



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “พันธุ์กรรมการศึกษาทอดลักษณะการสุกแก่เร็ว
ผลผลิตเยื่อหุ้มเมล็ด และปริมาณสารไลโคพีนในฟักข้าว
(*Momordica cochinchinensis* (Lou.) Spreng)”

โดย

ผศ.ดร. พัทธิน ส่องศรี และคณะ

มิถุนายน พ.ศ. 2561

สัญญาเลขที่ TRG5780083

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “พันธุกรรมการถ่ายทอดลักษณะการสุกแก่เร็ว ผลผลิตเยื่อ
หุ้มเมล็ด และปริมาณสารไลโคพีนในฟักข้าว
(*Momordica cochinchinensis* (Lou.) Spreng)”

คณะผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พัชริน ส่งศรี
ศาสตราจารย์ ดร. กมล เลิศรัตน์

คณะเกษตรศาสตร์ ม.ขอนแก่น
คณะเกษตรศาสตร์ ม.ขอนแก่น

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และมหาวิทยาลัยขอนแก่น
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. และมหาวิทยาลัยขอนแก่นไม่จำเป็นต้อง
เห็นด้วยเสมอไป)

สารบัญ

	หน้า
บทสรุปสำหรับผู้บริหาร	ก
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	ข
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	ง
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	20
บทที่ 4 ผลการทดลอง	36
บทที่ 5 วิเคราะห์ผลการทดลอง	60
บทที่ 6 สรุปและข้อเสนอแนะ	63
เอกสารอ้างอิง	64

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 พักข้าวลูกผสมจำนวน 30 คู่ผสม จำนวน 196 ต้น	21
ตารางที่ 2 อายุผล (วัน), ความกว้างผล (มิลลิเมตร), ความยาวผล (มิลลิเมตร), น้ำหนักผลสด (กรัมต่อผล), น้ำหนักเยื่อหุ้มเมล็ด (กรัมต่อผล) และเปอร์เซ็นต์เยื่อหุ้มเมล็ด ในพักข้าว 43 พันธุ์	43
ตารางที่ 3 ค่าสูงสุด (max), ค่าต่ำสุด (min), ค่าเฉลี่ย (means), ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD), ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (SE), ค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน (CV) ในพักข้าว 43 สายพันธุ์	45
ตารางที่ 4 ปริมาณสารแคโรทีนอยด์รวม (ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักสด) จากการวิเคราะห์ด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) วิธีการที่ 1, 2 และ 3 และ HPLC ในพักข้าว 43 สายพันธุ์	46
ตารางที่ 5 ปริมาณสารไลโคพีน (ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด) จากการวิเคราะห์ด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) วิธีการที่ 1, 2 และ 3 และ HPLC ในพักข้าว 43 สายพันธุ์	48
ตารางที่ 6 ปริมาณสารเบต้าแคโรทีน (ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด) จากการวิเคราะห์ด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) วิธีการที่ 1, 2 และ 3 และ HPLC ในพักข้าว 43 สายพันธุ์	50
ตารางที่ 7 ความสัมพันธ์ของปริมาณสารแคโรทีนอยด์ สารไลโคพีน และเบต้าแคโรทีน ระหว่าง HPLC และ สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)	53
ตารางที่ 8 สหสัมพันธ์ของอายุผล (วัน) น้ำหนักผลสด (กรัม) น้ำหนักเยื่อหุ้มเมล็ด (กรัม/ผล) เปอร์เซ็นต์เยื่อหุ้มเมล็ด ปริมาณสารแคโรทีนอยด์รวม ปริมาณไลโคพีน และ ปริมาณเบต้าแคโรทีน (ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักสด) ของพักข้าวจำนวน 43 พันธุ์	56
ตารางที่ 9 สหสัมพันธ์ระหว่างค่าการวัดสี ($L^*C^*h^o$) ปริมาณสารแคโรทีนอยด์รวม ไลโคพีน และเบต้าแคโรทีนจากการวิเคราะห์ด้วย HPLC ของพักข้าว 43 พันธุ์	57

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 ลักษณะลำต้นของฟักข้าว	4
ภาพที่ 2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบ	5
ภาพที่ 3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดอกเพศเมีย (ก) และดอกเพศผู้ (ข)	5
ภาพที่ 4 ผลฟักข้าวสุก (1) ส่วนของเนื้อผลฟักข้าว (2) ส่วนของเยื่อหุ้มเมล็ดและเมล็ด	6
ภาพที่ 5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของผล มีดังนี้ (1) = กลม; (2) = รี; (3) = รีคล้ายไข่; (4) = ป้านท้าย; (5) = ป้านข้าง และ (6) = กิ่งกระบอก	6
ภาพที่ 6 พัฒนาการของผลฟักข้าวระยะต่างๆ ประกอบด้วย R1 = ระยะดอกบาน; R2 = ระยะรังไข่ขยายเพิ่มขึ้นอยู่กึ่งกลาง ระหว่าง R1-R3 (ประมาณ 3-5 เท่าของรังไข่); R3 = ระยะหนามเปลี่ยนสีเป็นสีเหลือง แต่ผิวผลยังเป็นสีเขียว; R4 = ระยะผิวของผลและหนามเปลี่ยนสีเป็นสีเหลือง; R5 = ระยะสุกแก่ทางสรีรวิทยา (physiological maturity) ผิวของผลเป็นสีส้มแดง; R6 = ระยะสุกแก่เต็มที่ (maturity) ผิวของผลเป็นสีแดง และ R7 = ระยะสุกแก่เกินไป (over maturity) สังเกตได้จากข้าวผลและบริเวณผิวของผลที่ติดกับข้าวเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาลหรือสีดำ	7
ภาพที่ 7 ลักษณะเมล็ดของฟักข้าว	7
ภาพที่ 8 โครงสร้างทางเคมีของ hydrogenated carotenoid derivatives	10
ภาพที่ 9 โครงสร้างทางเคมีของ oxygenated carotenoid derivatives	10
ภาพที่ 11 กราฟมาตรฐานของสารเบต้าแคโรทีน	31
ภาพที่ 12 กราฟมาตรฐานของสารไลโคปีน (HPLC)	32
ภาพที่ 13 กราฟมาตรฐานของสารเบต้าแคโรทีน (HPLC)	33
ภาพที่ 14 ความสัมพันธ์ระหว่างการวิเคราะห์ด้วย HPLC และ สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ วิธีการที่ 3 ในฟักข้าว ได้แก่ ปริมาณสารไลโคปีน (a), ปริมาณสารเบต้าแคโรทีน (b) และปริมาณสารแคโรทีนอยด์รวม (** P = 0.01, (n=43))	54
ภาพที่ 15 Dendrogram ความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของฟักข้าว 43 พันธุ์ โดยใช้ลักษณะ ปริมาณสารสำคัญ ได้แก่ ปริมาณสารแคโรทีนอยด์รวม สารไลโคปีน และ สารเบต้าแคโรทีน (ไม่โครกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด) และลักษณะทางการเกษตร ได้แก่ น้ำหนักผลสด (กรัม) น้ำหนักเยื่อหุ้มเมล็ด (กรัมต่อผล) เปอร์เซ็นต์เยื่อหุ้มเมล็ด ความยาวผล (มิลลิเมตร) ความกว้างผล (มิลลิเมตร) อายุการสุกแก่ของผล (วัน)	59

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร (Executive Summary)

ฟักข้าวเป็นพืชที่มีศักยภาพสูง เนื่องจากเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวมีไลโคพินและเบต้าแคโรทีนสูง สามารถลดความเสี่ยงจากมะเร็งต่างๆได้ ดังนั้นจึงทำให้ฟักข้าวเหมาะสำหรับนำไปผลิตเป็นอาหารเพื่อสุขภาพ ซึ่งการทำผลิตภัณฑ์นั้นปริมาณสารสำคัญเป็นสิ่งจำเป็นต่อกระบวนการผลิตที่มีคุณภาพ ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์ให้มีผลผลิตสูงและสัณฐานภาพสูงเป็นสิ่งจำเป็น แต่ในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์ฟักข้าว ที่มีสายพันธุ์จำนวนมาก วิธีการตรวจวัดแบบมาตรฐาน High Performance Liquid Chromatography (HPLC) มีความแม่นยำสูง แต่ยังมีข้อจำกัดเรื่องเวลาและค่าใช้จ่ายที่สูง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อประเมินลักษณะทางการเกษตร ปริมาณแคโรทีนอยด์รวม ไลโคพินและเบต้าแคโรทีนในประชากรลูกผสม และเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างวิธีการตรวจวัดปริมาณแคโรทีนอยด์แบบมาตรฐาน โดยใช้ HPLC กับการตรวจวัดทางอ้อมโดยใช้สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ เพื่อใช้เป็นวิธีการตรวจวัดทางอ้อมที่ง่ายขึ้น สะดวก รวดเร็ว และยังคงมีความแม่นยำเทียบเท่าวิธีมาตรฐาน สำหรับใช้สนับสนุนงานด้านการปรับปรุงพันธุ์ฟักข้าวต่อไป

โดยในวิจัยครั้งนี้แบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือ (1) การประเมินลักษณะทางการเกษตร ได้แก่ อายุการสุกแก่ของผล (วันหลังดอกบาน) น้ำหนักผลสดต่อผล (กรัมต่อผล) ความยาวผล (เซนติเมตร) เส้นผ่านศูนย์กลางผล (เซนติเมตร) จำนวนเมล็ดต่อผล น้ำหนักเยื่อหุ้มเมล็ดต่อผล (กรัมต่อผล) เปอร์เซ็นต์เยื่อหุ้มเมล็ด (%) และปริมาณแคโรทีนอยด์ ได้แก่ การตรวจวัดด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ HPLC และเครื่องวัดสี (2) หาความสัมพันธ์ระหว่างวิธีการตรวจวัดแบบมาตรฐาน (HPLC) กับวิธีการตรวจวัดทางอ้อม (สเปกโตรโฟโตมิเตอร์และเครื่องวัดสี) โดยทำการประเมินจากฟักข้าวลูกผสม จำนวน 41 สายพันธุ์ และพันธุ์เปรียบเทียบ 2 พันธุ์

การทดลองที่ 1 ได้ประเมินลักษณะทางการเกษตร พบว่าฟักข้าวพันธุ์ [KKU ac.10-086 x KKU ac.10-093]-15 มีลักษณะทางการเกษตรที่ดี ซึ่งได้แก่ เส้นผ่านศูนย์กลางผล 13.1 เซนติเมตร ความยาวผล 9.5 เซนติเมตร น้ำหนักผลสดต่อผล 607.5 กรัม น้ำหนักเยื่อหุ้มเมล็ดต่อผล 176.5 กรัม และเปอร์เซ็นต์เยื่อหุ้มเมล็ดสูง 29 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณสารสำคัญปานกลาง ได้แก่ ปริมาณแคโรทีนอยด์รวม 1789.0 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด ปริมาณไลโคพิน 1399.0 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด และปริมาณเบต้าแคโรทีน 389.3 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด แต่ยังมีอายุการสุกแก่ยาว และฟักข้าวลูกผสมสายพันธุ์ [KKU ac.10-094 x KKU ac.09-008-4]-1 มีปริมาณแคโรทีนอยด์รวมและปริมาณไลโคพินสูงเท่ากับ 4180.0 และ 4015.0 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ แต่มีผลขนาดเล็ก น้ำหนักผลสดน้อย เปอร์เซ็นต์เยื่อหุ้มเมล็ดต่ำ และอายุการสุกแก่ที่ยาว

การทดลองที่ 2 หาความสัมพันธ์ระหว่างวิธีการตรวจวัดแบบมาตรฐาน (HPLC) กับวิธีการตรวจวัดทางอ้อม (สเปกโตรโฟโตมิเตอร์และเครื่องวัดสี) พบว่า วิธีการสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยใช้ตัวทำละลาย n-hexaen: ethanol: acetone (1.5:0.75:0.75) กับวิธี HPLC มีความสัมพันธ์สูงทางบวกทั้งปริมาณแคโรทีนอยด์รวม ไลโคพิน และเบต้าแคโรทีน ($r = 0.93, 0.94, 0.92$ ตามลำดับที่ $P=0.01$) ในขณะที่ความสัมพันธ์ระหว่างค่าสี (h^o) กับการตรวจวัดด้วยวิธี HPLC ในเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวมีความสัมพันธ์ปานกลางทางบวกกับแคโรทีนอยด์รวม ($r = 0.42, P=0.01$) และมีความสัมพันธ์ปานกลางทางลบในปริมาณไลโคพิน และปริมาณเบต้าแคโรทีน ($r = -0.53$ และ -0.47 ตามลำดับที่ $P=0.01$)

จากข้อมูลที่ทำการศึกษาการตรวจวัดปริมาณแคโรทีนอยด์รวม ไลโคพิน และเบต้าแคโรทีนด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตมิเตอร์สามารถใช้ทดแทนการวัดโดย HPLC ได้ จะเป็นประโยชน์ต่อการเพิ่มประสิทธิภาพของการปรับปรุงพันธุ์ฟักข้าวให้มีปริมาณแคโรทีนอยด์ ไลโคพิน และเบต้าแคโรทีน สูงได้ดียิ่งขึ้น

บทคัดย่อ

ฟักข้าวเป็นพืชที่มีศักยภาพสูง เนื่องจากเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวมีไลโคพินและเบต้าแคโรทีนสูง สามารถลดความเสี่ยงจากมะเร็งต่างๆได้ ดังนั้นจึงทำให้ฟักข้าวเหมาะสำหรับนำไปผลิตเป็นอาหารเพื่อสุขภาพ ซึ่งการทำผลิตภัณฑ์นั้นปริมาณสารสำคัญเป็นสิ่งจำเป็นต่อกระบวนการผลิตที่มีคุณภาพ ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์ให้มีผลผลิตสูงและสเถียรภาพสูง เป็นสิ่งจำเป็น แต่ในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์ฟักข้าว ที่มีสายพันธุ์จำนวนมาก วิธีการตรวจวัดแบบมาตรฐาน High Performance Liquid Chromatography (HPLC) มีความแม่นยำสูง แต่ยังมีข้อจำกัดเรื่องเวลาและค่าใช้จ่ายที่สูง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อประเมินลักษณะทางการเกษตร ปริมาณแคโรทีนอยด์รวม ไลโคพินและเบต้าแคโรทีนในประชากรลูกผสม และเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างวิธีการตรวจวัดปริมาณแคโรทีนอยด์แบบมาตรฐาน โดยใช้ HPLC กับการตรวจวัดทางอ้อมโดยใช้สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ และเครื่องวัดสี (a^* , b^* , L^* , C^* , h°)

โดยในการศึกษาครั้งนี้แบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือ (1) การประเมินลักษณะทางการเกษตร ได้แก่ อายุการสุกแก่ของผล (วันหลังดอกบาน) น้ำหนักผลสดต่อผล (กรัมต่อผล) ความยาวผล (เซนติเมตร) เส้นผ่านศูนย์กลางผล (เซนติเมตร) จำนวนเมล็ดต่อผล น้ำหนักเยื่อหุ้มเมล็ดต่อผล (กรัมต่อผล) เปอร์เซ็นต์เยื่อหุ้มเมล็ด (%) และปริมาณแคโรทีนอยด์ ได้แก่ การตรวจวัดด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ HPLC และเครื่องวัดสี (2) หาความสัมพันธ์ระหว่างวิธีการตรวจวัดแบบมาตรฐาน (HPLC) กับวิธีการตรวจวัดทางอ้อม (สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ และเครื่องวัดสี) โดยทำการประเมินจากฟักข้าวลูกผสม จำนวน 41 สายพันธุ์ และพันธุ์เปรียบเทียบ 2 พันธุ์

การทดลองที่ 1 การประเมินลักษณะทางการเกษตร พบว่าฟักข้าวพันธุ์ [KKU ac.10-086 x KKU ac.10-093]-15 มีลักษณะทางการเกษตรที่ดี ซึ่งได้แก่ เส้นผ่านศูนย์กลางผล 13.1 เซนติเมตร ความยาวผล 9.5 เซนติเมตร น้ำหนักผลสดต่อผล 607.5 กรัม น้ำหนักเยื่อหุ้มเมล็ดต่อผล 176.5 กรัม และเปอร์เซ็นต์เยื่อหุ้มเมล็ดสูง 29 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณสารสำคัญปานกลาง ได้แก่ ปริมาณแคโรทีนอยด์รวม 1789.0 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด ปริมาณไลโคพิน 1399.0 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด และปริมาณเบต้าแคโรทีน 389.3 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด แต่ยังมีอายุการสุกแก่ยาว และฟักข้าวลูกผสมสายพันธุ์ [KKU ac.10-094 x KKU ac.09-008-4]-1 มีปริมาณแคโรทีนอยด์รวมและปริมาณไลโคพินสูงเท่ากับ 4180.0 และ 4015.0 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ แต่มีผลขนาดเล็ก น้ำหนักผลสดน้อย เปอร์เซ็นต์เยื่อหุ้มเมล็ดต่ำ และอายุการสุกแก่ที่ยาว

การทดลองที่ 2 หาความสัมพันธ์ระหว่างวิธีการตรวจวัดแบบมาตรฐาน (HPLC) กับวิธีการตรวจวัดทางอ้อม (สเปกโตรโฟโตมิเตอร์และเครื่องวัดสี) พบว่า วิธีการสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยใช้ตัวทำละลาย n-hexane : ethanol : acetone (1.5 : 0.75 : 0.75) กับวิธี HPLC มีความสัมพันธ์สูงทางบวกทั้งปริมาณแคโรทีนอยด์รวม ไลโคพิน และเบต้าแคโรทีน ($r = 0.93, 0.94, 0.92$ ตามลำดับ ที่ $P=0.01$)

ในขณะที่ความสัมพันธ์ระหว่างค่าสี (h°) กับการตรวจวัดด้วยวิธี HPLC ในเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวมีความสัมพันธ์ปานกลางทางบวกกับแคโรทีนอยด์รวม ($r = 0.42, P=0.01$) และมีความสัมพันธ์ปานกลางทางลบในปริมาณไลโคพิน และปริมาณเบต้าแคโรทีน ($r = -0.53$ และ -0.47 ตามลำดับ ที่ $P=0.01$)

จากข้อมูลที่ทำการศึกษาเกี่ยวกับการตรวจวัดปริมาณแคโรทีนอยด์รวม ไลโคพีน และเบต้าแคโรทีนด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตมิเตอร์สามารถใช้ทดแทนการวัดโดย HPLC ได้ จะเป็นประโยชน์ต่อการเพิ่มประสิทธิภาพของการปรับปรุงพันธุ์ฟักข้าวให้มีปริมาณแคโรทีนอยด์ ไลโคพีน และเบต้าแคโรทีน สูงได้ดียิ่งขึ้น

คำสำคัญ: ลักษณะทางการเกษตร, ปรับปรุงพันธุ์, แคโรทีนอยด์, การตรวจวัดทางอ้อม

ABSTRACT

Spiny bitter gourd is an underutilized fruit crop with high potential for functional food products as it has high lycopene and beta-carotene in its aril. These phytochemicals help reduce the risk of cancer and spiny bitter gourd is suitable for use as raw material for functional food products. Uniform quality of raw material is important for high quality products and crop improvement is necessary to develop new varieties with high and stable phytochemicals in order to obtain high quality raw material. In breeding spiny bitter gourd for high lycopene, it is necessary to screen a large number of breeding materials. High performance liquid chromatography (HPLC) has been used as a standard method with high accuracy but it is costly and time consuming. The objectives of this study were to evaluate agronomic traits, total carotenoids, lycopene and beta carotene in a segregating breeding population and to investigate the relationships among methods for these phytochemical analysis including a standard method by high performance liquid chromatography, spectrophotometric method and color parameters (a^* , b^* , L^* , C^* , h°). The research project was divided into two parts. In the first part, agronomic characters of spiny bitter gourd including days to fruit maturity, fresh fruit weight, fruit length, fruit diameter, seed number, aril weight, aril percentage and carotenoids by HPLC method and color parameters in a spiny bitter gourd population consisting of 41 F_1 hybrid clones and 2 standard checks. In experiment 1, [KKU ac.10-086 x KKU ac.10-093]-15 had the highest agronomic traits including 92.5 days to maturity, fruit width of 13.1 cm fruit length of 9.5 cm, fruit fresh weight of 607.5 g, aril weight of 176.5 g, aril percentage of 29%. The accession had rather high days to maturity and high phytochemicals including 1399.0, 389.3 and 1789.0 $\mu\text{g/g}$ fresh weight of lycopene, beta carotene and total carotenoid, respectively. This breeding clone had high days to maturity, and the clone [KKU ac.10-094 x KKU ac.09-008-4]-1 had high total carotenoids (4180.0 $\mu\text{g/g}$ fresh weight) and high lycopene (4015.0 $\mu\text{g/g}$ fresh weight), respectively. This clones had small fruits, low fresh fruit weight and low aril percentage, but it had high days to maturity. In the experiment 2, the study was undertaken to determine the relationships among the methods for lycopene analysis (HPLC, spectrophotometric method and color parameters). Spectrophotometric method (method 3) using n-hexane : ethanol : acetone (1.5 : 0.75 : 0.75 (v/v/v)) had the highest correlation coefficients with the standard method for total carotenoid, lycopene and beta carotene ($r = 0.93, 0.94$ and 0.92 respectively ($P=0.01$)). The correlation coefficients between colors values (h°) and

determined by HPLC aril spiny bitter gourd were rather low. The h^2 value had positive correlation coefficients with total carotenoid ($r = 0.42$, $P=0.01$) and negative medium correlation coefficients with lycopene and beta carotene ($r = -0.53$, -0.47 respectively ($P=0.01$)). Spectrophotometric method for carotenoids, lycopene and beta carotene analysis is compatible to HPLC method. The information obtained in this study is useful to increase the efficiency of spiny bitter gourd breeding programs for high total carotenoid, lycopene and beta carotene.

Key words: Agronomic traits, Breeding, Carotenoid, Indirect measurement

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

ปัจจุบันคนไทยมีวิถีชีวิตที่เปลี่ยนไปจากเดิม และเริ่มเปลี่ยนแปลงจากสังคมชนบทเป็นสังคมเมืองมากขึ้นมีการบริโภคอาหารที่ไม่ถูกต้องตามหลักโภชนาการ ซึ่งเป็นเหตุให้เกิดปัญหาสุขภาพและทำให้มีภาระค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลเป็นจำนวนมากจากปัญหาสุขภาพที่รุนแรงเพิ่มมากขึ้น เช่น โรคความดันโลหิตสูง โรคเบาหวาน โรคหัวใจ โรคหลอดเลือดสมอง และโรคมะเร็ง เป็นต้น ดังนั้น การผลิตอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงและมีสารสำคัญที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย ไม่มีสารพิษปนเปื้อน จึงมีส่วนสำคัญที่ส่งผลดีต่อสุขอนามัยของผู้บริโภค ดังนั้นการเชื่อมโยงระหว่างเกษตรกรและเรื่องสุขภาพ จึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง อันจะส่งผลต่อการลดภาระค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาล และส่งผลทำให้คนไทยมีสุขภาพที่ดี มีอายุยืนยาว และมีความสุข (กมล, 2550)

ฟักข้าว (*Momordica cochinnensis* (Lour.) Spreng) จัดเป็นพืชวงศ์ Cucurbitaceae ซึ่งพบในแถบอาเซียน ได้แก่ เวียดนาม อินเดีย บังคลาเทศ จีน พม่า มาเลเซีย ลาว และไทย (Vuong, 2002) พืชที่มีศักยภาพสูงสำหรับใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อผลิตอาหารเพื่อสุขภาพเนื่องจากมีคุณค่าทางสารอาหารและมีสารสำคัญที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพสูง โดยเฉพาะไลโคพีน และเบต้าแคโรทีน ซึ่งสารสำคัญนี้มีรายงานว่าสามารถลดความเสี่ยงจากมะเร็ง เช่น มะเร็งต่อมลูกหมาก มะเร็งลำไส้ มะเร็งกระเพาะอาหาร และโรคหลอดเลือดหัวใจ เป็นต้น (Vuong *et al.*, 2006; Ishida *et al.*, 2009) อีกทั้งยังพบว่า เยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าว มีปริมาณเบต้าแคโรทีนมากกว่าแครอท 10 เท่า มีไลโคพีนมากกว่ามะเขือเทศ 70 เท่า และมีกรดไขมันขนาดยาวประมาณร้อยละ 10 ของมวล (Vuong *et al.*, 2002) อีกทั้งยังมีกรดไขมันที่จำเป็นและเป็นประโยชน์ต่อการดูดซึมของไลโคพีนและเบต้าแคโรทีนได้ดียิ่งขึ้น (Ishida *et al.*, 2004) ปัจจุบันได้มีการนำเยื่อหุ้มเมล็ดของฟักข้าวจากผลสุกมาพัฒนาเป็นแคปซูล เยื่อหุ้มเมล็ดแช่เยือกแข็ง เยื่อหุ้มเมล็ดตากแห้ง ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม ขนม แคปซูลอาหารเสริมสุขภาพ และเครื่องสำอาง (กมล และคณะ, 2553)

ปริมาณของสารสำคัญที่สกัดได้ทั้ง ไลโคพีน และ เบต้าแคโรทีนนั้นมีความแตกต่างกันในแต่ละแหล่งผลิต ซึ่งน่าจะเกิดจากพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อม (Vuong, 2002; Aoki *et al.*, 2002; Vuong *et al.*, 2003; Vuong *et al.*, 2006) สาเหตุหลักนั้นน่าจะมาจากความแตกต่างกันของสายพันธุ์ซึ่งมีการควบคุมจากพันธุกรรมในตัวพืช ซึ่งการผลิตในเชิงการค้าเน้นความคงที่ของปริมาณสารสำคัญต่างๆ เป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่งต่อกระบวนการผลิตที่มีคุณภาพและมาตรฐานของผลิตภัณฑ์ ซึ่งการปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ได้พันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงและมีความเสถียรภาพสูงนั้น เป็นสิ่งจำเป็นเพื่อให้ได้วัตถุดิบที่มีคุณภาพ

การพัฒนาพันธุ์จำเป็นต้องทราบค่าความสามารถในการถ่ายทอดลักษณะที่กำหนด กลยุทธ์ในการปรับปรุงพันธุ์ฟักข้าว แต่อย่างไรก็ดีการพัฒนาสายพันธุ์ฟักข้าวนี้ ที่มักจะมีจำนวนตัวอย่าง

หรือสายพันธุ์ที่เกิดจากประชากรลูกผสมจำนวนมาก ซึ่งมักจะมีปัญหาในเรื่องของการตรวจวัดปริมาณสารสำคัญ ดังนั้นหากมีวิธีการตรวจวัดที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว มีความถูกต้องแม่นยำ ซึ่งจะเป็นแนวทางการแก้ไขปัญหาก็สามารถนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นได้

โดยทั่วไปแล้วการวิเคราะห์ปริมาณสารแคโรทีนอยด์นิยมอยู่ 2 วิธีคือ การตรวจวัดด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ และการวิเคราะห์สารด้วยโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) (Rao *et al.*, 1998) เนื่องจากโดยใช้สเปกโตรโฟโตมิเตอร์เป็นวิธีการที่สามารถทำได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว มีค่าใช้จ่ายน้อย แต่ความแม่นยำค่อนข้างต่ำ ส่วนการตรวจวัดโดยใช้ HPLC (การวิเคราะห์สารด้วยโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง) นั้นถือว่าเป็นวิธีตรวจวัดแคโรทีนอยด์ที่มีประสิทธิภาพและแม่นยำสูง และถือว่าเป็นวิธีมาตรฐาน แต่ต้องอาศัยความชำนาญสูงในการตรวจวัด และมีค่าใช้จ่ายที่สูง (ศักดิ์สิทธิ์, 2541) ซึ่งข้อจำกัดในกรณีที่มีตัวอย่างจำนวนมากหรือจำนวนสายพันธุ์ที่มาก ก็อาจจะทำให้เสียเวลา และมีค่าใช้จ่ายที่มากขึ้น ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหาวิธีการวัดที่ทำได้ง่ายและแม่นยำ ซึ่งการวิเคราะห์โดยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์เป็นอีกทางเลือกหนึ่ง เหมาะที่จะนำมาใช้ในกรณีที่มีตัวอย่างจำนวนมาก เนื่องจากมีรายงานเกี่ยวกับความสัมพันธ์ในการตรวจวัดสูงในพืช เช่น ผลมะเขือเทศ (Rao *et al.*, 1998) ผลลิ้นจี่จากมะเขือเทศ และแป้งข้าวโพดสีเหลือง (Luterotti *et al.*, 2013) และน้ำผลไม้ส้ม (Meléndez-Martínez, 2011) เป็นต้น

แต่อย่างไรก็ตาม ความสัมพันธ์ระหว่างวิธีการวัด หรือการค้นหาวิธีการวัดทางอ้อม (indirect selection) เพื่อค้นหาวิธีการที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว มีความถูกต้องแม่นยำ ในพืชแต่ละชนิดจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการประเมินและทดสอบถึงความแม่นยำในการนำไปใช้ก่อนเสมอ แต่ในพืชชาวนั้นยังไม่มีการศึกษามาก่อน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายเพื่อประเมินวิธีการวิเคราะห์แคโรทีนอยด์ ไลโคพีน และเบต้าแคโรทีน และหาความสัมพันธ์ระหว่างวิธีการในการตรวจวิเคราะห์สารสำคัญ โดยวิธีสเปกโตรสโกปีโฟโตมิเตอร์ และ HPLC สำหรับการประยุกต์ใช้กับงานวิจัยการปรับปรุงพันธุ์พืชชาวน้ำให้มีสารไลโคพีนและเบต้าแคโรทีนสูงต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์

- 1) ประเมินลักษณะทางการเกษตร และลักษณะปริมาณสารสำคัญ (แคโรทีนอยด์รวม ไลโคพีน และเบต้าแคโรทีน)
- 2) ประเมินลักษณะพันธุกรรมที่ถ่ายทอดลักษณะของลักษณะทางการเกษตร และปริมาณสารสำคัญ
- 3) หาความสัมพันธ์ระหว่างวิธีการตรวจวัดปริมาณสารแคโรทีนอยด์รวม ไลโคพีน และเบต้าแคโรทีน

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

- 1) ปลุกทดสอบปักชำวุ้นผสมจำนวน 30 คู่ผสม ในเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2556 ที่หมวดไม้ผล ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
- 2) ประเมินลักษณะทางการเกษตรของปักชำวุ้นผสม
- 3) วิเคราะห์ปริมาณสารไลโคพีน เบต้าแคโรทีนและแคโรทีนอยด์ของปักชำวุ้นผสม โดยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์และ HPLC

บทที่ 2

วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

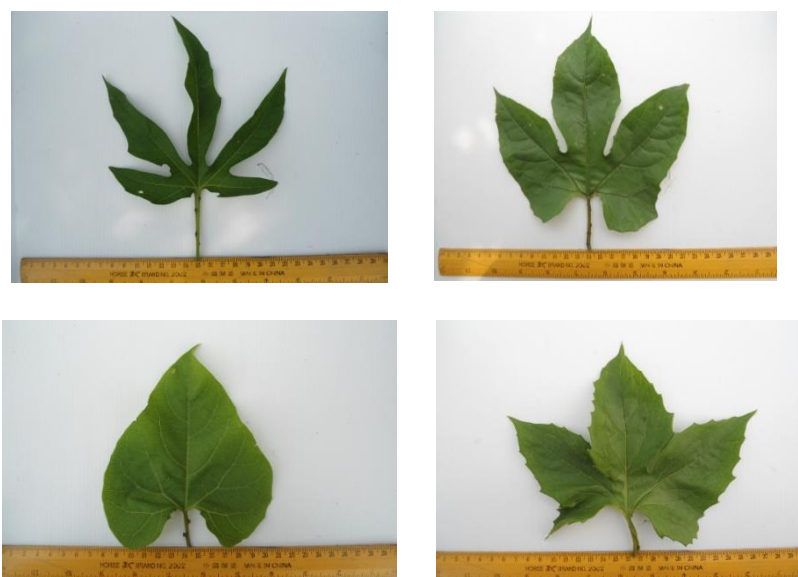
ฟักข้าวจัดอยู่ในวงศ์ Cucurbitaceae พืชในวงศ์นี้มีประมาณ 110 สกุล หรือ 850 ชนิด ซึ่งได้แก่ แตงกวา แตงโม แตงไทย บวบงู บวบเหลี่ยม น้ำเต้า ฟักทอง ตำลึง แคนตาลูป และมะระ เป็นต้น ฟักข้าวมีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Momordica cochinchinensis* (Lour.) Spreng มีชื่อสามัญ คือ gac fruit, sweet gourd, spiny bitter gourd และ baby jackfruit ชื่อพื้นเมือง คือ ผักข้าว (ตาก) มะข้าว (แพร่) ผักไห้ใหญ่ (ยโสธร) ผักสะไหร่ใหญ่ (กาฬสินธุ์) ขี้กาเครือ (ปัตตานี) ต้นฟักข้าวเป็นไม้เถาเลื้อยพันอายุหลายปี และมีมือพันเกาะออกตามง่ามใบ (พัชริน, 2554 ; พัทธิน และกมล, 2554)

ลำต้น ฟักข้าวเป็นไม้เถาขึ้นต้นมีอายุหลายปี และมีมือเกาะออกตามง่ามใบ (ภาพที่ 1)



