

ส่วนที่ 1 หน้าปก

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลของอุณหภูมิที่มีต่อกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด
จากรำข้าวพื้นเมืองมีสี

Effect of Temperature to Antioxidant Activity in Rice Bran Extract of
Indigeneous Pigmented Rice

ดร.วัชรีย์ สีสี่ขำนาญธุระกิจ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก งบประมาณแผ่นดิน
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ประจำปีงบประมาณ 2555 รหัสโครงการ AGR550057S

ชื่อโครงการ

ผลของอุณหภูมิที่มีต่อกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด
จากรำข้าวพื้นเมืองมีสี

คณะนักวิจัย

ดร. วชิร สีห์ขำนาญธุระกิจ

สถานวิจัยผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและอาหารเพื่อสุขภาพ
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112

สารบัญ

เนื้อหา	หน้า
สารบัญ	ii
รายการตาราง	iii
รายการภาพประกอบ	iv
กิตติกรรมประกาศ	vi
บทคัดย่อภาษาไทย	vii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	viii
ปัญหาและที่มาของงานวิจัย	1
วัตถุประสงค์	1
วิธีการทดลอง	2
ผลการทดลองและวิจารณ์	5
เอกสารอ้างอิง	19
ภาคผนวก	20
ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัย	20

รายการตาราง

Table1 องค์ประกอบทางเคมีของรำข้าวสาลีพันธุ์ต่างๆ

หน้า
6

รายการภาพประกอบ

	หน้า
Figure1 การเปรียบเทียบผลของอุณหภูมิการเก็บรักษารำข้าวที่ $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ ต่อปริมาณสารประกอบ α -, δ -tocopherol, α -tocotrienol และ γ -oryzanol ภายในระยะเวลา 1, 3, 6, และ 9 สัปดาห์	8
Figure2 การเปรียบเทียบผลของอุณหภูมิการเก็บรักษารำข้าวที่ $14\pm 2^{\circ}\text{C}$ ต่อปริมาณสารประกอบ α -, δ -tocopherol, α -tocotrienol และ γ -oryzanol ภายในระยะเวลา 1, 3, 6, และ 9 สัปดาห์	9
Figure3 การเปรียบเทียบผลของอุณหภูมิการเก็บรักษารำข้าวที่อุณหภูมิห้อง ($29\pm 2^{\circ}\text{C}$) ต่อปริมาณสารประกอบ α -, δ -tocopherol, α -tocotrienol และ γ -oryzanol ภายในระยะเวลา 1, 3, 6, และ 9 สัปดาห์	10
Figure4 การเปรียบเทียบผลของอุณหภูมิการเก็บรักษารำข้าวที่ $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ ต่อปริมาณสารประกอบ hydrophilic substances (cyaniding 3-O-glucoside และ peonidin 3-O-glucoside) ภายในระยะเวลา 1, 3, 6, และ 9 สัปดาห์	11
Figure5 การเปรียบเทียบผลของอุณหภูมิการเก็บรักษารำข้าวที่ $14\pm 2^{\circ}\text{C}$ ต่อปริมาณสารประกอบ hydrophilic substances (cyaniding 3-O-glucoside และ peonidin 3-O-glucoside) ภายในระยะเวลา 1, 3, 6, และ 9 สัปดาห์	12
Figure6 การเปรียบเทียบผลของอุณหภูมิการเก็บรักษารำข้าวที่อุณหภูมิห้อง ($29\pm 2^{\circ}\text{C}$) ต่อปริมาณสารประกอบ hydrophilic substances (cyaniding 3-O-glucoside และ peonidin 3-O-glucoside) ภายในระยะเวลา 1, 3, 6, และ 9 สัปดาห์	13
Figure7 ผลของระยะเวลาการเก็บรักษารำข้าว (1, 3, 6 และ 9 สัปดาห์) ที่อุณหภูมิต่างๆ ($4\pm 2^{\circ}\text{C}$, $14\pm 2^{\circ}\text{C}$ และอุณหภูมิห้อง $29\pm 2^{\circ}\text{C}$) กับความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ Lipid peroxidation ของสารกลุ่มชอบไขมัน (lipophilic part substances)	15
Figure8 ผลของระยะเวลาการเก็บรักษารำข้าว (1, 3, 6 และ 9 สัปดาห์) ที่อุณหภูมิต่างๆ ($4\pm 2^{\circ}\text{C}$, $14\pm 2^{\circ}\text{C}$ และอุณหภูมิห้อง $29\pm 2^{\circ}\text{C}$) กับความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของ Ferric reducing power assay (FRAP) ของสารกลุ่มชอบไขมัน (lipophilic part substances)	16
Figure9 ผลของระยะเวลาการเก็บรักษารำข้าว (1, 3, 6 และ 9 สัปดาห์) ที่อุณหภูมิต่างๆ ($4\pm 2^{\circ}\text{C}$, $14\pm 2^{\circ}\text{C}$ และอุณหภูมิห้อง $29\pm 2^{\circ}\text{C}$) กับความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของ ABTS ^{•+} assay ของสารกลุ่มชอบไขมัน (lipophilic part substances)	17
Figure10 ผลของระยะเวลาการเก็บรักษารำข้าว (1, 3, 6 และ 9 สัปดาห์) ที่อุณหภูมิ $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ กับความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของ Lipid peroxidation, Ferric reducing power (FRAP) และ ABTS ^{•+} assays	18

ของสารกลุ่ม hydrophilic substances (cyaniding 3-O-glucoside และ
peonidin 3-O-glucoside)

กิตติกรรมประกาศ

รายงานฉบับนี้สำเร็จลงด้วยความได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากทุนอุดหนุนการวิจัย จากเงินงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ปีงบประมาณ 2555 ความอนุเคราะห์ทางด้านอุปกรณ์เครื่องมือพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์และการใช้ห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์เคมีอาหาร ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร จึงขอขอบพระคุณนางบุปผา จงปัญญาเลิศ นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการพิเศษ และนางบุษกร ทองสาย พนักงานประจำห้องปฏิบัติการ และขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.เทวีทองแดง คาร์ริลลา และภาควิชาวิทยาศาสตร์การอาหารและโภชนาการ คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยี วิทยาเขตปัตตานี ที่ให้ความรู้ด้านเคมีอาหารของข้าวมีสีและความอนุเคราะห์ในการสีข้าวมีสี สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณศูนย์วิจัยข้าวจังหวัดปัตตานี ที่ให้ความอนุเคราะห์ข้าวมีสีจำนวน 6 สายพันธุ์สำหรับงานวิจัยมา ณ โอกาสนี้ด้วย

