i> L.	Stintzing et al., 2003
Kromasil 100 C-18 (250×4.6 mm, 5 μ m)	A: น้ำ+0.05% TFA; B: ACN + 0.05% TFA		<i>Portulaca grandiflora</i>	Gandia-Herrero et al., 2005
LUNA C18-RP (250×3 mm, 5 μ m)	A: 5% formic acid; B: ACN	538 (ปีตาไฮยานิน)	<i>Hylocereus polyrhizus</i>	Herbach et al., 2006
Synergi Hydro-RP (250×3 mm, 4 μ m)	A: ACN; B: 2% formic acid ในน้ำ	538	<i>Hylocereus spp.</i>	Wybraniec et al., 2007
Symmetry C18 (150 × 4.6 mm, 3.5 μ m)	A: 0.2% formic acid ในน้ำ; B: 80% ACN	538 (ปีตาไฮยานิน) 475 (ปีตาแซนทิน)	<i>Opuntia joconostle</i>	Osorio-Esquivel et al., 2011
Fluofix IEW 425 (250 × 4.6 mm, 5 μ m)	A: น้ำ+acetic acid+ACN (98.5:0.5:1.0 v/v/v); B: ACN	535 (ปีตาไฮยานิน)	<i>Opuntia macrorhiza</i>	Moussa-Ayoub et al., 2011
Kromasil C8 (150 × 4.6 mm, 5 μ m)	A: น้ำ+0.05% TFA; B: MeOH+0.05% TFA	538 (ปีตานิน) 475 (อินดิกาแซนทิน)	<i>Opuntia ficus-indica</i>	Guesmi et al., 2012
Lichrocart RP-18 (250×4 mm, 5 μ m)	A: 0.2% formic acid ในน้ำ; B: ACN	476, 538	<i>Beta vulgaris</i>	Ravichandran et al., 2013

หมายเหตุ: ACN = แอซีโตนไทรล์; TFA = กรดไตรฟลูออโรแอซีติก

การย่อยด้วยด่าง ใช้ในการวิเคราะห์อะซิ-เลตเตต ปีตาไฮยานิน โดยเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์

ความเข้มข้น 2 N ใน 50% เมทานอล ลงไปในสารสกัด ตั้งทิ้งไว้ภายใต้สุญญากาศที่อุณหภูมิห้องนาน 3 ชั่วโมง

จากนั้นเติม 2 N HCl เพื่อปรับให้พีเอชได้ 2.8-3.5 ก่อนทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ที่มีเจลดูดซับ แล้วนำไปวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง HPLC (Cai et al., 2001) ส่วนต่างทำให้โมเลกุลของบีตานินแตกตัวออกไปเหลือโครงสร้างที่เป็นคาร์บอน ถ้าใช้ต่างอ่อน ทำให้บีตานินบางส่วนเกิดอิพิเมอร์เชชันตรงตำแหน่งคาร์บอนที่ 15 ได้สารผสมที่มีอัตราส่วนของบีตานินและไอโซบีตานินเป็น 3 ต่อ 2 หรือถ้ามีไอโซบีตานินเป็นสารตั้งต้นได้สารผสมที่มีบีตานินและไอโซบีตานินในอัตราส่วน 2 ต่อ 3 สำหรับกรดที่แยกจากบีตานินในการย่อยด้วยต่าง สามารถนำไปวิเคราะห์หาชนิดได้ด้วยเครื่อง HPLC (Delgado-Vargas et al., 2000)

การวิเคราะห์บีตาแซนทิน มีวิธีคล้ายกับการวิเคราะห์กรดอะมิโน การใช้กรดไฮโดรคลอริก 1 N หรือ แอมโมเนีย 0.6 N ทำให้บีตาแซนทินแตกตัวเป็นกรดปีตาลามิกและกรดอะมิโนอิสระ (Piatelli, 1981) ในทางตรงกันข้าม การสังเคราะห์บีตาแซนทิน สามารถเกิดขึ้นได้จากการทำปฏิกิริยาของบีตานินในสารละลายแอมโมเนียในสถานะที่มีกรดอะมิโนจำนวนมากเกินพอ เช่น การผสมบีตานินในสารละลายแอมโมเนีย 0.6 N ที่มีกรดกลูตามิก 10 M ทำให้เกิดวัลกาแซนทิน II ขึ้นได้ (Trezza and Zryd, 1991)