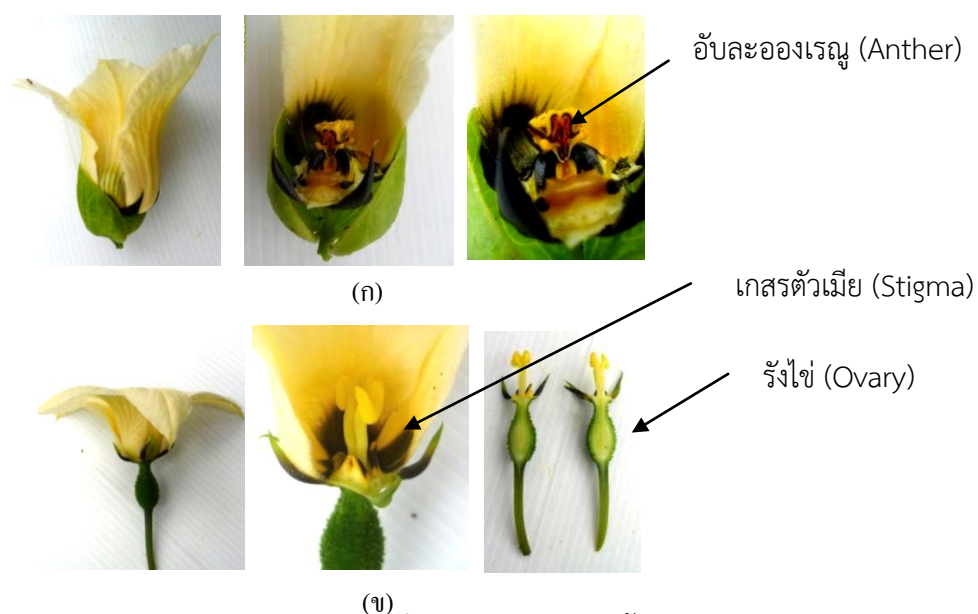
ภาพที่ 1 ลักษณะลำต้นของฟักข้าว

ใบ เป็นใบเดี่ยวเรียงตัวแบบสลับขอบใบหยักเว้าเป็นแฉกมี 3-5 แฉกใบกว้างยาวประมาณ 6-15 เซนติเมตร ปลายใบแหลม ผิวใบเกลี้ยงหรือมีขนอยู่ประปราย (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบ (น้ำอ้อย และคณะ, 2555)

ดอก พักข้ามมีดอกแยกเพศ เพศผู้และเพศเมีย อยู่ต่างต้นกัน ดอกออกเป็นดอกเดี่ยวมีขนาดใหญ่ ดอกจะออกตามซอกใบมีกลีบดอกสีครีมตรงกลางมีสีน้ำตาลแกมม่วง กลีบดอกมี 5 กลีบออกดอกตลอดปี ดอกเพศผู้ออกเดี่ยวๆ กลีบดอกมี 5 กลีบรูปถ้วย ปากกว้าง มีใบประดับรูปคีม กลมๆ ฐานกลีบดอกสีดำ กลีบดอกรูปรีหรือรูปขอบขนาน มีอับละอองเรณูเป็นสีส้ม ดอกเพศเมียออกเดี่ยวๆ กลีบดอกมี 5 กลีบรูปใบหอก รังไข่มีสีเขียวเป็นกระเปาะอยู่ฐานดอก มีเกสรตัวเมียเป็นสีเหลืองและเหนียว ซึ่งมีขนาดเล็กและแคบกว่าในดอกเพศผู้ (ภาพที่ 3) (น้ำอ้อย และคณะ, 2555)



ภาพที่ 3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดอกเพศเมีย (ก) และดอกเพศผู้ (ข) (พัชริน, 2555)

ผล พักข้าวมีผลหลากหลายรูปทรง มีหลายรูปทรง เช่น ผลทรงกลม และ ผลทรงรี เป็นต้น ขึ้นอยู่กับพันธุ์(ภาพที่ 5) ผลของพักข้าวจะมีหนามรอบๆผล ผลอ่อนมีสีเขียว ผลแก่สีเหลือง ผลแก่จะมีสีส้มแดงถึงแดงเข้ม ส่วนเยื่อหุ้มเมล็ดพักข้าวนี้จะมีสีแดงถึงสีแดงเข้ม ซึ่งขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ และพักข้าวสามารถติดผลได้ตลอดทั้งปี โดยระยะพัฒนาการของผลพักข้าว แบ่งออกเป็น 7 ระยะพัฒนาการ (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 4 ผลพักข้าวสุก (1) ส่วนของเนื้อผลพักข้าว (2) ส่วนของเยื่อหุ้มเมล็ดและเมล็ด (ดัดแปลงจาก Vuong, 2002)



(1)



(2)



(3)



(4)

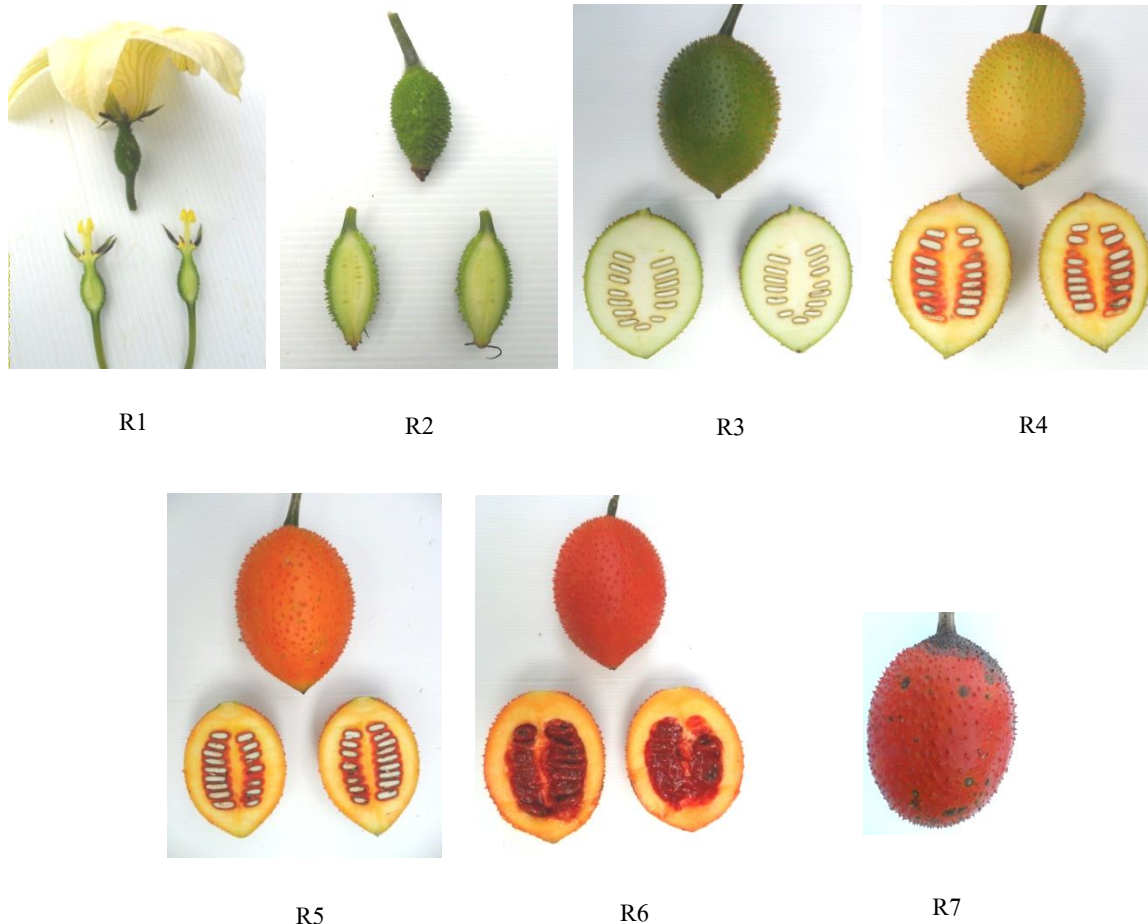


(5)



(6)

ภาพที่ 5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของผล มีดังนี้ (1) = กลม; (2) = รี; (3) = รีคล้ายไข่; (4) = ป้านท้าย; (5) = ป้านข้าง และ (6) = กิ่งกระบอก (น้ำอ้อย และคณะ, 2555)



ภาพที่ 6 พัฒนาการของผลฟักข้าวระยะต่างๆ ประกอบด้วย R1 = ระยะดอกบาน; R2 = ระยะรังไข่ขยายเพิ่มขึ้นอยู่กึ่งกลาง ระหว่าง R1-R3 (ประมาณ 3-5 เท่าของรังไข่); R3 = ระยะหนามเปลี่ยนสีเป็นสีเหลือง แต่ผิวผลยังเป็นสีเขียว; R4 = ระยะผิวของผลและหนามเปลี่ยนสีเป็นสีเหลือง; R5 = ระยะสุกแก่ทางสรีรวิทยา (physiological maturity) ผิวของผลเป็นสีส้มแดง; R6= ระยะสุกแก่เต็มที่ (maturity) ผิวของผลเป็นสีแดง และ R7 = ระยะสุกแก่เกินไป (over maturity) สังเกตได้จากข้าวผลและบริเวณผิวของผลที่ติดกับข้าวเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาลหรือสีดำ (ปาริชาติ และคณะ, 2555)

เมล็ด ฟักข้าวมีเมล็ดประมาณ 30-50 เมล็ดต่อผล เมล็ดมีรูปทรงกลม รูปทรงรี หรือเป็นรูปทรงกลมรี มีลักษณะแบนเปลือกหุ้มเมล็ดแข็งมีสีดำ ผิวเมล็ดมีลายขรุขระหรือผิวเรียบ (ภาพที่ 7) (น้ำอ้อย และคณะ, 2555)



ภาพที่ 7 ลักษณะเมล็ดของฟักข้าว (น้ำอ้อย และคณะ, 2555)

2. สารสำคัญในกลุ่มแคโรทีนอยด์

2.1 ไลโคพีน

ไลโคพีนเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ละลายน้ำได้ และมักอยู่ในผักหรือผลไม้ที่มีสีแดง ไลโคพีนเป็นรงควัตถุในกลุ่มของแคโรทีนอยด์ในผักและผลไม้ เช่น มะเขือเทศ แตงโม องุ่นแดง และ มะละกอ เป็นต้น เป็นสารธรรมชาติที่ได้จากพืชที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย โดยทำหน้าที่เป็นสารต้าน ภูมิกริยาออกซิเดชันทั้งในระบบอาหารและไม่ใช้ระบบอาหาร (วิธนา, 2543) เช่น อั้นทะ ต่อมหมวกไต ตับ ต่อมลูกหมาก เต้านม ตับอ่อน และผิวหนัง เนื่องจากไลโคพีนมีโครงสร้างโมเลกุลเป็นโซ่ตรง และเป็นสารที่ไม่มีขั้วจึงดูดซึมได้ไม่ดี สารไลโคพีนมีโครงสร้างทางเคมีที่มีพันธะคู่สลับกัน ทำให้มีคุณสมบัติ ในการเป็นสารต้านออกซิเดชันที่มีประสิทธิภาพสูงทั้งสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ ทำให้สามารถยับยั้ง การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งได้ และสามารถยับยั้งการเกิดโรคหัวใจ และโรคมะเร็ง (Takeoka *et al*, 2001)

ไลโคพีนเป็นสารที่มีสีแดงส้ม พบมากในมะเขือเทศ และยังพบได้ในแตงโม องุ่นแดง มะละกอ และฝรั่งสีแดง เป็นแคโรทีนอยด์ที่พบได้มากที่สุดในกระแสเลือด อาจพบที่บริเวณอื่นๆ ด้วย เช่น อั้นทะ ต่อมหมวกไต ตับ ต่อมลูกหมาก เต้านม ตับอ่อน และผิวหนัง เนื่องจากไลโคพีนมี โครงสร้างโมเลกุลเป็นโซ่ตรง และเป็นสารที่ไม่มีขั้วจึงดูดซึมได้ไม่ดี แต่ถ้าผ่านการปรุงด้วยความร้อน แล้วจะดูดซึมได้ดี (Gartner, 1997)

ไลโคพีนสามารถยับยั้งออกซิเจนพลังงานสูง (singlet state, $^1\text{O}_2^*$) ได้มากที่สุดในการ บรรดาสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ด้วยกัน และยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งได้ดีกว่าทั้งแอลฟาแคโรทีนและเบต้าแคโรทีน และคาดว่าไลโคพีนสามารถยับยั้งการเกิดโรคหัวใจและโรคมะเร็งโดยการ ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันบนเมมเบรนของ DNA รวมทั้ง LDL และโมเลกุลอื่น ๆ ที่ ถูกทำลายได้ด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยไลโคพีนจะจับอนุมูลอิสระและไปสะเทินความไวในการ เกิดปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระเหล่านั้น (Di *et al.*, 1989)

มีรายงานวิจัยว่าการลดอัตราเสี่ยงในการเกิดมะเร็งต่อมลูกหมาก มะเร็งปอด และ มะเร็งกระเพาะอาหาร (Rao *et al*, 1999) มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับการรับประทานมะเขือเทศ สำหรับการป้องกันโรคหัวใจ (Agarwal, 1998) พบว่ากลุ่มตัวอย่างที่มีไลโคพีนสะสมในเนื้อเยื่อ ไขมันในปริมาณสูงจะมีอัตราเสี่ยงในการเกิดโรคหัวใจที่ต่ำลง (Bramley, 2000) (Clinton, 1998) ไลโคพีนยังช่วยป้องกันการเกิดออกซิเดชัน อันเนื่องจากการกระตุ้นของแสงบนผิวหนังและให้ผลดีกว่า สาร เบต้าแคโรทีน และในการทดลองให้ไลโคพีนในรูปของอาหารเสริมเป็นเวลามากกว่า 1 สัปดาห์ พบระดับไลโคพีนในกระแสเลือดเพิ่มขึ้น และลดการเกิด lipid peroxidation และการเกิดออกซิเดชันของ LDL อย่างมีนัยสำคัญ (Arab, 2000)

2.2 เบต้าแคโรทีน

เบต้าแคโรทีนและวิตามินเอ เบต้าแคโรทีนพบมากในพืชที่มีสีเหลือง และสีส้ม เช่น หัวแครอท หัวผักกาดแดง มะเขือเทศ เป็นต้น เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์วิตามินเอ โดยร่างกาย

มนุษย์สามารถเปลี่ยน 9-cis-beta-carotene ไปเป็นวิตามินเอที่ตับและลำไส้ด้วยเอนไซม์ 15,15-beta-carotenoid dioxygenase ซึ่งวิตามินเอเป็นสารที่มีความสำคัญต่อการมองเห็น การสร้างสเปิร์ม การสร้างกระดูกและฟัน การซ่อมแซมเนื้อเยื่อ และสุขภาพของผิวหนัง (Naves and Moreno, 1998)

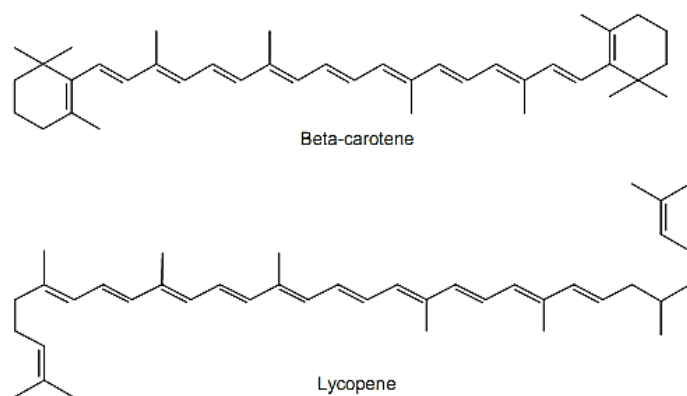
เบต้าแคโรทีนยังใช้ในการรักษาโรคบางชนิด เช่น โรคกระดูก ความผิดปกติของผิวหนังอันเนื่องมาจากความไวต่อแสง ซึ่งการที่ผิวหนังมีความไวต่อแสงจะกระตุ้นให้มีการสร้างพอร์ฟิริน (porphyrins) ที่ผิวหนังซึ่งจะดูดกลืนพลังงานจากแสงและทำให้เกิดอนุมูลอิสระ ที่จะเข้าไปทำลายเซลล์และทำให้เกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อ การได้รับเบต้าแคโรทีน (Pryor *et al.*, 2000) แคโรทีนอยด์ยังสามารถช่วยป้องกันโรคหัวใจ โดยการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของ LDL การมีฤทธิ์เป็นสารต้านออกซิเดชันของเบต้าแคโรทีนและแคโรทีนอยด์ตัวอื่น ๆ และยังช่วยลดอัตราการเกิดโรคมะเร็ง ซึ่งมีรายงานเกี่ยวกับการศึกษาพบว่า ในการรับประทานผัก ผลไม้ ที่มีแคโรทีนอยด์ในปริมาณสูงจะมีความแปรผกผันกับอัตราการเกิดโรคมะเร็งปอด หลอดลม กระเพาะอาหารลำไส้ใหญ่ รังไข่ และคอ (Naves and Moreno, 1998)

2.3 ประโยชน์ของสารแคโรทีนอยด์

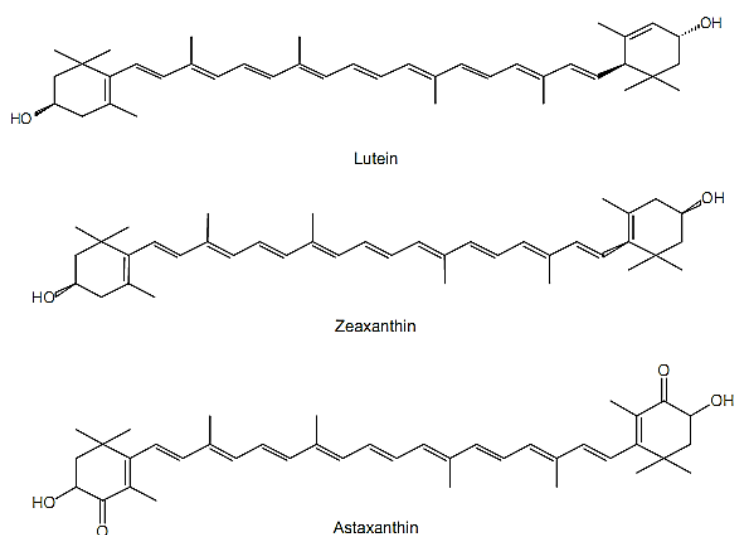
แคโรทีนอยด์เป็นรงควัตถุที่พบในคลอโรพลาสต์ (chloroplast) และโครโมพลาสต์ (chromoplast) ของผลไม้ ดอกไม้ ใบของพืช ทั้งยังพบได้ในสัตว์ จุลชีพที่สังเคราะห์แสงได้และสาหร่าย มีแคโรทีนอยด์กว่า 700 โมเลกุลที่ตรวจสอบโครงสร้างได้ และพบทั่วไปในธรรมชาติ แคโรทีนอยด์ในพืชจะดูดกลืนพลังงานแสง เพื่อส่งต่อไปให้คลอโรฟิลล์ในกระบวนการสังเคราะห์แสง และเป็นตัวจับรังสีอุลตราไวโอเลต จึงปกป้องพืชจากปฏิกิริยาออกซิเดชันอันเนื่องจากแสง (photooxidation) และยังป้องกันการทำลายเซลล์จากอนุมูลอิสระ (free radical) แคโรทีนอยด์ปกป้องพืชในสภาวะที่ไม่เหมาะสม เช่น เกิดบาดแผล หรือกระทบกับแสงแดดอย่างรุนแรง เพื่อป้องกันการติดเชื้อและการทำลายจากแสงแดด (Demmig, 1996)

แคโรทีนอยด์กลุ่มแรก ตัวอย่างแคโรทีนอยด์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ ลูทีน (lutein) ซีแซนทีน (zeaxanthin) และแอสตาแซนทีน โมเลกุลของแคโรทีนอยด์อาจเป็นเส้นตรง พบในไลโคพีน (lycopene) หรือเป็นวงแหวน (ring) ที่ปลายโซ่ของโมเลกุล พบในเบต้าแคโรทีน (beta-carotene) สามารถจำแนกแคโรทีนอยด์เป็น 2 กลุ่ม คือ hydrogenated และ oxygenated carotenoid derivatives โดยกลุ่ม hydrogenated carotenoid derivatives หรือกลุ่มแคโรทีน (carotene) เป็นโมเลกุลที่ประกอบด้วยสายไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon) ทำให้เป็นสารไม่มีขั้วและละลายได้ในไขมัน ตัวอย่างแคโรทีนอยด์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ เบต้าแคโรทีน และ ไลโคพีน เป็นต้น (Stahl and Sies, 2003)

ส่วนกลุ่มที่ 2 คือ กลุ่ม Oxygenated carotenoid derivatives หรือกลุ่มแซนโทฟิลล์ (xanthophyll) นั้นมีอะตอมของออกซิเจนอยู่ในโมเลกุล จึงมีขั้วมากกว่าและละลายในไขมันได้น้อยกว่า (Stahl and Sies, 2003)



ภาพที่ 8 โครงสร้างทางเคมีของ hydrogenated carotenoid derivatives (Stahl and Sies, 2003)



ภาพที่ 9 โครงสร้างทางเคมีของ oxygenated carotenoid derivatives (Stahl and Sies, 2003)

2.4 ปริมาณสารไลโคพีนและเบต้าแคโรทีนในฟักข้าว

จากการวิเคราะห์แคโรทีนอยด์และโทโคฟีรอลในเยื่อหุ้มเมล็ดและมีโซคาร์พของ ฟักข้าว พบว่าในเยื่อหุ้มเมล็ดมีแคโรทีนอยด์ทั้งหมดในปริมาณ 497 ไมโครกรัม/กรัม ซึ่งมีไลโคพีนอยู่ในปริมาณ 408 ไมโครกรัม/กรัม และเบต้าแคโรทีนปริมาณ 83 ไมโครกรัม/กรัม แต่ในเนื้อฟักข้าว มีอัลฟาโทโคฟีรอลในปริมาณ 76 ไมโครกรัม/กรัม มีแคโรทีนอยด์ทั้งหมดปริมาณ 5,700 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีเบต้าแคโรทีนปริมาณ 2,710 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ไขมันไม่อิ่มตัว 69 เปอร์เซ็นต์ และ polyunsaturated 35 เปอร์เซ็นต์ (Vuong *et al*, 2003; 2006)

การวิเคราะห์แคโรทีนอยด์ในเยื่อหุ้มเมล็ด และเนื้อฟักข้าวของฟักข้าว โดยการสกัด และการทำ saponified พบว่าทั้งการสกัดและการทำ saponified ในเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าว มีไลโคพีน และเบต้าแคโรทีนสูงกว่าเนื้อฟักข้าว ซึ่งในการสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าว 1 กรัม มีไลโคพีนเฉลี่ย 310-460 ไมโครกรัม และมีเบต้าแคโรทีนเฉลี่ย 60-140 ไมโครกรัม และการทำ saponified ในเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าว 1 กรัม มีไลโคพีนเฉลี่ย 300-400 ไมโครกรัม และมีเบต้าแคโรทีนเฉลี่ย 50-110 ไมโครกรัม และพบว่ามีซีแซนทีนและเบต้าคริปโตแซนทีนปริมาณต่ำมาก ซึ่งลดลงประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ในการทำ saponified (Aoki *et al.*, 2002)

การวิเคราะห์กรดไขมันและแคโรทีนอยด์ในเยื่อหุ้มเมล็ดของฟักข้าว พบว่าเยื่อหุ้มเมล็ดประกอบด้วยไลโคพีนที่มี trans isomers ปริมาณ 1,342 ไมโครกรัม และ cis isomers ปริมาณ 204 ไมโครกรัม และปริมาณไลโคพีนทั้งหมด 2,227 ไมโครกรัม ส่วนเบต้าแคโรทีน ประกอบด้วย trans isomers ปริมาณ 597 ไมโครกรัม และ cis isomers ปริมาณ 39 ไมโครกรัม และปริมาณเบต้าแคโรทีนทั้งหมด 718 ไมโครกรัม และแอลฟาแคโรทีน 107 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักสด (กรัม) ส่วนมิโซคาร์พ ประกอบด้วยเบต้าแคโรทีนที่มี trans isomers 11 ไมโครกรัม และ cis isomers 5 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักสด (กรัม) และแอลฟาแคโรทีนปริมาณเล็กน้อย และพบว่าไม่มีไลโคพีน นอกจากนี้เยื่อหุ้มเมล็ด ประกอบด้วย fatty acid, oleic acid, palmitic acid และ linoleic acids จำนวน 22, 32, 29 และ 28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมล็ด (seed) ประกอบด้วย stearic acid, inoleic acid, oleic acid และ palmitic acid จำนวน 60.5, 120, 9 และ 5-6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Ishida *et al.*, 2004)

การวิเคราะห์แคโรทีนอยด์และโทโคฟีรอลในเยื่อหุ้มเมล็ดและมีโซคาร์พของฟักข้าว พบว่าในเยื่อหุ้มเมล็ดมีแคโรทีนอยด์ทั้งหมดปริมาณ 497 ไมโครกรัม/กรัม ซึ่งมีไลโคพีนปริมาณ 408 ไมโครกรัม/กรัม และเบต้าแคโรทีนปริมาณ 83 ไมโครกรัม/กรัม แต่ในเนื้อฟักข้าวมีอัลฟาโทโคฟีรอลมีปริมาณ 76 ไมโครกรัม/กรัม (Vuong *et al.*, 2006) และกรดไขมันที่จำเป็นในฟักข้าว พบว่าฟักข้าวมีแคโรทีนทั้งหมดปริมาณ 5,700 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีเบต้าแคโรทีนปริมาณ 2,710 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ไขมันไม่อิ่มตัว 69 เปอร์เซ็นต์ และ Polyunsaturated 35 เปอร์เซ็นต์ (Vuong *et al.*, 2003)

3. การวิเคราะห์ปริมาณสารแคโรทีนอยด์ ไลโคพีน และเบต้าแคโรทีน

การสกัดแคโรทีนอยด์ยังไม่มีวิธีการหรือเทคนิคที่แน่นอน ต้องควบคุมปัจจัยหลายๆอย่าง เช่น อุณหภูมิ แสง เอนไซม์ วัตถุดิบที่ใช้ต้องมีความสด ไม่มีส่วนที่เน่าเสีย ในการสกัดต้องหลีกเลี่ยง หรือลดการเกิดออกซิเดชัน โดยการเติมสารแอนติออกซิแดนต์ เช่น BHT (butylated hydroxytoluene), BHA (butylated hydroxyanisole) และ alkaline carbonate ในกระบวนการสกัด ก่อนทำการสกัดต้องทำขึ้นส่วนที่จะสกัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ หรือบดเป็นผงเพื่อให้ง่ายต่อการสกัด ถ้าเป็นตัวอย่างของผักที่มีเอนไซม์ไลพอกซิจีเนส (lipoxygenase) เป็นส่วนประกอบต้อง

ลวกก่อนทำการสกัด ในเนื้อเยื่อสดมีส่วนประกอบของน้ำอยู่สูงจึงละลายในน้ำได้ดี และแคโรทีนอยด์ยังสามารถสกัดได้ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ได้หลายชนิด เช่น acetone, methanol, ethanol, hexane, diethyl ether หรือจะผสมตัวทำละลายระหว่าง acetone และ methanol ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของวัตถุดิบ และในการสกัดควรทำอย่างรวดเร็ว เพื่อลดการเสื่อมของแคโรทีนอยด์ที่เกิดจากเอนไซม์หรือออกซิเจน (Gross, 1991) ซึ่ง Rodriguez-Amaya and Kimura (2004) รายงานไว้ว่าการสกัดแคโรทีนอยด์นั้นควรมีการใช้ตัวทำละลายที่สามารถระเหยได้ มีจุดเดือดต่ำ เช่น petroleum ether มีจุดเดือดอยู่ช่วง 35-60 องศาเซลเซียส acetone, methanol และ ethanol ในการสกัดแคโรทีนอยด์จากเนื้อเยื่อพืชควรจะทำให้เนื้อเยื่อถูกทำลายหรือแตกออก ซึ่งในงานทดลองของ Rodriguez-Amaya and Kimura (2004) ได้มีการทำเนื้อเยื่อพืชให้เป็นเนื้อเดียวกัน (homogenization) ในตัวทำละลายด้วยเครื่องปั่นไฟฟ้า (electric blender) ถ้าตัวอย่างที่มีปริมาณน้อยอาจทำการบด (grind) เนื้อเยื่อในอะซิโตนด้วยทรายสะอาด ซึ่งประสิทธิภาพการสกัดอาจไม่ดีนัก ในทางการค้ายิยมการปั่น (agitation) ด้วยตัวทำละลายเย็นแต่บางครั้งการใช้ตัวทำละลายร้อนอาจมีประสิทธิภาพที่ดีกว่า และสามารถสกัดซ้ำได้จากการกรองของแข็งที่เหลืออยู่ ส่วนใหญ่ทำซ้ำ 2-3 ครั้ง สำหรับอุตสาหกรรมการสกัดขนาดใหญ่ ตัวทำละลายที่นำมาสกัดควรมีความเข้มข้นสูง (Henry, 1996)

สารแคโรทีนอยด์สามารถดูดกลืนแสงได้หลายช่วงความยาวคลื่นที่ขึ้นอยู่กับจำนวนพันธะคู่ที่เชื่อมต่อกัน (conjugated double bonds) และชนิดของสารทำละลาย ดังนั้นการจำแนกชนิดของแคโรทีนอยด์ควรใช้สารละลายมากกว่า 1 ชนิด (Goodwin, 1967) วิธีการวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ซึ่งนิยมกันอย่างแพร่หลายมี 2 วิธี คือการวิเคราะห์สารด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) และวิธีการวิเคราะห์สารด้วยการวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer (Rao *et al.*, 1998)

3.1 การวิเคราะห์สารแคโรทีนอยด์ ไลโคพีน และเบต้าแคโรทีนด้วยเครื่อง Spectrophotometer

เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ คือ การดูดกลืนแสงหรือการส่องผ่านของแสง โดยที่สารบริสุทธิ์จะต้องมีคุณสมบัติในการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวช่วงหนึ่งหรือหลายช่วงคลื่น ซึ่งขึ้นกับโครงสร้างของสารแต่ละชนิด เครื่อง UV-Vis Spectrophotometer สามารถวัดในช่วงคลื่น 200-800 นาโนเมตร ซึ่งอยู่ในช่วงของรังสีอัลตราไวโอเลตและวิสิเบิล สามารถจำแนกชนิดของสารได้เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงสถานะของอิเล็กตรอนวงนอกสุด (valence electron) โดยเกิดจากการที่สารอินทรีย์ดูดกลืนรังสีอัลตราไวโอเลตหรือวิสิเบิลเข้าไป ทำให้อิเล็กตรอนของสารอินทรีย์เปลี่ยนสถานะไป ซึ่งการเปลี่ยนสถานะก็จะแตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดของสารอินทรีย์ที่ให้พลังงานในการเกิดเป็นแถบที่ดูดกลืนแสงต่างที่ความยาวคลื่นแตกต่างกัน (Owen, 1996)

ส่วนประกอบหลักของเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer ประกอบด้วย

1. แหล่งกำเนิดแสง (light source) นิยมใช้อยู่ 2 แหล่ง คือ แหล่งกำเนิด

แสงจากหลอดดีวเทอเรียสำหรับวัดช่วงแสงยูวี (160-360 นาโนเมตร) และหลอดทังสเตน สำหรับวัดช่วงคลื่นอัลตราไวโอเลตถึงวิสิเบิล (200-800 นาโนเมตร)

2. Monochromator คือ ส่วนที่ทำหน้าที่ในการแยกองค์ประกอบของแสงที่มีความยาวคลื่นต่อเนื่องให้กลายเป็นลำแสงที่มีความยาวคลื่นเดียว

3. ที่บรรจุสารตัวอย่าง

4. เครื่องวิเคราะห์ความถี่ (frequency analyzer)

5. เครื่องตรวจวัด (detector)

3.2 การวิเคราะห์สารด้วยโครมาโทกราฟฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

เครื่องโครมาโทกราฟฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) เป็นเครื่องมือใช้สำหรับการแยกสารประกอบที่สนใจที่ผสมอยู่ในตัวอย่าง โดยกระบวนการแยกสารประกอบที่สนใจจะเกิดขึ้นระหว่างเฟส 2 เฟส คือ เฟสอยู่กับที่ (stationary phase) หรือ คอลัมน์ (column) กับเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ซึ่งจะถูกแยกออกมาในเวลาที่แตกต่างกันโดยสารที่ถูกแยกออกมาได้นี้จะถูกตรวจวัดสัญญาณด้วยตัวตรวจวัดสัญญาณ (detector) และสัญญาณที่บันทึกได้จากตัวตรวจวัดจะมีลักษณะเป็นพีค เรียกว่า โครมาโตแกรม (chromatogram) (Jones, 1991; ชูชาติ, 2544) ซึ่งในการวิเคราะห์ HPLC สามารถตรวจวัดได้ทั้งเชิงคุณภาพ (qualitative analysis) และเชิงปริมาณ (quantitative analysis) โดยการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ส่วนใหญ่นิยมใช้วิเคราะห์สารประกอบที่ระเหยยาก (low volatile substitution) หรือมีน้ำหนักโมเลกุลสูง (high molecular weight compounds) ซึ่งการแยกสารเป็นผลจากแรงที่เกิดขึ้นระหว่างโมเลกุลของสารกับโมเลกุลของเฟส ซึ่งแรงที่เกิดขึ้นเป็นแรงจากสมบัติทางเคมีและกายภาพระหว่างสารกับเฟสทั้งสอง เทคนิคนี้มีข้อดี คือ ทำให้สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้หลายชนิด เครื่องมือเป็นแบบอัตโนมัติ วิเคราะห์ปริมาณได้ง่าย ให้ผลเร็ว แม่นยำและมีประสิทธิภาพสูง แต่มีข้อเสีย คือ ราคาค่อนข้างแพงต้องใช้ความรู้และความชำนาญสูงในการวิเคราะห์ (ศักดิ์สิทธิ์, 2541)

ส่วนประกอบหลักของเครื่อง HPLC ประกอบด้วย

1. Mobile phase / Solvent (Reservoir): ตัวทำละลายที่ใช้ในการชะหรือแยกตัวอย่าง เป็นเฟสเคลื่อนที่ มีลักษณะเป็นของเหลว ทำหน้าที่ในการนำสารตัวอย่างและตัวทำละลายเข้าสู่เฟสที่อยู่กับที่ที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ ซึ่งกระบวนการแยกจะเกิดขึ้นภายในคอลัมน์