ดร.วัชรีย์ สีสี่ชำนาญการ

บทคัดย่อภาษาไทย

รำข้าวมีสีจำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ ข้าวสังข์หยด ข้าวหอมกระดังงา ข้าวเหนียวดำหอม ข้าวเหนียวดำต้นดำใบดำ ข้าวเหนียวแดงกรมแดง และรำข้าวไม่มีสีใช้ รำข้าวเล็บนก เป็นรำข้าวควบคุม สถานที่ได้มาของรำข้าวคือ ศูนย์วิจัยข้าวจังหวัดปัตตานี ประกอบด้วยสารสำคัญ 2 ชนิด ได้แก่ สารประกอบประเภทละลายไขมัน (lipophilic substances) และสารประกอบที่ละลายน้ำได้ (hydrophilic substances) ซึ่งสารประกอบประเภท lipophilic substances เช่น α -, δ -tocopherol, α -tocotrienol, γ -oryzanol สำหรับสารประเภท hydrophilic substances เช่น cyanidin 3-O-glucoside และ peonidin 3-O-glucoside โครงการวิจัยนี้มีจุดประสงค์ เพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิการเก็บรักษา ($4\pm 2^{\circ}\text{C}$, อุณหภูมิห้องหรือ $29\pm 2^{\circ}\text{C}$, $14\pm 2^{\circ}\text{C}$) มีอิทธิพลต่อปริมาณสารสำคัญทั้ง 2 ประเภทและกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระในรำข้าวที่ต้องการศึกษาทั้งชนิด lipid peroxidation, ferric reducing power และ ABTS $^{\bullet+}$ assays จากผลการวิจัยพบว่าการเก็บรำข้าวที่อุณหภูมิ $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ ภายในระยะเวลาไม่เกิน 3 สัปดาห์ เป็นสภาวะการเก็บรำข้าวที่เหมาะสม โดยไม่ทำให้สารสำคัญเกิดการสลายตัวมากนัก รำข้าวทุกสายพันธุ์มีปริมาณสารสำคัญเรียงลำดับจากมากไปหาน้อย ดังต่อไปนี้ สารประกอบ γ -oryzanol > α -tocotrienol > total tocopherol (α -, δ -tocopherol) และ cyaniding 3-O-glucoside > peonidin 3-O-glucoside ที่อุณหภูมิ $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ ระยะเวลาการเก็บ 1 สัปดาห์ ปริมาณสารประกอบ α -tocotrienol มีมากกว่าปริมาณ total tocopherol (α -, δ -tocopherol) ประมาณ 2-4 เท่า และปริมาณสารประกอบ γ -oryzanol มากกว่าปริมาณสารประกอบ total tocopherol (α -, δ -tocopherol) ประมาณ 45 - 123 เท่า นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบรำข้าว waxy rice สายพันธุ์ข้าวเหนียวดำหอม มีปริมาณสารประกอบ total tocopherol (13.16 ± 0.45 $\mu\text{g}/\text{mL}$) และ γ -oryzanol ($1,342.34\pm 0.82$ $\mu\text{g}/\text{mL}$) สูงกว่ารำข้าว non-waxy rice (ข้าวเล็บนก (10.35 ± 0.44 , 567.64 ± 4.08 $\mu\text{g}/\text{mL}$), ข้าวสังข์หยด (9.74 ± 2.62 , 584.20 ± 3.48 $\mu\text{g}/\text{mL}$), ข้าวหอมกระดังงา (9.23 ± 0.23 , 508.15 ± 4.92 $\mu\text{g}/\text{mL}$)) ที่อุณหภูมิ $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ ระยะเวลาการเก็บ 1 สัปดาห์ ส่วนปริมาณสารประกอบ α -tocotrienol ในรำข้าว non-waxy rice (รำข้าวสังข์หยด (44.25 ± 0.14 $\mu\text{g}/\text{mL}$), ข้าวหอมกระดังงา (45.17 ± 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$)) มีปริมาณมากกว่าในรำข้าว waxy rice (ข้าวเหนียวดำหอม (32.04 ± 0.24 $\mu\text{g}/\text{mL}$), ข้าวเหนียวดำต้นดำใบดำ (24.93 ± 0.24 $\mu\text{g}/\text{mL}$), ข้าวเหนียวแดงกรมแดง (35.42 ± 0.02 $\mu\text{g}/\text{mL}$)) เมื่อเปรียบเทียบสารประกอบ hydrophilic substances (cyaniding 3-O-glucoside และ peonidin 3-O-glucoside) ที่อุณหภูมิการเก็บรำข้าวที่ $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ ระยะการเก็บ 1 สัปดาห์ รำข้าวสายพันธุ์ข้าวเหนียวดำหอมมีปริมาณ cyaniding 3-O-glucoside มากที่สุด (155.88 ± 0.70 $\mu\text{g}/\text{mL}$) มากกว่าปริมาณ peonidin 3-O-glucoside ประมาณ 17 เท่า (8.71 ± 0.20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) พิจารณากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ lipid peroxidation, ABTS $^{\bullet+}$ และ FRAP assays พบว่าที่อุณหภูมิ $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ ทั้งส่วนสกัด lipophilic substances และ hydrophilic substances ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการต้านอนุมูลอิสระ FRAP values ปริมาณที่สูงกว่าที่อุณหภูมิ $14\pm 2^{\circ}\text{C}$ และอุณหภูมิห้อง ($29\pm 2^{\circ}\text{C}$) ดังนั้นจากข้อมูลข้างต้น สามารถสรุปได้ว่าที่อุณหภูมิ $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บรำข้าว สามารถเก็บได้นานไม่เกิน 3 สัปดาห์ ทำให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ FRAP assay ของสารสกัดในรำข้าวมีสีสูงกว่าที่อุณหภูมิ $14\pm 2^{\circ}\text{C}$ และอุณหภูมิห้อง ($29\pm 2^{\circ}\text{C}$).

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Two fractions included lipophilic and hydrophilic substances from six varieties of pigmented rice brans. These collected from Pattani Rice Research Center, Pattani, Thailand. These were determined the anthocyanins (cyaniding 3-O-glucoside and peonidin 3-O-glucoside), α -, δ -Tocopherol, α -Tocotrienol and γ -oryzanol contents with antioxidant capacity using lipid peroxidation, ferric reducing ability power (FRAP) and ABTS^{•+} assay. The result was showed that the optimum storage time of pigmented rice brans was at $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ within 3 weeks storage. The antioxidant bioactive contents in pigmented rice brans were ranked in the range of γ -oryzanol > α -tocotrienol > total tocopherol (α -, δ -tocopherol) and cyaniding 3-O-glucoside > peonidin 3-O-glucoside, at $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ for storage time 1 week. The α -tocotrienol content was 2-4 times higher than those of total tocopherols (α -, δ -tocopherol). The γ -oryzanol content was also 45-123 times higher than those of total tocopherols. According to the pigmented waxy rice brans (Dummor, Thondumbaidum and Niawdangkarmrad) and pigmented non-waxy rice brans (Sangyod and Homkradangnga), the varies of Dummor contained higher tocopherols ($13.16\pm 0.45\ \mu\text{g/mL}$) and γ -oryzanol contents ($1,342.34\pm 0.82\ \mu\text{g/mL}$) than those of Lebnok (10.35 ± 0.44 , $567.64\pm 4.08\ \mu\text{g/mL}$), Sangyod (9.74 ± 2.62 , $584.20\pm 3.48\ \mu\text{g/mL}$) and Homkradangnga (9.23 ± 0.23 , $508.15\pm 4.92\ \mu\text{g/mL}$), respectively, at $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ for storage time 1 week. Whereas Sangyod ($44.25\pm 0.14\ \mu\text{g/mL}$) and Homkradangnga ($45.17\pm 0.01\ \mu\text{g/mL}$) contained more α -tocotrienol content than that of Dummor ($32.04\pm 0.24\ \mu\text{g/mL}$), Thondumbaidum ($24.93\pm 0.24\ \mu\text{g/mL}$) and Niawdangkarmrad ($35.42\pm 0.02\ \mu\text{g/mL}$), respectively. For 1 week-storage time of the pigmented rice brans at $4\pm 2^{\circ}\text{C}$, Dummor contained highest cyaniding 3-O-glucoside content ($155.88 \pm 0.70\ \mu\text{g/mL}$) than peonidin 3-O-glucoside content ($8.71 \pm 0.20\ \mu\text{g/mL}$). This amount of cyaniding 3-O-glucoside content was accounted to 17 times higher than peonidin 3-O-glucoside content. For the antioxidant assays of lipophilic and hydrophilic extracts, the inhibition of FRAP assay at $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ was higher than that of other storage temperature ($14\pm 2^{\circ}\text{C}$ and $29\pm 2^{\circ}\text{C}$). Therefore, it was then concluded that the storage time at $4\pm 2^{\circ}\text{C}$, within 3 weeks was the optimum condition to storage pigmented rice brans.