การเชื่อมต่อเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลว (LC) กับเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ (MS) ช่วยวิเคราะห์ชนิดและโครงสร้างของบีตาเลนโดยการตรวจสอบมวลโมเลกุล (Strack et al., 2003) โดย Kobayashi et al. (2000) ใช้ LC-MS วิเคราะห์ชนิดบีตาเลนในกลีบดอกแคคตัส Cai et al. (2005) และ Biswas et al. (2013) ใช้วิเคราะห์ชนิดบีตาเลนในพืชสกุล *Amaranthaceae* ส่วน Stintzing et al. (2002) และ Osorio-Esquivel et al. (2011) ใช้วิเคราะห์ชนิดบีตาไซยานินใน *Hylocereus polyrhizus* (Weber) Britton & Rose และ *Opuntia joconostle* ตามลำดับ

บทสรุป

บีตาเลนเป็นรงควัตถุที่พบในพืชอันดับ *Caryophyllales* โดยเป็นอนุพันธ์อิมโมเนียมของกรดปีตาลามิก บีตาเลนแบ่งเป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ คือ บีตาไซยานินที่ให้สีแดงถึงม่วง และบีตาแซนทินที่ให้สีเหลืองส้ม การสกัดบีตาเลน ทำได้ด้วยตัวทำละลาย เช่น น้ำ สารละลายเมทานอล และเอทานอลความเข้มข้น 20-80% และทำให้สารสกัดบริสุทธิ์ด้วยตัวดูดซับของแข็ง เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ และ/หรือแบบเจลฟิลเตรชัน การวิเคราะห์ปริมาณบีตาเลนทั้งหมด นิยมใช้เครื่องอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิลสเปกโตรมิเตอร์ ส่วนการวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง HPLC เป็นการวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของบีตาเลน

เอกสารอ้างอิง

- Azerdo, H.M.C. (2009). Betalains: properties, sources, applications, and stability – a review. *Inter J of Food Sci and Tech*. 44(12): 2365-2376.
- Bilyk, A. (1981). Thin layer chromatographic separation of beet pigments. *J Food Sci*. 46(1): 298-299.
- Biswas, M., Dey, S. and Sen, R. (2013). Betalains from *Amaranthus tricolor* L. *J Pharm Phytochem*. 1(5): 87-95.
- Cai, Y.Z., Sun, M., and Corke, H. (2001). Identification and distribution of simple and acylated betacyanin pigments in the *Amaranthaceae*. *J Agric Food Chem*. 49(4): 1971-1978.
- Cai, Y.Z., Sun, M. and Corke, H. (2003). Antioxidant activity of betalains from plants in the *Amaranthaceae*. *J Agric Food Chem*. 51(8): 2288-2294.
- Cai, Y.Z., Sun, M. and Corke, H. (2005). Characterization and application of betalain pigments from

- plants of the Amaranthaceae. Trends in Food Sci Tech. 16(9): 370–376.
- Cai, Y.Z., Sun, M., Wu, H.X., Huang, R.H. and Corke, H. (1998). Characterization and quantification of betacyanin pigments from diverse *Amaranthus* species. J Agric Food Chem. 46(6): 2063–2070.
- Delgado-Vargas, F., Jiménez A.R. and Paredes-López, O. (2000). Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains--characteristics, biosynthesis, processing, and stability. Crit Rev Food Sci Nutr. 40(3): 173-289.
- Fernandez-López, J.A. and Almela, L. (2001). Application of high-performance liquid chromatography to the characterization of the betalain pigments in prickly pears fruits. J Chromato A. 913(1-2): 415-420.
- Fernandez-López, J.A., Castellar, R., Obón, J.M. and Almela, L. (2002). Screening and mass-spectral confirmation of betalains in cactus pears. Chromatographia 56(9-10): 591-595.
- Fincan, M., De Vito, F. and Dejmek, P. (2004). Pulsed electric field treatment for solid-liquid extraction of red beetroot pigment. J Food Eng. 64(3): 381–388.
- Gandia-Herrero, F., Escribano, J., and García-Carmona, F. (2005). Betaxanthins as pigment responsible for visible fluorescence in flowers. Planta 222(4): 586–593.
- Guesmi, A., Ladhari, N., Ben Hamadi, N. and Sakli, F. (2012). Isolation, identification and dyeing studies of betanin on modified acrylic fabrics. Ind Crop Prod. 37(1): 342-346.
- Herrera-Hernández, M.G., Guevara-Lara, F., Reynoso-Camacho, R. and Guzmán-Maldonado, S.H. (2011). Effects of maturity stage and storage on cactus berry (*Myrtillocactus geometrizans*) phenolics, vitamin C, betalains and their antioxidant properties. Food Chem. 129(4): 1744-1750.
- Herbach, K.M., Stintzing, F.C., Elss, S., Preston, C., Schreier, P. and Carle, R. (2006). Isotope ratio mass spectrometrical analysis of betanin and isobetanin isolates for authenticity evaluation of purple pitaya-based products. Food Chem. 99(1): 204-209.
- Kobayashi, N., Schmidt, J., Nimtz, M., Wray, V. and Schliemann, W. (2000). Betalains from *Christmas cactus*. Phytochem. 54: 419-426.
- Lee, C.H., Wettasinghe, M., Bolling, B.W., Ji, L.L. and Parkin, K.L. (2005). Betalains, phase II enzyme-inducing components from red beetroot (*Beta vulgaris* L.) extracts. Nutr Cancer. 53(1): 91–103.
- Moßhammer, M.R., Stintzing, F.C. and Carle, R. (2005). Colour studies on fruit juice blends from *Opuntia* and *Hylocereus* cacti and betalain-containing model solutions derived therefrom. Food Res Inter. 38(8-9): 975–981.
- Moussa-Ayoub T.E., El-Samahy, S.K., Rohn, S. and Kroh, L.W. (2011). Flavonols, betacyanins content and antioxidant activity of cactus *Opuntia macrorhiza* fruits. Food Res Int. 44(7): 2169-2174.
- Nayak, C.A., Chethana, S., Rastogi, N.K. and Raghavarao, K. (2006). Enhanced mass transfer during solid-liquid extraction of gamma-irradiated red beetroot. Rad Phys Chem. 75(1): 173-178.
- Nilsson, T. 1970. Studies into the pigments in beetroot (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris* var. *rubra* L.). Lantbrukshogskolans Annaler 36: 179–219
- Osorio-Esquivel, O., Ortiz-Moreno, A., Álvarez, V.B., Dorantes-Álvarez, L. and Giusti, M.M. (2011). Phenolics, betacyanins and antioxidant