2. Pump: ทำหน้าที่ดึงตัวทำละลายซึ่งทำหน้าที่เป็นเฟสเคลื่อนที่เข้าสู่ระบบ HPLC

3. Injector/autosampler: ทำหน้าที่ในการฉีดสารตัวอย่างเข้าระบบ HPLC

4. Column: ภายในบรรจุด้วยเฟสที่อยู่กับที่ มีลักษณะเป็นของแข็งหรือเจล ทำให้เกิดกระบวนการแยกองค์ประกอบของสารที่สนใจ โดยกระบวนการแยกเกิดขึ้นระหว่างเฟสที่เคลื่อนที่ กับเฟสที่อยู่กับที่

5. Detector เป็นตัวตรวจวัดสัญญาณ ทำหน้าที่ในการตรวจวัดสัญญาณของสารที่สนใจที่ได้จากกระบวนการแยก ซึ่งเครื่องนี้มี Detector 3 ชนิด คือ Photodiode array Detector, Fluorescence Detector และ Refractive index Detector (ชูชาติ, 2544)

3.3 ความสัมพันธ์ระหว่างการวัดปริมาณไลโคพินและเบต้าแคโรทีนด้วย HPLC และ Spectrophotometer

การวิเคราะห์ปริมาณสารไลโคพินนั้นมีวิธีที่นิยมอย่างแพร่หลาย 2 วิธี คือการวิเคราะห์สารด้วยโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) และวิธีการวิเคราะห์สารด้วยการวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer โดยทำการศึกษาเปรียบเทียบการวิเคราะห์ไลโคพินในมะเขือเทศและผลิตภัณฑ์มะเขือเทศโดยใช้เทคนิค HPLC และ Spectrophotometer พบว่า ปริมาณสารไลโคพินให้ผลที่แตกต่างกันเฉลี่ยเพียง 11 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น ซึ่งการวิเคราะห์สารไลโคพินโดยใช้ Spectrophotometer เป็นเทคนิคที่ง่ายและรวดเร็วกว่าเทคนิค HPLC ซึ่ง HPLC เทคนิคนี้มีประสิทธิภาพในการแยกสารและบ่งชี้สารที่ต้องการวิเคราะห์ได้ดีกว่าและมีราคาแพงกว่า แต่เป็นเทคนิคที่เหมาะสมกับการวิเคราะห์ที่ทำเป็นประจำและต้องการผลที่รวดเร็ว ดังนั้นการเลือกใช้วิธีการวิเคราะห์จึงขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของงานทดลอง (Rao *et al.*, 1998)

Meléndez-Martínez. (2011) ได้ทำการศึกษาหาวิธีการที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารแคโรทีนอยด์จากน้ำผลไม้ที่มีสีส้ม โดยใช้สารสกัดคือ hexane/methanol/acetone ในอัตราส่วน 50:25:25 (v/v/v) รวมกับ 0.1% BHT ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง แล้วนำไปกำจัดน้ำโดยเติม ethanolic KOH (10% w/v) ภายใต้อุณหภูมิห้องและห้องที่ไฟสลัว แล้วล้างน้ำ 4 ครั้ง แล้วนำไประเหยน้ำออกให้แห้ง หลังจากนั้นเติม acetone:methanol (1:2 v/v ที่มี 0.1% BHT) แล้วนำการวิเคราะห์สารแคโรทีนอยด์ด้วย HPLC ในช่วงคลื่นแสงที่แตกต่างกันและพื้นที่หลังต่างกัน คือ 420, 455, 515, 545 และ 610 นาโนเมตรโดยมีพื้นที่หลังเป็นสีขาว ส่วนที่ความยาวคลื่น 420, 445, 510, 545 และ 605 นาโนเมตรพื้นที่หลังเป็นสีดำ พบว่ามีความสัมพันธ์ที่ดี เนื่องจากมีค่า $R = 0.94$ และ 0.90 ตามลำดับ ซึ่งจากการศึกษาสามารถนำไปใช้ควบคุมคุณภาพและปริมาณสารแคโรทีนอยด์ในการทำผลิตภัณฑ์เชิงอุตสาหกรรม หรือในการสร้างผลิตภัณฑ์เชิงการเกษตรได้อีกด้วย

Kubola *et al.* (2011) เตรียมตัวอย่างผักข้าวในระยยะผลอ่อน (ผลสีเขียว) ระยยะผลแก่ (ผลสีเหลือง) ระยยะผลสุก (ผลสีแดง) โดยใช้สารตัวทำละลายหรือสารสกัดคือ hexane/acetone/ethanol ในอัตราส่วน 50 ml: 25 ml: 25 ml ใช้ตัวอย่าง 0.2 กรัม เติมสารสกัดที่เตรียมไว้ 15 ml เติมน้ำสะอาดลงในหลอดสกัดเพื่อล้างเอา acetone และ ethanol สารสกัดจะแยกชั้น จากนั้นนำสารสกัดที่อยู่ส่วนบนมา 10 ml. นำไประเหยให้แห้ง โดยวิธี evaporated เมื่อแห้งแล้วเติม hexane 4 ml แล้วกรองผ่าน membrane filters $0.45\ \mu\text{m}$ ปริมาณ $20\ \mu\text{m}$ นำไปตรวจวัดด้วย HPLC ที่ความยาวคลื่น 475 nm. พบว่าปริมาณสารไลโคพินและเบต้าแคโรทีนสูงที่สุด คือ เยื่อหุ้มเมล็ดที่มีสีแดงมี ส่วนในเปลือกที่มีสีเหลืองจะพบว่ามีปริมาณของสารลูทีนสูงที่สุด

Nhung *et al.* (2010) นำผักขำระยะผลอ่อน ระยะสุกปานกลาง และระยะสุกแก่ เต็มที่ถูกเก็บไว้ 1 และ 2 สัปดาห์แล้วนำเยื่อสดมา 0.2 กรัม บดกับ Magnesium carbonate (MgCO_3) 15 ml ทำซ้ำกัน 3 ครั้งจนกว่าสีของเยื่อผักขำจะซีดจางลง จากนั้นล้างด้วยโซเดียมคลอไรด์ 3 ครั้ง เมื่อสารสกัดแยกชั้นกันแล้วก็นำสารสกัดส่วนที่อยู่ชั้นบนไประเหยให้แห้ง (evaporated) เมื่อสารสกัดแห้งแล้วให้เติมสารตัวทำละลาย Dichloromethane และ Methanol (6:4) 10 ml และปรับปริมาตรด้วย acetonitrile 20 ml จากนั้นนำไปวิเคราะห์ HPLC 20 μl ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร พบว่าผักขำที่สุกเต็มที่เก็บไว้เป็นเวลา 1 สัปดาห์มีสารไลโคพีนสูงสุดอยู่ที่ 3.728 mg/g fresh weight สารไลโคพีนและเบต้าแคโรทีนสูงสุดอยู่ที่ 0.379 mg/g fresh weight ส่วนในผักขำที่ถูกเก็บไว้เป็นเวลา 2 สัปดาห์ มีปริมาณของสารไลโคพีนและเบต้าแคโรทีนอยู่ในปริมาณต่ำ

Aoki *et al.* (2002) ชั่งเยื่อหุ้มเมล็ดผักขำ 10 กรัม/น้ำหนักสด แล้วบดโดยใช้ hexane เป็นสารตัวทำละลายหรือสารสกัด ซึ่งใช้ hexane ในปริมาณ 4 เท่าของเยื่อ บดจนสีของเยื่อหุ้มเมล็ดผักขำมีสีซีดจางลง จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปใส่ในกรวยแยก แล้วเติม diethyl ether ในปริมาณ 4 เท่าของเยื่อ จากนั้นล้างด้วยโซเดียมคลอไรด์ 3 ครั้งซึ่งสารสกัดที่อยู่ในกรวยแยกจะเกิดการแยกชั้นกัน เติม dichloromethane 4 ml จากนั้นนำเอาสารสกัดที่อยู่ชั้นไประเหยให้แห้ง (evaporated) เมื่อสารสกัดแห้งแล้วให้เติม diethyl ether และปรับปริมาตรด้วย acetonitrile 20 ml จากนั้นนำไปวิเคราะห์ HPLC พบว่าในเยื่อหุ้มเมล็ดที่มีสีแดงมีปริมาณสารไลโคพีน 380 $\mu\text{g/g}$ เบต้าแคโรทีน 101 $\mu\text{g/g}$ ซึ่งสูงกว่าส่วนของเนื้อผักขำที่มีสีเหลือง ที่มีปริมาณสารไลโคพีนเพียง 22.2 $\mu\text{g/g}$ และมีเบต้าแคโรทีน 0.9 $\mu\text{g/g}$

Vuong *et al.* (2006) วิเคราะห์ปริมาณสารแคโรทีนอยด์ในผักขำ โดยใช้เยื่อหุ้มเมล็ด 0.05-0.075 กรัม/น้ำหนักแห้ง ใช้ tetrahydrofuran (THF) สกัด 3 ครั้ง จนสีเยื่อหุ้มเมล็ดซีดจาง แล้วสกัดต่อด้วย hexane 3 ครั้ง แล้วเติมโซเดียมคลอไรด์เพื่อไปล้างสารสกัด เมื่อสารสกัดแยกชั้นให้นำสารสกัดที่อยู่ชั้นบนซึ่งเป็นส่วนของสารเฮกเซนไปวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ด้วย HPLC ที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร พบว่าในเยื่อหุ้มเมล็ดมีแคโรทีนอยด์ทั้งหมดในปริมาณ 497 ไมโครกรัม/กรัม ซึ่งมีไลโคพีนอยู่ในปริมาณ 408 ไมโครกรัม/กรัม และเบต้าแคโรทีนปริมาณ 83 ไมโครกรัม/กรัม

Ishida *et al.* (2004) นำเยื่อผักขำมา 0.2 กรัม น้ำหนักสด ผสมกับสารตัวทำละลาย hexane/2 propanol (8:2 v/v) เติม BHT 50 $\mu\text{g/ml}$ แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 30 นาที จากนั้นนำไปแช่เย็น (shocking) 10 นาที แล้วล้างด้วยโซเดียมคลอไรด์ 3 ครั้ง นำเอาสารสกัดที่อยู่ชั้นไประเหยให้แห้ง โดยใช้แก๊สไนโตรเจน เมื่อสารสกัดแห้งแล้วให้เติม diethyl ether และปรับปริมาตรด้วย acetonitrile 20 ml. จากนั้นนำไปวิเคราะห์ HPLC พบว่าเยื่อหุ้มเมล็ดประกอบด้วยไลโคพีนทั้งหมด 1546.5 - 3053.6 ไมโครกรัม/กรัม น้ำหนักสด ปริมาณเบต้าแคโรทีนทั้งหมด 636.2 - 836.3 ไมโครกรัม/กรัม น้ำหนักสด

3.4 การศึกษาสหสัมพันธ์ของสารแคโรทีนอยด์และค่าสี

สีมีความสำคัญที่บ่งบอกถึงคุณภาพและคุณสมบัติทางกายภาพของผลิตภัณฑ์อาหาร การมองเห็นสีของอาหาร เกิดจากรงควัตถุชนิดต่างๆ ในอาหาร ซึ่งรงควัตถุชนิดต่างๆ มีความสามารถในการสะท้อนแสงออกมาในช่วงความยาวคลื่นที่กระตุ้นให้เรตินาที่อยู่ในตาของคนเรามองเห็น อยู่ในช่วง 380-780 นาโนเมตร ขึ้นอยู่กับจำนวนพันธะคู่ที่เชื่อมต่อกัน (conjugated double bonds) ในโครงสร้างและชนิดของสารทำละลายที่ใช้ ในขณะเดียวกันแคโรทีนอยด์มีการดูดกลืนแสงที่คลื่นแตกต่างกันขึ้นอยู่กับโครงสร้างและชนิดของตัวทำละลาย การแปรรูปหรือการสกัดมีผลต่อโครงสร้างแคโรทีนอยด์แตกต่างกัน ซึ่งจะส่งผลให้แคโรทีนอยด์มีการดูดกลืนแสงที่แตกต่างกัน (Moore *et al.*, 1995)

การวัดค่าสีสามารถวัดได้ 3 ระบบ คือระบบ CIEXYZ (1931) ระบบ Hunter Lab (1958) และระบบ CIELAB (1976) ซึ่งเป็นระบบที่นิยมใช้ในปัจจุบัน (Pomeranz and Meloan, 1994) ระบบ CIELAB ประกอบด้วยค่า L^* (lightness) แสดงค่าความสว่าง ตั้งแต่ 0-100 (สีดำเท่ากับ 0 และสีขาวเท่ากับ 100) ค่า a^* (red) แสดงความสัมพันธ์ของสีแดง/สีเขียว ($a^*+/-$) ค่า b^* (yellow) แสดงความสัมพันธ์ของสีเหลือง/สีน้ำเงิน ($b^*+/-$) ค่า C^* (Chroma) ค่าความเข้มของสี ($a^{*2}+b^{*2}$)^{1/2} และค่า h^* ค่าองศาของสี (hue angle = $\tan^{-1} (b^*/a^*)$) (Macdougall, 2002)

Batu (2004) รายงานค่าสีของผลมะเขือเทศสด มีค่า a^* / b^* อยู่ในช่วง 0.95-1.21 และ Shalin *et al.* (2004) รายงานผลการศึกษาค่าสีของผลมะเขือเทศสด 2 พันธุ์ พบว่ามีค่า a^* เท่ากับ 24.1 และ 23.1 ค่า b^* เท่ากับ 20.5 และ 16.8 และค่า a^* / b^* เท่ากับ 1.2 และ 1.4 สำหรับพันธุ์ Aranca และ Excell ตามลำดับ

เปรมศิริ และรณชัย (2554) ได้ศึกษาวัดค่า L^* a^* b^* ของผลิตภัณฑ์ด้วยเครื่องวัดสี Colorimeter ยี่ห้อ Minolta รุ่น CR-400 โดยค่า L^* เป็นค่าความสว่าง (lightness) a^* เป็นค่าสีแดงและสีเขียว (redness/greenness) และ b^* เป็นค่าสีเหลืองและสีน้ำเงิน (yellowness/blueness)

L^* คือค่าความสว่าง มีค่าอยู่ในช่วง 0 ถึง 100

a^* คือค่าสีแดงและสีเขียว เมื่อ a^* มีค่าบวกเป็นสีแดง และเมื่อ a^* เป็นค่าลบเป็นสีเขียว

b^* คือค่าสีเหลืองและสีน้ำเงิน เมื่อ b^* มีค่าบวกเป็นสีเหลือง และเมื่อ b^* เป็นค่าลบเป็นสีน้ำเงิน

ก่อนการวัดสีทุกครั้งต้องปรับมาตรฐานเครื่อง (calibration) โดยใช้แผ่นสีขาวมาตรฐาน (white blank; $Y = 93.60$, $x = 0.3162$ และ $y = 0.3326$) แล้วจึงวัดค่าสีตัวอย่าง โดยนำตัวอย่างน้ำผักขาว 20 ml ใส่ใน Plate หรือถาดพลาสติกใส แล้วทำการวัดค่าสีในระบบ CIE $L^*a^*b^*$ เพื่อกำหนดค่า Hue (H°) จากสูตร $Hue = \arctan (b^*/a^*)$ และค่า Chroma (C^*)

$$\text{จากสูตร Chroma} = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2}$$

โดยนำตัวอย่างเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าว 3 กรัม ใส่ใน Plate พลาสติกใสทำ 4 ซ้ำ แล้วทำการวัดค่าสีในระบบ CIE $L^*a^*b^*$ เพื่อคำนวณหาค่า Hue (H°) จากสูตร $Hue = \arctan(b^*/a^*)$ และค่า Chroma (C^*) (ดัดแปลงจาก เปรมศิริ และธณชัย, 2554)

Hue (H°) ซึ่งเป็นตัวเลขที่ระบุว่าสีมีตำแหน่งอยู่ที่ใดในกราฟมีหน่วยเป็นองศาตามสูตร

$$h^\circ = \tan^{-1}(b^*/a^*) \text{ -----(1)}$$

เมื่อ $h^\circ = 90^\circ$ แสดงว่าเป็นสีเหลือง

$h^\circ = 180^\circ$ แสดงว่าเป็นสีเขียว

$h^\circ = 270^\circ$ แสดงว่าเป็นสีน้ำเงิน

$h^\circ = 0^\circ$ แสดงว่าเป็นสีแดง

คำนวณค่า C^* (Chroma) ซึ่งเป็นตัวเลขที่แสดงถึงความอิ่มตัวของสีตามสูตร

$$C^* = [(a^*)^2 + (b^*)^2]^{1/2} \text{ -----(2)}$$

Seroczynska *et al.* (2006) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสีดอก winter squash กับปริมาณสารแคโรทีนอยด์และเบต้าแคโรทีนที่มีอยู่ใน Squash ผลสด เพื่อนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ Squash ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารแคโรทีนอยด์ โดยใช้ spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร และการวัดสีดอกด้วยเครื่องวัดสี จากนั้นคำนวณหาค่าสมการ จากสมการ CIE $L^*a^*b^*$ และโดย ค่า a^* แสดงค่าความสัมพันธ์ของแคโรทีนอยด์ทั้งหมด และค่าของเบต้าแคโรทีน ซึ่งและค่า a^* มีค่าความสัมพันธ์ที่สูงที่สุด จะมีความสัมพันธ์กับค่า b^* ที่ต่ำ ซึ่งจากการคำนวณโดยแทนค่าในสมการ $L^*a^*b^*$ ก็พบว่า ความสัมพันธ์ของสีดอก Squash กับปริมาณสารแคโรทีนอยด์และเบต้าแคโรทีนที่มีอยู่ใน winter squash ผลสด ไม่มีความสัมพันธ์กัน หรือทั้งสองลักษณะนั้นเป็นอิสระต่อกันอธิบายได้ว่า สีของดอก Squash ที่มีสีเข้มๆไม่ได้หมายความว่า จะมีปริมาณแคโรทีนอยด์และเบต้าแคโรทีนอยด์ ที่จะต้องมีปริมาณมากตามไปด้วย และปริมาณของแคโรทีนอยด์และเบต้าแคโรทีนที่มีค่าสัมพันธ์สูงที่สุดเมื่อค่า b^* คือความเข้มของสี ค่า b^* มีค่าที่สูงที่สุด แสดงว่าความสัมพันธ์ของดอก winter squash มีความสัมพันธ์กับปริมาณแคโรทีนอยด์ในทางลบโดยมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

Rachel *et al.*, (2009) ศึกษาความสัมพันธ์ของ $L^*a^*b^*$ ระหว่าง ค่าพื้นที่สีของผล ฟักทองกับปริมาณสารแคโรทีนอยด์ ในฟักทองและ Squash เพื่อใช้ประเมินลักษณะปริมาณแคโรทีนอยด์และสามารถนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ฟักทองและ Squash โดยได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารแคโรทีนอยด์ ด้วยการใช้ HPLC แล้วคำนวณค่าสมการจากสมการ CIE $L^*a^*b^*$ พบว่า a^* มีค่า $r = 0.91$ และ b^* มีค่า $r = 0.87$ ซึ่งจากการศึกษาพบว่าสีและปริมาณของแคโรทีนอยด์มีความสัมพันธ์กัน

ซึ่งก็เป็นวิธีที่ง่าย และสามารถนำไปใช้เพื่อประเมินปริมาณสารแคโรทีนอยด์ในการคัดพันธุ์ของฟักทอง และ Squash ได้ต่อไป

4. การถ่ายทอดลักษณะพันธุกรรมของสารไลโคปีนและเบต้าแคโรทีนในพืช

ความสามารถในการถ่ายทอดพันธุกรรม (heritability) หมายถึง ความสามารถของยีนในการแสดงออกของลักษณะที่ควบคุมด้วยยีนนั้นๆ จากรุ่นหนึ่งไปยังอีกรุ่นหนึ่ง (กฤษฎา, 2546) ซึ่งลักษณะทางปริมาณนั้นถูกควบคุมด้วยยีนจำนวนมากมีผลกระทบจากปัจจัยภายในและปัจจัยภายนอกสูง ทำให้การแสดงออกของยีนโดยรวมมีความแปรปรวนสูงจากรุ่นหนึ่งไปยังอีกรุ่นหนึ่ง ดังนั้นความสามารถในการถ่ายทอดพันธุกรรมในลักษณะปริมาณ แบ่งออกเป็น 2 แบบ ได้แก่ ค่าอัตราพันธุกรรมแบบกว้าง (broad sense heritability, H^2) และ ค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบ (narrow sense heritability, h^2) โดยค่าอัตราพันธุกรรมแบบกว้าง คืออัตราส่วนระหว่างความแปรปรวนทางพันธุกรรมทั้งหมดต่อความแปรปรวนที่สังเกตได้ทั้งหมด การตรวจวัดความแปรปรวนทางพันธุกรรมนี้จะมีทั้งพันธุกรรมที่ไม่ใช่ผลบวกและเป็นผลบวก สำหรับพันธุกรรมที่ไม่ใช่ผลบวกสามารถคาดการณ์ได้ยากเพราะปฏิสัมพันธ์ของยีนแต่ละตัวสามารถเปลี่ยนไปได้เมื่อรวมกับยีนที่ต่างกัน ส่วนพันธุกรรมที่เป็นผลบวกสามารถคาดการณ์ได้สูงเพราะลักษณะของลูกจะอยู่กึ่งกลางระหว่างพ่อกับแม่เสมอ และสำหรับค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบ คือเป็นค่าพันธุกรรมที่คำนวณได้จากอัตราส่วนระหว่างความแปรปรวนเนื่องจากอิทธิพลของยีนแบบบวกต่อความแปรปรวนที่สังเกตได้ทั้งหมด นิยมประเมินเพื่อศึกษาปฏิกริยาของยีนที่เป็นผลบวก (additive gene action) (กฤษฎา, 2546) ดังนั้นอัตราพันธุกรรมจึงเป็นตัวกำหนดความสำเร็จของนักปรับปรุงพันธุ์ ซึ่งนักปรับปรุงพันธุ์สามารถเพิ่มหรือลดลักษณะนั้นๆ ได้น้อยเพียงไร และความแปรปรวนยังขึ้นอยู่กับความถี่และปฏิกริยาของยีน อัตราพันธุกรรมจึงเป็นลักษณะเฉพาะตัวของประชากร ซึ่งมีประโยชน์ในการใช้วัดขนาดของความแปรปรวนทางพันธุกรรมเมื่อเปรียบเทียบกับความแปรปรวนทั้งหมดที่เกิดขึ้น สามารถทำนายความก้าวหน้าในการคัดเลือกหรือการตอบสนองต่อการคัดเลือกได้ (พีระศักดิ์, 2525)

Tomes *et al.* (1952) ศึกษาการปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศ 4 ชนิดที่เนื้อสีของแคโรทีนอยด์แตกต่างกัน ได้แก่ มะเขือเทศเนื้อสีแดง (*RRTTbb*), มะเขือเทศเนื้อสีเหลือง (*rrTTbb*) และมะเขือเทศ beta-orange (*RRTTBb*) ซึ่งทั้ง 3 ชนิดนี้มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงในเชิงปริมาณของสารไลโคปีนและเบต้าแคโรทีน ส่วนชนิดที่ 4 คือมะเขือเทศสีส้ม (*RRttbb*) ซึ่งเป็น zeta-carotene และ prolycopene เมื่อผสมพันธุ์แบบข้ามพ่อแม่ในมะเขือเทศทั้ง 4 ชนิดพบว่าได้ 6 พันธุ์ในรุ่น F_1 และในรุ่น F_2 ก็เห็นได้ว่าการกระจายตัวเพิ่มขึ้นของสีจากการควบคุมอย่างอิสระของยีน *R*, *B* และ *T* ซึ่งยีน *R* และ *T* จะมีการแสดงออกของยีนที่เด่นในทางเคมี ยีน *R* เป็นยีนที่ควบคุมการผลิตสารตั้งต้นแต่ไม่ทราบปริมาณ ส่วนยีน *T* เป็นยีนที่เปลี่ยนสีในระบบ Jubilee ซึ่งเป็นระบบของไลโคปีนและเบต้าแคโรทีน และยีน *B* เป็นตัวกำหนดสัดส่วนของไลโคปีนและเบต้าแคโรทีน ที่จะไปปรากฏที่ยีน *R* และ *T* ซึ่งในการกำหนดเม็ดสีเหล่านี้จะอยู่ที่ปริมาณและสัดส่วนของยีนที่ควบคุม ที่ได้แก่ *rrtt*

และ *rrtt* เมื่อเทียบกับ *RRTT* และ *RRtt* ในมะเขือเทศสีเนื้อที่มีสีแดง ซึ่งเป็นสีของสารไลโคปีนเป็นสารพฤษเคมีที่สำคัญ แต่สารเบต้าแคโรทีน (สีส้ม) ยังคงปริมาณของมีเพียงเล็กน้อย ทั้งนี้การที่มะเขือเทศจะเปลี่ยนสีไปเป็นสีแดง หรือสีส้มขึ้นจะอยู่กับพื้นฐานการควบคุมของยีน B

Stommel และ Haynes (1994) ศึกษาการถ่ายทอดลักษณะของสารเบต้าแคโรทีนและไลโคปีนในมะเขือเทศที่ศึกษาจากประชากร F_1 , F_2 และ BC_1 ซึ่งเกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างมะเขือเทศที่มีผลเป็นสีส้มที่เป็นพันธุ์ป่า คือ *Lycopersicon cheesmann* Riley. กับ มะเขือเทศพันธุ์ *L. esculentum* Mill. ซึ่งมีการคัดแยกสีของผลไม้และเปอร์เซ็นต์ของเบต้าแคโรทีนที่สมดุลกัน ของประชากร F_1 , F_2 และ BC_1 ที่อาจจะมียูนิคของการแสดงออกของยีนเด่น ที่มีเปอร์เซ็นต์ของเบต้าแคโรทีนที่สูง และพบว่าในมะเขือเทศสีส้มมีเปอร์เซ็นต์เบต้าแคโรทีนสูง พบว่าปริมาณไลโคปีนและเบต้าแคโรทีน ในรุ่น พ่อ-แม่ F_1 , F_2 และประชากร BC_1 ที่ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่าง *L. esculentum* (P_1) x *L. cheetmanii* (P_2) พบว่า ในผลมะเขือเทศสีส้มมีปริมาณเบต้าแคโรทีนที่มีเปอร์เซ็นต์สูง พบในพันธุ์ป่า *L. esculentum* ซึ่งใช้เป็นพันธุ์พ่อ-แม่ ส่วน *L. cheetmanii* มีความโดดเด่นของไลโคปีนที่มีสีแดงมากกว่า ซึ่งในการถ่ายทอดลักษณะเบต้าแคโรทีนในมะเขือเทศพันธุ์ *L. cheetmanii* ที่ถูกควบคุมด้วยยีน B เช่นเดียวกับ มะเขือเทศพันธุ์ *L. hirsutum* ที่การเปลี่ยนแปลงสีแคโรทีนอยด์ ที่จะส่งผลต่อปริมาณไลโคปีนและเบต้าแคโรทีน ซึ่งทั้งหมดนี้เกิดจากการการควบคุมของยีนอย่างอิสระจากพันธุกรรม

Cuevas et al., (2010) ศึกษาการถ่ายทอดลักษณะเบต้าแคโรทีนในสีเนื้อของแตงกวา (*Cucumis sativus* L.) โดยศึกษาจากแตงกวาพันธุ์ 'EOM 402-10' ที่มีเบต้าแคโรทีนสูง (มีเนื้อสีส้ม: P_2) ผสมพันธุ์กับแตงกวาพันธุ์ 'Gy7' ที่ไม่มีเบต้าแคโรทีน (มีเนื้อสีขาว: P_1) เพื่อศึกษาลักษณะการถ่ายทอดเบต้าแคโรทีนที่ mesocarp และ endocarp ของผลที่จะแสดงในรุ่นพ่อ-แม่ และรุ่นลูก (F_1 , F_2 , BC_1P_1 , and BC_1P_2) ภายใต้สภาพโรงเรือน พบว่า F_1 และ BC_1P_1 สีที่ mesocarp ของผลผลิตที่ได้ คือ สีขาว สีเขียวอ่อน และสีเขียว ($0.01-0.02 \mu\text{g g}^{-1}$ beta-carotene) ส่วนใน F_2 และ BC_1P_2 สีที่ mesocarp ของผลผลิตที่ได้มี คือ สีขาว สีเขียว สีเหลือง ($0.01-0.34 \mu\text{g g}^{-1}$ beta-carotene), และสีส้ม ($1.90-2.72 \mu\text{g g}^{-1}$ beta-carotene). สำหรับ mesocarp และ endocarp ในรุ่น F_2 มีสัดส่วนของเบต้าแคโรทีนที่ต่ำ ต่อเบต้าแคโรทีนที่สูง อยู่ที่ 15:1 ($0.01-0.34 \mu\text{g g}^{-1}$ beta-carotene: $1.90-2.72 \mu\text{g g}^{-1}$ beta-carotene) และ 3:1 ตามลำดับ และในขณะเดียวกันปริมาณเบต้าแคโรทีน mesocarp และ endocarp ในรุ่น BC_1P_2 พบว่ามีสัดส่วนของเบต้าแคโรทีนที่ต่ำ : เบต้าแคโรทีนที่สูง อยู่ที่ 3:1 และ 1:1 ตามลำดับ จากการศึกษาสรุปได้ว่าลักษณะการถ่ายทอดปริมาณเบต้าแคโรทีนที่ mesocarp ถูกควบคุมด้วยยีนด้อย 2 คู่ การถ่ายทอดปริมาณเบต้าแคโรทีนที่ endocarp ถูกควบคุมด้วยยีนด้อย 1 คู่ และจากการวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอ (single marker) ในรุ่น F_2 พบว่ามีการใช้ยีน Phytoene synthase ในการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ ซึ่งจะเห็นได้ว่ายีนและการเปลี่ยนแปลงของเบต้าแคโรทีนสามารถพบได้ทั้งใน mesocarp และ endocarp

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

การทดลองในครั้งนี้เป็นการศึกษาถึงพันธุกรรมการถ่ายทอดลักษณะปริมาณสารไลโคปีน และเบต้าแคโรทีน ของฟักข้าว และทำการประเมินวิธีการที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารไลโคปีน และเบต้าแคโรทีนในประชากรฟักข้าวลูกผสม และหาความสัมพันธ์ (ค่าสหสัมพันธ์ correlation coefficient) ของทั้งสองวิธีการวิเคราะห์ระหว่างวิธี Spectrophotometer และ HPLC

1. การเพาะเมล็ดฟักข้าว

ฟักข้าวลูกผสมจำนวน 30 คู่ผสม ที่มีความแตกต่างจากแหล่งที่มา ลักษณะของทรงผล รูปร่างใบ และปริมาณสารสำคัญ เพาะเมล็ดฟักข้าวในระหว่าง เดือนมกราคม 2556 ถึง มีนาคม 2556 โดยทำการทดลอง ณ หนองไม้ผล ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น นำเมล็ดลูกผสมทั้ง 30 คู่ผสม ไปอบในตู้อบภายใต้อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วแช่ในสารละลายอีทีฟอน ความเข้มข้น 3,000 ppm เป็นเวลา 12 ชั่วโมง (น้ำอ้อย และคณะ, 2554) นำเมล็ดมาเพาะลงในถุงเพาะชำขนาด 6x12 นิ้วโดยใช้วัสดุเพาะคือ ดิน:ปุ๋ยคอก:แกลบเผา อัตราส่วน 1:1:1 เมื่อเมล็ดงอกก็ย้ายต้นกล้าลงในถุงเพาะชำขนาด 6x12 นิ้วโดยใช้วัสดุเพาะคือ ดิน:ปุ๋ยคอก:แกลบเผา:แกลบดิบ อัตราส่วน 2:1:1:1 ทำการอนุบาลต้นกล้า 30 วัน แล้วจึงนำลงปลูกในแปลง

2. การเตรียมแปลงปลูก

โดยทำไถพรวนและยกแปลงปลูกขนาดกว้าง 0.8 เมตร ระยะห่างระหว่างแปลงปลูก 1.50 เมตร ระยะห่างระหว่างต้น 4 เมตร จำนวน 20 แปลง คลุมพื้นด้วยพลาสติกคลุมแปลง พร้อมทั้งทำค้ำแบบหลังคาโดยใช้ตาข่ายแดงสำหรับให้ฟักข้าวเกาะ

ตารางที่ 1 ฟักข้าวลูกผสมจำนวน 30 คู่ผสม จำนวน 196 ต้น

ลำดับที่	คู่ผสม	จำนวนต้น	ตัวผู้	ตัวเมีย
1	KKU ac.002/1 x KKU ac. 010 /1	7	3	4
2	KKU ac.002/3 x KKU ac.082/2	1	-	1
3	KKU ac.002/3 x KKU ac. 019/2	1	1	-
4	KKU ac.008/ 1 x KKU ac. 002/1	4	2	2
5	KKU ac.008/1x KKU ac.043/1	1	-	1
6	KKU ac.008/1 x KKU ac.087/1	2	1	1
7	KKU ac.012/1 x KKU ac.008/1	1	-	1
8	KKU ac.012/1 x KKU ac.019/1	3	2	1
9	KKU ac.016/2 x KKU ac.046/2	9	7	2
10	KKU ac.018/5 x KKU ac.050/4	3	2	1
11	KKU ac.021/1 x KKU ac.015/3	6	3	3
12	KKU ac.021/1x KKU ac.055/5	11	7	4
13	KKU ac.030/1 x KKU ac.094/1	4	2	2
14	KKU ac.050/1x KKU ac.060/1	7	5	2
15	KKU ac.055/5 x KKU ac.046/2	1	0	1
16	KKU ac. 077/1x KKU ac.008/1	9	3	6
17	KKU ac. 077/1x KKU ac.008-4	2	1	1
18	KKU ac. 077/1x KKU ac.010/1	7	4	3
19	KKU ac. 077/1x KKU ac.020/1	9	9	-
20	KKU ac. 077/1x KKU ac.049/1	4	1	3
21	KKU ac. 080/1x KKU ac.049/1	5	2	3
22	KKU ac. 080/1x KKU ac.093/1	8	3	5
23	KKU ac. 086/1x KKU ac.093/1	21	11	10
24	KKU ac.090/1x KKU ac.002/1	19	11	8
25	KKU ac. 090/1x KKU ac.087/1	8	6	2
26	KKU ac.094/1x KKU ac.008/1	1	-	1
27	KKU ac.094/1x KKU ac.008-4	1	-	1
28	KKU ac.094/1x KKU ac.093/1	8	2	6
29	KKU ac.12-161	1	-	1
30	KKU ac.11-134	32	12	20
	รวม	196	100	96