6. บทสรุปผู้บริหาร (Executive Summary) ประกอบด้วย

6.1. บทนำ

ปัญหาและที่มาของการทำวิจัย

ในภาวะการณปัจจุบัน คนเราต้องเผชิญกับโรคภัยไข้เจ็บที่เป็นโรคเรื้อรัง ได้แก่ ความดันโลหิตสูง คลอเลสเตอรอลอุดตันเส้นเลือด ภาวะถุงพรุณ เบาหวาน และมะเร็ง อาหารเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญของต้นเหตุของโรคเหล่านี้ อาหารเพื่อสุขภาพจึงเป็นประเด็นที่น่าความสนใจ ข้าวเป็นอาหารหลักของคนไทย ชาวต่างประเทศให้ความสนใจข้าวไทยในด้านรสชาติ กลิ่นหอม คุณค่าทางโภชนาการและสารต้านอนุมูลอิสระ ไร่ข้าวเป็นผลผลิตพลอยได้จากการสีข้าว และอุดมไปด้วยสาร Phytochemicals หลายชนิดได้แก่ Tocopherol, Tocotrienol, γ -oryzanol, phenolic compounds, anthocyanins และ phytosterol เป็นต้น Tocopherol และ Tocotrienol สามารถยับยั้งปฏิกิริยา lipid peroxidation ที่เกิดขึ้นบน membrane และลดภาวะเค้นของออกซิเดชั่น (Oxidative stress) ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดเซลล์มะเร็ง นอกจากนี้ยังสามารถกวดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ และยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งในต่อมลูกหมาก (prostate carcinoma) ลำไส้ใหญ่ (colon adenocarcinoma) และเซลล์กระดูก (osteosarcoma cells) (Gysin, Azzi and Visarius, 2002) เมื่อเร็วๆนี้ มีข้อเสนอแนะจากงานวิจัยว่า ข้าวมีสี (pigmented rice) และส่วนสกัดไร่ข้าวมีสีสามารถแสดงคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระได้สูงกว่าข้าวไม่มีสี (non-pigmented rice) สารประกอบ phytochemicals ที่อยู่ในไร่ข้าวมีสีสามารถสนับสนุนกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของ antioxidant enzyme (Chiang et al., 2006) และกวดการขยายตัวของเซลล์เนื้อร้าย (tumor progression or carcinogenesis) (Chiang et al., 2006; Nam et al., 2005, 2006) สารประกอบ ferulic acid สารต้านอนุมูลอิสระที่มีศักยภาพมากพบมากในไร่ข้าวมีสี (pigmented rice bran) สารประกอบ phenolic ชนิดนี้สามารถป้องกันการเหนี่ยวนำให้เกิดเซลล์มะเร็งในปากและลำไส้ของหนูทดลอง

ศูนย์วิจัยข้าวจังหวัดปัตตานีได้ให้ความอนุเคราะห์ไร่ข้าวมีสี จำนวน 6 สายพันธุ์ แบ่งได้เป็น 2 ประเภท ได้แก่ non-waxy rice: ข้าวเล็บนก (ใช้เป็นไร่ข้าวตัวควบคุม) ข้าวสังข์หยด ข้าวหอมกระดังงา และ waxy rice: ข้าวเหนียวดำตันดำใบดำ ข้าวเหนียวดำหมอ ข้าวเหนียวแดงกรมแดง ข้าวมีสีสายพันธุ์เหล่านี้ล้วนเป็นข้าวพื้นเมืองมีสี ศูนย์วิจัยข้าวมีจุดประสงค์คือ ต้องการอนุรักษ์พันธุ์ข้าวมีสีให้ตกทอดสู่รุ่นลูกหลาน โดยส่งเสริมให้เกษตรกรมีการเพาะปลูกอีกครั้ง หลังจากที่หันไปสนใจข้าวสายพันธุ์พีซีไร์ ซึ่งมีผลผลิตต่อไร่สูงกว่า ดังนั้นขณะนี้ ทางศูนย์วิจัยข้าว จังหวัดปัตตานีมีการส่งเสริมให้เกษตรกรทำการเพาะปลูกข้าวเหนียวดำตันดำใบดำและข้าวเหนียวดำหมอมากขึ้น เนื่องจากข้าวเหนียวดำ 2 สายพันธุ์นี้ มีความนิยมรับประทานกันมากทางภาคใต้ รงควัตถุของข้าวมีสีมีสีม่วงคล้ำ อุดมไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ สามารถลดคลอเลสเตอรอลและไขมันอุดตันในกระแสเลือด ไม่มีกลูเตน เหมาะสำหรับทำผลิตภัณฑ์อาหารสำหรับผู้ที่ไม่แพ้โปรตีนและอาหารสำเร็จรูปสำหรับเด็กทารก ย่อยง่าย ให้พลังงานต่ำ มีกรดอะมิโนที่จำเป็น 8 ชนิด เหมาะสำหรับพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปสำหรับผู้สูงอายุ จะเห็นได้ว่าภาคใต้มีความหลากหลายของสายพันธุ์ข้าว โดยเฉพาะข้าวพื้นเมืองมีสี เป็นสายพันธุ์ข้าวที่จำเป็นต้องอนุรักษ์ไว้ ก่อนที่จะสูญหายไปจากคลังข้อมูลข้าวของประเทศไทย จากจุดนี้จึงเป็นแรงจูงใจให้คณะผู้วิจัยสนใจทำการศึกษาวิเคราะห์ข้อมูลทางด้านเสถียรภาพของอนุกรมการเก็บรักษาไร่ข้าวมีสีต่อปริมาณสารสำคัญ phytochemicals ในไร่ข้าวและกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ

6.2. วัตถุประสงค์

1. ศึกษาวิธีการสกัดสารสำคัญ α -, δ -tocopherol, α -tocotrienol, γ -oryzanol และ

anthocyanins จากรำข้าวมีสีให้ประสิทธิภาพการสกัดที่ดีที่สุด

2. ศึกษาความสัมพันธ์ของสารสกัดที่อุณหภูมิการเก็บรักษากับกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ณ อุณหภูมิต่างๆกัน ($4\pm 2^{\circ}\text{C}$, อุณหภูมิห้อง $\pm 2^{\circ}\text{C}$, $14\pm 2^{\circ}\text{C}$) เพื่อหาข้อสรุปว่าที่อุณหภูมิใด สารสกัดยังคงความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ
 3. ศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณความเข้มข้นสารสำคัญ อันได้แก่ α -, δ -tocopherol, α -tocotrienol, γ -oryzanol และ anthocyanins จากรำข้าวมีสีกับอุณหภูมิการเก็บรักษารำข้าวมีสี เพื่อหาข้อสรุปว่า ที่อุณหภูมิใดเป็นสถานะที่ดีที่สุด ใช้ในการเก็บรักษารำข้าวมีสี และทำให้สารสกัดมีปริมาณความเข้มข้นสารสำคัญรวมทั้งมีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระสูง
 4. ศึกษาที่อุณหภูมิหนึ่งๆ ได้ทำการเปลี่ยนแปลงระยะเวลาการเก็บรักษาที่แตกต่างกัน (1, 3, 6 และ 9 สัปดาห์) ที่ระยะเวลาการเก็บใดมีความสัมพันธ์อย่างไรกับปริมาณความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระและกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ
- 6.3 สรุป (สรุปผลการทดลองทั้งหมดของงานวิจัยทั้งชุดโครงการ/โครงการ ทั้งตีพิมพ์แล้วและยังไม่ได้ตีพิมพ์)

วิธีการทดลอง

6.3.1 การเตรียมวัตถุดิบรำข้าวมีสี

เก็บตัวอย่างข้าวเปลือกมีสีจากศูนย์วิจัยข้าวปัตตานี จังหวัดปัตตานีจำนวน 6 สายพันธุ์ ได้แก่ ข้าวเล็บนก ข้าวสังข์หยด ข้าวเหนียวแดงกรมแรก ข้าวหอมกระดังงา ข้าวเหนียวดำหอม ข้าวเหนียวดำตันดำ ใบดำ

นำตัวอย่างข้าวเปลือกมีสีทั้ง 6 สายพันธุ์ ไปสีเอาแกลบออก ที่คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยี ภาควิชาวิทยาศาสตร์การอาหารและโภชนาการ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี ได้ข้าวสารมีสีเรื่อยๆและรำข้าวมีสีที่ผ่านการกะเทาะรำ 2 ครั้ง

6.3.2 การสกัดส่วนสกัดหยาบจากรำข้าวมีสี

- การสกัดส่วนสกัดหยาบส่วนที่ละลายไขมัน (lipophilic part) จากรำข้าวมีสี

นำรำข้าวทั้ง 6 สายพันธุ์ สกัดด้วยตัวทำละลาย MeOH จำนวน 30 มิลลิลิตร โดยการเขย่าด้วยเครื่องเขย่า เป็นเวลา 4 ชั่วโมง กรองเอากรำข้าวมีสีออกด้วยกระดาษ Whatman filter paper no.1 ระเหยตัวทำละลาย MeOH ด้วยเครื่อง rotary evaporator จะได้ของเหลวผสมสีน้ำตาลของ α -, δ -tocopherol, α -tocotrienol, γ -oryzanol