- activity in *Opuntia joconostle* fruits. Food Res Inter. 44(7): 2160-2168.
- Piatelli, M. (1981). The betalains: structure, biosynthesis and chemical taxonomy. In The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise. Vol. 17. Secondary Plant Products. New York: Academic Press. pp. 557-575.
- Pourrat, A., Lejeune, B., Grand, A. and Pourrat, H. (1988). Betalains assay of fermented red beet root extract by high performance liquid chromatography. J Food Sci. 53(1): 294-295.
- Ravichandran, K., Saw, N.M.M.T., Mohdaly, A.A.A., Gabr, A.M.M., Kastell, A. Riedel, H., Cai, Z. Knorr, D. and Smetanska, I. (2013). Impact of processing of red beet on betalain content and antioxidant activity. Food Res Inter. 50(2): 670-67.
- Schliemann, W., Joy R.W., Komamine, A., Metzger, J.W., Nimtz, M., Wray, V. and Strack, D. (1996). Betacyanins from plants and cell cultures of *Phytolacca americana*. Phytochem. 42(4): 1039-46.
- Schliemann, W., Kobayashi, N. and Strack, D. (1999). The decisive step in betaxanthin biosynthesis is a spontaneous reaction. Plant Phys. 119(4): 1217-1232.
- Schwartz, S.J. and von Elbe, J.H. (1980). Quantitative determination of individual betacyanin pigments by high performance liquid chromatography. J Agric Food Chem. 28(3): 540-543.
- Stintzing, F.C. and Carle, R. (2004). Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. Trends in Food Sci Tech. 15(1): 19-38.
- Stintzing, F.C., Schieber, A. and Carle, R. (2002). Betacyanins in fruits from red-purple pitaya, *Hylocereus polyrhizus* (Weber) Britton & Rose. Food Chem. 77(1): 101-106.
- Stintzing, F.C., Schieber, A., and Carle, R. (2003). Evaluation of colour properties and chemical quality parameters of cactus juices. Eur Food Res Tech. 216(4): 303-311.
- Strack, D., Steglich, W. and Wray, V. (1993). Betalains. In Methods in Plant Biochemistry Vol. 8. Orlando: Academic Press. pp. 421-450.
- Strack, D., Vogt, T. and Schliemann, W. (2003). Recent advances in betalain research. Phytochem. 62(3): 247-269.
- Sturzoiu, A. Stroescu, M., Stoica, A. and Dobre, T. (2011). Betanine extraction from *Beta vulgaris* - Experimental research and statistical modeling. UPB Sci Bull, Series B. 73(1): 145-156.
- Trezzini, G.F. and Zrýd, J.P. (1991). Characterization of some natural and semi-synthetic betaxanthins. Phytochem. 30(6): 1901-1903.
- Von Elbe, J.H. (2005). Betalains. In Handbook of Food Analytical Chemistry. Vol. 2. Pigments, Colorants, Flavors, Texture, and Bioactive Food Components. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. pp. 123-129.
- Wybraniec, S., Nowak-Wydra, B., Mitka, K., Kowalski, P. and Mizrahi, Y. (2007). Minor betalains in fruits of *Hylocereus* species. Phytochem. 68(2): 251-259.