3. การปลูกผักข้าว

ปลูกผักข้าวด้วยการย้ายกล้าผักข้าวลูกผสมอายุ 2 เดือน ทั้งหมด 30 คู่ผสม จำนวน 160 ต้น (ตารางที่ 1) โดยใช้ระยะห่างระหว่างต้น 4 เมตร ในเดือนพฤษภาคม 2556

3.1 การดูแลรักษา

ฉีดพ่นปุ๋ยทางใบหลังปลูก 15 วัน ใส่ปุ๋ยสูตร 15-15-15 เมื่อผักข้าวอายุได้ 30 วัน หลังปลูก อัตรา 10 กรัมต่อต้น โดยโรยห่างจากโคนต้นประมาณ 10 เซนติเมตร กลบโคนต้นพร้อมกำจัดวัชพืช และพ่นปุ๋ยทางใบทุก 15 วัน อัตราการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคและแมลงตามความจำเป็น และให้น้ำโดยใช้ระบบน้ำหยดตลอดฤดูการปลูก

4. ข้อมูลที่ทำการตรวจวัด

การตรวจวัดข้อมูลโดยทำการเก็บผลผักข้าวลูกผสมจำนวน 1 ต้นๆ ละ 4 ผล (5 ซ้ำ)

4.1 ข้อมูลทางการเกษตร

- 1) น้ำหนักผลสดที่อายุเก็บเกี่ยว (ระยะ R6 = ผิวของผลเปลี่ยนสีเป็นสีแดง)
- 2) น้ำหนักเยื่อหุ้มเมล็ดที่อายุเก็บเกี่ยว (ระยะ R6 = ผิวของผลเปลี่ยนสีเป็นสีแดง)
- 3) ขนาดความยาว ความกว้างของผลผักข้าวที่อายุเก็บเกี่ยว (ระยะ R6 = ผิวของผลเปลี่ยนสีเป็นสีแดง)
- 4) จำนวนเมล็ดผักข้าวต่อผลหลังการเก็บเกี่ยวที่อายุเก็บเกี่ยว (ระยะ R6 = ผิวของผลเปลี่ยนสีเป็นสีแดง)

4.2 วิเคราะห์ปริมาณสารแคโรทีนอยด์ด้วยเครื่องวัดสี (Colorimeter: L, a, b)

วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) 4 ซ้ำ โดยทำการเก็บผลผักข้าวลูกผสม 4 ผลต่อต้น ทำการวัดค่าสีในระบบ CIE $L^*a^*b^*$ เพื่อคำนวณหาค่า Hue (H°) จากสูตร $Hue = \arctan(b^*/a^*)$ และค่า Chroma (C^*) โดยรายงานค่าที่อ่านได้เป็นค่า $L^* a^* b^*$ และ $L^* C^* h^*$ (ดัดแปลงจาก เปรมศิริ และธณชัย, 2554)

L^* คือ ค่าความสว่างโดยมีค่าตั้งแต่ 0-100

a^* คือ ค่าแสดงถึงความเป็นสีเขียวและสีแดงโดยหากค่าที่วัดได้อยู่ในช่วงเป็นลบ (-60-0) จะมีสีเป็นสีเขียวแต่หากค่าที่วัดได้อยู่ในช่วงเป็นบวก (0-60) จะมีความเป็นสีแดง

b^* คือ ค่าแสดงถึงความเป็นสีเหลืองและสีน้ำเงิน ในกรณีที่มียค่า b^* มีค่าเป็นบวก จะแสดงถึงความเป็นสีเหลือง หากค่า b^* เป็นลบจะแสดงถึงความเป็นสีน้ำเงิน

$$\text{จากสูตร Chroma} = \sqrt{(a^*^2) + (b^*^2)}$$

โดยนำตัวอย่างเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าว 3 กรัม ใส่ใน Plate พลาสติกใสทำ 4 ซ้ำ แล้วทำการวัดค่าสีในระบบ CIE $L^*a^*b^*$ เพื่อคำนวณหาค่า Hue (H°) จากสูตร $Hue = \arctan(b^*/a^*)$ และค่า Chroma (C^*) (ดัดแปลงจาก เปรมศิริ และรณชัย, 2554)

Hue (H°) ซึ่งเป็นตัวเลขที่ระบุว่ามีตำแหน่งอยู่ที่ใดในกราฟมีหน่วยเป็นองศาตามสูตร

$$h^\circ = \tan^{-1}(b^*/a^*) \text{ -----(1)}$$

เมื่อ $h^\circ = 90^\circ$ แสดงว่าเป็นสีเหลือง

$h^\circ = 180^\circ$ แสดงว่าเป็นสีเขียว

$h^\circ = 270^\circ$ แสดงว่าเป็นสีน้ำเงิน

$h^\circ = 0^\circ$ แสดงว่าเป็นสีแดง

คำนวณค่า C^* (Chroma) ซึ่งเป็นตัวเลขที่แสดงถึงความเข้มตัวของสีตามสูตร

$$C^* = [(a^*)^2 + (b^*)^2]^{1/2} \text{ -----(2)}$$

4.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารแคโรทีนอยด์รวม โลโคพิน และเบต้าแคโรทีน

วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) 4 ซ้ำ โดยทำการเก็บผลฟักข้าวลูกผสม 5 ผลต่อต้น ข้อมูลการตรวจวัดปริมาณสารสำคัญได้แก่ แคโรทีนอยด์ โลโคพิน และเบต้าแคโรทีน ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (thermo scientific รุ่น genesys) และเครื่อง HPLC (shimadzu รุ่น LC20A) โดยมีวิธีการตรวจวัดทั้งหมด 4 วิธี ดังรายละเอียดต่อไปนี้

1) วิธีการสกัดที่ 1 การใช้สาร Tetrahydrofuran สกัดและวิเคราะห์ด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (ดัดแปลงจาก Vuong *et al.*, 2006)

2) วิธีการสกัดที่ 2 n-hexane 95%: ethanol: DW (1.67 mL: 1 mL. 0.33 mL.) วิเคราะห์ด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (ดัดแปลงจาก Prasit, 2006)

3) วิธีการสกัดที่ 3 n-hexane 95%: ethanol: acetone (1.5 mL: 0.75 mL: 0.75 mL.) วิเคราะห์ด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (ดัดแปลงจาก Volker *et al.*, 2002)

4) การวิเคราะห์โดย HPLC (ดัดแปลงจาก Kubola *et al.*, 2011) ซึ่งจะกล่าวในรายละเอียดไว้ในหัวข้อ 4.4

4.4 การสกัดแคโรทีนอยด์ในเยื่อหุ้มเมล็ดของฟักข้าว

1) การเตรียมตัวอย่าง

โดยนำผลฟักข้าวสดมาผ่าเพื่อนำเมล็ดที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดที่มีสีแดงติดอยู่ มาแยกให้เยื่อหุ้มเมล็ดและเมล็ดออกจากกันโดยกรองกับกระชอน แล้วนำเอาเฉพาะส่วนของเยื่อหุ้มเมล็ดที่มีสีแดงมาชั่งน้ำหนัก 0.1 กรัม

2) การเตรียมสารตัวทำละลาย (solvents) แบ่งตามวิธีการสกัดและการวิเคราะห์ดังนี้

2.1) วิธีการสกัดที่ 1 tetrahydrofuran วิเคราะห์โดยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

2.2) วิธีการสกัดที่ 2 n-hexane 95%: ethanol: DW (1.67 ml: 1 ml: 0.33 ml) วิเคราะห์โดยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

2.3) วิธีการสกัดที่ 3 n-hexane 95%: ethanol: acetone (1.5 ml: 0.75 ml: 0.75 ml) วิเคราะห์โดยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

2.4) วิเคราะห์โดย HPLC

3) ขั้นตอนวิธีการสกัดที่ 1 tetrahydrofuran วิเคราะห์โดยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

3.1) ขั้นตอนการวิเคราะห์แคโรทีนอยด์

(1) นำตัวอย่างเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวที่ซั่งแล้ว 0.1 กรัม มาบดในโกรงโดยเติมสารตัวทำละลาย ethanol ลงไปเรื่อยๆ บดจนเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวละเอียดและเริ่มมีสีซีด

(2) นำตัวอย่างที่บดแล้วใส่ในหลอด facontube จากนั้นเติม tetrahydrofuran 1 มิลลิลิตร แล้วนำไป vortex (ความเร็วระดับ 6) 1 นาที จนเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวมีสีขาวซีด

(3) เติม n-hexane 95% 5 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดสารตัวอย่าง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

(4) ดูดสารสกัดตัวอย่างของเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวบริเวณชั้นบนมา 5 มิลลิลิตรแล้วปรับปริมาตร ด้วย n-hexane 95% 5 มิลลิลิตร

(5) ดูดสารสกัดที่ปรับปริมาตรแล้ว 0.3 มิลลิลิตร เติม n-hexane 95% 2.7 มิลลิลิตร เพื่อเจือจางสารสกัดก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

(6) คำนวณหาปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด โดยใช้สูตร $A = ECL$

3.2) ขั้นตอนการวิเคราะห์ไลโคพีน

(1) นำตัวอย่างเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวที่ซั่งแล้ว 0.1 กรัม มาบดในโกรงโดยเติมตัวทำละลาย ethanol ลงไปเรื่อยๆ บดจนเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวละเอียดและเริ่มมีสีซีด

(2) นำตัวอย่างที่บดแล้วใส่ในหลอด facontube จากนั้นเติม tetrahydrofuran 1 มิลลิลิตร แล้วนำไป vortex (ความเร็วระดับ 6) จนเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวมีสีขาวซีด

(3) เติม n-hexane 95% 5 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดสารตัวอย่าง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

(4) ดูดสารสกัดตัวอย่างของเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวบริเวณชั้นบนมา 5 มิลลิลิตรแล้วปรับปริมาตร ด้วย n-hexane 95% 5 มิลลิลิตร

(5) ดูดสารสกัดที่ปรับปริมาตรแล้ว 0.3 มิลลิลิตร เติม n-hexane 95% 2.7 มิลลิลิตร เพื่อเจือจางสารสกัดก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 470 และ 502 นาโนเมตร

(6) คำนวณหาปริมาณไลโคพีน ดังนี้ คำนวณหาปริมาณไลโคพีน โดยเทียบกับสมการเส้นตรงของสารมาตรฐาน และคำนวณหาปริมาณไลโคพีนโดยการหาอัตราส่วน ไลโคพีนกับเบต้าแคโรทีน ระหว่างความยาวคลื่น 470 และ 502 นาโนเมตร

3.3) ขั้นตอนการวิเคราะห์เบต้าแคโรทีน

(1) นำตัวอย่างเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวที่ซั่งแล้ว 0.1 กรัม มาบดใน โกรงโดยเติมสารตัวทำละลาย ethanol ลงไปเรื่อยๆ บดจนเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวละเอียดและเริ่มมีสีซีด

(2) นำตัวอย่างที่บดแล้วใส่ในหลอด facontube จากนั้นเติม tetrahydrofuran 1 มิลลิลิตร แล้วนำไป vortex (ความเร็วระดับ 6) จนเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวมีสีขาวซีด

(3) เติม n-hexane 95% 5 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดสารตัวอย่าง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

(4) ดูดสารสกัดตัวอย่างของเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวบริเวณชั้นบนมา 5 มิลลิลิตรแล้วปรับปริมาตร ด้วย n-hexane 95% 5 มิลลิลิตร

(5) ดูดสารสกัดที่ปรับปริมาตรแล้ว 0.3 มิลลิลิตร เติม n-hexane 95% 2.7 มิลลิลิตร เพื่อเจือจางสารสกัดก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

(6) คำนวณหาปริมาณเบต้าแคโรทีนโดยเทียบกับสมการเส้นตรงของสารมาตรฐาน

4) ขั้นตอนวิธีการสกัดที่ 2 สารตัวทำละลายคือ n-hexane 95%: ethanol: DW (1.67 ml: 1 ml : 0.33 ml)

4.1.) ขั้นตอนการวิเคราะห์แคโรทีนอยด์

(1) นำตัวอย่างเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวที่ซั่งแล้ว 0.1 กรัม มาบดใน โกรงโดยเติมสารตัวทำละลาย n-hexane 95%: ethanol: DW (1.67 ml: 1 ml : 0.33 ml) ลงไปเรื่อยๆ บดจนเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวละเอียดและมีสีซีด

(2) นำตัวอย่างที่บดแล้วใส่ในหลอด facontube จากนั้นเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตรนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

(3) ดูดสารสกัดตัวอย่างของเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวบริเวณชั้นบนมา 5 มิลลิลิตรแล้วปรับปริมาตร ด้วย n-hexane 95% 5 มิลลิลิตร

(4) ดูดสารสกัดที่ปรับปริมาตรแล้ว 0.3 มิลลิลิตร เติม n-hexane 95% 2.7 มิลลิลิตร เพื่อเจือจางสารสกัดก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

(5) คำนวณหาปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด โดยใช้สูตร $A=ECL$

4.2) ขั้นตอนการวิเคราะห์ไลโคพีน

(1) นำตัวอย่างเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวที่ซั่งแล้ว 0.1 กรัม มาบดในโกรงโดยเติมสารตัวทำละลาย n-hexane 95%: ethanol: DW (1.67 ml: 1 ml : 0.33 ml) ลงไปเรื่อยๆ บดจนเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวละเอียดและมีสีซีด

(2) นำตัวอย่างที่บดแล้วใส่ในหลอด facontube จากนั้นเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

(3) ดูดสารสกัดตัวอย่างของเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวบริเวณชั้นบนมา 5 มิลลิลิตรแล้วปรับปริมาตร ด้วย n-hexane 95% 5 มิลลิลิตร

(4) ดูดสารสกัดที่ปรับปริมาตรแล้ว 0.3 มิลลิลิตร เติม n-hexane 95% 2.7 มิลลิลิตร เพื่อเจือจางสารสกัดก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 470 และ 502 นาโนเมตร

(5) คำนวณหาปริมาณไลโคพีน ดังนี้ คำนวณหาปริมาณไลโคพีนโดยเทียบกับสมการเส้นตรงของสารมาตรฐาน และคำนวณหาปริมาณไลโคพีนโดยการหาอัตราส่วนไลโคพีนกับเบต้าแคโรทีน ระหว่างความยาวคลื่น 470 และ 502 นาโนเมตร

4.3) ขั้นตอนการวิเคราะห์เบต้าแคโรทีน

(1) นำตัวอย่างเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวที่ซั่งแล้ว 0.1 กรัม มาบดในโกรงโดยเติมสารตัวทำละลาย n-hexane 95%: ethanol: DW (1.67 ml: 1 ml : 0.33 ml) ลงไปเรื่อยๆ บดจนเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวละเอียดและมีสีซีด

(2) นำตัวอย่างที่บดแล้วใส่ในหลอด facontube จากนั้นเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

(3) ดูดสารสกัดตัวอย่างของเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวบริเวณชั้นบนมา 5 มิลลิลิตรแล้วปรับปริมาตร ด้วย n-hexane 95% 5 มิลลิลิตร

(4) ดูดสารสกัดตัวอย่างของเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวบริเวณชั้นบนมา 5 มิลลิลิตรแล้วปรับปริมาตร ด้วย n-hexane 95% 5 มิลลิลิตร

(5) ดูดสารสกัดที่ปรับปริมาตรแล้ว 0.3 มิลลิตร เติม n-hexane 95% 2.7 มิลลิตร เพื่อเจือจางสารสกัดก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

(6) คำนวณหาปริมาณเบต้าแคโรทีน โดยเทียบกับสมการเส้นตรงของสารมาตรฐาน

5) ขั้นตอนวิธีการสกัดที่ 3 ตัวทำละลายคือ n-hexane 95%: ethanol: acetone (1.5 ml: 0.75 ml : 0.75 ml)

5.1) ขั้นตอนการวิเคราะห์แคโรทีนอยด์

(1) นำตัวอย่างเยื่อหุ้มเมล็ดผักขาวที่ซังแล้ว 0.1 กรัม มาบดในโกรงโดยเติมสารตัวทำละลาย n-hexane 95%: ethanol: acetone (1.5 ml: 0.75 ml: 0.75 ml) ลงไปเรื่อยๆ บดจนเยื่อหุ้มเมล็ดผักขาวละเอียดและมีสีซีด

(2) นำตัวอย่างที่บดแล้วใส่ในหลอด facontube จากนั้นเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

(3) ดูดสารสกัดตัวอย่างของเยื่อหุ้มเมล็ดผักขาวบริเวณชั้นบนมา 5 มิลลิตรแล้วปรับปริมาตร ด้วย n-hexane 95% 5 มิลลิตร

(4) ดูดสารสกัดที่ปรับปริมาตรแล้ว 0.3 มิลลิตร เติม n-hexane 95% ปริมาณ 2.7 มิลลิตร เพื่อเจือจางสารสกัดก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

(5) คำนวณหาปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด โดยใช้สูตร $A=ECL$

5.2) ขั้นตอนการวิเคราะห์ไลโคพีน

(1) นำตัวอย่างเยื่อหุ้มเมล็ดผักขาวที่ซังแล้ว 0.1 กรัม มาบดในโกรงโดยเติมสารตัวทำละลาย n-hexane 95%: ethanol: acetone (1.5 ml: 0.75 ml: 0.75 ml) ลงไปเรื่อยๆ บดจนเยื่อหุ้มเมล็ดผักขาวละเอียดและมีสีซีด

(2) นำตัวอย่างที่บดแล้วใส่ในหลอด facontube จากนั้นเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

(3) ดูดสารสกัดตัวอย่างของเยื่อหุ้มเมล็ดผักขาวบริเวณชั้นบนมา 5 มิลลิตรแล้วปรับปริมาตร ด้วย n-hexane 95% 5 มิลลิตร

(4) ดูดสารสกัดที่ปรับปริมาตรแล้ว 0.3 มิลลิตร เติม n-hexane 95% 2.7 มิลลิตร เพื่อเจือจางสารสกัดก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 470 และ 502 นาโนเมตร

(5) คำนวณหาปริมาณไลโคพีน ดังนี้ คำนวณหาปริมาณไลโคพีน โดยเทียบกับสมการเส้นตรงของสารมาตรฐาน และคำนวณหาปริมาณไลโคพีนโดยการหาอัตราส่วน ไลโคพีนกับเบต้าแคโรทีน ระหว่างความยาวคลื่น 470 และ 502 นาโนเมตร

5.3) ขั้นตอนการวิเคราะห์เบต้าแคโรทีน

(1) นำตัวอย่างเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวที่ซั่งแล้ว 0.1 กรัม มาบดใน โกรงโดยเติมสารตัวทำละลาย n-hexane 95%: ethanol: acetone (1.5 ml: 0.75 ml: 0.75 ml) ลงไปเรื่อยๆ บดจนเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวละเอียดและมีสีซีด

(2) นำตัวอย่างที่บดแล้วใส่ในหลอด facontube จากนั้นเติมน้ำ กลั่น 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

(3) ดูดสารสกัดตัวอย่างของเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวบริเวณชั้นบนมา 5 มิลลิลิตรแล้วปรับปริมาตร ด้วย n-hexane 95% 5 มิลลิลิตร

(4) ดูดสารสกัดตัวอย่างของเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวบริเวณชั้นบนมา 5 มิลลิลิตรแล้วปรับปริมาตร ด้วย n-hexane 95% 5 มิลลิลิตร

(5) ดูดสารสกัดที่ปรับปริมาตรแล้ว 0.3 มิลลิลิตร เติมน-hexane 95% 2.7 มิลลิลิตร เพื่อเจือจางสารสกัดก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาว คลื่น 450 นาโนเมตร

(6) คำนวณหาปริมาณเบต้าแคโรทีน โดยเทียบกับสมการเส้นตรง ของสารมาตรฐาน

6) การวิเคราะห์โดย HPLC

6.1) ขั้นตอนการวิเคราะห์แคโรทีนอยด์

(1) ทำการสกัดสารตัวอย่างจากเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวเช่นเดียวกับ ข้อ 4.4.1

(2) นำสารสกัดของตัวอย่าง สำหรับให้นำสารสกัด 1 มิลลิเมตร มา กรองผ่าน filter 0.45 μm . (การวัด HPLC ไม่ต้องทำการเจือจางสารสกัด)

(3) แล้วนำไปวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 450 และ 470 นาโนเมตร

6.2) ขั้นตอนการวิเคราะห์ไลโคพีน

(1) ทำการสกัดสารตัวอย่างจากเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวเช่นเดียวกับ ข้อ 4.4.1

(2) นำสารสกัดของตัวอย่าง สำหรับให้นำสารสกัด 1 มิลลิเมตร มา กรองผ่าน filter 0.45 μm . (การวัด HPLC ไม่ต้องทำการเจือจางสารสกัด)

(3) แล้วนำไปวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 450 และ 470 นาโนเมตร

(4) คำนวณหาปริมาณไลโคพีน โดยเทียบกับสมการเส้นตรงของสารมาตรฐาน

6.3) ขั้นตอนการวิเคราะห์เบต้าแคโรทีน

(1) ทำการสกัดสารตัวอย่างจากเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวเช่นเดียวกับข้อ 4.4.1

(2) นำสารสกัดของตัวอย่าง สำหรับให้นำสารสกัด 1 มิลลิเมตร มากรองผ่าน filter 0.45 μm . (การวัด HPLC ไม่ต้องทำการเจือจางสารสกัด)

(3) แล้วนำไปวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 450 และ 470 นาโนเมตร

(4) คำนวณหาปริมาณเบต้าแคโรทีน โดยเทียบกับสมการเส้นตรงของสารมาตรฐาน

5. การคำนวณหาปริมาณสารสำคัญ

5.1 การคำนวณหาปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด โดยใช้สูตร $A=ECL$

นำสารสกัดแคโรทีนอยด์จากตัวอย่างเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวที่สกัดได้มาปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิตร ด้วย n-hexane 95% จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร แล้วคำนวณดังตัวอย่าง

$$A_{1\text{ cm. hexane}}^{1\%} = 2,500$$

$$\text{ค่า } A^{1\%} \text{ (absorbance coefficient)} = 2,500 \text{ (average range)}$$

$$\text{จาก 1 g. in 100 ml. is } A = 2,500$$

$$\text{ถ้า 1 } \mu\text{g. in 1 ml. is } A = 0.25$$

E คือ ค่าการดูดกลืนแสง

C คือ ความเข้มข้นของสารละลาย

L คือ ระยะทางที่แสงผ่าน = 1 cm.

$$\text{ตัวอย่าง เช่น } A = 0.430$$

$$\text{น้ำหนักของเยื่อฟักข้าวสดก่อนสกัด} = 0.1 \text{ กรัม}$$

$$\text{ปริมาตรสุดท้ายของสารสกัด} = 10 \text{ มิลลิตร}$$

$$\text{มีการเจือจางสารสกัด} = 10 \text{ เท่า}$$

$$\text{ดังนั้น ความเข้มข้น} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm}}{\text{absorbance coefficient}}$$

$$\text{ความเข้มข้น} = 0.430 / 0.25 = 1.72 \mu\text{g/ml}$$

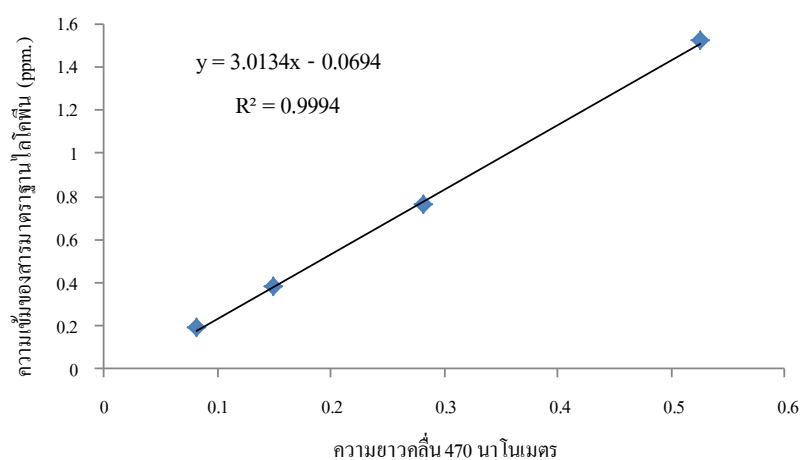
$$\text{ปริมาตรสุดท้ายของสารสกัด} = 10 \text{ ml}$$

$$\text{ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด} = 1.72 \mu\text{g/ml} \times 10 \text{ ml} = 17.2 \mu\text{g}$$

มีการเจือจางสารสกัด 10 เท่า = 17.2×10 เท่า = $172 \mu\text{g/ml}$
 ดังนั้น น้ำหนักของเยื่อผักข้าวสาคู = 0.1 กรัม จะมี แคโรทีนอยด์ทั้งหมด $172 \mu\text{g/ml}$
 ถ้า เยื่อผักข้าวสาคูหนัก 1 กรัม จะมี แคโรทีนอยด์ทั้งหมด = $172 \times 1 / 0.1$
 = $1,720 \text{ mg/g fresh}$

5.2 การคำนวณหาปริมาณไลโคพีน โดยเทียบกับสมการเส้นตรงของสารมาตรฐาน

นำค่าดูดกลืนแสงของสารไลโคพีนมาตรฐาน มาพล็อตกราฟ และนำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ได้มาคำนวณเทียบกับ standard curve ซึ่งได้ดังนี้ (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 10 กราฟมาตรฐานของสารไลโคพีน

จากกราฟมาตรฐานของสารไลโคพีนสมการเส้นตรงที่ได้ คือ $y = 3.013 \times 0.069$

โดยค่า y = ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

x = ค่าความเข้มข้นของสารในตัวอย่าง

ตัวอย่าง เช่น $y = 0.496$

น้ำหนักของเยื่อผักข้าวสาคูก่อนสกัด = 0.1 กรัม

ปริมาตรสุดท้ายของสารสกัด = 10 มิลลิลิตร

มีการเจือจางสารสกัด = 10 เท่า

ดังนั้น หาค่า x จาก $y = 3.013x - 0.069$

$$x = y + 0.069 / 3.013$$

$$x = 0.496 + 0.069 / 3.013$$

$$x = 0.19 \mu\text{g/ml}$$

ปริมาตรสุดท้ายของสารสกัด = 10 มิลลิลิตร

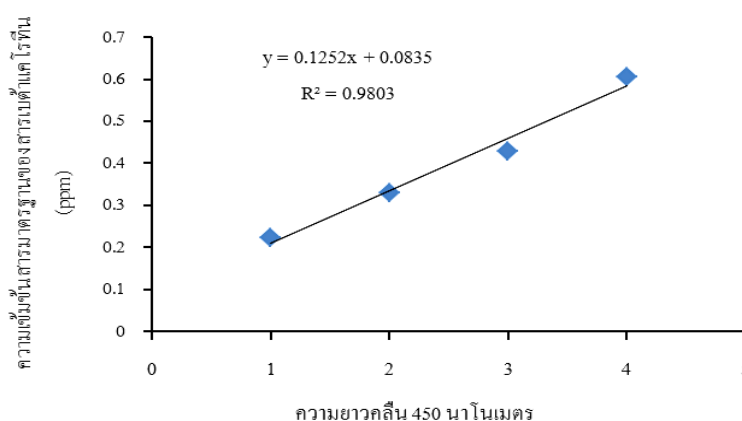
ปริมาณไลโคพีน = $0.19 \times 10 = 1.9 \mu\text{g/ml}$

มีการเจือจางสารสกัด 10 เท่า = 1.9×10 เท่า = $19 \mu\text{g/ml}$
 ดังนั้น น้ำหนักของเยื่อผักขาวสด = 0.1 กรัม จะมี แคโรทีนอยด์ทั้งหมด $19 \mu\text{g/ml}$

ถ้า เยื่อผักขาวสดหนัก 1 กรัม จะมี แคโรทีนอยด์ทั้งหมด = $19 \times 1 / 0.1$
 $= 190 \text{ mg/g fresh}$

5.3 การคำนวณหาปริมาณเบต้าแคโรทีน โดยเทียบกับสมการเส้นตรงของสารมาตรฐาน

นำค่าดูดกลืนแสงของ betacarotene standard มาพล็อตกราฟ และนำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ได้มาคำนวณเทียบกับ standard curve ซึ่งได้ดังนี้ (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 11 กราฟมาตรฐานของสารเบต้าแคโรทีน

จากกราฟมาตรฐานของสารเบต้าแคโรทีนสมการเส้นตรงที่ได้ คือ $y = 0.125x + 0.0835$

โดยค่า y = ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จาก Spectrophotometer

x = ค่าความเข้มข้นของสารในตัวอย่าง

ตัวอย่าง เช่น $y = 0.310$

น้ำหนักของเยื่อผักขาวสดก่อนสกัด = 0.1 กรัม

ปริมาตรสุดท้ายของสารสกัด = 10 มิลลิลิตร

มีการเจือจางสารสกัด = 10 เท่า

ดังนั้น หาค่า x จาก $x = (y - 0.083) / 0.125$

$$x = 0.310 - 0.083 / 0.125$$

$$x = 1.82 \mu\text{g/ml}$$

ปริมาตรสุดท้ายของสารสกัด = 10 มิลลิลิตร

ปริมาณไลโคพีน = $1.82 \times 10 = 18.2 \mu\text{g/ml}$

มีการเจือจางสารสกัด 10 เท่า = 18.2×10 เท่า = $182 \mu\text{g/ml}$

ดังนั้น น้ำหนักของเยื่อผักข้าวสาคู = 0.1 กรัม จะมี แคโรทีนอยด์ทั้งหมด 182 $\mu\text{g/ml}$

ถ้า เยื่อผักข้าวสาคูหนัก 1 กรัม จะมี แคโรทีนอยด์ทั้งหมด = $182 \times 1 / 0.1$
 $= 1,820 \text{ mg/g fresh}$

5.4 การคำนวณหาปริมาณไลโคพีนโดยการหาอัตราส่วนไลโคพีนกับเบต้าแคโรทีน ระหว่างความยาวคลื่น 470 และ 502 นาโนเมตร (Soroka laroslav M. et.al., 2012)

$$A_{lyc}^{1\%} = \left(-1.79 + 11.306 \cdot \frac{D_{470}}{D_{502}} - 0.061 \cdot \left(\frac{D_{470}}{D_{502}} \right)^2 \right) \cdot e^{\left(5.696 - 0.09 \cdot \left(\frac{D_{470}}{D_{502}} \right) + 0.147 \cdot \left(\frac{D_{470}}{D_{502}} \right)^2 \right)}$$

ตัวอย่าง เช่น ที่ 470 nm (D_{470}) มีค่า OD = 0.655, ที่ 502 nm (D_{502}) มีค่า OD = 0.590

กำลังของ e = 5.777 จาก สมการ ที่ ①

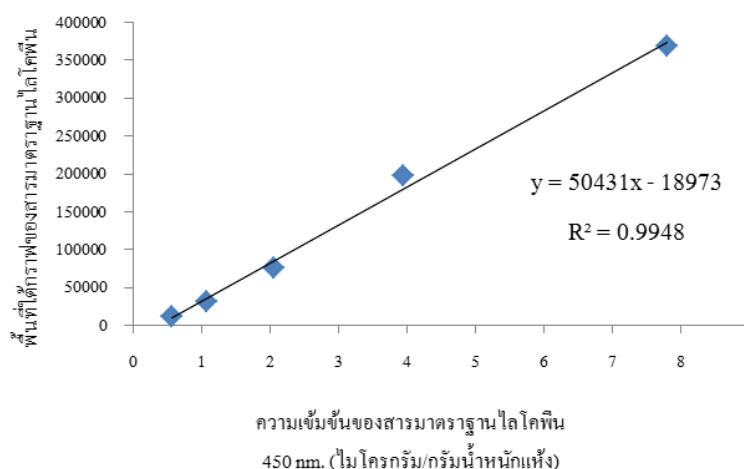
e ยกกำลัง = 322.87

2) นำค่าของการดูดกลืนแสงที่วัดได้จาก 470 และ 502 นาโนเมตร มาหาอัตราส่วน จากสมการ ② เช่น ที่ 470 nm. มีค่า OD = 0.655, ที่ 502 nm. มีค่า OD = 0.590 ดังนั้นค่าอัตราส่วนระหว่าง คือ $0.655 / 0.590 = 1.11$ เป็นต้น

3) นำค่าที่ได้จากข้อ 2 แทนค่าลงในสูตรเพื่อหาค่า $A^{1\%}$ ของไลโคพีน ③

5.5 การคำนวณหาปริมาณไลโคพีน จาก HPLC

การพล็อตกราฟ lycopene standard โดยกำหนดให้แกน X เป็นความเข้มข้น , แกน Y เป็นพื้นที่ใต้กราฟ) และนำค่าพื้นที่ใต้กราฟ (peak area) มาคำนวณเพื่อหาสมการเส้นตรง (ภาพที่ 12)



ภาพที่ 12 กราฟมาตรฐานของสารไลโคพีน (HPLC)