ละลายของเหลวด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ Hexane ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำการแยกสิ่งเจือปนด้วย SPE C18 ขนาด 200 มิลลิกรัมต่อ 3 มิลลิลิตร (VertiPak™ C18) ทำการกระตุ้น (activate) ตัวดูดซับด้วยตัวทำละลายเมทานอล 5 มิลลิลิตร และตามด้วยน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ใช้เข็มฉีดยากดไล่ตัวทำละลายที่ค้างค้างออกให้หมด ทำการ load ส่วนสกัดหยาบ lipophilic part ลงบน cartridge ของ SPE เตรียมภาชนะที่รองรับสารที่ชะจาก cartridge ทำการชะสารด้วยตัวทำละลาย MeOH ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ทำการชะ cartridge อีกครั้งด้วยตัวทำละลายเดิม รองรับสารที่ชะออกมา ระเหยตัวทำละลาย MeOH ด้วยเครื่อง rotary evaporator ได้ของเหลวสีน้ำตาลของ α -, δ -tocopherol, α -tocotrienol, γ -oryzanol

- การสกัดส่วนสกัดหยาบส่วนที่ไม่ละลายไขมัน (hydrophilic part) จากรำข้าวมีสี (Kerio et al., 2012)

นำรำข้าวมีสีที่ผ่านการสกัดส่วน lipophilic part แล้ว มาสกัดส่วน hydrophilic part ด้วยตัวทำละลาย MeOH:HCl = 99:1 (v/v) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่า เป็นเวลา 4 ชั่วโมง กรองเอากากรำข้าวมีสีออกด้วยกระดาษ Whatman No.1 ระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator ได้ของเหลวผสมสีน้ำตาลแดงของสารประกอบ anthocyanins

ละลายของเหลวผสมด้วยตัวทำละลาย MeOH ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ทำการแยกสิ่งปนเปื้อนด้วย SPE Strata C18-U cartridge ขนาด 200 มิลลิกรัมต่อ 3 มิลลิลิตร (phenomenex, U.S.A.) ก่อน load ของเหลวผสมลง cartridge SPE ให้ทำการกระตุ้น SPE เปล่าๆ ด้วยตัวทำละลาย MeOH และ 0.01%Aqueous HCl (v/v) อย่างละ 2 มิลลิลิตร Load ตัวอย่างลงใน cartridge SPE, ชะเอากรดอินทรีย์น้ำตาลและโปรตีนบางชนิดที่เจือปนอยู่ในตัวอย่างให้หลุดออกมาก่อนด้วยสารละลาย 0.01%Aqueous HCl (v/v) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และตามด้วยการชะสาร anthocyanins (hydrophilic part) ด้วยสารละลาย 0.01% HCl in MeOH ปริมาตร 5 มิลลิลิตร รองรับสารที่ถูกชะออกมา ระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator ได้ของเหลวสีแดงของสารประกอบ anthocyanins

6.3.3. HPLC analysis

นำของเหลวทั้ง lipophilic และ hydrophilic part ซึ่งผ่าน SPE แล้ว มาละลายด้วย Mobile phase ปริมาตร 1 มิลลิลิตร กรองด้วย Syringe filter membrane Nylon ขนาด 0.45 μm , diameter 13 mm

- สภาวะการวิเคราะห์สารสำคัญ α -, δ -tocopherol, α -tocotrienol และ γ -oryzanol

คอลัมน์ที่ใช้ชนิด ACE 5 C18 (250 x 4.6 mm, 100 \AA , 5 μm , Advanced Chromatography Technologies, Aberdeen, Scotland) อุณหภูมิคอลัมน์กำหนดที่อุณหภูมิ 35°C ระบบตัวทำละลายเคลื่อนที่ (Mobile phase) ของสารสำคัญ α -, δ -tocopherol, α -tocotrienol ประกอบด้วย MeOH : AcCN : IsOH : H₂O = 45 : 45 : 5 : 5 (v/v) ในการวิเคราะห์ใช้ระบบเกรเดียน โดยเวลา 0-3 นาทีแรก การไหลของระบบตัวทำละลายเคลื่อนที่ MeOH : AcCN : IsOH : H₂O = 45 : 45 : 5 : 5, เวลา 3-15 นาทีต่อมา การไหลของระบบตัวทำละลายเคลื่อนที่ MeOH : AcCN : IsOH : H₂O = 45 : 50 : 5 : 0 และ เวลา 15-20 นาที การไหลของระบบตัวทำละลายเคลื่อนที่กลับมาสู่จุดตั้งต้น อัตราเร็วการไหลของตัวทำละลาย 1 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรฉีดตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร ใช้ Fluorescence เป็นตัวตรวจวัด และ กำหนดให้ $\lambda_{\text{excit.}}$ = 290 นาโนเมตร $\lambda_{\text{emis.}}$ = 330 นาโนเมตร ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ โดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน α -, δ -tocopherol และ α -tocotrienol ในช่วงความเข้มข้น 1-75 $\mu\text{g/mL}$ แสดงค่าความเข้มข้นที่คำนวณได้ในหน่วยของ $\mu\text{g/mL}$

ระบบตัวทำละลายเคลื่อนที่ (Mobile phase) ของสารสำคัญ γ -oryzanol ประกอบด้วย MeOH : AcCN : IsOH : Acetic acid = 40 : 45 : 5 : 10 (v/v) ในการวิเคราะห์ใช้ระบบเกรเดียน โดยเวลา 0-3 นาทีแรก การไหลของระบบตัวทำละลายเคลื่อนที่ MeOH : AcCN : IsOH : Acetic acid = 40 : 45 : 5 : 10, เวลา 3-15 นาทีต่อมา การไหลของระบบตัวทำละลายเคลื่อนที่ MeOH : AcCN : IsOH : Acetic acid = 45 : 45 : 15 : 0 และ เวลา 15-20 นาที การไหลของระบบตัวทำละลายเคลื่อนที่กลับมาสู่จุดตั้งต้น ใช้ Diode array detector เป็นตัวตรวจวัด ทำการวิเคราะห์ที่ความยาวคลื่น 290 นาโนเมตร ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ โดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน γ -oryzanol ในช่วงความเข้มข้น 1-75 $\mu\text{g/mL}$ แสดงค่าความเข้มข้นที่คำนวณได้ในหน่วยของ $\mu\text{g/mL}$

- สภาวะการวิเคราะห์สารสำคัญ anthocyanins (cyaniding 3-O-glucoside และ peodin 3-O-glucoside)

คอลัมน์ที่ใช้ชนิด ACE 5 C18 (250 x 4.6 mm, 100 Å, 5 µm, Advanced Chromatography Technologies, Aberdeen, Scotland) อุณหภูมิคอลัมน์กำหนดที่อุณหภูมิ 35°C ระบบตัวทำละลายเคลื่อนที่ (Mobile phase) ประกอบด้วย mobile phase A (H₂O : AcCN : formic acid = 87 : 3 : 10) = 97% mobile B = 3% ในการวิเคราะห์ที่ใช้ระบบเกรเดียน โดยเวลา 0-20 นาทีแรก การไหลของ mobile phase A:B = 97:3%, 20-23 นาที : 75:25%, 23-25 นาที : 70:30%, 25-27 นาที : 97:3% ใช้ Diode array detector เป็นตัวตรวจวัด ทำการวิเคราะห์ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร อัตราเร็วการไหลของตัวทำละลาย 1 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรฉีดตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน cyaniding 3-O-glucoside และ peodin 3-O-glucoside ในช่วงความเข้มข้น 1-75 µg/mL แสดงค่าความเข้มข้นที่คำนวณได้ในหน่วยของ µg/mL

6.3.4 Antioxidant activity assay

6.3.4.1. ABTS^{•+} assay

ทำการวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระแบบ ABTS^{•+} assay อ้างอิงดัดแปลงจากวิธีของ Arnao et al. (2001)

ทำการเตรียมสารละลาย working solution ABTS^{•+} เข้มข้น 7.4 mM และสารละลาย potassium persulfate เข้มข้น 2.6 mM ผสมกันด้วยอัตราส่วน 1:1 (v/v) บ่มทิ้งไว้ 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด จากนั้นเจือจางสารละลายผสม ABTS^{•+} solution ด้วยตัวทำละลาย MeOH ปริมาตร 60 มิลลิลิตร วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader สารละลาย ABTS^{•+} ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำทดลองใหม่