จากกราฟมาตรฐานของสารไลโคพีน สมการเส้นตรงที่ได้ คือ $y = 50431x - 8973$

โดยค่า y = ค่าพื้นที่ใต้กราฟ (peak area)

x = ค่าความเข้มข้นของสารในตัวอย่าง

ตัวอย่าง เช่น y (peak area) = 981984

น้ำหนักของเยื่อผักข้าวสาก่อนสกัด = 0.1 กรัม

ปริมาตรสุดท้ายของสารสกัด = 10 มิลลิลิตร

ดังนั้น หาค่า x จาก $y = 50431x - 8973$

$$x = (y + 8973) / 50431$$

$$x = (981984 + 8973) / 50431$$

$$x = 19.85 \mu\text{g/ml}$$

ปริมาตรสุดท้ายของสารสกัด = 10 มิลลิลิตร

ปริมาณไลโคพีน = $19.85 \times 10 = 198.48 \mu\text{g/ml}$

ดังนั้น น้ำหนักของเยื่อผักข้าวสาก่อนสกัด = 0.1 กรัม จะมีไลโคพีน 198.48

$\mu\text{g/ml}$

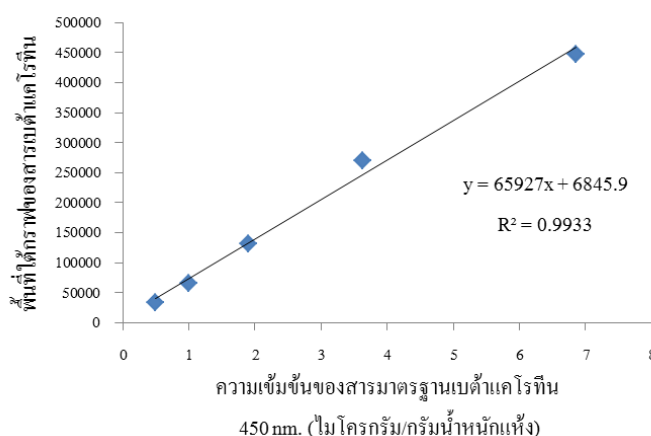
ถ้า เยื่อผักข้าวสาก่อนสกัด 1 กรัม จะมี ไลโคพีน = 198.48×10

0.1

$$= 1984.80 \text{ mg/g fresh}$$

5.6 การคำนวณหาปริมาณเบต้าแคโรทีน จาก HPLC

การพล็อตกราฟมาตรฐานของสารเบต้าแคโรทีน โดยกำหนดให้แกน X เป็นความเข้มข้น , แกน Y เป็นพื้นที่ใต้กราฟ และนำค่าพื้นที่ใต้กราฟ (peak area) มาคำนวณเพื่อหาสมการเส้นตรง (ภาพที่ 13)



ภาพที่ 13 กราฟมาตรฐานของสารเบต้าแคโรทีน (HPLC)

จาก standard curve สมการเส้นตรงที่ได้ คือ $y = 65927x - 6845.9$

โดยค่า y = ค่าพื้นที่ใต้กราฟ (peak area)

x = ค่าความเข้มข้นของสารในตัวอย่าง

ตัวอย่าง เช่น y (peak area) = 331448

น้ำหนักของเยื่อผักข้าวสาก่อนสกัด = 0.1 กรัม

ปริมาตรสุดท้ายของสารสกัด = 10 มิลลิลิตร

ดังนั้น หาค่า x จาก $y = 65927x - 6845.9$

$$x = y - 6845.9 / 65927$$

$$x = 331448 - 6845.9 / 65927$$

$$x = 4.92 \mu\text{g/ml}$$

ปริมาตรสุดท้ายของสารสกัด = 10 มิลลิลิตร

ปริมาณไลโคพีน = $4.92 \times 10 = 49.24 \mu\text{g/ml}$

ดังนั้น น้ำหนักของเยื่อผักข้าวสาก่อนสกัด = 0.1 กรัม จะมีเบต้าแคโรทีน 49.24

$\mu\text{g/ml}$

ถ้า เยื่อผักข้าวสาก่อนสกัด 1 กรัม จะมีเบต้าแคโรทีน = $49.24 \times 1 / 0.1$

$$= 492.37\text{mg/g fresh}$$

5.7 การเตรียม stock lycopene solution และ stock beta carotene solution

5.7.1 การเตรียม stock lycopene solution

ชั่งน้ำหนักสารมาตรฐานไลโคพีน 1 มิลลิกรัม เติมน้ำ chloroform 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ปริมาตรสุดท้าย คือ 10 มิลลิลิตร

การเตรียม working lycopene solution นำ stock lycopene solution ที่เก็บไว้มา 1 มิลลิลิตร เติมน้ำเฮกเซน 2 มิลลิลิตร ปริมาตรสุดท้าย คือ 3 มิลลิลิตร

การเตรียมกราฟมาตรฐานของสารไลโคพีน โดยการเตรียมสารไลโคพีน ในเฮกเซน และใช้เฮกเซนเป็น blank มีค่าการดูดกลืนคลื่นแสง 470 นาโนเมตร

5.7.2 การเตรียม stock beta -carotene solution

ชั่งน้ำหนักสารมาตรฐานเบต้าแคโรทีน 5 มิลลิกรัม เติมน้ำ chloroform 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ปริมาตรสุดท้าย คือ 10 มิลลิลิตร

การเตรียม working beta -carotene solution นำ stock beta -carotene solution ที่เก็บไว้มา 1 มิลลิลิตร เติมน้ำเฮกเซน 2 มิลลิลิตร ปริมาตรสุดท้าย คือ 3 มิลลิลิตร

การเตรียม beta -carotene standard curve โดยการเตรียม standard curve ในเฮกเซน และใช้เฮกเซนเป็น blank มีค่าการดูดกลืนคลื่นแสง 450 นาโนเมตร

6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

6.1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนและการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย

โดยการทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ตามแผนการทดลอง CRD การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี LSD (Least significant difference) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ statistix 8 ระหว่างจากสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ และ HPLC

6.2 การวิเคราะห์สหสัมพันธ์

วิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ Correlation และ Regression ระหว่างปริมาณสารแคโรทีนอยด์รวม สารไลโคพีน และสารเบต้าแคโรทีน ที่วิเคราะห์จากสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ และ HPLC และหาค่าสหสัมพันธ์ระหว่างค่าสีเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวและปริมาณสารแคโรทีนอยด์รวม สารไลโคพีน และสารเบต้าแคโรทีนที่วิเคราะห์จาก HPLC

7. สถานที่ทำการวิจัย

หมวดไม้ผล และอาคารปฏิบัติการหลังเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตภัณฑ์พืชสวน ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ และภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

8. ระยะเวลาทำการวิจัย

เริ่มเดือนพฤศจิกายน 2555 สิ้นสุดเดือนมีนาคม 2557

1. เพาะเมล็ดฟักข้าว และปลูกฟักข้าวระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2555 ถึงเดือนพฤษภาคม 2556

2. ทำการเก็บข้อมูลลักษณะทางการเกษตร และวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2556 ถึงเดือนมีนาคม 2557

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. ลักษณะทางการเกษตรของฟักข้าว 43 พันธุ์

1.1 อายุสุกแก่ของผล

อายุของผลฟักข้าว 43 พันธุ์ พบว่าอายุของผลเฉลี่ยของฟักข้าวมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$) โดยพันธุ์ [KKU ac.10-094 x KKU ac.10-093]-6, [KKU ac.10-094 x KKU ac.09-008-4]-1, [KKU ac.10-086 x KKU ac.10-093]-15 และ KKU ac.12-161 มีอายุของผลเฉลี่ยยาวที่สุด เท่ากับ 104.5, 96.5, 96.3 และ 93.7 วัน ตามลำดับ และพันธุ์ [KKU ac.10-077 x KKU ac.09-008]-2, [KKU ac.10-050 x KKU ac.10-055]-11, [KKU ac.10-090 x KKU ac.09-002]-2 และ [KKU ac.09-008 x KKU ac.09-002]-2 มีอายุของผลเฉลี่ยสั้นที่สุด เท่ากับ 55.3, 60.0, 62.0 และ 65.0 วัน ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

1.2 ความกว้างผล

ความกว้างของผลฟักข้าว 43 พันธุ์ พบว่าความกว้างผลเฉลี่ยของฟักข้าวมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$) โดยพันธุ์ [KKU ac.10-080 x KKU ac.10-093]-4, KKU ac.11-134, KKU ac.12-161 และ KKU ac.10-094 x KKU ac.10-093]-6 มีความกว้างผลเฉลี่ยมากที่สุด เท่ากับ 112.6, 110.8, 105.1 และ 102.0 มิลลิเมตร ตามลำดับ และพันธุ์ [KKU ac.09-008 x KKU ac.09-002]-2, [KKU ac.10-055 x KKU ac.10-046]-1, [KKU ac.10-021 x KKU ac.10-055]-10 และ [KKU ac.10-021 x KKU ac.10-015]-6 มีความกว้างผลเฉลี่ยน้อยสุด เท่ากับ 54.1, 54.4, 68.6 และ 69.3 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

1.3 ความยาวผล

ความยาวของผลฟักข้าว 43 พันธุ์ พบว่าความยาวผลเฉลี่ยของฟักข้าวมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$) โดยพันธุ์ [KKU ac.10-094 x KKU ac.10-093]-6, [KKU ac.10-086 x KKU ac.10-093]-3, [KKU ac.10-086 x KKU ac.10-093]-1, [KKU ac.10-050 x KKU ac.10-055]-11 และ [KKU ac.09-008 x KKU ac.10-043]-1 มีความยาวผลเฉลี่ยมากที่สุด เท่ากับ 136.3, 134.9, 131.4, 129.6 และ 127.2 มิลลิเมตร ตามลำดับ และพันธุ์ [KKU ac.10-077 x KKU ac.10-049]-6, [KKU ac.10-021 x KKU ac.10-015]-6, [KKU ac.09-008 x KKU ac.09-002]-3 และ [KKU ac.10-090 x KKU ac.09-002]-2 มีความยาวผลเฉลี่ยน้อยสุด เท่ากับ 12.5, 33.9, 34.2 และ 33.0 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

1.4 น้ำหนักผลสด

น้ำหนักผลสดของผลฟักข้าว 43 พันธุ์ พบว่าน้ำหนักผลสดเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$) โดยพันธุ์ [KKU ac.10-080 x KKU ac.10-093]-4, KKU ac.11-134, KKU ac.12-161 และ [KKU ac.10-080 x KKU ac.10-093]-5 มีน้ำหนักผลสดเฉลี่ย

มากที่สุด เท่ากับ 1018.0, 954.8, 776.7 และ 711.0 มิลลิเมตร ตามลำดับ และพันธุ์ [KKU ac.09-008 x KKU ac.09-002]-2, [KKU ac.09-008 x KKU ac.09-002]-3, [KKU ac.10-021 x KKU ac.10-055]-10 มีน้ำหนักผลสดเฉลี่ยน้อยที่สุด เท่ากับ 128.0 268.3 283.0 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

1.5 น้ำหนักเยื่อหุ้มเมล็ด

น้ำหนักเยื่อหุ้มเมล็ดของผลฟักข้าว 43 พันธุ์ พบว่ามีน้ำหนักเยื่อหุ้มเมล็ดเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$) โดยพันธุ์ KKU ac.11-134, [KKU ac.10-080 x KKU ac.10-093]-4, [KKU ac.10-080 x KKU ac.10-093]-5 และ [KKU ac.10-086 x KKU ac.10-093]-1 มีน้ำหนักเยื่อหุ้มเมล็ดเฉลี่ยมากที่สุด เท่ากับ 312.3, 296.0, 208.3 และ 176.5 กรัมต่อผล ตามลำดับ และพันธุ์ [KKU ac.09-008 x KKU ac.09-002]-2, [KKU ac.09-008 x KKU ac.09-002]-3, [KKU ac.10-050 x KKU ac.10-055]-11 และ [KKU ac.10-055 x KKU ac.10-046]-1 มีน้ำหนักเยื่อหุ้มเมล็ดเฉลี่ยน้อยที่สุด เท่ากับ 25.5, 32.0, 50.0 และ 50.0 กรัมต่อผล ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

1.6 เปอร์เซ็นต์เยื่อหุ้มเมล็ด

เปอร์เซ็นต์เยื่อหุ้มเมล็ดของผลฟักข้าว 43 พันธุ์ พบว่ามีเปอร์เซ็นต์เยื่อหุ้มเมล็ดเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$) โดยพันธุ์ KKU ac.11-134, [KKU ac.10-080 x KKU ac.10-093]-5, [KKU ac.10-080 x KKU ac.10-093]-4, [KKU ac.10-086 x KKU ac.10-093]-1, [KKU ac.10-080 x KKU ac.10-093]-3 และ [KKU ac.10-094 x KKU ac.10-093]-8 มีเปอร์เซ็นต์เยื่อหุ้มเมล็ดเฉลี่ยมากที่สุด เท่ากับ 32.8, 30.0, 29.1, 29.0, 27.6 และ 27.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และพันธุ์ [KKU ac.09-008 x KKU ac.09-002]-3, [KKU ac.10-094 x KKU ac.09-008]-1, [KKU ac.10-090 x KKU ac.10-087]-3, [KKU ac.10-077 x KKU ac.10-049]-6 และ [KKU ac.10-050 x KKU ac.10-055]-11 มีเปอร์เซ็นต์เยื่อหุ้มเมล็ดเฉลี่ยน้อยที่สุด เท่ากับ 14.5, 15.7, 13.8, 15.1 และ 11.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

2. ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในฟักข้าวทั้ง 43 พันธุ์ โดย HPLC และสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ วิธีการที่ 1, 2 และ 3

2.1 การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญโดยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ วิธีการที่ 1

2.1.1 ปริมาณสารแคโรทีนอยด์รวม

ปริมาณสารแคโรทีนอยด์รวมของฟักข้าวทั้ง 43 พันธุ์ที่วิเคราะห์โดยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ วิธีการที่ 1 พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$) โดยพันธุ์ [KKU ac.10-094 x KKU ac.09-008-4]-1, [KKU ac.10-077 x KKU ac.09-008-4]-5, KKU ac.12-161, [KKU ac.10-094 x KKU ac.10-093]-6, [KKU ac.10-094 x KKU ac.09-008]-1 มีปริมาณแคโรทีนอยด์รวมเฉลี่ยมากที่สุด เท่ากับ 2705.2, 1973.2, 1961.9, 1757.6 และ 1645.3 ไมโครกรัม/กรัม น้ำหนักสด ตามลำดับ และพันธุ์ [KKU ac.10-021 x KKU ac.10-015]-4, [KKU ac.10-090 x KKU

ac.09-002]-3, [KKU ac.10-050 x KKU ac.10-055]-11, [KKU ac.10-021 x KKU ac.10-055]-10, และ [KKU ac.10-090 x KKU ac.09-002]-11 มีปริมาณแคโรทีนอยด์รวมเฉลี่ยน้อยสุด เท่ากับ 179.7, 359.7, 435.7, 438.1 และ 499.2 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

2.1.2 ปริมาณสารไลโคพีน

ปริมาณสารไลโคพีนของผักขาวทั้ง 43 พันธุ์ ที่วิเคราะห์โดยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ วิธีการที่ 1 พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$) โดยพันธุ์ [KKU ac.10-094 x KKU ac.09-008-4]-1, [KKU ac.10-077 x KKU ac.09-008-4]-5, KKU ac.12-161, [KKU ac.10-094 x KKU ac.10-093]-6 และ [KKU ac.10-094 x KKU ac.09-008]-1 มีปริมาณไลโคพีนเฉลี่ยมากที่สุด เท่ากับ 2543.8, 1897.0, 1728.4, 1711.6 และ 1608.3 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ และพันธุ์ [KKU ac.10-021 x KKU ac.10-055]-10, [KKU ac.10-090 x KKU ac.09-002]-11, [KKU ac.10-050 x KKU ac.10-055]-11, [KKU ac.10-090 x KKU ac.09-002]-3 และ [KKU ac.10-021 x KKU ac.10-015]-4 ปริมาณไลโคพีนเฉลี่ยน้อยสุด เท่ากับ 375.3, 330.8, 274.6, 272.1 และ 123.4 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

2.1.3 ปริมาณสารเบต้าแคโรทีน

ปริมาณสารเบต้าแคโรทีนของผักขาวทั้ง 43 พันธุ์ ที่วิเคราะห์โดยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ วิธีการที่ 1 พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$) โดยพันธุ์ [KKU ac.09-030 x KKU ac.10-094]-1, [KKU ac.10-086 x KKU ac.10-093]-6, [KKU ac.10-086 x KKU ac.10-093]-10, [KKU ac.10-080 x KKU ac.10-093]-3 และ [KKU ac.10-086 x KKU ac.10-093]-1 มีปริมาณสารเบต้าแคโรทีนเฉลี่ยมากที่สุด เท่ากับ 663.8, 554.0, 551.7, 503.1 และ 471.9 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ และพันธุ์ [KKU ac.09-008 x KKU ac.10-087]-1, [KKU ac.09-008 x KKU ac.10-043]-1, [KKU ac.10-055 x KKU ac.10-046]-1, [KKU ac.10-094 x KKU ac.09-008]-1 และ [KKU ac.10-094 x KKU ac.10-093]-6 มีปริมาณสารเบต้าแคโรทีนเฉลี่ยน้อยสุด เท่ากับ 8.8, 24.0, 25.4, 37.1 และ 45.9 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ (ตารางที่ 6)

2.1.4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของลักษณะปริมาณสารสำคัญ

การวิเคราะห์ความแปรปรวนของลักษณะปริมาณสารสำคัญจากการวิเคราะห์โดยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ วิธีการที่ 1 ได้แก่ ปริมาณแคโรทีนอยด์รวมมีค่าสูงสุด ค่าต่ำสุด และค่าเฉลี่ย เท่ากับ 2932.0, 139.8 และ 1112.5 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ ปริมาณสารไลโคพีนมีค่าสูงสุด ค่าต่ำสุด และค่าเฉลี่ย เท่ากับ 2839.9, 94.4 และ 890.4 ไมโครกรัม/กรัม ตามลำดับ มีปริมาณเบต้าแคโรทีนมีค่าสูงสุด ค่าต่ำสุด และค่าเฉลี่ย เท่ากับ 827.5, 2.3 และ 222.1 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ และพบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์แปรปรวนปานกลาง (C.V.) ของปริมาณสารแคโรทีนอยด์รวม และไลโคพีน 27.4 และ 23.9 ส่วนเบต้าแคโรทีนนี้นั้นมีค่าสัมประสิทธิ์แปรปรวนสูง (C.V.) เท่ากับ 41.8 (ตารางที่ 3)

2.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญโดยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ วิธีการที่ 2

2.2.1 ปริมาณสารแคโรทีนอยด์รวม

ปริมาณสารแคโรทีนอยด์รวมของผักข่าทั้ง 43 พันธุ์ ที่วิเคราะห์โดยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ วิธีการที่ 2 พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$) โดยพันธุ์ [KKU ac.10-094 x KKU ac.09-008-4]-1, [KKU ac.10-094 x KKU ac.09-008]-1, [KKU ac.10-086 x KKU ac.10-093]-15, KKU ac.12-161 และ [KKU ac.10-094 x KKU ac.10-093]-6 มีปริมาณสารแคโรทีนอยด์เฉลี่ยมากที่สุด เท่ากับ 2351.8, 1982.5, 1735.3, 1641.5 และ 1551.0 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ และ [KKU ac.10-021 x KKU ac.10-015]-4, [KKU ac.10-021 x KKU ac.10-015]-6, [KKU ac.10-090 x KKU ac.09-002]-3, [KKU ac.10-090 x KKU ac.09-002]-11 และ [KKU ac.09-008 x KKU ac.10-087]-1 มีปริมาณสารแคโรทีนอยด์เฉลี่ยน้อยที่สุด เท่ากับ 169.5, 333.8, 364.2, 412.9, 417.3 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

2.2.2 ปริมาณสารไลโคพีน

ปริมาณสารไลโคพีนของผักข่าทั้ง 43 พันธุ์ ที่วิเคราะห์โดยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ วิธีการที่ 2 พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$) โดยพันธุ์ [KKU ac.10-094 x KKU ac.09-008-4]-1, [KKU ac.10-094 x KKU ac.09-008]-1, KKU ac.12-161, [KKU ac.10-094 x KKU ac.10-093]-6 และ [KKU ac.10-086 x KKU ac.10-093]-15 มีปริมาณสารไลโคพีนเฉลี่ยมากที่สุด เท่ากับ 2323.1, 1918.5, 1519.2, 1516.0 และ 1319.1 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ และ [KKU ac.10-021 x KKU ac.10-015]-4, [KKU ac.10-050 x KKU ac.10-060]-4, [KKU ac.10-021 x KKU ac.10-015]-6, [KKU ac.10-090 x KKU ac.09-002]-3 และ [KKU ac.10-090 x KKU ac.09-002]-11 มีปริมาณสารไลโคพีนเฉลี่ยน้อยที่สุด เท่ากับ 94.5, 241.5, 250.6, 260.9 และ 305.1 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

2.2.3 ปริมาณสารเบต้าแคโรทีน

ปริมาณสารเบต้าแคโรทีนของผักข่าทั้ง 43 พันธุ์ ที่วิเคราะห์โดยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ วิธีการที่ 2 พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$) โดยพันธุ์ [KKU ac.10-086 x KKU ac.10-093]-10, [KKU ac.09-030 x KKU ac.10-094]-1, [KKU ac.10-086 x KKU ac.10-093]-6, [KKU ac.10-086 x KKU ac.10-093]-12 และ [KKU ac.10-080 x KKU ac.10-093]-5 มีปริมาณสารเบต้าแคโรทีนเฉลี่ยมากที่สุด เท่ากับ 654.2, 628.8, 594.6, 479.6 และ 432.2 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ และพันธุ์ [KKU ac.10-094 x KKU ac.09-008-4]-1, [KKU ac.10-077 x KKU ac.09-008]-2, [KKU ac.10-094 x KKU ac.10-093]-6, [KKU ac.10-077 x KKU ac.09-010]-1 และ [KKU ac.10-094 x KKU ac.09-008]-1 มีปริมาณสารเบต้าแคโรทีนเฉลี่ยน้อยที่สุด เท่ากับ 28.7, 32.3, 35.0, 36.9 และ 64.0 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ (ตารางที่ 6)

2.2.4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของลักษณะปริมาณสารสำคัญ

การวิเคราะห์ความแปรปรวนของลักษณะปริมาณสารสำคัญจากการวิเคราะห์โดยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ วิธีการที่ 2 ได้แก่ ปริมาณแคโรทีนอยด์รวมมีค่าสูงสุด ค่าต่ำสุด และค่าเฉลี่ย เท่ากับ 2550.0, 693.0 และ 2992.1 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ ปริมาณสารไลโคพีนมีค่าสูงสุด ค่าต่ำสุด และค่าเฉลี่ย เท่ากับ 2495.8, 57.6 และ 783.9 ไมโครกรัม/กรัม ตามลำดับ มีปริมาณเบต้าแคโรทีนมีค่าสูงสุด ค่าต่ำสุด และค่าเฉลี่ย เท่ากับ 755.1, 8.0 และ 208.3 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ และพบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์แปรปรวนปานกลาง (C.V.) ของปริมาณสารแคโรทีนอยด์รวม และไลโคพีน 25.7 และ 27.7 ส่วนเบต้าแคโรทีนนั้นมีค่าสัมประสิทธิ์แปรปรวนสูง (C.V.) เท่ากับ 46.6 (ตารางที่ 3)

2.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญโดยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ วิธีการที่ 3

2.3.1 ปริมาณสารแคโรทีนอยด์รวม

ปริมาณสารแคโรทีนอยด์รวมของผักขาวทั้ง 43 พันธุ์ ที่วิเคราะห์โดยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ วิธีการที่ 3 พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$) โดยพันธุ์ [KKU ac.10-094 x KKU ac.09-008-4]-1, [KKU ac.10-094 x KKU ac.10-093]-6, KKU ac.11-134, [KKU ac.10-086 x KKU ac.10-093]-1 และ [KKU ac.10-094 x KKU ac.09-008]-1 มีปริมาณสารแคโรทีนอยด์รวมเฉลี่ยมากที่สุด เท่ากับ 3855.3, 2169.6, 2099.6, 2041.0 และ 1871.7 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ และพันธุ์ [KKU ac.10-021 x KKU ac.10-015]-4, [KKU ac.10-090 x KKU ac.09-002]-3, [KKU ac.10-050 x KKU ac.10-060]-4 [KKU ac.10-090 x KKU ac.10-087]-3 และ [KKU ac.10-090 x KKU ac.09-002]-11 มีปริมาณสารแคโรทีนอยด์รวมเฉลี่ยน้อยสุด เท่ากับ 271.4, 475.3, 527.0, 546.5 และ 599.3 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

2.3.2 ปริมาณสารไลโคพีน

ปริมาณสารไลโคพีนของผักขาวทั้ง 43 พันธุ์ ที่วิเคราะห์โดยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ วิธีการที่ 3 พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$) [KKU ac.10-094 x KKU ac.09-008-4]-1, [KKU ac.10-094 x KKU ac.10-093]-6, KKU ac.11-134, [KKU ac.10-094 x KKU ac.09-008]-1 และ KKU ac.12-161 มีปริมาณสารไลโคพีนเฉลี่ยมากที่สุด เท่ากับ 3798.0, 2136.7, 1824, 1795.3 และ 1620.3 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ และพันธุ์ [KKU ac.10-021 x KKU ac.10-015]-4, [KKU ac.10-050 x KKU ac.10-060]-4, [KKU ac.10-090 x KKU ac.09-002]-11, [KKU ac.10-090 x KKU ac.09-002]-3 และ [KKU ac.10-090 x KKU ac.10-087]-3 มีปริมาณสารไลโคพีนเฉลี่ยน้อยสุด เท่ากับ 172.0, 376.4, 383.3, 392.4 และ 440.7 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

2.3.3 ปริมาณสารเบต้าแคโรทีน

ปริมาณสารเบต้าแคโรทีนของผักขาวทั้ง 43 พันธุ์ ที่วิเคราะห์โดยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

วิธีการที่ 3 พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$) พันธุ์ [KKU ac.10-086 x KKU ac.10-093]-10, [KKU ac.09-030 x KKU ac.10-094]-1, [KKU ac.10-086 x KKU ac.10-093]-6, [KKU ac.10-086 x KKU ac.10-093]-1 และ [KKU ac.10-080 x KKU ac.10-093]-4 มีปริมาณสารเบต้าแคโรทีนเฉลี่ยมากที่สุด เท่ากับ 673.3, 630.3, 602.9, 594.0 และ 553.5 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ และพันธุ์ [KKU ac.09-008 x KKU ac.10-087]-1, [KKU ac.09-008 x KKU ac.10-043]-1, [KKU ac.10-094 x KKU ac.10-093]-6, [KKU ac.10-021 x KKU ac.10-055]-10 และ [KKU ac.10-050 x KKU ac.10-055]-11 มีปริมาณสารเบต้าแคโรทีนเฉลี่ยน้อยสุด เท่ากับ 19.6, 26.2, 32.9, 50.1 และ 52.2 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ (ตารางที่ 6)

2.3.4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของลักษณะปริมาณสารสำคัญ

การวิเคราะห์ความแปรปรวนของลักษณะปริมาณสารสำคัญจากการวิเคราะห์โดยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ วิธีการที่ 3 ได้แก่ ปริมาณแคโรทีนอยด์รวมมีค่าสูงสุด ค่าต่ำสุด และค่าเฉลี่ย เท่ากับ 3855.3, 427.8 และ 1210.5 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ ปริมาณสารไลโคพีนมีค่าสูงสุด ค่าต่ำสุด และค่าเฉลี่ย เท่ากับ 3798.0, 172.0 และ 996.3 ไมโครกรัม/กรัม ตามลำดับ มีปริมาณเบต้าแคโรทีนมีค่าสูงสุด ค่าต่ำสุด และค่าเฉลี่ย เท่ากับ 884.2, 19.6 และ 214.3 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ และพบว่ามีความสัมพันธ์แปรปรวนปานกลาง (C.V.) ของปริมาณสารแคโรทีนอยด์รวม และไลโคพีน 30.2 และ 34.3 ส่วนเบต้าแคโรทีนนั้นมีค่าสัมประสิทธิ์แปรปรวนสูง (C.V.) เท่ากับ 46.4 (ตารางที่ 3)

2.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญโดย HPLC

2.4.1 ปริมาณสารแคโรทีนอยด์รวม

ปริมาณสารแคโรทีนอยด์รวมฟักข้าวทั้ง 43 พันธุ์ ที่วิเคราะห์โดย HPLC พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$) พันธุ์ [KKU ac.10-094 x KKU ac.09-008-4]-1, [KKU ac.10-094 x KKU ac.10-093]-6, KKU ac.11-134, [KKU ac.10-094 x KKU ac.09-008]-1 และ [KKU ac.10-086 x KKU ac.10-093]-1 มีปริมาณสารของแคโรทีนอยด์รวม เท่ากับ 4179.8, 2688.2, 2083.6, 1956.1 และ 1788.6 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ และพันธุ์ [KKU ac.10-021 x KKU ac.10-015]-4, [KKU ac.10-050 x KKU ac.10-060]-4, [KKU ac.10-090 x KKU ac.10-087]-3, [KKU ac.10-090 x KKU ac.09-002]-3 และ [KKU ac.10-090 x KKU ac.09-002]-11 มีปริมาณสารแคโรทีนอยด์เฉลี่ยมากที่สุด เท่ากับ 427.8, 611.6, 614.6, 633.5 และ 653.5 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

2.4.2 ปริมาณสารไลโคพีน

ปริมาณสารไลโคพีนฟักข้าวทั้ง 43 พันธุ์ ที่วิเคราะห์โดย HPLC พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$) พันธุ์ [KKU ac.10-094 x KKU ac.09-008-4]-1, [KKU ac.10-094 x KKU ac.10-093]-6, KKU ac.11-134, [KKU ac.10-094 x KKU ac.09-008]-1

และ KKU ac.12-161 มีปริมาณสารไลโคพีนเฉลี่ยมากที่สุด เท่ากับ 4014.7, 2490.6, 1860.4, 1804.6 และ 1503.5 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ และพันธุ์ [KKU ac.10-021 x KKU ac.10-015]-4, [KKU ac.10-050 x KKU ac.10-060]-4, [KKU ac.10-090 x KKU ac.10-087]-3, [KKU ac.10-090 x KKU ac.09-002]-3 และ [KKU ac.10-090 x KKU ac.09-002]-11 มีปริมาณสารไลโคพีนเฉลี่ยน้อยสุดเท่ากับ 300.1, 465.6, 445, 475.7 และ 482.3 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

2.4.3 ปริมาณสารเบต้าแคโรทีน

ปริมาณสารเบต้าแคโรทีนของฟักข้าวทั้ง 43 พันธุ์ ที่วิเคราะห์โดย HPLC พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$) พันธุ์ [KKU ac.10-086 x KKU ac.10-093]-1, [KKU ac.10-086 x KKU ac.10-093]-10, [KKU ac.10-086 x KKU ac.10-093]-6, [KKU ac.10-080 x KKU ac.10-093]-4, และ [KKU ac.09-030 x KKU ac.10-094]-1 มีปริมาณสารเบต้าแคโรทีนเฉลี่ยมากที่สุด เท่ากับ 389.3, 361.1, 357.8, 341.9 และ 345.9 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ และพันธุ์ [KKU ac.09-008 x KKU ac.10-087]-1, [KKU ac.09-008 x KKU ac.10-043]-1, [KKU ac.10-021 x KKU ac.10-015]-4, [KKU ac.10-021 x KKU ac.10-055]-10 และ [KKU ac.10-055 x KKU ac.10-046]-1 มีปริมาณสารเบต้าแคโรทีนเฉลี่ยน้อยที่สุด เท่ากับ 121.8, 125.9, 127.7, 135.6 และ 128.3 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ (ตารางที่ 6)

2.4.4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของลักษณะปริมาณสารสำคัญ

การวิเคราะห์ความแปรปรวนของลักษณะปริมาณสารสำคัญจาก HPLC ได้แก่ ปริมาณแคโรทีนอยด์รวมมีค่าสูงสุด ค่าต่ำสุด และค่าเฉลี่ย เท่ากับ 4179.8, 427.8 และ 1162.1 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ ปริมาณสารไลโคพีนมีค่าสูงสุด ค่าต่ำสุด และค่าเฉลี่ย เท่ากับ 4014.7, 300 และ 951.1 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ มีปริมาณเบต้าแคโรทีนมีค่าสูงสุด ค่าต่ำสุด และค่าเฉลี่ย เท่ากับ 454.4, 121.6 และ 211.0 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ และพบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์แปรปรวนปานกลาง (C.V.) ของปริมาณสารแคโรทีนอยด์รวม และไลโคพีน 29.3 และ 34.2 ส่วนเบต้าแคโรทีนนี้นั้นมีค่าสัมประสิทธิ์แปรปรวนต่ำ (C.V.) เท่ากับ 16.4 (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 2 อายุผล (วัน), ความกว้างผล (มิลลิเมตร), ความยาวผล (มิลลิเมตร), น้ำหนักผลสด (กรัมต่อผล), น้ำหนักเยื่อหุ้มเมล็ด (กรัมต่อผล) และเปอร์เซ็นต์เยื่อหุ้มเมล็ด ในพริกขี้หนู 43 พันธุ์

พันธุ์	อายุผล	ความกว้าง ผล	ความยาว ผล	น้ำหนัก ผลสด	น้ำหนักเยื่อ หุ้มเมล็ด	เปอร์เซ็นต์ เยื่อหุ้มเมล็ด
[KKU ac.09-008 x KKU ac.09-002]-2	65.0 opq	54.1 y	75.3 h-m	128.0 q	25.5 o	19.9 g-o
[KKU ac.09-008 x KKU ac.09-002]-3	87.7 c-f	70.5 v-x	34.2 n-p	268.3 p	32.0 no	11.8 q
[KKU ac.09-008 x KKU ac.10-043]-1	70.0 l-p	93.3 d-g	127.2 a-c	628.0 cd	127.0 d-h	20.2 g-m
[KKU ac.09-008 x KKU ac.10-087]-1	69.0 m-p	80.4 l-t	102.0 a-j	378.0 j-p	87.0 h-m	23.0 c-h
[KKU ac.09-012 x KKU ac.09-008]-1	80.0 f-k	72.8 s-x	116.8 a-e	382.5 j-p	71.0 j-n	18.6 h-p
[KKU ac.09-016 x KKU ac.10-046]-6	73.5 i-o	81.0 j-r	121.4 a-d	440.5 g-m	92.0 g-l	20.9 f-k
[KKU ac.09-018 x KKU ac.11-054]-1	74.3 i-n	72.6 t-x	107.1 a-i	345.3 j-p	63.0 k-o	18.4 h-p
[KKU ac.09-030 x KKU ac.10-094]-1	73.3 j-o	80.7 k-s	78.0 g-m	364.3 j-p	84.5 h-m	20.1 g-n
[KKU ac.10-021 x KKU ac.10-015]-4	69.0 m-p	80.7 k-s	105.2 a-j	370.0 j-p	63.0 k-o	17.0 i-q
[KKU ac.10-021 x KKU ac.10-015]-6	66.0 n-q	69.3 wx	33.9 n-p	338.0 m-p	76.0 i-n	22.5 d-i
[KKU ac.10-021 x KKU ac.10-055]-10	73.0 j-o	68.6 x	99.8 b-j	283.0 op	53.0 l-o	18.7 h-p
[KKU ac.10-050 x KKU ac.10-055]-11	60.0 qr	92.7 d-g	129.6 a-c	346.0 j-p	50.0 l-o	14.5 n-q
[KKU ac.10-050 x KKU ac.10-060]-4	81.0 f-j	71.9 u-x	97.7 c-k	295.0 nop	59.0 k-o	20.0 g-n
[KKU ac.10-055 x KKU ac.10-046]-1	82.0 f-i	54.4 y	106.5 a-i	340.0 l-p	50.0 l-o	14.7 m-q
[KKU ac.10-077 x KKU ac.09-008]-2	55.3 r	77.1 n-w	77.8 g-m	328.0 m-p	64.3 j-o	19.4 g-p
[KKU ac.10-077 x KKU ac.09-008]-9	74.0 i-n	76.2 p-x	101.8 a-j	322.0 m-p	46.0 mno	14.3 opq
[KKU ac.10-077 x KKU ac.09-008-4]-5	73.0 j-o	78.3 m-v	82.5 e-m	368.7 j-p	78.3 i-m	21.3 e-k
[KKU ac.10-077 x KKU ac.09-010]-1	69.5 l-p	77.8 m-v	74.5 h-m	386.0 j-p	57.5 k-o	14.8 m-q
[KKU ac.10-077 x KKU ac.09-010]-2	70.5 l-p	88.9 e-j	90.2 d-l	622.8 cd	92.0 g-l	16.8 j-q
[KKU ac.10-077 x KKU ac.10-049]-6	82.0 f-i	83.4 i-p	12.5 p	443.0 g-m	67.0 j-o	15.1 l-q
[KKU ac.10-080 x KKU ac.10-049]-2	78.0 g-l	86.8 f-l	113.5 a-g	480.0 e-k	102.0 f-k	21.3 e-k
[KKU ac.10-080 x KKU ac.10-049]-3	85.5 d-g	85.6 g-m	58.9 l-o	482.0 e-j	132.0 c-g	28.3 abc
[KKU ac.10-080 x KKU ac.10-093]-2	69.0 m-p	81.5 j-q	121.6 a-d	478.3 e-l	98.7 f-k	21.0 f-k
[KKU ac.10-080 x KKU ac.10-093]-3	80.7 f-j	94.5 c-f	72.0 i-m	571.0 d-g	158.0 cd	27.6 a-d
[KKU ac.10-080 x KKU ac.10-093]-4	84.0 e-h	112.6 a	63.0 k-o	1018.0 a	296.0 a	29.1 ab
[KKU ac.10-080 x KKU ac.10-093]-5	82.0 f-i	98.0 b-d	114.5 a-f	711.0 bc	208.3 b	30.0 ab

ตารางที่ 2 (ต่อ) อายุการเก็บเกี่ยว (วัน) ความกว้างผล (มิลลิเมตร) ความยาวผล (มิลลิเมตร) น้ำหนักผลสด (กรัมต่อผล), น้ำหนักเยื่อหุ้มเมล็ด (กรัมต่อผล) และเปอร์เซ็นต์เยื่อหุ้มเมล็ด ในพืชข้าว 43 พันธุ์

พันธุ์	อายุผล	ความกว้าง ผล	ความยาว ผล	น้ำหนัก ผลสด	น้ำหนักเยื่อ หุ้มเมล็ด	เปอร์เซ็นต์ เยื่อหุ้มเมล็ด
[KKU ac.10-086 x KKU ac.10-093]-1	92.0 b-e	95.7 c-e	131.4 a-c	607.5 cde	176.5 bc	29.0 ab
[KKU ac.10-086 x KKU ac.10-093]-3	88.3 b-f	90.8 d-i	134.9 ab	594.0 c-f	117.3 d-i	20.5 g-l
[KKU ac.10-086 x KKU ac.10-093]-6	76.7 h-m	91.5 d-h	52.9 m-o	536.7 d-i	135.7 c-g	25.0 b-g
[KKU ac.10-086 x KKU ac.10-093]-9	77.3 g-m	84.2 h-o	71.7 i-m	429.3 h-n	116.0 d-i	26.7 b-e
[KKU ac.10-086 x KKU ac.10-093]-10	83.8 e-h	84.5 h-n	81.6 e-m	459.3 f-m	117.0 d-i	26.3 b-f
[KKU ac.10-086 x KKU ac.10-093]-12	88.0 b-f	79.2 l-u	78.8 f-m	342.5 k-p	77.5 i-m	22.2 d-j
[KKU ac.10-086 x KKU ac.10-093]-15	96.3 abc	78.8 l-u	109.0 a-h	396.8 j-p	79.5 i-m	19.6 g-o
[KKU ac.10-090 x KKU ac.09-002]-2	62.0 pqr	90.3 d-i	33.0 op	554.0 d-h	108.0 e-j	19.5 g-o
[KKU ac.10-090 x KKU ac.09-002]-3	72.7 j-o	76.3 o-x	71.7 i-m	332.7 m-p	73.7 i-n	22.2 d-j
[KKU ac.10-090 x KKU ac.09-002]-11	74.0 i-n	73.1 r-x	69.3 j-n	411.5 i-o	78.5 i-m	19.0 h-p
[KKU ac.10-090 x KKU ac.10-087]-3	71.0 l-o	74.4 q-x	51.0 m-o	339.3 l-p	48.3 l-o	13.8 pq
[KKU ac.10-094 x KKU ac.09-008]-1	72.0 k-o	79.5 l-u	109.3 a-h	343.0 j-p	54.0 l-o	15.7 k-q
[KKU ac.10-094 x KKU ac.09-008-4]-1	96.5 ab	91.2 d-i	109.6 a-h	342.0 k-p	70.8 j-n	20.5 g-l
[KKU ac.10-094 x KKU ac.10-093]-6	104.5 a	102.0 bc	136.3 a	639.5 bcd	138.5 c-f	20.8 f-k
[KKU ac.10-094 x KKU ac.10-093]-8	83.0 fgh	88.5 e-k	111.7 a-g	548.0 d-i	150.0 cde	27.4 a-d
KKU ac.11-134	80.5 f-k	110.8 a	105.5 a-i	954.8 a	312.3 a	32.8 a
KKU ac.12-161	93.7 bcd	105.1 ab	61.3 l-o	776.7 b	153.3 cd	20.8 f-k
mean	83.1	88.0	89.4	506.3	118.0	22.5
F-test	**	**	**	**	**	**

หมายเหตุ ** แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 3 ค่าสูงสุด (max), ค่าต่ำสุด (min), ค่าเฉลี่ย (means), ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD), ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (SE), ค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน (CV) ในฟักข้าว 43 สายพันธุ์

	ปริมาณสารไลโคพิน (ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักสด)				ปริมาณสารเบต้าแคโรทีน (ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักสด)				ปริมาณสารแคโรทีนอยด์รวม (ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักสด)			
	วิธีการที่ 1	วิธีการที่ 2	วิธีการที่ 3	HPLC	วิธีการที่ 1	วิธีการที่ 2	วิธีการที่ 3	HPLC	วิธีการที่ 1	วิธีการที่ 2	วิธีการที่ 3	HPLC
Max	2543.8	2323.1	3789.0	4014.7	827.5	755.1	884.2	454.4	2705.2	2351.8	3855.3	4179.8
Min	123.4	94.5	172.0	300.1	8.8	28.7	19.6	121.8	179.7	169.5	271.4	427.8
Mean	890.4	783.9	996.3	951.1	222.1	208.3	214.3	211.0	1112.6	992.1	1210.5	1162.1
SD.	556.0	497.4	697.7	701.1	180.2	189.9	206.5	83.6	577.8	530.4	720.5	715.9
SE.	42.4	37.9	53.2	53.5	13.7	14.5	15.7	6.4	44.1	40.4	54.9	54.6
C.V. (%)	27.4	27.7	34.3	34.2	41.8	46.6	46.4	16.4	23.9	25.7	30.2	29.3
F-test	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**

หมายเหตุ ** แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์

ตารางที่ 4 ปริมาณสารแคโรทีนอยด์รวม (ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักสด) จากการวิเคราะห์ด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) วิธีการที่ 1, 2 และ 3 และ HPLC ในฟักข้าว 43 สายพันธุ์

พันธุ์	สเปกโตรโฟโตมิเตอร์			HPLC
	วิธีการที่ 1	วิธีการที่ 2	วิธีการที่ 3	
[KKU ac.09-008 x KKU ac.09-002]-2	1658.8 bcd	1331.0 d-i	1308.4 g-m	821.7 j-q
[KKU ac.09-008 x KKU ac.09-002]-3	1512.3 c-g	1471.7 c-f	1333.2 g-m	1193.7 f-l
[KKU ac.09-008 x KKU ac.10-043]-1	545.6 m-p	505.9 o-r	833.8 m-r	872.7 i-q
[KKU ac.09-008 x KKU ac.10-087]-1	553.5 mno	417.3 pqr	497.1 qrs	686.9 m-q
[KKU ac.09-012 x KKU ac.09-008]-1	728.4 k-o	754.8 l-p	987.5 j-q	962.9 h-p
[KKU ac.09-016 x KKU ac.10-046]-6	753.3 k-n	585.4 m-q	654.1 o-s	697.9 m-q
[KKU ac.09-018 x KKU ac.11-054]-1	558.1 mno	583.4 m-q	902.0 k-r	844.1 i-q
[KKU ac.09-030 x KKU ac.10-094]-1	1525.6 c-f	1361.1 d-g	1389.2 e-k	1045.5 g-p
[KKU ac.10-021 x KKU ac.10-015]-4	179.7 p	169.5 r	271.4 s	427.8 q
[KKU ac.10-021 x KKU ac.10-015]-6	511.4 m-p	333.8 qr	556.6 p-s	663.0 m-q
[KKU ac.10-021 x KKU ac.10-055]-10	438.1 nop	578.3 m-q	525.3 p-s	628.1 opq
[KKU ac.10-050 x KKU ac.10-055]-11	435.7 nop	480.4 o-r	632.2 o-s	718.9 l-q
[KKU ac.10-050 x KKU ac.10-060]-4	988.6 i-l	326.5 qr	527.0 p-s	611.6 pq
[KKU ac.10-055 x KKU ac.10-046]-1	525.0 m-p	536.1 n-q	708.0 n-s	812.2 j-q
[KKU ac.10-077 x KKU ac.09-008]-2	1217.0 f-i	987.1 h-l	1091.1 i-o	885.0 i-q
[KKU ac.10-077 x KKU ac.09-008]-9	1372.6 d-h	1122.8 f-k	839.7 l-r	1029.3 h-p
[KKU ac.10-077 x KKU ac.09-008-4]-5	1973.2 b	1212.7 e-j	1637.2 c-h	1108.0 g-n
[KKU ac.10-077 x KKU ac.09-010]-1	1160.5 f-j	1040.8 g-l	1255.3 g-m	1100.5 g-o
[KKU ac.10-077 x KKU ac.09-010]-2	1432.5 c-h	980.1 h-l	1495.2 e-j	1514.0 d-g
[KKU ac.10-077 x KKU ac.10-049]-6	1643.9 b-e	828.1 k-o	1025.9 j-p	797.0 k-q
[KKU ac.10-080 x KKU ac.10-049]-2	595.5 mno	572.9 m-q	865.0 l-r	921.5 h-p
[KKU ac.10-080 x KKU ac.10-049]-3	683.0 l-o	761.9 l-p	657.0 o-s	968.6 h-p
[KKU ac.10-080 x KKU ac.10-093]-2	1096.8 h-k	881.6 j-n	1180.1 h-n	800.8 j-q
[KKU ac.10-080 x KKU ac.10-093]-3	1436.9 c-h	1301.9 d-i	1349.4 f-kl	1080.3 g-p
[KKU ac.10-080 x KKU ac.10-093]-4	818.2 j-m	895.1 j-m	1250.5 g-m	1128.6 g-m
[KKU ac.10-080 x KKU ac.10-093]-5	1146.5 g-j	1211.0 e-j	1484.3 e-j	1276.6 f-j

ตารางที่ 4 (ต่อ) ปริมาณสารแคโรทีนอยด์รวม (ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด) จากการวิเคราะห์ด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) วิธีการที่ 1, 2 และ 3 และ HPLC ในผักข้าว 43 สายพันธุ์

พันธุ์	สเปกโตรโฟโตมิเตอร์			HPLC
	วิธีการที่ 1	วิธีการที่ 2	วิธีการที่ 3	
[KKU ac.10-086 x KKU ac.10-093]-1	1499.0 c-g	1469.3 c-f	2041 bcd	1788.6 cde
[KKU ac.10-086 x KKU ac.10-093]-3	1280.5 e-i	1230.7 e-j	1660.3 b-h	1188.0 g-l
[KKU ac.10-086 x KKU ac.10-093]-6	1421.6 c-h	1336.0 d-h	1465.7 e-j	1262.3 f-k
[KKU ac.10-086 x KKU ac.10-093]-9	1220.0 f-i	1233.7 e-ij	1547.5 d-i	1298.6 f-i
[KKU ac.10-086 x KKU ac.10-093]-10	1303.1 d-i	1377.3 d-g	1540.3 d-i	1267.4 f-k
[KKU ac.10-086 x KKU ac.10-093]-12	1183.6 f-j	1189.5 f-j	1441.3 e-j	1392.3 e-h
[KKU ac.10-086 x KKU ac.10-093]-15	1609.7 b-e	1735.3 bc	1860.1 b-f	1381.0 e-h
[KKU ac.10-090 x KKU ac.09-002]-2	832.7 j-m	747.2 l-p	825 m-r	929.0 h-p
[KKU ac.10-090 x KKU ac.09-002]-3	359.7 op	364.2 qr	475.3 rs	633.5 n-q
[KKU ac.10-090 x KKU ac.09-002]-11	499.2 m-p	412.9 pqr	599.3 o-s	653.5 m-q
[KKU ac.10-090 x KKU ac.10-087]-3	727.0 k-o	596.5 m-q	546.5 p-s	614.6 pq
[KKU ac.10-094 x KKU ac.09-008]-1	1645.3 b-e	1982.5 b	1871.7 b-e	1956.1 cd
[KKU ac.10-094 x KKU ac.09-008-4]-1	2705.2 a	2351.8 a	3855.3 a	4179.8 a
[KKU ac.10-094 x KKU ac.10-093]-6	1757.6 bc	1551.0 cde	2169.6 b	2688.2 b
[KKU ac.10-094 x KKU ac.10-093]-8	969.0 i-l	974.3 i-l	1099.7 i-o	1388.7 e-h
KKU ac.11-134	1373.9 d-h	1236.5 e-j	2099.6 bc	2083.6 c
KKU ac.12-161	1961.9 b	1641.5 bcd	1697.0 b-g	1667.7 c-f
mean	1103.1	983.8	1214.4	1177.1
F-test	**	**	**	**

หมายเหตุ ** แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์ ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

ตารางที่ 5 ปริมาณสารไลโคพีน (ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด) จากการวิเคราะห์ด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) วิธีการที่ 1, 2, และ 3 และ HPLC ในผักข้าว 43 สายพันธุ์

พันธุ์	สเปกโตรโฟโตมิเตอร์						HPLC	
	วิธีการที่ 1		วิธีการที่ 2		วิธีการที่ 3			
[KKU ac.09-008 x KKU ac.09-002]-2	1382.0	d-g	1116.7	d-g	1181.4	e-h	646.9	i-o
[KKU ac.09-008 x KKU ac.09-002]-3	1408.7	c-g	1305.8	cde	1235.6	d-h	1004.5	f-j
[KKU ac.09-008 x KKU ac.10-043]-1	521.6	o-u	452.4	m-r	807.5	h-o	746.8	h-o
[KKU ac.09-008 x KKU ac.10-087]-1	544.6	n-u	381.4	p-s	477.5	l-p	565.1	j-o
[KKU ac.09-012 x KKU ac.09-008]-1	407.5	s-v	438.1	m-r	655.1	j-o	710.6	h-o
[KKU ac.09-016 x KKU ac.10-046]-6	567.4	m-u	433.3	n-r	552.0	j-p	541.3	k-o
[KKU ac.09-018 x KKU ac.11-054]-1	458.9	p-v	477.0	l-r	694.6	i-o	696.7	h-o
[KKU ac.09-030 x KKU ac.10-094]-1	861.9	i-o	733.1	i-n	958.9	g-k	699.6	h-o
[KKU ac.10-021 x KKU ac.10-015]-4	123.4	v	94.5	s	172.0	p	300.1	o
[KKU ac.10-021 x KKU ac.10-015]-6	431.2	q-v	250.6	rs	493.8	k-p	514.2	k-o
[KKU ac.10-021 x KKU ac.10-055]-10	375.3	tuv	496.1	l-r	475.2	l-p	492.5	l-o
[KKU ac.10-050 x KKU ac.10-055]-11	274.6	uv	365.3	p-s	580.0	j-p	517.9	k-o
[KKU ac.10-050 x KKU ac.10-060]-4	694.8	l-t	241.5	rs	376.4	op	465.6	mno
[KKU ac.10-055 x KKU ac.10-046]-1	499.6	p-u	459.7	m-r	620.4	j-p	684.0	i-o
[KKU ac.10-077 x KKU ac.09-008]-2	885.2	i-n	954.8	f-i	1021.1	f-j	743.7	h-o
[KKU ac.10-077 x KKU ac.09-008]-9	1197.7	f-i	953.7	f-i	776.2	h-o	878.0	h-n
[KKU ac.10-077 x KKU ac.09-008-4]-5	1897.0	b	1090.2	d-g	1577.5	cde	923.8	g-l
[KKU ac.10-077 x KKU ac.09-010]-1	1090.3	g-k	1003.9	e-i	1149.0	e-i	953.5	f-k
[KKU ac.10-077 x KKU ac.09-010]-2	1286.6	e-h	822.4	g-k	1376.5	c-g	1350.0	d-g
[KKU ac.10-077 x KKU ac.10-049]-6	1521.0	c-f	778.0	h-l	939.1	g-l	648.1	i-o
[KKU ac.10-080 x KKU ac.10-049]-2	420.5	r-v	411.5	o-r	631.4	j-p	718.7	h-o
[KKU ac.10-080 x KKU ac.10-049]-3	569.7	m-u	615.0	k-q	463.4	l-p	758.8	h-n
[KKU ac.10-080 x KKU ac.10-093]-2	860.5	i-o	627.8	j-q	937.8	g-l	587.0	j-o
[KKU ac.10-080 x KKU ac.10-093]-3	933.8	i-l	902.8	f-k	1013.6	f-j	828.6	h-n
[KKU ac.10-080 x KKU ac.10-093]-4	400.5	s-v	488.5	l-r	697.0	i-o	786.8	h-n
[KKU ac.10-080 x KKU ac.10-093]-5	770.8	k-q	778.8	h-l	1029.3	f-j	953.1	f-k

ตารางที่ 5 (ต่อ) ปริมาณสารไลโคพีน (ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด) จากการวิเคราะห์ด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) วิธีการที่ 1, 2, และ 3 และ HPLC ในผักข้าว 43 สายพันธุ์

พันธุ์	สเปกโตรโฟโตมิเตอร์			HPLC
	วิธีการที่ 1	วิธีการที่ 2	วิธีการที่ 3	
[KKU ac.10-086 x KKU ac.10-093]-1	1027.1 h-l	1203.1 def	1447.1 c-f	1399.3 def
[KKU ac.10-086 x KKU ac.10-093]-3	908.1 i-m	817.6 g-k	1191.4 e-h	886.4 h-n
[KKU ac.10-086 x KKU ac.10-093]-6	867.6 i-n	741.5 i-m	862.9 h-n	904.5 g-m
[KKU ac.10-086 x KKU ac.10-093]-9	932.4 i-l	921.1 f-j	1165.4 e-i	1004.7 f-j
[KKU ac.10-086 x KKU ac.10-093]-10	751.5 k-r	723.1 i-n	867.0 h-m	906.4 g-m
[KKU ac.10-086 x KKU ac.10-093]-12	793.6 j-p	709.9 i-o	964.3 g-k	1054.4 e-i
[KKU ac.10-086 x KKU ac.10-093]-15	1380.1 d-g	1319.1 cd	1713.5 bcd	1147.3 e-h
[KKU ac.10-090 x KKU ac.09-002]-2	735.0 l-s	646.7 j-p	689.3 i-o	746.4 h-o
[KKU ac.10-090 x KKU ac.09-002]-3	272.1 uv	260.9 rs	392.4 m-p	475.7 l-o
[KKU ac.10-090 x KKU ac.09-002]-11	330.8 uv	305.1 rs	440.7 m-p	482.3 l-o
[KKU ac.10-090 x KKU ac.10-087]-3	447.8 q-v	341.5 qrs	383.3 nop	445 no
[KKU ac.10-094 x KKU ac.09-008]-1	1608.3 b-e	1918.5 b	1795.3 bc	1804.6 cd
[KKU ac.10-094 x KKU ac.09-008-4]-1	2543.8 a	2323.1 a	3798.0 a	4014.7 a
[KKU ac.10-094 x KKU ac.10-093]-6	1711.6 bcd	1516.0 c	2136.7 b	2490.6 b
[KKU ac.10-094 x KKU ac.10-093]-8	731.1 l-s	717.7 ij-n	856.7 h-n	1053.1 e-i
KKU ac.11-134	1134.9 g-j	1048.9 d-h	1824 bc	1860.4 c
KKU ac.12-161	1728.4 bc	1519.2 c	1620.3 cde	1503.5 cde
mean	890.4	783.9	996.6	958.3
F-test	**	**	**	**

หมายเหตุ ** แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์ ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

ตารางที่ 6 ปริมาณสารเบต้าแคโรทีน (ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด) จากการวิเคราะห์ด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) วิธีการที่ 1, 2 และ 3 และ HPLC ในฟักข้าว 43 สายพันธุ์

พันธุ์	สเปกโตรโฟโตมิเตอร์			HPLC
	วิธีการที่ 1	วิธีการที่ 2	วิธีการที่ 3	
[KKU ac.09-008 x KKU ac.09-002]-2	276.8 f-i	214.3 f-i	118.0 j-o	174.8 i-o
[KKU ac.09-008 x KKU ac.09-002]-3	103.6 k-p	165.9 g-l	97.5 k-o	189.3 g-m
[KKU ac.09-008 x KKU ac.10-043]-1	24.0 op	53.5 j-m	26.2 no	125.9 pq
[KKU ac.09-008 x KKU ac.10-087]-1	8.8 p	35.9 klm	19.6 o	121.8 q
[KKU ac.09-012 x KKU ac.09-008]-1	320.9 efg	316.7 def	332.4 e-h	252.3 ef
[KKU ac.09-016 x KKU ac.10-046]-6	185.9 h-l	152.2 g-m	102.1 k-o	156.6 k-q
[KKU ac.09-018 x KKU ac.11-054]-1	99.2 l-p	106.4 i-m	207.3 g-l	147.4 m-q
[KKU ac.09-030 x KKU ac.10-094]-1	663.8 a	628.8 a	630.3 a	345.9 abc
[KKU ac.10-021 x KKU ac.10-015]-4	56.3 l-p	75.0 j-m	99.4 k-o	127.7 opq
[KKU ac.10-021 x KKU ac.10-015]-6	80.2 l-p	83.2 i-m	62.8 mno	148.8 m-q
[KKU ac.10-021 x KKU ac.10-055]-10	62.9 l-p	82.2 i-m	50.1 no	135.6 n-q
[KKU ac.10-050 x KKU ac.10-055]-11	161.1 i-n	115.1 i-m	52.2 no	200.9 g-k
[KKU ac.10-050 x KKU ac.10-060]-4	293.9 e-h	85 i-m	150.7 i-o	145.9 m-q
[KKU ac.10-055 x KKU ac.10-046]-1	25.4 op	76.4 j-m	87.6 l-o	128.3 opq
[KKU ac.10-077 x KKU ac.09-008]-2	331.9 efg	32.3 lm	70.0 l-o	141.3 m-q
[KKU ac.10-077 x KKU ac.09-008]-9	174.9 h-m	169.2 g-k	63.5 mno	151.3 l-q
[KKU ac.10-077 x KKU ac.09-008-4]-5	76.2 l-p	122.4 h-m	59.8 mno	184.2 h-m
[KKU ac.10-077 x KKU ac.09-010]-1	70.2 l-p	36.9 klm	106.3 j-o	147.0 m-q
[KKU ac.10-077 x KKU ac.09-010]-2	145.9 j-o	157.7 g-m	118.6 j-o	164.1 j-q
[KKU ac.10-077 x KKU ac.10-049]-6	122.9 j-p	50.1 klm	86.8 l-o	148.9 m-q
[KKU ac.10-080 x KKU ac.10-049]-2	175.0 h-m	161.4 g-m	233.6 g-k	202.9 g-k
[KKU ac.10-080 x KKU ac.10-049]-3	113.3 j-p	146.8 g-m	193.7 h-m	209.8 f-j
[KKU ac.10-080 x KKU ac.10-093]-2	236.2 g-j	253.8 fgh	242.2 g-j	213.8 f-i
[KKU ac.10-080 x KKU ac.10-093]-3	503.1 bc	399.1 cde	335.8 efg	251.8 ef
[KKU ac.10-080 x KKU ac.10-093]-4	417.7 cde	406.6 cd	553.5 abc	341.9 a-d
[KKU ac.10-080 x KKU ac.10-093]-5	375.8 c-f	432.2 cd	455.0 cde	323.5 bcd

ตารางที่ 6 (ต่อ) ปริมาณสารเบต้าแคโรทีน (ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด) จากการวิเคราะห์ด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) วิธีการที่ 1, 2 และ 3 และ HPLC ในผักข้าว 43 สายพันธุ์

พันธุ์	สเปกโตรโฟโตมิเตอร์			HPLC
	วิธีการที่ 1	วิธีการที่ 2	วิธีการที่ 3	
[KKU ac.10-086 x KKU ac.10-093]-1	471.9 bcd	266.2 efg	594.0 abc	389.3 a
[KKU ac.10-086 x KKU ac.10-093]-3	372.5 def	413.1 cd	468.9 b-e	301.6 cd
[KKU ac.10-086 x KKU ac.10-093]-6	554.0 ab	594.6 ab	602.9 ab	357.8 ab
[KKU ac.10-086 x KKU ac.10-093]-9	287.7 f-i	312.7 def	382.2 def	293.9 de
[KKU ac.10-086 x KKU ac.10-093]-10	551.7 ab	654.2 a	673.3 a	361.1 ab
[KKU ac.10-086 x KKU ac.10-093]-12	390.0 c-f	479.6 bc	477.1 bcd	338.0 bcd
[KKU ac.10-086 x KKU ac.10-093]-15	229.6 g-k	416.1 cd	146.6 i-o	233.6 fg
[KKU ac.10-090 x KKU ac.09-002]-2	97.7 l-p	100.5 i-m	135.8 j-o	182.6 h-n
[KKU ac.10-090 x KKU ac.09-002]-3	87.6 l-p	103.3 i-m	82.9 l-o	157.9 k-q
[KKU ac.10-090 x KKU ac.09-002]-11	168.4 h-m	107.8 i-m	158.6 i-o	171.1 i-p
[KKU ac.10-090 x KKU ac.10-087]-3	279.2 f-i	255.0 fgh	163.3 i-n	169.6 i-q
[KKU ac.10-094 x KKU ac.09-008]-1	37.1 nop	64.0 j-m	90.6 l-o	151.6 l-q
[KKU ac.10-094 x KKU ac.09-008-4]-1	161.4 i-n	28.7 m	57.3 mno	165.3 j-q
[KKU ac.10-094 x KKU ac.10-093]-6	45.9 m-p	35.0 klm	32.9 no	197.6 g-l
[KKU ac.10-094 x KKU ac.10-093]-8	237.9 g-j	256.6 fgh	243.0 g-j	335.6 bcd
KKU ac.11-134	239.0 g-j	187.7 f-j	275.6 f-i	223.2 fgh
KKU ac.12-161	233.6 g-j	122.4 h-m	76.7 l-o	164.1 j-q
mean	222.1	208.3	214.3	211.1
F-test	**	**	**	**

หมายเหตุ ** แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์ ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

2.5 ความสัมพันธ์ระหว่างสเปกโตรโฟโตมิเตอร์และ HPLC ในการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ

2.5.1 ปริมาณสารแคโรทีนอยด์

ปริมาณแคโรทีนอยด์รวม ระหว่างสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ วิธีการที่ 1, 2 และ 3 กับ HPLC พบว่ามีความสัมพันธ์ทางสถิติไปในทิศทางบวก ซึ่งมีสมการและค่าความสัมพันธ์เท่ากับ

$y = 0.90x + 157.66$, $r = 0.74^{**}$, $y = 1.07x + 101.91$, $r = 0.80^{**}$ และ $y = 0.93x + 26.83$, $r = 0.93^{**}$ ตามลำดับ (ตารางที่ 7) โดยปริมาณสารแคโรทีนอยด์ระหว่างสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ 3 และ HPLC มีความสัมพันธ์กันสูง (ภาพที่ 14)

2.5.2 ปริมาณสารไลโคพีน

ปริมาณไลโคพีนระหว่างสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ วิธีการที่ 1, 2 และ 3 กับ HPLC พบว่ามีความสัมพันธ์ทางสถิติไปในทิศทางบวก ซึ่งมีสมการและค่าความสัมพันธ์เท่ากับ $y = 0.95x - 101.84$, $r = 0.77^{**}$, $y = 1.17x + 32.72$, $r = 0.85^{**}$ และ $y = 0.96x - 7.48$, $r = 0.94^{**}$ ตามลำดับ (ตารางที่ 7) โดยปริมาณสารไลโคพีนระหว่างสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ 3 และ HPLC มีความสัมพันธ์กันสูง (ภาพที่ 14)

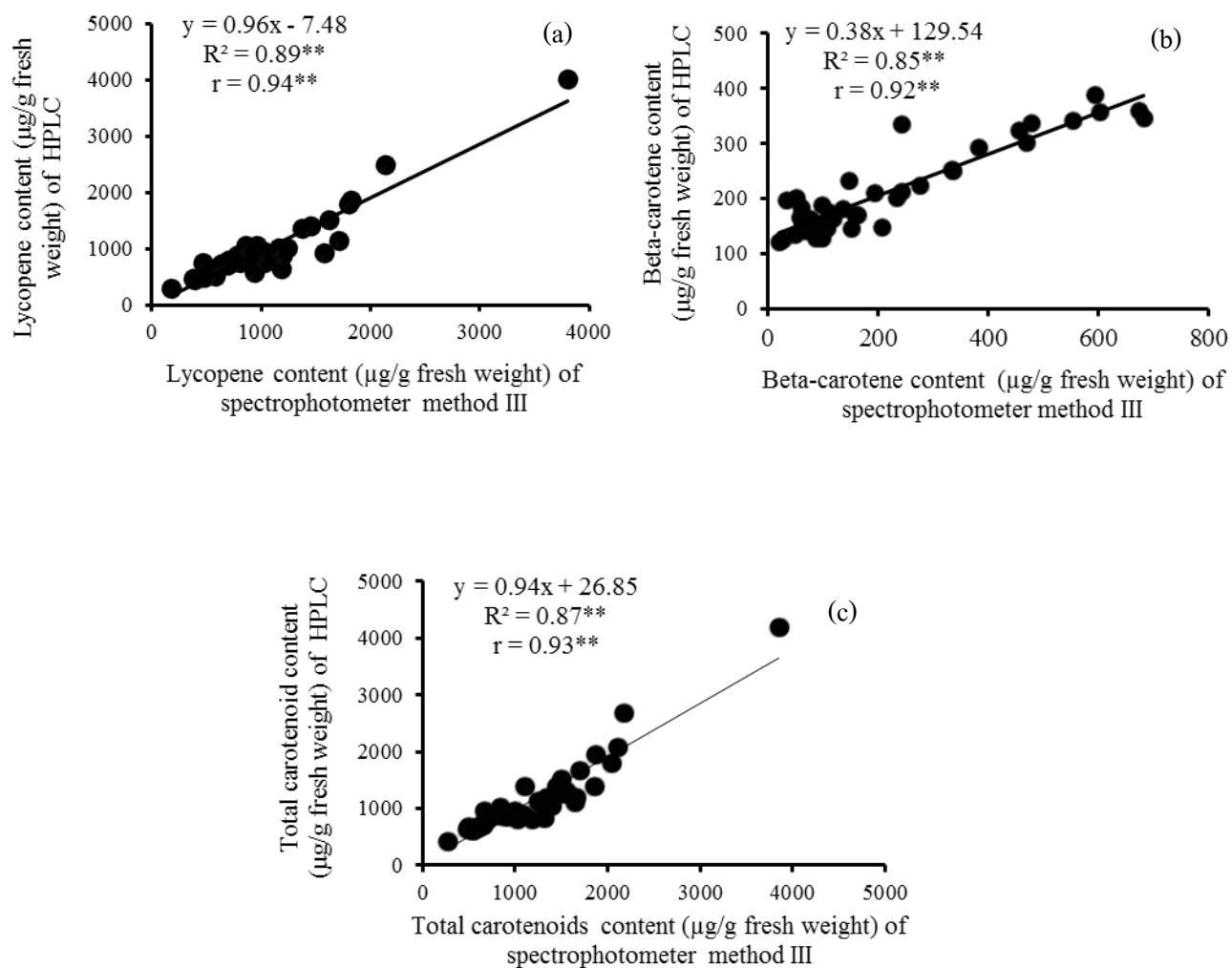
2.5.2 ปริมาณสารเบต้าแคโรทีน

ปริมาณเบต้าแคโรทีนระหว่างสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ วิธีการที่ 1, 2 และ 3 กับ HPLC พบว่ามีความสัมพันธ์ทางสถิติไปในทิศทางบวก ซึ่งมีค่าความสัมพันธ์เท่ากับ $y = 0.40x + 123.36$, $r = 0.82^{**}$, $y = 0.40x + 128.32$, $r = 0.86^{**}$ และ $y = 0.38x + 129.54$, $r = 0.92^{**}$ ตามลำดับ (ตารางที่ 7) โดยปริมาณสารเบต้าแคโรทีนระหว่างสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ 3 และ HPLC มีความสัมพันธ์กันสูง (ภาพที่ 14)