ทำการผสมสารสกัด lipophilic หรือ hydrophilic จำนวน 150 ไมโครลิตร และสารละลาย working solution ABTS^{•+} ด้วยปริมาตร 2850 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เปรียบเทียบการยับยั้งของสารสกัดตัวอย่างกับกราฟมาตรฐาน ซึ่งใช้สารละลาย ferulic acid เข้มข้น 25-1000 mM เป็นสารมาตรฐาน ผลการวิเคราะห์แสดงค่าการยับยั้งการต้านอนุมูลอิสระเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน หน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของการต้านอนุมูลอิสระ ความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระแสดงหน่วยเป็น mg equivalent ferulic acid /100 g sample (Thaipong et al., 2006) ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง แสดงผลการวิเคราะห์เป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

6.3.4.2. The ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay

วิธีดังกล่าวอาศัยหลักการปฏิกิริยา reduction ของ ferric 2,4,6-tripyridyl-s-triazine complex (Fe³⁺-TPTZ) ไปเป็น ferrous form (Fe²⁺-TPTZ) (Thaipong et al., 2006)

ทำการเตรียม working FRAP reagent โดยการผสมสารละลายบัฟเฟอร์ 300 mM sodium acetate (pH 3.6) (sodium acetate trihydrate (C₂H₃NaO₂·3H₂O) 3.1 กรัม ผสมกับ glacial acetic acid 16 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น จนมีปริมาตร 1 ลิตร) และสารละลาย 10 mM 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) (10 mM TPTZ ใน 40 mM HCl) และ 20 mM FeCl₃·6H₂O ในอัตราส่วน 10:1:1 อุณหภูมิสารละลายผสมที่อุณหภูมิ 37°C ก่อนใช้งาน

ทำการผสมสารสกัดตัวอย่าง (150 มิลลิลิตร) ด้วยสารละลาย working FRAP reagent

(2850 มิลลิลิตร) บ่มนาน 30 นาทีในที่มืด วัดการดูดกลืนแสงของสารละลาย ferrous tripyridyltriazine complex ที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader ใช้สารมาตรฐาน $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ เข้มข้น 50 - 750 μM . ในการสร้าง calibration curve ซึ่งพลอตระหว่าง FRAP value กับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน แสดงค่า FRAP values ในหน่วยของ $\mu\text{M Fe(II)}/100$ กรัม รำข้าวมีสี

6.3.4.3. Inhibition of lipid peroxidation (Ferric-Thiocyanate Method) (Zin et al., 2006)

สารละลาย Linoleic acid (100 ไมโครลิตร) ละลายในตัวทำละลาย EtOH ปริมาตร 4 มิลลิลิตร, สารละลายบัฟเฟอร์ phosphate 0.05 M (pH 7.0) ปริมาตร 8 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น ปริมาตร 3.9 มิลลิลิตร ผสมของผสมดังกล่าวเพื่อเตรียมเป็นสารละลาย linoleic acid solution สารสกัดตัวอย่างปริมาตร 50 ไมโครลิตรเติมลงในสารละลาย linoleic acid solution ปริมาตร 1.4 มิลลิลิตร บ่มของผสมไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 40 °C. การวัดปฏิกิริยาการเร่ง oxidation ของ linoleic acid จะวัดหลังจาก 72 ชั่วโมง degree of oxidation วิเคราะห์ได้ดังต่อไปนี้ ของผสมปฏิกิริยา (30 ไมโครลิตร) เติมลงใน 75%EtOH ปริมาตร 2.91 มิลลิลิตร, 30% ammonium thiocyanate ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และ 30 ไมโครลิตร 0.02 M ferrous chloride ใน 3.5% HCl วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร %inhibition of linoleic acid peroxidation คำนวณได้จากสมการต่อไปนี้

$$\% \text{ Inhibition on LA peroxidation} = [1/(A_{500 \text{ nm, sample}} - A_{500 \text{ nm, control}})] \times 100$$

Statistic analysis

ผลการวิเคราะห์แสดงค่าในรูปแบบ mean \pm standard deviations ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป One-way ANOVA คำนวณค่า significance different between treatments ที่ $P < 0.05$ ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (Proximal analysis)

จากผลการทดลอง สรุปได้ว่ารำข้าวมีสีเป็นแหล่งโปรตีนสำคัญ โดยสายพันธุ์ข้าวเหนียวดำ ต้นดำใบดำมีปริมาณโปรตีนสูงที่สุด มากกว่ารำข้าวสายพันธุ์อื่นๆ โดยเรียงลำดับรำข้าวสายพันธุ์ต่างๆจากมากไปหาน้อยได้ดังนี้คือ ข้าวเหนียวดำต้นดำใบดำ (14.41% \pm 0.27) > ข้าวเหนียวดำหอม (13.98% \pm 0.72) > ข้าวเล็บนก (13.03% \pm 0.56) > ข้าวสังข์หยด (11.61% \pm 0.26) > ข้าวหอมกระดังงา (10.76% \pm 1.09) > ข้าวเหนียวแดงกรมแดง (10.18% \pm 0.26) สำหรับปริมาณไขมัน รำข้าวเล็บนกมีปริมาณไขมันสูงที่สุด (29.41% \pm 0.35) รองลงมาคือ ข้าวเหนียวดำหอม (27.42% \pm 0.39) ข้าวสังข์หยด (25.33% \pm 1.20) ข้าวเหนียวดำต้นดำใบดำ (23.69% \pm 0.28) ข้าวเหนียวแดงกรมแดง (23.30% \pm 0.02) และข้าวหอมกระดังงา (22.65% \pm 0.02) ดังนั้นรำข้าวเล็บนกมีโอกาสความเป็นไปได้ที่จะเกิดปฏิกิริยา oxidation กับอากาศ เกิดการเหม็นหืนได้เร็วกว่ารำข้าวสายพันธุ์อื่นๆ อย่างไรก็ตาม รำข้าวมีสีมีองค์ประกอบคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบหลักประมาณ 46.80% - 57.58% ดังข้อมูลใน Table 1

Table 1 องค์ประกอบทางเคมีของรำข้าวสายพันธุ์ต่างๆ

รำข้าว	%ความชื้น	%เถ้า	%โปรตีน	%ไขมัน	%คาร์โบไฮเดรต
ข้าวเล็บนก	3.34 ± 0.21	7.42 ± 0.27	13.03 ± 0.56	29.41 ± 0.35	46.80 ± 1.97
ข้าวสังข์หยด	4.99 ± 0.80	7.42 ± 0.26	11.61 ± 0.26	25.33 ± 1.20	50.65 ± 3.56
ข้าวเหนียวแดงกรมแรก	3.21 ± 0.09	5.60 ± 0.09	10.18 ± 0.26	23.30 ± 0.02	57.58 ± 0.47
ข้าวหอมกระดังงา	4.14 ± 0.12	6.25 ± 0.03	10.76 ± 1.09	22.65 ± 0.02	56.20 ± 1.78
ข้าวเหนียวดำหอม (PTNC96051-37)	3.12 ± 0.14	7.04 ± 0.07	13.98 ± 0.72	27.42 ± 0.39	48.44 ± 1.87
ข้าวเหนียวดำตันดำใบดำ	3.07 ± 0.05	5.75 ± 0.05	14.41 ± 0.27	23.69 ± 0.28	53.08 ± 0.92

All data were measured based on dry basis and all measurements were repeated in triplicate.

2. ผลของอุณหภูมิการเก็บต่อปริมาณสารสำคัญประเภทชอบไขมัน (lipophilic substances)

จากผลงานวิจัยของ Chen และคณะ (Chen and Bergman, 2005) ศึกษาตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารประกอบประเภทชอบไขมัน ได้แก่ tocopherol, tocotrienol และ γ -oryzanol พบว่า MeOH เป็นตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพในการสกัดสารกลุ่มที่ชอบไขมัน จึงเลือกตัวทำละลาย MeOH ในการสกัดสารกลุ่มที่ชอบไขมัน

เมื่อศึกษาการเก็บรักษารำข้าวที่อุณหภูมิ 4±2, 14±2 และ 29±2°C ในระยะเวลา 1, 3, 6 และ 9 สัปดาห์ กับปริมาณการเปลี่ยนแปลงสารประกอบกลุ่มที่ชอบไขมัน (α -, δ -tocopherol, α -tocotrienol และ γ -oryzanol) พบว่า รำข้าวทุกสายพันธุ์ (ข้าวเล็บนก (รำข้าวควบคุม), ข้าวสังข์หยด, ข้าวหอมกระดังงา, ข้าวเหนียวดำตันดำใบดำ, ข้าวเหนียวดำหอม, ข้าวเหนียวแดงกรมแรก) มีปริมาณสารประกอบ γ -oryzanol > α -tocotrienol > total tocopherol (α -, δ -tocopherol) ดัง Figure 1, 2 และ 3 สำหรับอุณหภูมิที่เหมาะสม ในการเก็บรำข้าว โดยไม่ทำให้สารประกอบประเภทชอบไขมันเกิดการสลายตัว สามารถเก็บได้ที่อุณหภูมิ 4±2°C ภายในระยะเวลาไม่เกิน 3 สัปดาห์ (Figure1 และ2) นอกจากนี้ที่อุณหภูมิ 4±2°C ระยะเวลาการเก็บ 1 สัปดาห์ ปริมาณสารประกอบ α -tocotrienol มีมากกว่าปริมาณ total tocopherol (α -, δ -tocopherol) ประมาณ 2-4 เท่า และปริมาณสารประกอบ γ -oryzanol มากกว่าปริมาณสารประกอบ total tocopherol (α -, δ -tocopherol) ประมาณ 45 – 123 เท่า ทั้งนี้ขึ้นกับสายพันธุ์รำข้าว (Figure 1) เมื่อเปรียบเทียบรำข้าว waxy rice (ข้าวเหนียวดำหอม, ข้าวเหนียวดำตันดำใบดำ, ข้าวเหนียวแดงกรมแรก) และ non-waxy rice (ข้าวเล็บนก, ข้าวสังข์หยด, ข้าวหอมกระดังงา)พบว่า waxy rice สายพันธุ์ข้าวเหนียวดำหอม มีปริมาณสารประกอบ total tocopherol (13.16±0.45 $\mu\text{g}/\text{mL}$) และ γ -oryzanol (1,342.34±0.82 $\mu\text{g}/\text{mL}$) สูงกว่ารำข้าว non-waxy rice (ข้าวเล็บนก (10.35±0.44, 567.64±4.08 $\mu\text{g}/\text{mL}$), ข้าวสังข์หยด (9.74±2.62, 584.20±3.48 $\mu\text{g}/\text{mL}$), ข้าวหอมกระดังงา (9.23±0.23, 508.15±4.92 $\mu\text{g}/\text{mL}$)) ที่อุณหภูมิ 4±2°C ระยะเวลาการเก็บ 1 สัปดาห์ ส่วนปริมาณสารประกอบ α -tocotrienol ในรำข้าว non-waxy rice โดยเฉพาะรำข้าวสังข์หยด (44.25±0.14 $\mu\text{g}/\text{mL}$) และข้าวหอมกระดังงา (45.17 ± 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$) มีปริมาณมากกว่าในรำข้าว waxy rice (ข้าวเหนียวดำหอม (32.04±0.24 $\mu\text{g}/\text{mL}$), ข้าวเหนียวดำตันดำใบดำ (24.93±0.24 $\mu\text{g}/\text{mL}$), ข้าวเหนียวแดงกรมแรก (35.42±0.02 $\mu\text{g}/\text{mL}$)) (Figure1)

3. ผลของอุณหภูมิการเก็บต่อปริมาณสารประกอบ hydrophilic substances (cyaniding 3-O-glucoside และ peonidin 3-O-glucoside)

เมื่อเปรียบเทียบที่อุณหภูมิทั้ง 3 อุณหภูมิ ระยะเวลาการเก็บรำข้าว 1 สัปดาห์ พบว่าปริมาณสารประกอบ cyanidin 3-O-glucoside มีปริมาณสูงกว่าสารประกอบ peonidin 3-O-glucoside ดัง Figure 4, 5 และ 6 และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บรำข้าวคือที่ $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ระยะเวลาไม่เกิน 3 สัปดาห์ รำข้าวสายพันธุ์ข้าวเหนียวดำหอมมีปริมาณ cyaniding 3-O-glucoside มากที่สุด ($155.88 \pm 0.70 \mu\text{g/mL}$) มากกว่าปริมาณ peonidin 3-O-glucoside ประมาณ 17 เท่า ($8.71 \pm 0.20 \mu\text{g/mL}$) ระยะเวลาเก็บ 1 สัปดาห์ จากการศึกษาเสถียรภาพของส่วนสกัด anthocyanin จากดอก *T. semidecandra* สามารถสรุปได้ว่า อุณหภูมิ ระยะเวลาการเก็บและแสงมีอิทธิพลต่อเสถียรภาพ anthocyanins ดังนั้นที่อุณหภูมิ 4°C เก็บในที่มืด เป็น ระยะเวลานาน 26 วัน สารประกอบ anthocyanins มีปริมาณความเข้มข้นมากที่สุด นั้นแสดงถึงเสถียรภาพของสารประกอบ anthocyanin (Janna et al., 2007)

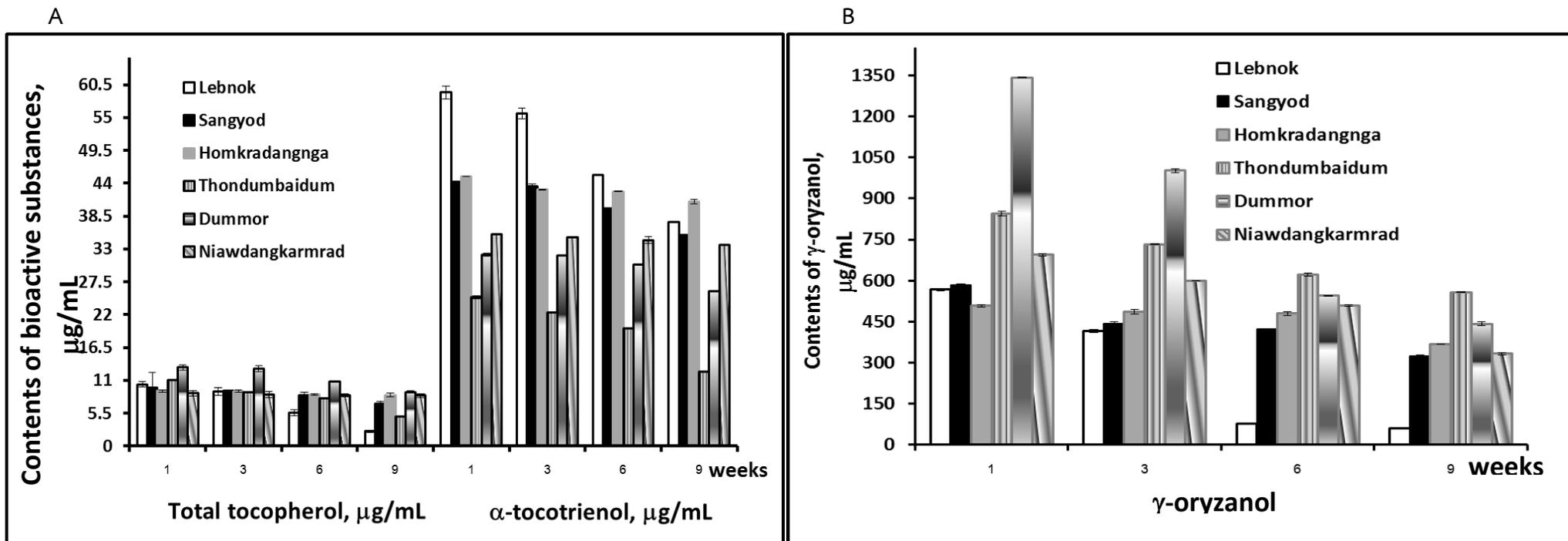


Figure 1 การเปรียบเทียบผลของอุณหภูมิการเก็บรักษารำข้าวที่ 4±2°C ต่อปริมาณสารประกอบ α-, δ-tocopherol, α-tocotrienol และ γ-oryzanol ภายในระยะเวลา 1, 3, 6, และ 9 สัปดาห์ โดยที่ภาพ A คือ สารประกอบ α, δ-tocopherol (total tocopherol) และ α-tocotrienol, ภาพ B คือสารประกอบ γ-oryzanol