ตารางที่ 7 ความสัมพันธ์ของปริมาณสารแคโรทีนอยด์ สารไลโคพีน และเบต้าแคโรทีน ระหว่าง HPLC และ สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)

	equation	R ²	r
Total carotenoid			
HPLC vs method I	$y = 0.90x + 157.66$	0.55**	0.74**
HPLC vs method II	$y = 1.07x + 101.91$	0.64**	0.80**
HPLC vs method III	$y = 0.93x + 26.83$	0.87**	0.93**
Lycopene			
HPLC vs method I	$y = 0.95x - 101.84$	0.59**	0.77**
HPLC vs method II	$y = 1.17x + 32.72$	0.71**	0.85**
HPLC vs method III	$y = 0.96x - 7.48$	0.89**	0.94**
Beta-carotene			
HPLC vs method I	$y = 0.40x + 123.36$	0.67**	0.82**
HPLC vs method II	$y = 0.40x + 128.32$	0.74**	0.86**
HPLC vs method III	$y = 0.38x + 129.54$	0.85**	0.92**

หมายเหตุ ** P = 0.01, (n=43)



ภาพที่ 14 ความสัมพันธ์ระหว่างการวิเคราะห์ด้วย HPLC และ สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ วิธีการที่ 3 ใน พักข้าว ได้แก่ ปริมาณสารไลโคพีน (a), ปริมาณสารเบต้าแคโรทีน (b) และปริมาณสาร แคโรทีนอยด์รวม (** $P = 0.01$, $(n=43)$)

2.6 สหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารสำคัญ และลักษณะทางการเกษตร

2.6.1 ปริมาณแคโรทีนอยด์รวม

ปริมาณสารแคโรทีนอยด์รวมมีความสัมพันธ์ทางสถิติในทิศทางบวกกับปริมาณไลโคพีน และปริมาณเบต้าแคโรทีน อายุผล น้ำหนักเยื่อหุ้มเมล็ด และเปอร์เซ็นต์เยื่อหุ้มเมล็ด เท่ากับ 0.61 และ 0.65 ($P=0.01$) ตามลำดับ และไม่มีความสัมพันธ์กับน้ำหนักผลสด มีค่าความสัมพันธ์เท่ากับ 0.28 (ตารางที่ 6)

2.6.2 ปริมาณสารไลโคพีน

ปริมาณสารไลโคพีนมีความสัมพันธ์ทางสถิติในทิศทางบวกกับแคโรทีนอยด์รวม และปริมาณเบต้าแคโรทีน อายุผล น้ำหนักเยื่อหุ้มเมล็ด และเปอร์เซ็นต์เยื่อหุ้มเมล็ด เท่ากับ 0.99, 0.57 และ 0.61 ($P=0.01$) ตามลำดับ และไม่มีความสัมพันธ์กับน้ำหนักผลสด มีค่าความสัมพันธ์เท่ากับ 0.23 (ตารางที่ 6)

2.6.3 ปริมาณสารเบต้าแคโรทีน

ปริมาณสารเบต้าแคโรทีนมีความสัมพันธ์ทางสถิติในทิศทางบวกกับสารแคโรทีนอยด์รวม และปริมาณสารไลโคพีน อายุผล น้ำหนักเยื่อหุ้มเมล็ด และเปอร์เซ็นต์เยื่อหุ้มเมล็ด เท่ากับ 0.40, 0.50 และ 0.40 ($P=0.01$) ตามลำดับ และไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณไลโคพีน (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 8 สหสัมพันธ์ของอายุผล (วัน) น้ำหนักผลสด (กรัม) น้ำหนักเยื่อหุ้มเมล็ด (กรัม/ผล) เปอร์เซ็นต์เยื่อหุ้มเมล็ด ปริมาณสารแคโรทีนอยด์รวม ปริมาณไลโคพีน และปริมาณเบต้าแคโรทีน (ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักสด) ของฟักข้าวจำนวน 43 พันธุ์

	อายุผล	น้ำหนัก ผลสด	น้ำหนักเยื่อ หุ้มเมล็ด	เปอร์เซ็นต์ เยื่อหุ้มเมล็ด	ปริมาณแคโร ทีนอยด์รวม	ปริมาณ ไลโคพีน
น้ำหนักผลสด	0.34*					
น้ำหนักเยื่อหุ้มเมล็ด	0.41**	0.89**				
เปอร์เซ็นต์เยื่อหุ้มเมล็ด	0.40**	0.33*	0.70**			
ปริมาณแคโรทีนอยด์รวม	0.61**	0.28	0.46**	0.65**		
ปริมาณไลโคพีน	0.57**	0.23	0.41**	0.61**	0.99**	
ปริมาณเบต้าแคโรทีน	0.39**	0.40**	0.50**	0.40**	0.20**	0.08

หมายเหตุ ** P=0.01, (n=43)

2.7 สหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารสำคัญและค่าการวัดสี

2.7.1 ปริมาณสารแคโรทีนอยด์รวม ไลโคพีน และเบต้าแคโรทีน HPLC

ค่า L* (luminance) มีความสัมพันธ์ทางสถิติในทิศทางบวกกับปริมาณเบต้าแคโรทีนมีความสัมพันธ์กัน เท่ากับ 0.57** ปริมาณแคโรทีนอยด์รวมและปริมาณไลโคพีน เท่ากับ -0.13^{ns} และ -0.20^{ns} ตามลำดับ

ค่า C* (chroma) มีความสัมพันธ์ทางสถิติในทิศทางบวกกับปริมาณเบต้าแคโรทีน เท่ากับ 0.72** และปริมาณแคโรทีนอยด์รวม และปริมาณไลโคพีนไม่มีความสัมพันธ์กัน เท่ากับ 0.08^{ns} และ -0.16^{ns} ตามลำดับ

ค่า h° (hue angle) มีความสัมพันธ์ทางสถิติในทิศทางบวกกับปริมาณแคโรทีนอยด์รวม ปริมาณไลโคพีนและปริมาณเบต้าแคโรทีน เท่ากับ 0.42, -0.53 และ -0.47 (P=0.01) ตามลำดับ

ตารางที่ 9 สหสัมพันธ์ระหว่างค่าการวัดสี ($L^*C^*h^\circ$) ปริมาณสารแคโรทีนอยด์รวม ไลโคพีน และเบต้าแคโรทีนจากการวิเคราะห์ด้วย HPLC ของฟักข้าว 43 พันธุ์

	L^*	C^*	h°
C^*	0.67**		
h°	0.50**	0.30**	
เบต้าแคโรทีน	0.57**	0.72**	0.42**
ไลโคพีน	-0.20	0.08	-0.53**
แคโรทีนอยด์รวม	-0.13	0.16	-0.47**

หมายเหตุ ** $P=0.01$, ($n=43$)

L^* คือ ค่าความสว่างของสี

C^* คือ ค่าความเข้มของสี

h° คือ การระบุตำแหน่งสีเป็นองศา

3. การจัดกลุ่มทางพันธุกรรมจากลักษณะทางการเกษตรและปริมาณสารสำคัญของฟักข้าว

จากการศึกษาลักษณะทางการเกษตรและการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในฟักข้าวทั้ง 43 พันธุ์ ที่พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน ซึ่งสามารถนำมาจัดกลุ่มความสัมพันธ์ได้ โดยพบว่า ลักษณะที่นำมาวิเคราะห์เพื่อจัดกลุ่ม ได้แก่ ปริมาณแคโรทีนอยด์รวม ปริมาณไลโคพีน ปริมาณเบต้าแคโรทีน อายุผล น้ำหนักผลสด น้ำหนักเยื่อหุ้มเมล็ด และเปอร์เซ็นต์เยื่อหุ้มเมล็ด สามารถจัดกลุ่มพันธุ์ฟักข้าวทั้ง 43 พันธุ์ ได้เป็น 6 กลุ่ม (ภาพที่ 15)

กลุ่มที่ 1 มี 16 พันธุ์ ได้แก่ [KKU ac.09-008 x KKU ac.09-002]-2, [KKU ac.10-055 x KKU ac.10-046]-1, [KKU ac.09-008 x KKU ac.10-087]-1, [KKU ac.10-021 x KKU ac.10-015]-4, [KKU ac.09-018 x KKU ac.11-054]-1, [KKU ac.10-021 x KKU ac.10-055]-10, [KKU ac.10-050 x KKU ac.10-060]-4, [KKU ac.10-077 x KKU ac.10-008-4]-5, [KKU ac.10-090 x KKU ac.10-002]-3, [KKU ac.10-090 x KKU ac.09-002]-11, [KKU ac.10-077 x KKU ac.09-008]-9, [KKU ac.10-077 x KKU ac.09-010]-1, [KKU ac.10-090 x KKU ac.10-087]-3, [KKU ac.10-021 x KKU ac.10-015]-6, [KKU ac.10-077 x KKU ac.09-008]-2 และ [KKU ac.10-090 x KKU ac.10-002]-10

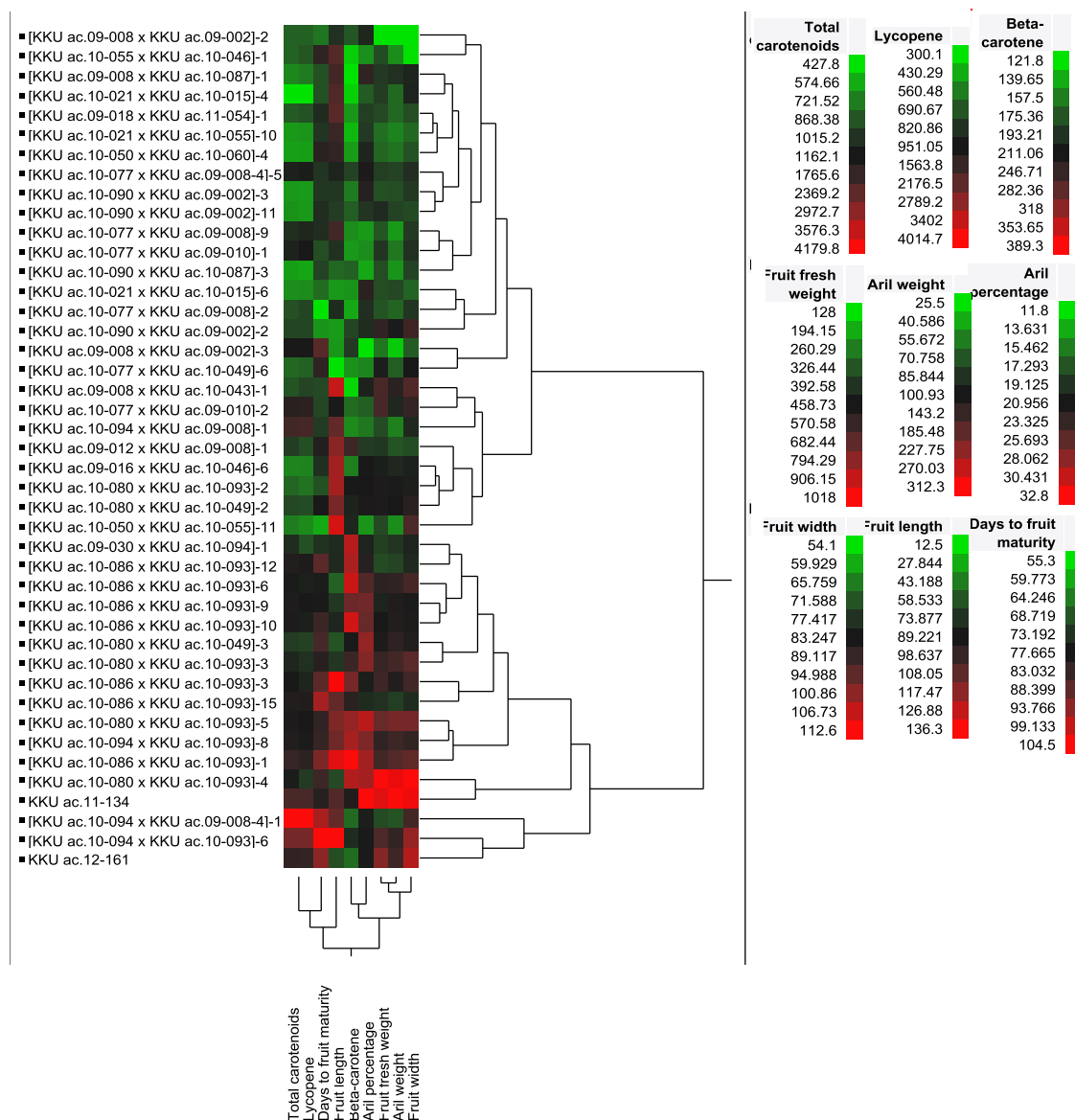
กลุ่มที่ 2 มี 2 พันธุ์ ได้แก่ [KKU ac.09-008 x KKU ac.09-002]-3 และ [KKU ac.10-077 x KKU ac.09-008]-6

กลุ่มที่ 3 มี 8 พันธุ์ ได้แก่ [KKU ac.09-008 x KKU ac.10-043]-1, [KKU ac.10-077 x KKU ac.09-010]-2, [KKU ac.10-094 x KKU ac.09-008]-1, [KKU ac.09-012 x KKU ac.09-008]-1, [KKU ac.09-016 x KKU ac.10-046]-6, [KKU ac.10-080 x KKU ac.10-093]-2, [KKU ac.10-080 x KKU ac.10-049]-2 และ [KKU ac.10-050 x KKU ac.10-055]-11

กลุ่มที่ 4 มี 12 พันธุ์ ได้แก่ [KKU ac.09-030 x KKU ac.10-094]-1, [KKU ac.10-086 x KKU ac.10-093]-12, [KKU ac.10-086 x KKU ac.10-093]-6, [KKU ac.10-086 x KKU ac.10-093]-9, [KKU ac.10-086 x KKU ac.10-093]-10, [KKU ac.10-080 x KKU ac.10-049]-3, [KKU ac.10-080 x KKU ac.10-093]-3, [KKU ac.10-086 x KKU ac.10-093]-3, [KKU ac.10-086 x KKU ac.10-093]-15, [KKU ac.10-080 x KKU ac.10-093]-5, [KKU ac.10-094 x KKU ac.10-093]-8 และ [KKU ac.10-086 x KKU ac.10-093]-1

กลุ่มที่ 5 มี 2 พันธุ์ ได้แก่ [KKU ac.10-080 x KKU ac.10-093]-4 และ KKU ac.11-134

กลุ่มที่ 6 มี 3 พันธุ์ ได้แก่ [KKU ac.10-094 x KKU ac.09-008-4]-1, [KKU ac.10-094 x KKU ac.09-093]-6 และ KKU ac.12-161



ภาพที่ 15 Dendrogram ความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของฟักข้าว 43 พันธุ์ โดยใช้ลักษณะปริมาณ

สารสำคัญ ได้แก่ ปริมาณสารแคโรทีนอยด์รวม สารไลโคพีน และสารเบต้าแคโรทีน (ไม่โครกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด) และลักษณะทางการเกษตร ได้แก่ น้ำหนักผลสด (กรัม) น้ำหนักเยื่อหุ้มเมล็ด (กรัมต่อผล) เปอร์เซ็นต์เยื่อหุ้มเมล็ด ความยาวผล (มิลลิเมตร) ความกว้างผล (มิลลิเมตร) อายุการสุกแก่ของผล (วัน)

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

1. ความหลากหลายของปริมาณสารแคโรทีนอยด์รวม ไลโคพีนและเบต้าแคโรทีน

การจัดกลุ่มความสัมพันธ์จากลักษณะทางการเกษตรและปริมาณสารสำคัญของฟักข้าว 43 พันธุ์ โดยนำข้อมูลปริมาณสารสำคัญ ได้แก่ ปริมาณแคโรทีนอยด์รวม ปริมาณไลโคพีน และปริมาณเบต้าแคโรทีน และลักษณะการเกษตร ได้แก่ อายุผล น้ำหนักผลสด น้ำหนักเยื่อหุ้มเมล็ด และเปอร์เซ็นต์เยื่อหุ้มเมล็ด พบว่าจัดกลุ่มพันธุ์ได้ 6 กลุ่มพันธุ์ กลุ่มที่ 1 มี 18 พันธุ์ พันธุ์แม่มีแหล่งกำเนิดในประเทศไทย กลุ่มที่ 2 มี 8 พันธุ์ พันธุ์แม่มีแหล่งกำเนิดในประเทศไทย กลุ่มที่ 3 มี 8 พันธุ์ พันธุ์แม่ที่มีแหล่งกำเนิดในประเทศไทย 7 พันธุ์ และ 1 พันธุ์ พันธุ์แม่ที่มีแหล่งกำเนิดจากประเทศเวียดนาม กลุ่มที่ 4 มี 2 พันธุ์ มี 1 พันธุ์ เป็นพันธุ์แม่ที่มีแหล่งกำเนิดในประเทศไทย และ 1 พันธุ์ พันธุ์แม่มีแหล่งกำเนิดจากประเทศเวียดนาม กลุ่มที่ 5 มี 1 พันธุ์ พันธุ์แม่มีแหล่งกำเนิดจากประเทศเวียดนาม กลุ่มที่ 6 มี พันธุ์มีแหล่งกำเนิดจากประเทศเวียดนาม ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ น้ำอ้อย บุตรพรมและคณะ (2555). ที่ทำการประเมินลักษณะความหลากหลายทางพันธุกรรมของฟักข้าวใน 26 พันธุ์และได้จัดจำแนกลักษณะรูปทรงผลฟักข้าวไว้ทั้งหมด 6 รูปทรง ได้แก่ รูปทรงผลรี รูปทรงผลกลม รูปทรงผลรูปไข่ รูปทรงผลป้านด้านล่าง รูปทรงผลป้านด้านข้าง และรูปทรงผลกึ่งทรงกระบอก และ Dey et al. (2006). ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะระ (*Momordica charantia* L.) พันธุ์พื้นเมืองของประเทศอินเดีย จำนวน 38 พันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด RAPD และลักษณะทางการเกษตร ได้แก่ น้ำหนักผลเฉลี่ย ความยาวผลเฉลี่ย และความกว้างผลเฉลี่ย เป็นต้น สามารถจัดกลุ่มได้ 2 กลุ่ม

2. ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารสำคัญที่วิเคราะห์โดย HPLC และสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

ปริมาณสารแคโรทีนอยด์รวม ไลโคพีน และเบต้าแคโรทีนของทั้ง 4 วิธีการมีค่าเฉลี่ยของที่ค่อนข้างสูง และมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจากงานทดลองพบว่าในฟักข้าวพันธุ์ [KKU ac.10-094 x KKKU ac.09-008-4]-1 มีปริมาณสารแคโรทีนอยด์รวม ไลโคพีน จาก HPLC สูงสุดเท่ากับ 4179.8 และ 4014.7 มีปริมาณสารสำคัญดังกล่าวที่มากกว่ารายงานของ Aoki et al. (2002) ซึ่งทำการวิเคราะห์เยื่อหุ้มฟักข้าวจาก HPLC และพบว่าในเยื่อหุ้มเมล็ดที่มีสีแดงมีปริมาณสารไลโคพีน 380 $\mu\text{g/g}$ เบต้าแคโรทีน 101 $\mu\text{g/g}$ ซึ่งสูงกว่าส่วนของเนื้อฟักข้าวที่มีสีเหลือง ที่มีปริมาณสารไลโคพีนเพียง 22.2 $\mu\text{g/g}$ และมีเบต้าแคโรทีน 0.9 $\mu\text{g/g}$ Vuong et al. (2006) ได้วิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ในเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวด้วย HPLC ที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร พบว่าในเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวมีแคโรทีนอยด์ทั้งหมดในปริมาณ 497 ไมโครกรัม/กรัม ซึ่งมีไลโคพีนอยู่ในปริมาณ 408 ไมโครกรัม/กรัม และเบต้าแคโรทีนปริมาณ 83 ไมโครกรัม/กรัม และ Ishida et al. (2004) เยื่อฟักข้าวมา 0.2 กรัม น้ำหนักสดผสมกับสารตัวทำละลาย hexane/2 propanol (8:2 v/v) เติมน้ำ BHT 50 $\mu\text{g/ml}$. แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 30 นาที จากนั้นนำไปเขย่า

(shceking) 10 นาที แล้วล้างด้วยโซเดียมคลอไรด์ 3 ครั้ง นำเอาสารสกัดที่อยู่ชั้นไประเหยให้แห้ง โดยใช้แก๊สไนโตรเจน เมื่อสารสกัดแห้งแล้วให้เติม diethyl ether และปรับปริมาตรด้วย acetonitrile 20 ml. จากนั้นนำไปวิเคราะห์ HPLC พบว่าเยื่อหุ้มเมล็ดประกอบด้วยไลโคพีนทั้งหมด 1546.5 - 3053.6 $\mu\text{g/g}$ fresh weight ปริมาณเบต้าแคโรทีนทั้งหมด 636.2 - 836.3 $\mu\text{g/g}$ fresh weight

ความสัมพันธ์ของปริมาณสารแคโรทีนอยด์รวม ไลโคพีน และเบต้าแคโรทีน ทั้ง 4 วิธีการนั้นก็พบว่ามีความสัมพันธ์กันดีในทางบวก และการวิเคราะห์ปริมาณสารแคโรทีนอยด์รวม ไลโคพีน และเบต้าแคโรทีน ด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ วิธีการที่ 3 และ HPLC มีความสัมพันธ์กันสูง นั้นแสดงว่าในทางปรับปรุงพันธุ์พืชข้าวเพื่อเพิ่มปริมาณสารไลโคพีนหรือเบต้าแคโรทีนให้สูงขึ้นนั้น เราสามารถตรวจวัดโดยใช้สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ วิธีการที่ 3 แทนการใช้ HPLC เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก ประหยัดเวลาและประหยัดค่าใช้จ่ายได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Rao et al. (1998) ที่ทำการศึกษาวเคราะห์ปริมาณสารไลโคพีนจาก 2 วิธี คือ การวิเคราะห์สารด้วย HPLC และสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ในมะเขือเทศและผลิตภัณฑ์มะเขือเทศ พบว่าปริมาณสารไลโคพีนให้ผลที่แตกต่างกันเฉลี่ยเพียง 11 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น ซึ่งการวิเคราะห์สารไลโคพีนโดยใช้ Spectrophotometer เป็นเทคนิคที่ง่ายและรวดเร็วกว่าเทคนิค HPLC ซึ่ง HPLC เทคนิคนี้มีประสิทธิภาพในการแยกสารและบ่งชี้สารที่ต้องการวิเคราะห์ได้ดีกว่าและมีราคาแพงกว่า แต่เป็นเทคนิคที่เหมาะสมกับการวิเคราะห์ที่ทำเป็นประจำและต้องการผลที่รวดเร็ว ดังนั้นการเลือกใช้วิธีการวิเคราะห์จึงขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของงานทดลอง

3. สหสัมพันธ์ระหว่างค่าวัดสีและปริมาณสารสำคัญ

ความสัมพันธ์ระหว่างค่าวัดสีและปริมาณสารสำคัญซึ่งประกอบด้วยสารแคโรทีนอยด์รวม สารไลโคพีน และสารเบต้าแคโรทีน ของทั้ง 4 วิธีการนั้น และ ค่า C^* และ h° มีความสัมพันธ์ทางสถิติในทางบวก พบว่าค่า C^* ที่มีความสัมพันธ์ เบต้าแคโรทีนที่วิเคราะห์จากสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ทั้ง 3 วิธีการและ HPLC แต่ไม่มีความสัมพันธ์กันกับสารแคโรทีนอยด์รวมของทั้ง 3 วิธีการ ส่วนค่า h° พบว่ามีความสัมพันธ์กันสูงกับปริมาณสารแคโรทีนอยด์รวม สารไลโคพีน และสารเบต้าแคโรทีนของทั้ง 4 วิธีการ นั้นแสดงว่าช่วงของสีเยื่อหุ้มเมล็ดพืชข้าวอยู่ในตำแหน่งไปทางสีแดง-สีเหลือง ซึ่งจากการศึกษานี้ตรงกับรายงานของ Seroczynska et al. (2006) ที่ศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างสีดอก winter squash กับปริมาณสารแคโรทีนอยด์และเบต้าแคโรทีนที่มีอยู่ใน squash ผลสด เพื่อนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ squash ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารแคโรทีนอยด์ โดยการวัดสีดอกด้วยเครื่องวัดสี พบว่าค่า L^* , a^* , b กับความสัมพันธ์ของสีดอก Squash และปริมาณสารแคโรทีนอยด์และเบต้าแคโรทีนที่มีอยู่ใน winter squash ผลสด ไม่มีความสัมพันธ์กันหรือทั้งสองลักษณะนั้นเป็นอิสระต่อกัน อธิบายได้ว่าสีของดอก squash ที่มีสีเข้มมากนั้นไม่ได้หมายความว่าจะมีปริมาณแคโรทีนอยด์และเบต้าแคโรทีนจะต้องมีปริมาณมากตามไปด้วย Rachel et al. (2009) ที่ศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของ $CIE L^*a^*b$ ระหว่าง ค่าสีผลกับปริมาณสารแคโรทีนอยด์ด้วย HPLC ในฟักทองและ squash เพื่อใช้ประเมินปริมาณแคโรทีนอยด์และนำไปใช้ในการ

ปรับปรุงพันธุ์ฟักทอง ซึ่งพบว่ามีความสัมพันธ์กันโดยค่า a^* , $r = 0.91$ และ b^* , $r = 0.87$ ดังนั้นการวัดสีจึงเป็นการวิธีที่ง่าย และสามารถนำไปใช้เพื่อประเมินปริมาณสารแคโรทีนอยด์ในการคัดพันธุ์ของฟักทองและ Squash ได้ต่อไป

บทที่ 6

สรุปและข้อเสนอแนะ

1. สรุปผลการทดลอง

จากการลักษณะทางสัณฐานวิทยาของผล ซึ่งทำการปลูกทดสอบปักชำลูกผสมทั้งหมด 43 พันธุ์ ที่มีแหล่งกำเนิดในประเทศไทย และจากประเทศเวียดนาม ปริมาณสารสำคัญ ได้แก่ ปริมาณแคโรทีนอยด์รวม ปริมาณไลโคพิน และปริมาณเบต้าแคโรทีน และลักษณะการเกษตร ได้แก่ อายุผล น้ำหนักผลสด ความกว้างผล ความยาวผล น้ำหนักเยื่อหุ้มเมล็ด และเปอร์เซ็นต์เยื่อหุ้มเมล็ด มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) และเมื่อนำข้อมูลไปจัดกลุ่มพันธุ์ สามารถจัดกลุ่มพันธุ์ปักชำได้ 6 กลุ่ม

และจากการวัดสีเยื่อหุ้มเมล็ดปักชำนั้น ค่า C^* และ h° มีความสัมพันธ์กันสูงไปในทิศทางบวก ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าการวัดค่าสีสามารถนำมาประเมินปริมาณสารไลโคพิน และเบต้าแคโรทีนได้ในเบื้องต้น เนื่องจากค่า h° ที่สามารถระบุตำแหน่งของสีที่เป็นสีแดง-สีเหลือง ได้อย่างชัดเจน และค่า C^* ที่บอกความเข้มของสีเยื่อหุ้มเมล็ดปักชำ ถ้าสีของเยื่อหุ้มเมล็ดปักชำซึ่งมีสีแดง พบว่ามีความเข้มมากขึ้นแสดงว่ามีปริมาณสารแคโรทีนอยด์อยู่มากเช่นกัน

ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณสารแคโรทีนอยด์รวม ไลโคพิน และเบต้าแคโรทีน จากความสัมพันธ์ระหว่างวิธีการสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ วิธีการที่ 3 กับ HPLC มีความสัมพันธ์สูงไปในทิศทางบวกของปริมาณสารแคโรทีนอยด์รวม ($r = 0.93$) ไลโคพิน ($r = 0.94$) และเบต้าแคโรทีน ($r = 0.94$) ดังนั้นการวิเคราะห์ปริมาณสารแคโรทีนอยด์รวม ไลโคพินและเบต้าแคโรทีน ด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ สามารถใช้แทน HPLC ได้ และการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ในกรณีที่มีตัวอย่างพันธุ์จำนวนมากจะทำให้นักปรับปรุงพันธุ์ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายลงได้

ข้อมูลจากงานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่องานปรับปรุงพันธุ์ ซึ่งข้อมูลเหล่านี้สามารถช่วยในการตัดสินใจเลือกพันธุ์ปักชำในการปรับปรุงพันธุ์ปักชำเพื่อให้มีสารสำคัญสูงได้

2. ข้อเสนอแนะ

2.1 ในการศึกษาพันธุ์กรรมการถ่ายทอดลักษณะปริมาณสารไลโคพินและเบต้าแคโรทีน และการพัฒนาวิธีตรวจวัดปริมาณสารไลโคพินและเบต้าแคโรทีนในปักชำ จะเห็นได้ว่ามีจำนวนสายพันธุ์ปักชำที่มีจำนวนมาก ดังนั้นในการศึกษาครั้งต่อไปควรหาความสัมพันธ์ค่าสีที่ผิว ($L^*C^*h^\circ$) ของผลปักชำระหว่างปริมาณแคโรทีนอยด์ เพื่อจะได้เป็นการประเมินเบื้องต้นและลดจำนวนพันธุ์ปักชำได้ และสามารถนำไปใช้ในการคัดเลือกพันธุ์เพื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ ซึ่งจะนำไปสู่การปรับปรุงพันธุ์เพื่อเพิ่มปริมาณสารไลโคพินต่อไปได้

เอกสารอ้างอิง

- กมล เลิศรัตน์. 2550. พันธุ์พืชยุคใหม่เพื่อชีวิตที่ยืนยาวอย่างเป็นสุข. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- กมล เลิศรัตน์ มนัญญา งามคักดี และอานูภาพ สังข์ศรี. 2553. R & D เพื่อการบริโภคผักและผลไม้:
บนเส้นทางสู่คุณภาพชีวิต. โรงพิมพ์คลังนานาวิทยา, ขอนแก่น.
- กฤษฎา สัมพันธ์รักษ์. 2528. การปรับปรุงพันธุ์พืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- กฤษฎา สัมพันธ์รักษ์. 2546. การปรับปรุงพันธุ์พืช: พื้นฐาน วิธีการ และแนวคิด. สำนักพิมพ์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วีณา จิรจรรย์กุล. 2543. มะเขือเทศ. คณะเกษตรศาสตร์มหาวิทยาลัยมหิดล: กรุงเทพฯ. ศักดิ์สิทธิ์
จันทร์ไทย. 2541. โครมาโตรกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง. ขอนแก่น: ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- ชูชาติ อารีจิตราอนุสรณ์. 2544. เครื่องมือวิทยาศาสตร์ พิมพ์ครั้งที่ 3. ภาควิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิค
การแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- น้ำอ้อย บุตรพรม. 2555. การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ
และปริมาณสารสำคัญในผักขาว. [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาพืช
สวน]. ขอนแก่น: มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- ปาริชาติ ปาระทั้ง พชริน สงศรี ปวันรัตน์ วิหังส์ พลัง สุริหาร และ กมล เลิศรัตน์. 2555. การ
เจริญเติบโตและ ระยะพัฒนาการของผลผักขาว (*Momordica cochinchinensis* (Lour.)
Spreng). แก่นเกษตร 40: 504- 513
- เปรมศิริ โรจน์สัจจะกุล และ รณชัย ยอดดำเนิน. 2554. รายงานฉบับสมบูรณ์. โครงการการศึกษาการ
เปลี่ยนแปลงของไลโคปีนในน้ำผักขาวพร้อมดื่มบรรจุขวดที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อน
และระหว่างการเก็บรักษา พร้อมการปรับปรุงกระบวนการผลิตให้ได้มาตรฐาน GMP.
คลินิกเทคโนโลยีเครือข่าย. มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตกาญจนบุรี
- พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์. 2525. พันธุศาสตร์ปริมาณที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช. ภาควิชาพืชไร่นา คณะ
เกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 179 หน้า.
- พัชริน สงศรี. 2554. ผักขาว พืชพื้นบ้านคุณค่าสูงที่ไม่ควรมองข้าม: แนวทางการปรับปรุงพันธุ์. เกษตร
ก้าวหน้า 24(3): 32 - 42.
- พัชริน สงศรี และ กมล เลิศรัตน์. 2554. ผักขาวมหัศจรรย์ผักพื้นบ้านต้านมะเร็ง. เคหะการเกษตร 32
(1): 173-174.
- สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว). 2548. พืชกินได้ในป่าสะแกราช.
(สืบค้นข้อมูลวันที่ 5 มีนาคม 2556) Available
from:URL:<http://www.tistr.or.th/sakaerat/Plant%02in%02Sakaerat/plant.htm>

- Agarwal S. and Rao AV. 1998. Tomato lycopene and low density lipoprotein oxidation: a human dietary intervention study. *Lipids* 33: 981-984.
- Arab L. and Steck S. 2000. Lycopene and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 71: 1691S-1695S.
- Aoki, H., Kieu, N.T.M., Kuze, N. and Tomisaka, K. 2002. Carotenoid pigments in Gac fruit (*Momordica cochinchinensis* Spreng). *Biosci, Biotechnol, Biochem* 66: 2479-2482.
- Bramley, PM. 2000. Is lycopene beneficial to human health? *Phytochem* 54: 233-236.
- Batu, A. 2004. Determination of acceptable firmness and colour values of tomatoes. *Journal of Food Engineering*, 61, 471-475.
- Clinton S.K. 1998. Lycopene: chemistry, biology, and implications for human health and disease. *Nutritional Reviews* 56: 35-51.
- Cunningham F.X. and Gantt E. 1998. Gene and enzymes of carotenoid Biosynthesis in Plant. *Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 557-83.
- Cuevas H. E., Song H., Staub J. E. and Simon P. W. 2010. Inheritance of beta-carotene-associated flesh color in cucumber (*Cucumis sativus* L.) fruit. *Euphytica*. 171:301-311
- Demmig, A.B. and Gilmore A.M.. 1996. In vivo functions of carotenoids in higher plants. *Journal of Federation American Societies for Experimental Biology* 10: 403-412.
- Mascio, D., Kaiser S. and Seis H. 1989. Lycopene as the most efficient biological carotenoids singlet oxygen quencher. *Arch Biochem Biophys* 274: 532-538.
- Gartner. C, Stahl W. and Sies H. 1997. Lycopene is more bioavailable from tomato paste than from fresh tomatoes. *American Journal of Clinical Nutrition*. 66: 116-122.
- Gross, J.N. 1991. *Pigment in Vegetable: Chlorophyll and Carotenoid*. The AVI Publ. Co. Inc., New York.
- Henry, B.S. 1996. Natural Food Colours. *In* Natural food colourants. 2nd ed. (Hendry G.A.F. and Houghton, J.D., Eds.), London: Chapman and Hall Inc.
- Ishida, B. K., Turner, C., Chapman, M. H. and McKeon, A. T. 2004. Fatty acid and composition of Gac (*Momordica cochinchinensis* Spreng) fruit. *Agricultural and Food Chemistry* 52: 274-279.