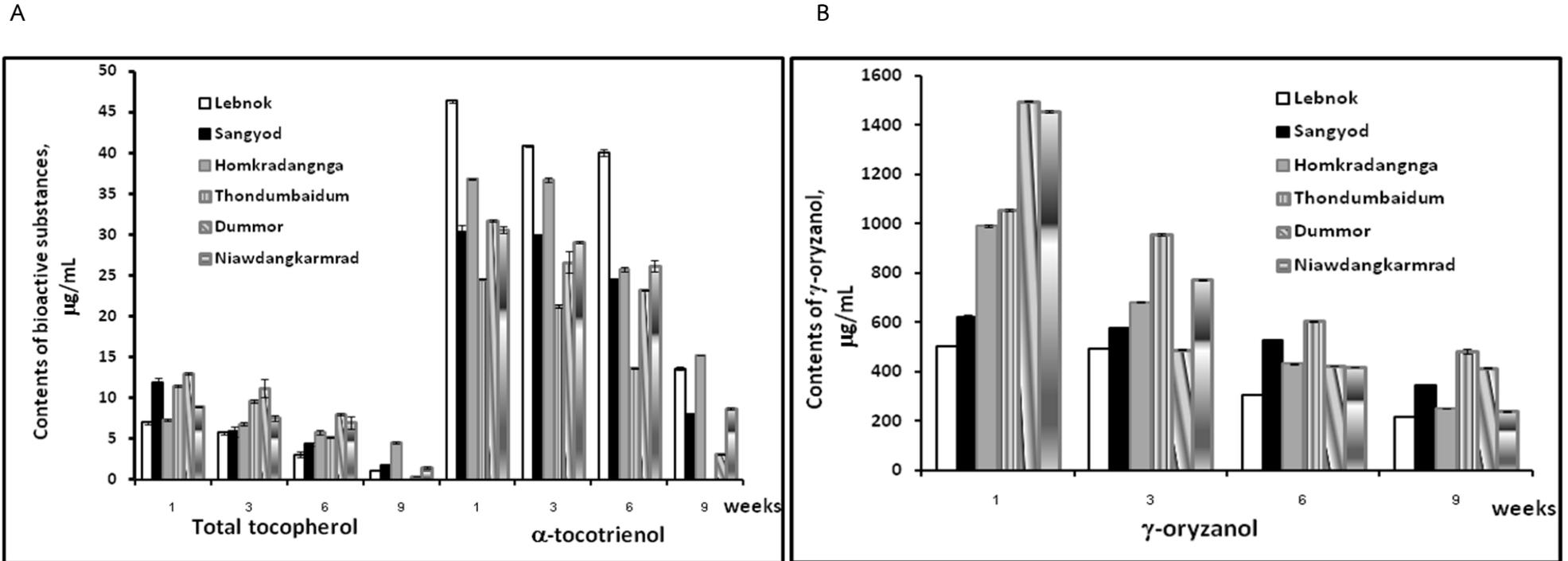


Figure 2 การเปรียบเทียบผลของอุณหภูมิการเก็บรักษารำข้าวที่ $14 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ต่อปริมาณสารประกอบ α -, δ -tocopherol, α -tocotrienol และ γ -oryzanol ภายในระยะเวลา 1, 3, 6, และ 9 สัปดาห์ โดยที่ภาพ A คือ สารประกอบ α , δ -tocopherol (total tocopherol) และ α -tocotrienol ภาพ B คือสารประกอบ γ -oryzanol

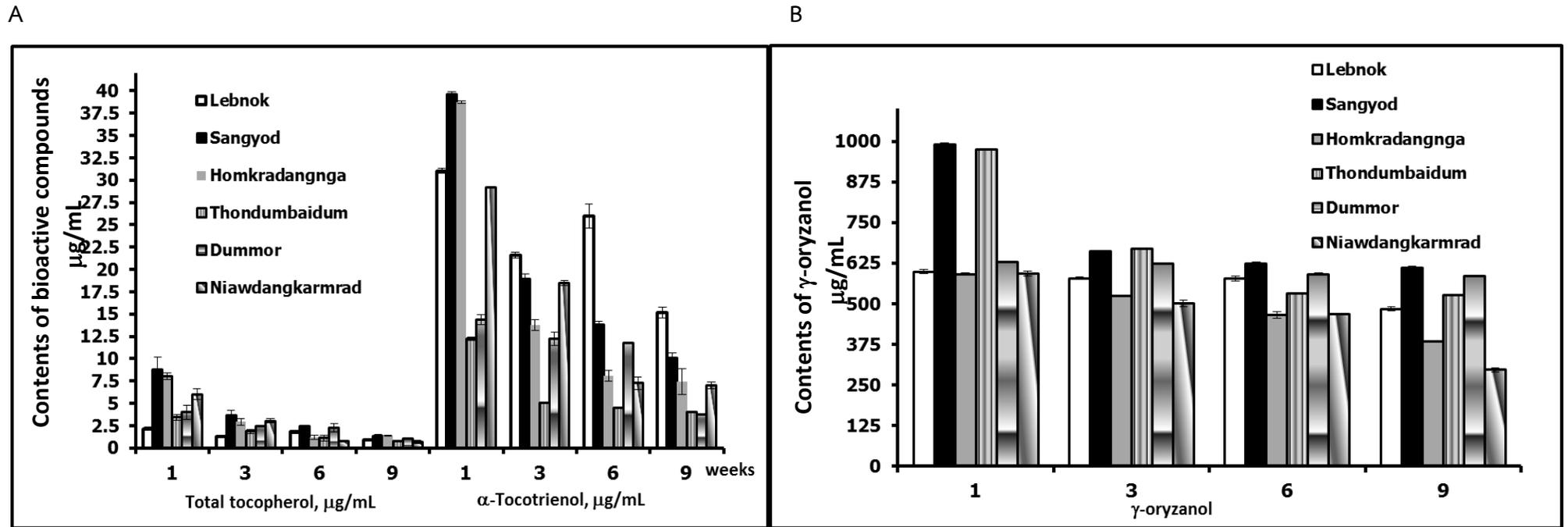


Figure 3 การเปรียบเทียบผลของอุณหภูมิการเก็บรักษารำข้าวที่อุณหภูมิห้อง ($29 \pm 2^{\circ}\text{C}$) ต่อปริมาณสารประกอบ α -, δ -tocopherol, α -tocotrienol และ γ -oryzanol ภายในระยะเวลา 1, 3, 6, และ 9 สัปดาห์ โดยที่ภาพ A คือ สารประกอบ α , δ -tocopherol (total tocopherol) และ α -tocotrienol, ภาพ B คือสารประกอบ γ -oryzanol

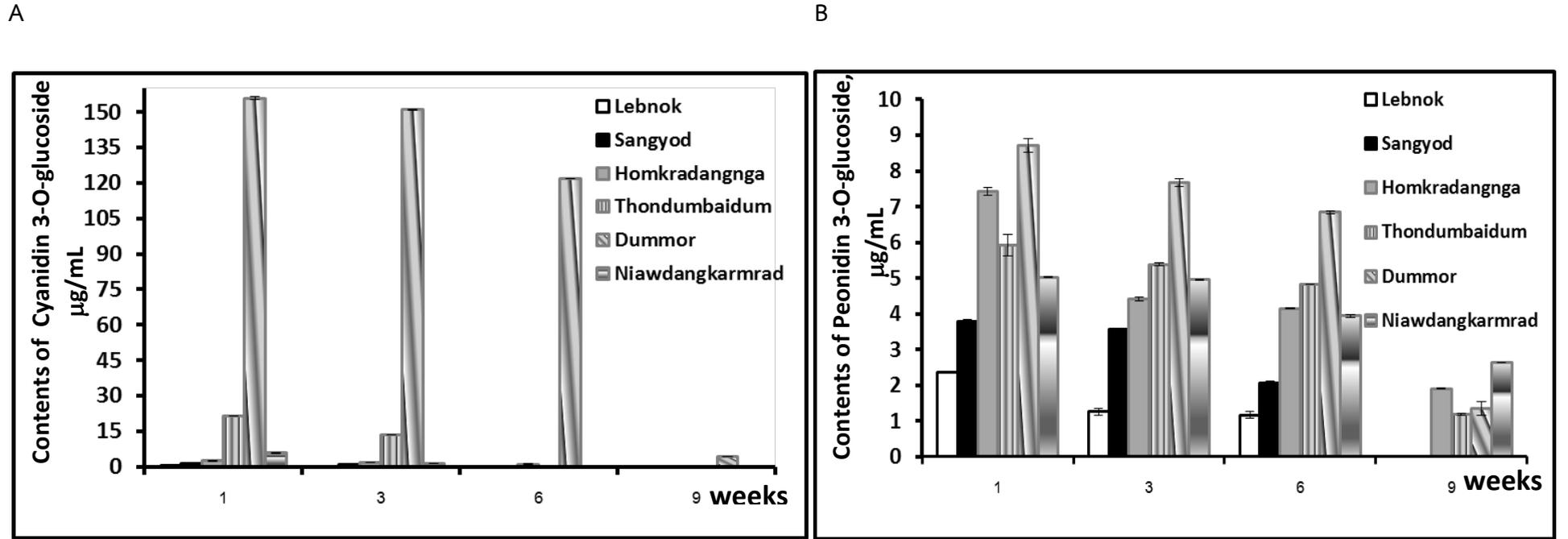


Figure 4 การเปรียบเทียบผลของอุณหภูมิการเก็บรักษารำข้าวที่ $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ต่อปริมาณสารประกอบ hydrophilic substances (cyaniding 3-O-glucoside และ peonidin 3-O-glucoside) ภายในระยะเวลา 1, 3, 6, และ 9 สัปดาห์ โดยที่ภาพ A คือ สารประกอบ cyaniding 3-O-glucoside ภาพ B คือสารประกอบ peonidin 3-O-glucoside