- Ishida, B.K. and Chapman, M.H. 2009. Carotenoid Extraction from plants using a novel, environmentally friendly solvent. *Agricultural and Food Chemistry*. 57: 1051-1059
- Jone RR. HPLC keeping grow away the separation sciences. 1991 *R&D* 31: 54-7.
- Kubola, J. and Siriamornpun, S.. 2011. Phytochemicals and antioxidant activity of different fruit fractions (peel, pulp, aril and seed) of Thai gac (*Momordica cochinchinensis Spreng*), Mahasarakham University. *Food Chemistry* 127: 1138–1145.
- Luterotti S, Markovic´ K, Franko M, Bicanic D, Madzžgalj A and Kljak K. 2013. Comparison of spectrophotometric and HPLC methods for determination of carotenoids in foods. *Food Chemistry* 140: 390-397.
- Macdougall, D.B. 2002. *Colour in Food: Improving quality*. USA: CRC press.
- Meléndez-Martínez A.J., Ayala F., Echvarri J.F., Negueruela A.I. , Escudero-Gilete M.L., Gonzclez-Miret M.L., Vicario I.M. and Heredia F.J. 2011. A novel and enhanced approach for the assessment of the total carotenoid content of foods based on multipoint spectroscopic measurements. *Food Chemistry* 126: 1862-1869.
- Moore, R., Clark, W.D., Kingsley, R.S., and Vodopich, D., Botany, Wm. C. Brown, 1995. *Botany*. William C Brown Pub.
- Naves, M.M.V. and Moren F.S. 1998. Beta-carotene and cancer chemoprevention: from epidemiological associations to cellular mechanisms of action. *Nutritional Reviews* 18: 1807- 1824
- Nhung, D.T.T., Bung P.N., Ha N.T. and Phong T.K. 1994. Changes in lycopene and beta carotene contents in aril oil of gac fruit during storage. *Food Chemistry* 121: 326-331.
- Pomeranz. Y. and Melaon. C.E. 1994. *Food Analysis*. 3th Ed.
- Prasit suwannalert. 2006. Lycopene content, antioxidant activity in colored fruits and serum lycopene level in Northeastern Thai people. Master of Science Thesis in Medical Biochemistry, Graduate School, Khon Kean University.
- Pryor, W.A., Stahl W. and Rock C.L.. 2000. Beta-carotene: from biochemistry to clinical trials. *Nutritional Reviews*. 58:39-53.
- Rao AV, Waseem Z and Agarwal S . 1998. Lycopene content of and tomato products and their contribution to dietary lycopene. *Food Research International*. 31 (10): 734-741.

- Rao AV, and Agarwal S. 1999. Role of lycopene as antioxidant carotenoid in the prevention of chronic diseases: A review. *Nutr Res.* 19: 305-323.
- Rachel A. ItleEileen A. Kabelka1.2009. Correlation between $L^*a^*b^*$ ColorSpace Values and Carotenoid Content in Pumpkins and Squash (*Cucurbita* spp.). *Hortscience.* 44(3);633–637
- Rodriguez-Amaya, D.B., 2008. and Kimura, M. 2004. Handbook for Carotenoid Analysis; Harvest Plus: Washington, D.C. and Cali, Columbia.
- Seroczyńska, A., Korzeniewska A., Wiśniewska J S., Szczytt K.N., and Gajewski M.. 2006. Relationship between carotenoids content and flower or fruit flesh colour of winter squash (*Cucurbita maxima* Duch.). *Folia Horticulturae, Ann.* 18(1); 51-61.
- Stommel J. R. and Haynes K. G. 1994. Inheritance of Beta Carotene Content in the Wild Tomato Species *Lycopersicon cheesmanii*. *Journal of Heredity.* 85(5); 401-404.
- Stahl W. and Sies H. 2003, Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular aspects of medicine.* 24: 345- 351.
- Soroka Iaroslav M, Narushin Valeriy G, Turiyansky Yuriy D. and Alexey A. Tyurenkov. 2012. Spectroscopy analysis for simultaneous determination of lycopene and β -carotene in fungal biomass of *Blakeslea trispora*. *Biochimica ponica.* 59: 65–69.
- Takeoka, G.R., Dao, L., Flessa, S., Gillespie, D.M., Sewell, W.T., Huebner, B., Bertow D. and Ebeler, S.E. 2001. Processing effects on lycopene content and antioxidant activity of tomatoes. *Agricultural and Food Chemistry.* 49: 3713-3717.
- Tomes, M.L., Quackenbush F.W., Nelson O. E., JR .and North B. 1953. The Inheritance of Carotenoid pigment systems in the Tomato. *Journal of Genetics.* 38; 117-127
- Owen T. 1996. Fundamentals of UV-visible spectroscopy. Germany.
- Volker Bohm, Ni Luh Puspitasari-Nienaber, Mario G. Ferruzzi and Steven J. Schwartz. 2002. Trolox Equivalent Antioxidant Capacity of Different Geometrica Isomers of α -Carotene, β -Carotene, Lycopene and Zeaxanthin. *Agricultural. Food Chemistry.* 50: 221-226
- Vuong, L.T., 2002. A Fruit from Heaven, Vietnam journal, Available: <http://www.vietnamjournal.org/article> (September 10, 2010.)

- Vuong, L.T., and King J.C. 2003. A method of preserving and testing the acceptability of Gac fruit oil, a good source of beta-carotene and essential fatty acids. Food and Nutrition bulletin 24: np.
- Vuong, L.T., Franke A.A., Custer, L.J. and Murphy S.P. 2006. *Momordica cochinchinensis* Spreng. (gac) fruit carotenoids reevaluated. Food Composition and Analysis. 19: 664-668.

RAPID ASSESSMENT OF LYCOPENE AND β -CAROTENE IN SPINY BITTER GOURD (*MOMORDICA COCHINCHINENSIS* (LOUR.) SPRENG)

PAWANRAT WIHONG¹, PATCHARIN SONGSRI^{1,2*}, BHALANG SURIHARN^{1,2},
KHOMSORN LOMTHAISONG³ AND KAMOL LERTRAT^{1,2}

¹Department of Plant Science and Agricultural Resources, Faculty of Agriculture, KhonKaen University,
KhonKaen 40002, Thailand

²Plant Breeding Research Center for Sustainable Agriculture, Khon Kaen University, KhonKaen 40002, Thailand

³Department of Biochemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, KhonKaen 40002, Thailand

*Corresponding author's email: patcharinso@kku.ac.th

Abstract

A simple spectrophotometric method was developed for the analysis of lycopene, β -carotene and total carotenoids in the spiny bitter gourd. Lycopene, β -carotene and total carotenoids were extracted from spiny bitter gourd aril samples using three accelerated solvent extraction methods. The supernatants of the extracted samples were then analyzed for carotenoids using spectrophotometry at the wavelengths of 450, 470 and 502 nm. The proposed method was validated for its analytical performance parameters including simplicity, accuracy and effectiveness. The method was applied to the determination of lycopene, β -carotene and total carotenoids in 43 spiny bitter gourd genotypes. Over all genotypes, the lycopene, β -carotene and total carotenoids contents obtained using the proposed spectrophotometric method were not significantly different from those obtained from HPLC methods. A spiny bitter gourd genotype with high lycopene, β -carotene and total carotenoids was identified by the HPLC method, and this result was similar to the results of the spectrophotometric method. The highest positive correlation was found between HPLC and spectrophotometric method III for lycopene ($r = 0.94$; $p \leq 0.01$), β -carotene ($r = 0.92$; $p \leq 0.01$) and total carotenoids ($r = 0.93$; $p \leq 0.01$). The results indicated that the present spectrophotometric method could be used as an alternative to chromatographic analysis for the determination of the lycopene, β -carotene and total carotenoids contents in spiny bitter gourd. This method is reliable, rapid and inexpensive and can be used to screen a large number of accessions in spiny bitter gourd breeding programs.

Key words: Gac fruit, Spectrophotometer, Indirect selection, Carotenoids, Phytochemical.

Introduction

The modern lifestyle and the consumption of low quality food can cause several health problems such as diabetes, hypertension, heart disease and cancer (Voung & King, 2003; Voung *et al.*, 2006; Ishida & Chapman, 2009). Functional food products, including many vegetables and fruits that contain useful phytochemicals, have health benefits beyond ordinary food, and appropriate consumption of these functional food products reduces the risk of many chronic diseases.

Spiny bitter gourd or gac fruit (*Momordica cochinchinensis* (Lour.) Spreng) is an underutilized climbing plant in the Cucurbitaceae family. Its aril is rich in lycopene and β -carotene, which can reduce the risk of several diseases such as cancer of the prostate, colon and stomach as well as coronary heart disease (Vuong *et al.*, 2006; Ishida & Chapman, 2009). The species is distributed widely in many Asian countries, including Vietnam, India, Bangladesh, China, Laos, Myanmar, Malaysia and Thailand (Bootprom *et al.*, 2012; Bootprom *et al.*, 2015). The spiny bitter gourd aril contains higher levels of β -carotene and lycopene than any known fruit crop, and it also contains high quality fatty acids (Ishida *et al.*, 2004). The fatty acids in spiny bitter gourd play an important role in the absorption of lycopene and β -carotene (Ishida *et al.*, 2004). Thus, arils of the spiny bitter gourd are currently used for the production of many functional food products, such as encapsulated arils, frozen arils, dry arils, beverages, snacks, health foods and cosmetics.

For the quality control of raw materials and breeding of spiny bitter gourd for a high lycopene content, reliable and effective methods for the determination of lycopene are required. The methods available for lycopene analysis include spectrophotometry-based methods and high performance liquid chromatographic (HPLC) methods used in tomato products (Luterotti *et al.*, 2013). The spectrophotometric method is simple, rapid and cost-effective and can be used as a tool for the analysis lycopene in other plants. The HPLC method, in contrast, is more effective and accurate, but it is also more complex and time-consuming. The spectrophotometric method is an alternative method for large numbers of samples. A positive and significant correlation between the values obtained with the spectrophotometric method and the HPLC method has been reported in tomato (Davis *et al.*, 2003a), vegetables (Barba *et al.*, 2006), orange juice (Meléndez-Martínez *et al.*, 2011) and yellow maize flour (Luterotti *et al.*, 2013). However, the HPLC method is more sensitive for the quantification of lycopene in fruit and vegetable samples, and is more specific than the spectrophotometric method (Cámara *et al.*, 2010).

The HPLC method is not appropriate for the evaluation of lycopene in large numbers of accessions or segregating materials in breeding programs because it is difficult, costly and time-consuming. For the spiny bitter gourd, the spectrophotometric method may be useful as an alternative method for screening spiny bitter gourd accessions for high lycopene contents if the results are closely related to those of the HPLC method. Although the spectrophotometric method was developed for the analysis of lycopene and total carotenoid contents in many plant species, the development of this method in

spiny bitter gourd plant is still lacking. Moreover, the relationship between these methods in spiny bitter gourd is not known. The objectives of this study were to evaluate carotenoids, lycopene and β -carotene in spiny bitter gourd accessions using the spectrophotometric and HPLC methods and to determine the relationship between these methods. This information will be useful for the quality control and breeding of spiny bitter gourd with a high lycopene and β -carotene content.

Materials and methods

Plant materials: Forty-three genotypes of spiny bitter gourd were used in this study. Forty-one F_1 plants were obtained from the hybridization of parental plants from various sources of origin and two accessions (KKU ac.11-134 and KKU ac.12-161) were introduced from Vietnam for comparison. These genotypes were planted from seeds as individual plants in May 2013-May 2014 at the Fruit Crop Research Station, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University. Agronomic practices, including irrigation, fertilizer application, insecticides and fungicides were applied appropriately and mini-sprinkler irrigation was available to avoid drought. Six months after transplanting, the female flowers were artificially pollinated and tagged to identify the parents and days to maturity. At maturity, or about 60-90 days after pollination, the ripe fruits (identified by the red skin of the fruits) were harvested. Four fruits from each genotype were harvested, and the arils were separated from the fruits and stored separately as four replicates at -20°C until phytochemical analysis.

Reagents and standards: Butylated hydroxyl toluene (BHT), carotenoid standards for the HPLC method, lycopene and β -carotene were purchased from Sigma Chemical Co. (Louis, MO, USA). Methanol, acetonitrile and dichloromethane used in the extraction of carotenoids and used in the HPLC and spectrophotometer analysis were purchased from Labscan (RCI, Labscan, Thailand). All chemicals and reagents used in the experiments were of analytical grade.

Extraction of carotenoids: Three extraction methods were used for carotenoid analysis for 43 genotypes of spiny bitter gourd. Aril samples (0.1 g) were used for the analysis. These samples were placed in plastic cups and covered with lids. The cups were wrapped in aluminum foil to protect the aril samples from direct sunlight. These samples were used for all extraction methods.

The extraction methods used in this study are described briefly. In method I, the samples were extracted with ethanol in a mortar and ground until the aril samples were pale. The ground samples were then put in a Falcon tube with 3 mL of tetrahydrofuran (Vuong *et al.*, 2006). In method II, the samples were mixed with 100 mL of extraction solvent (n-hexane/DW/ethanol, 56:10:34 v/v/v) until the complete exhaustion of color. In method III, the samples were mixed with 100 mL of extraction solvent (n-hexane/acetone/ethanol, 50:25:25 v/v/v) (Bohm *et al.*, 2002; Kubola & Siriamornpun, 2011).

The extracted samples were loaded in Falcon tubes and then vortexed (speed 6) for 1 minute. The samples were supplemented with 5 mL of 95% n-hexane and 5 mL of distilled water and centrifuged at 5000 rpm at 25°C

for 10 minutes. The supernatants of the extracted samples were used for the analysis of carotenoids.

The samples obtained from methods I, II and III were analyzed by a spectrophotometer at the wavelengths of 450, 470 and 502 nm. The samples obtained from method III were also filtered through 0.45 μm membrane filters and sub-samples of 20 μL were injected for HPLC analysis at a wavelength of 450 nm.

Carotenoid analysis by spectrophotometry: A spectrophotometer (10S UV/visible spectrophotometer, Thermo Scientific Genesys, Australia) was used for carotenoid analysis in spiny bitter gourd aril samples. The spectrophotometer analyzed the samples in the visible spectrum ranging from 190 to 1100 nm. The samples were diluted with hexane, and 3 mL of the diluted samples was used for analysis at the wavelengths of 450, 470 and 502 nm. Hexane was used as the blank. A quartz cuvette was used in the spectrophotometer. The coefficient of $A^{1\%}$ was used for the calculation of lycopene and β -carotene, and the extinction coefficient of 1% was used as the absorbance coefficient for hexane.

Carotenoid analysis by high performance liquid chromatography (HPLC): An HPLC method (Kubola & Siriamornpun, 2011) with minor modifications was used for the analysis of the carotenoid, β -carotene and lycopene contents in the arils of ripe fruits. The composition of the solvents and the isocratic conditions used were described previously (Kubola & Siriamornpun, 2011). Analysis was performed using a Shimadzu (Japan) LC-20AC pump, an SPD-M20A diode array detector and a LUNA C-18 column (4.6×250 mm i.d., 5 μm). The mobile phase consisted of acetonitrile 1 (solvent A)/dichloromethane (solvent B) and methanol (solvent C) at a flow rate of 1 mL/min. At this flow rate, one sample took 30 minutes to pass through the column, and the absorbance was measured at the wavelength of 450 nm.

Statistical analysis: The data were analyzed for the individual methods according to a completely randomized design, and the combined analysis of variance for all methods was performed for all parameters that showed homogeneity of variance. The least significant difference (LSD) test at $p > 0.05$ was used to compare means. All calculations were carried out in the STATIX8 software package.

Results

Variations in lycopene, β -carotene and total carotenoid levels: The spectrophotometric and HPLC methods were used for the evaluation of lycopene, β -carotene and total carotenoid levels in 43 spiny bitter gourd genotypes. Significant differences were observed among the 43 genotypes of gac fruit regarding lycopene, β -carotene and carotenoid levels determined using all methods (Table 1). Lycopene levels determined by three different spectrophotometric methods ranged from 94.5 to 3798.0 $\mu\text{g/g}$ fresh weight, whereas it ranged from 300.1 to 4014.7 $\mu\text{g/g}$ fresh weight by the HPLC method (Table 1). Method II had the lowest range (94.5 to 2323.1 $\mu\text{g/g}$ fresh weight), whereas method III had the highest range (172.0 to 3798.0 $\mu\text{g/g}$ fresh weight).

Table 1. Maximum (max), minimum (min) and means for lycopene, Beta-carotene and total carotenoids in 43 spiny bitter gourd genotypes determined by three spectrophotometric methods (method I, II and III) and HPLC method.

	Lycopene (µg/g fresh weight)				Beta-carotene (µg/g fresh weight)				Total carotenoids (µg/g fresh weight)			
	Method I	Method II	Method III	HPLC	Method I	Method II	Method III	HPLC	Method I	Method II	Method III	HPLC
Max.	2543.8	2323.1	3798.0	4014.7	827.5	755.1	884.2	454.4	2705.2	2351.8	3855.3	4179.8
Min.	123.4	94.5	172.0	300.1	8.8	28.7	19.6	121.6	179.7	169.5	271.4	427.8
Mean	890.4	783.9	996.3	951.1	222.1	208.3	214.2	211.0	1112.6	992.1	1210.5	1162.1
SD.	556.0	497.4	697.7	701.1	180.2	189.9	206.5	83.6	577.8	530.4	720.5	715.9
SE.	42.4	37.9	53.2	53.5	13.7	14.5	15.7	6.4	44.1	40.4	54.9	54.6
C.V.(%)	27.4	27.7	34.3	34.2	41.8	46.6	46.4	16.4	23.9	25.7	30.2	29.3
F-test	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**

** = Significant at p<0.01

SD = Standard deviation, SE = Standard errors, C.V. = Calculation from of variance data

Table 2. The simple linear regression, coefficient of determination (R²) and correlation coefficients between three spectrophotometric methods and HPLC method in analysis of lycopene, β-carotene and total carotenoid content in 43 spiny bitter gourd genotypes.

Method	Equation	R ²	r
Lycopene			
HPLC vs method I	y = 0.95x – 101.84	0.59**	0.77**
HPLC vs method II	y = 1.17x + 32.72	0.71**	0.85**
HPLC vs method III	y = 0.96x – 7.48	0.89**	0.94**
β-carotene			
HPLC vs method I	y = 0.40x + 123.36	0.67**	0.82**
HPLC vs method II	y = 0.40x + 128.32	0.74**	0.86**
HPLC vs method III	y = 0.38x + 129.54	0.85**	0.92**
Total carotenoids			
HPLC vs method I	y = 0.90x + 157.66	0.55**	0.74**
HPLC vs method II	y = 1.07x + 101.91	0.64**	0.80**
HPLC vs method III	y = 0.93x + 26.83	0.87**	0.93**

** Significant at p<0.01

The β-carotene levels determined by the three spectrophotometric methods ranged from 8.8 to 882.5 µg/g fresh weight, while it ranged from 121.6 to 454.4 µg/g fresh weight by the HPLC method. The ranges of β-carotene were rather similar for method I (8.8 to 827.5 µg/g fresh weight) and method III (19.6 to 884.2 µg/g fresh weight); however, it was rather narrow for method II (28.7 to 755.1 µg/g fresh weight).

Total carotenoid levels determined by the three spectrophotometric methods ranged from 169.5 to 3855.3 µg/g fresh weight, while the total carotenoid levels determined by the HPLC method ranged from 427.8 to 4179.8 µg/g fresh weight. Method II had the lowest range (169.5 to 2351.8 µg/g fresh weight), while method III had the highest range (271.4 to 3855.3 µg/g fresh weight). Of note, the range of values provided by spectrophotometric method III were rather similar to those determined by the HPLC method.

Relationship between the HPLC and spectrophotometric methods: The correlation coefficients between the HPLC and spectrophotometric methods for lycopene, β-carotene and carotenoid contents were calculated for 43 spiny bitter gourd genotypes (Table 2). Strong positive correlations were found between the HPLC method and spectrophotometric method I for lycopene (r = 0.77), β-carotene (r = 0.82) and total carotenoids (r = 0.74). There were also positive correlations between the HPLC method and spectrophotometric method II regarding the lycopene (r = 0.85), β-carotene (r = 0.86) and total carotenoid (r = 0.80) contents. Similarly, there was a consistently strong and

positive correlation between HPLC and spectrophotometric method III for the lycopene (r = 0.94), β-carotene (r = 0.92) and total carotenoid (r = 0.93) contents. The results show that spectrophotometric method III was more strongly and positively correlated with the HPLC method than spectrophotometric methods I and II.

Thus, we focused on the relationship between HPLC method and spectrophotometric method III for the determination of phytochemicals (Fig. 1).

Discussion

Spectrophotometry-based methods have been used for the analysis of lycopene, β-carotene and total carotenoids in various crops such as tomato (Davis *et al.*, 2003a), watermelon (Davis *et al.*, 2003b), vegetables (Barba *et al.*, 2006) and orange juice (Meléndez-Martínez *et al.*, 2011). However, studies have been limited to a small number of genotypes, and information on the development of this method for the analysis of gac fruit is still lacking.

In this study, lycopene, β-carotene and total carotenoids were determined by three spectrophotometry-based methods and an HPLC method in 43 spiny bitter gourd genotypes. The results indicate that the spectrophotometric method can be used to identify different spiny bitter gourd genotypes according to their lycopene, β-carotene and total carotenoid contents, similar to the HPLC method. The carotenoid levels were the highest, the lycopene levels were intermediate, and the β-carotene levels were the lowest. High CV values and F-ratios indicate considerable variations in these phytochemicals.

The average lycopene, β-carotene and total carotenoids contents were 300.1, 121.6 and 427.8 µg/g fresh weight, respectively, determined by HPLC. These levels were similar to the findings of Vuong *et al.* (2006), who reported average lycopene, β-carotene and total carotenoids content of 408, 83 and 497 µg/g fresh weight, respectively. In addition, the lycopene and β-carotene contents were estimated to be 380 and 101 µg/g fresh fruit, respectively, by Aoki *et al.* (2002). In contrast, Ishida *et al.* (2004) reported average lycopene and β-carotene contents of 2300 and 750 µg/g fresh weight, respectively. The differences in these observations could be due to differences in plant materials. In this study, the phytochemical content determined by HPLC was rather similar to the levels provided by the spectrophotometric methods, especially spectrophotometric method III. This result is similar to that of Luterotti *et al.* (2013), reported in tomato products and yellow maize flour.

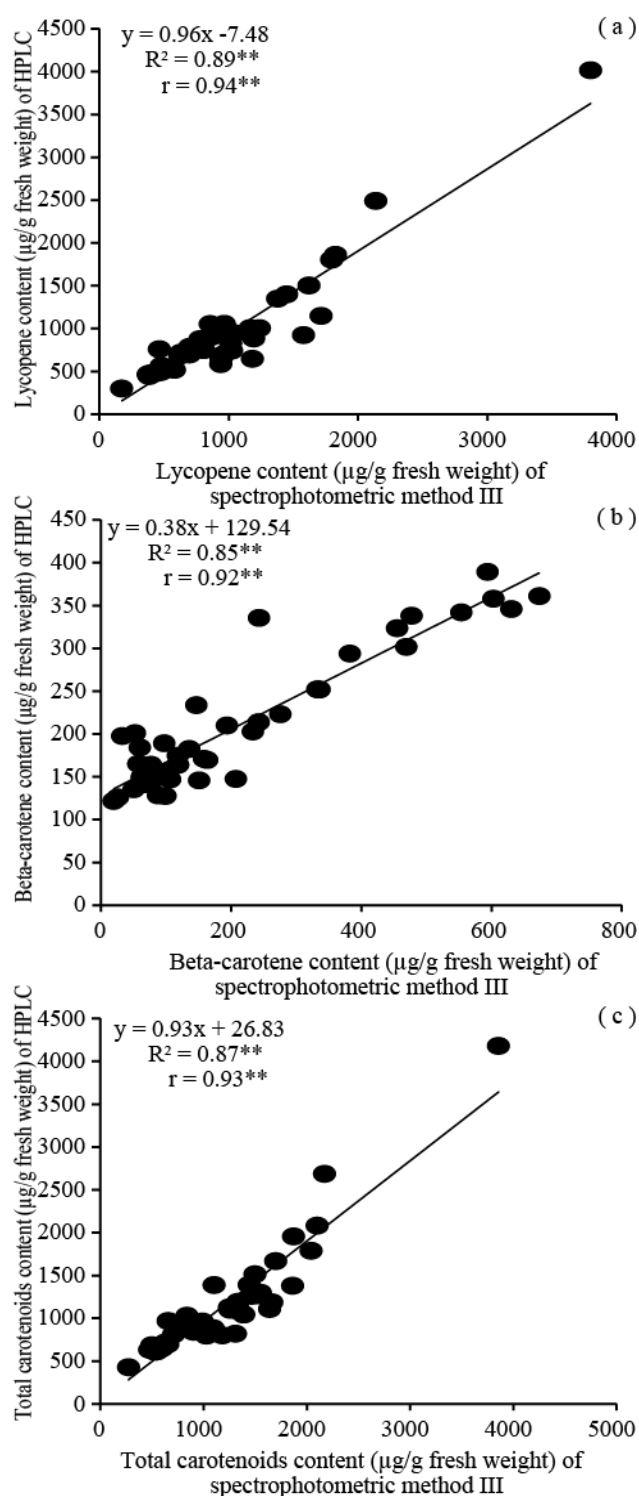


Fig. 1. Relationships between HPLC and spectrophotometric method III for determination of lycopene content (a), β -carotene content (b), and total carotenoid content (c) in 43 spiny bitter gourd genotypes.

Although the application of spectrophotometric methods for the analysis of lycopene, β -carotene and total carotenoids has been investigated in many plant species (Davis *et al.*, 2003a; Barba *et al.*, 2006; Meléndez-Martínez *et al.*, 2011; Luterotti *et al.*, 2013), there is limited information on the application of this method to gac fruit. An understanding of the relationship between the HPLC method and spectrophotometric methods may

be helpful in choosing a simple method for the determination of phytochemicals in spiny bitter gourd accessions. In the present study, three spectrophotometric methods with different extraction methods were compared with the HPLC method for the determination of lycopene, β -carotene and total carotenoids in the arils of the spiny bitter gourd. All correlation coefficients between the spectrophotometric methods and the HPLC method were positive and significant for the lycopene, β -carotene and total carotenoid contents. The current study supports previous studies in which that high correlations are found between the HPLC method and the spectrophotometric methods for the analysis of lycopene, β -carotene and total carotenoids in tomato and orange (Meléndez-Martínez *et al.*, 2011, Luterotti *et al.*, 2013).

Interestingly, the correlation coefficients between spectrophotometric method III and the HPLC method had the highest coefficients of determination for lycopene, β -carotene and total carotenoids. Thus, the HPLC method could be largely explained by spectrophotometric method III for the analysis of lycopene ($R^2 = 0.89$), β -carotene ($R^2 = 0.85$) and total carotenoids ($R^2 = 0.87$). This result is in agreement with those observed in which a high positive relationship was found between spectrophotometric method III and the HPLC method, likely because the same extraction method was used for phytochemical analysis.

To the best of our knowledge, this study is the first report on the relationship between spectrophotometric methods and HPLC methods for the analysis of lycopene, β -carotene and total carotenoids in spiny bitter gourd. The present study demonstrates that spectrophotometry can be used as a tool for the analysis of carotenoids, including lycopene and β -carotene in spiny bitter gourd arils. The spectrophotometric method is rapid and accurate for measuring phytochemicals and can be used for screening the spiny bitter gourd germplasm or for large breeding populations.

Conclusions

This study demonstrated that spectrophotometric methods can be developed for the analysis of lycopene, β -carotene and total carotenoids in spiny bitter gourd arils. The results show high correlation coefficients between the spectrophotometric methods and the HPLC method for the analysis of lycopene, β -carotene and total carotenoids. Based on its rapid, precise and inexpensive assessment of phytochemicals, the spectrophotometric method can be used as an alternative to the HPLC method for the determination of lycopene, β -carotene and total carotenoids in spiny bitter gourd. This method can be used in spiny bitter gourd selection programs to increase lycopene, β -carotene and carotenoid levels and to evaluate fruit quality in the functional food industry.

Acknowledgment

This work was supported by the Higher Education Research Promotion and National Research University Project of Thailand, Office of the Higher Education Commission through the Food and Functional Food Research Cluster of Khon Kaen University. Grateful

acknowledgments are made to the Thailand Research Fund (TRF) providing financial support through the New Research Scholar Project (Project no. TRG5780083) and partial support from the Plant Breeding Research Center for Sustainable Agriculture, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University. Acknowledgement is extended to the Thailand Research Fund (IRG 5780003), Khon Kaen University and Faculty of Agriculture for providing financial support for manuscript preparation activities.

References

- Aoki, H., N.T.M. Kieu, N. Kuze and K. Tomisaka. 2002. Carotenoid pigments in Gac fruit (*Momordica cochinchinensis* Spreng). *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66: 2479-2482.
- Barba, A.I.O., M. Ca'mara Hurtado, M.C. Sa'nchez Mata, V. Fern'andez Ruiz and M. Lo'pez Sa'enz de Tejada. 2006. Application of a UV-vis detection-HPLC method for a rapid determination of lycopene and b-carotene in vegetables. *Food Chem.*, 95: 328-336.
- Bohm, V., N.L. Puspitasari-Nienaber, M.G. Ferruzzi and S.J. Schwartz. 2002. Trolox equivalent antioxidant capacity of different geometric isomers of α -carotene, β -carotene, lycopene and zeaxanthin. *Agric. Food Chem.*, 50: 221-226.
- Bootprom, N., P. Songsri, B. Suriham, K. Lomthaisong and K. Lertrat. 2015. Genetics Diversity Based on Agricultural Traits and Phytochemical Contents in Spiny Bitter Gourd (*Momordica cochinchinensis* (Lour.) Spreng). *SABRAO J. Breed. Gen.*, 47(3): 278-290.
- Bootprom, N., P. Songsri, B. Suriham, P. Chareonsap, J. Sanitchon and K. Lertrat. 2012. Molecular diversity among selected *Momordica cochinchinensis* (Lour.) Spreng accessions using RAPD markers. *SABRAO J. Breed. Gen.*, 44 (2): 406-417.
- Càmarà, M., J.S. Torrecilla, J.O. Caceres, M.C.S. Mata and V. Fern'andez-Ruiz. 2010. Neural network analysis of spectroscopic data of lycopene and β -Carotene content in food samples compared to HPLC-UV-Vis. *J. Agric. Food Chem.*, 58:72-75.
- Davis, A.R., W.W. Fish and P. Perkins-Veazie. 2003a. A rapid spectrophotometric method for analyzing lycopene content in tomato and tomato products. *Postharvest Biol. Tec.*, 28: 425-430.
- Davis, A.R., W.W. Fish, P. Perkins-Veazie. 2003b. A rapid hexane-free method for analyzing lycopene content in watermelon. *J. Food Sci.*, 68:328-332.
- Iaroslav, M.S., G.N. Valeriy, D.T. Yuriy and A.A. Tyurenkov. 2012. Spectroscopy analysis for simultaneous determination of lycopene and β -carotene in fungal biomass of *Blakeslea trispora*. *Acta Biochem Pol.*, 59: 65-69.
- Ishida, B.K. and M.H. Chapman. 2009. Carotenoid extraction from plants using a novel, environmentally friendly solvent. *J. Agric. Food Chem.*, 57: 1051-1059.
- Ishida, B.K., C. Turner, M.H. Chapman and A.T. McKeon. 2004. Fatty acid and composition of Gac (*Momordica cochinchinensis* Spreng) fruit. *J. Agric. Food Chem.*, 52: 274-279.
- Kubola, J. and S. Siriamornpun. 2011. Phytochemicals and antioxidant activity of different fruit fractions (peel, pulp, aril and seed) of Thai Gac (*Momordica cochinchinensis* Spreng). *Food Chem.*, 127(3): 1138-1145.
- Luterotti, S., K. Markovic, M. Franko, D. Bicanic, A. Madzgalj and K. Kljak. 2013. Comparison of spectrophotometric and HPLC methods for determination of carotenoids in foods. *Food Chem.*, 140: 390-397.
- Meléndez-Martínez, A.J., F. Ayala, J.F. Echúvarri, A.I. Negueruela, M.L. Escudero-Gilete, M.L. Gonz'alez-Miret, I.M. Vicario and F.J. Heredia. 2011. A novel and enhanced approach for the assessment of the total carotenoid content of foods based on multipoint spectroscopic measurements. *Food Chem.*, 126: 1862-1869.
- Vuong, L.T. and J.C. King. 2003. A method of preserving and testing the acceptability of Gac fruit oil, a good source of beta-carotene and essential fatty acids. *Food Nutr. Bull.*, 24(2): 224-230.
- Vuong, L.T., A.A. Franke, L.J. Custer and S.P. Murphy. 2006. *Momordica cochinchinensis* Spreng. (Gac) fruit carotenoids reevaluated. *J. Food Comp. Anal.*, 19: 664-668.

(Received for publication 8 February 2016)