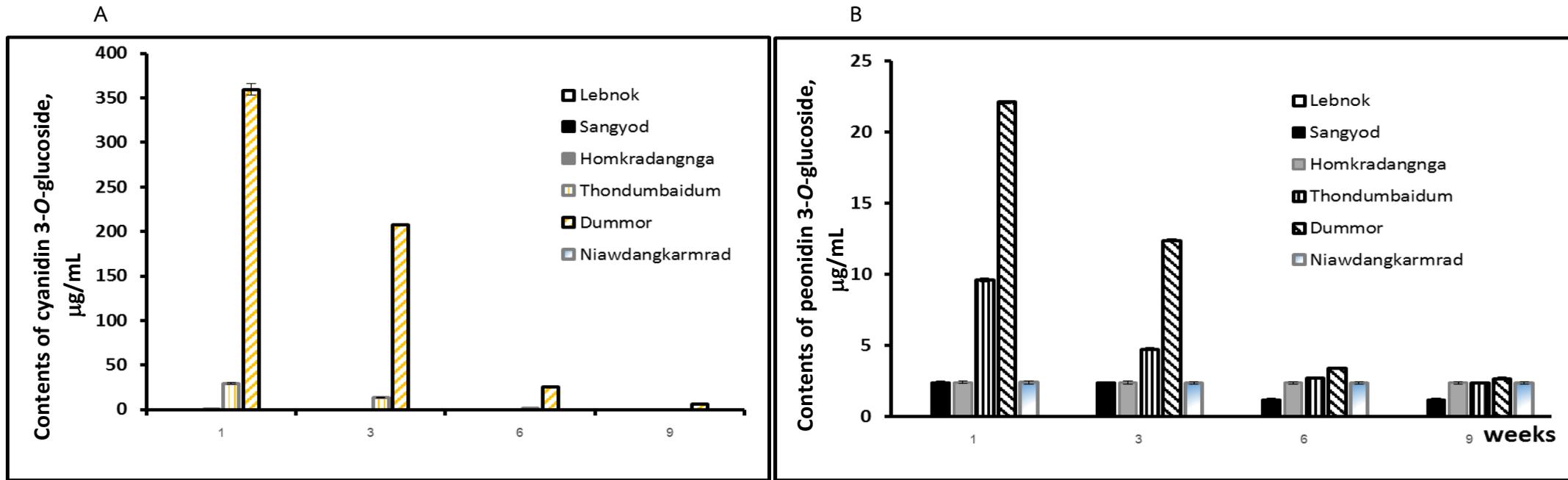


Figure5 การเปรียบเทียบผลของอุณหภูมิการเก็บรักษารำข้าวที่ $14\pm 2^{\circ}\text{C}$ ต่อปริมาณสารประกอบ hydrophilic substances (cyaniding 3-O-glucoside และ peonidin 3-O-glucoside) ภายในระยะเวลา 1, 3, 6, และ 9 สัปดาห์ โดยที่ภาพ A คือ สารประกอบ cyaniding 3-O-glucoside ภาพ B คือสารประกอบ peonidin 3-O-glucoside

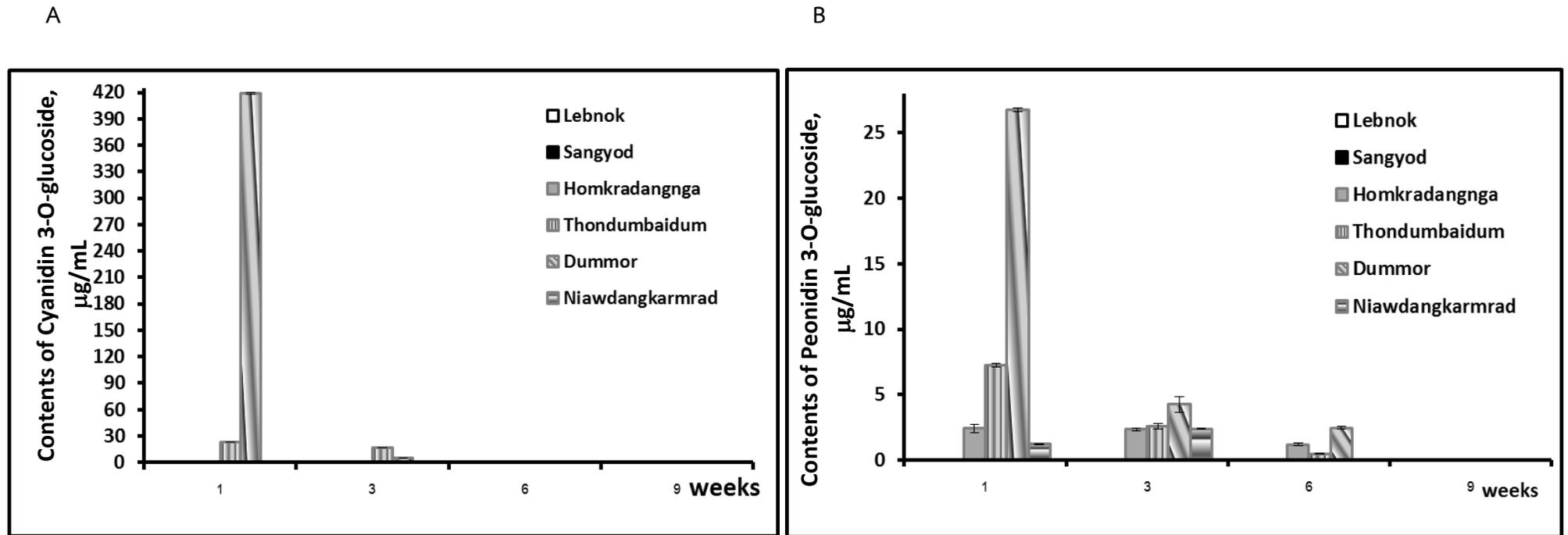


Figure6 การเปรียบเทียบผลของอุณหภูมิการเก็บรักษารำข้าวที่อุณหภูมิห้อง ($29\pm 2^{\circ}\text{C}$) ต่อปริมาณสารประกอบ hydrophilic substances (cyaniding 3-O-glucoside และ peonidin 3-O-glucoside) ภายในระยะเวลา 1, 3, 6, และ 9 สัปดาห์ โดยที่ภาพ A คือ สารประกอบ cyaniding 3-O-glucoside ภาพ B คือ สารประกอบ peonidin 3-O-glucoside

4. ผลของอุณหภูมิและระยะเวลาการเก็บต่อเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง Lipid peroxidation, Ferric reducing power และ ABTS^{•+} assay

เมื่อพิจารณาส่วนสกัดที่ขบไขมัน และเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง Lipid peroxidation พบว่าที่อุณหภูมิ 4±2°C และ 14±2°C ระยะเวลา 1 สัปดาห์ รำข้าวทุกสายพันธุ์มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง Lipid peroxidation สูงกว่ารำข้าวเล็บนกเล็กน้อย ซึ่งเป็นรำข้าวไม่มีสี (รำข้าวควบคุม) ดัง Figure7 แสดงให้เห็นว่าทางด้านการจัดการด้านอนุมูลอิสระ Lipid peroxidation ไม่มีแตกต่างจากรำข้าวไม่มีสีมากนัก

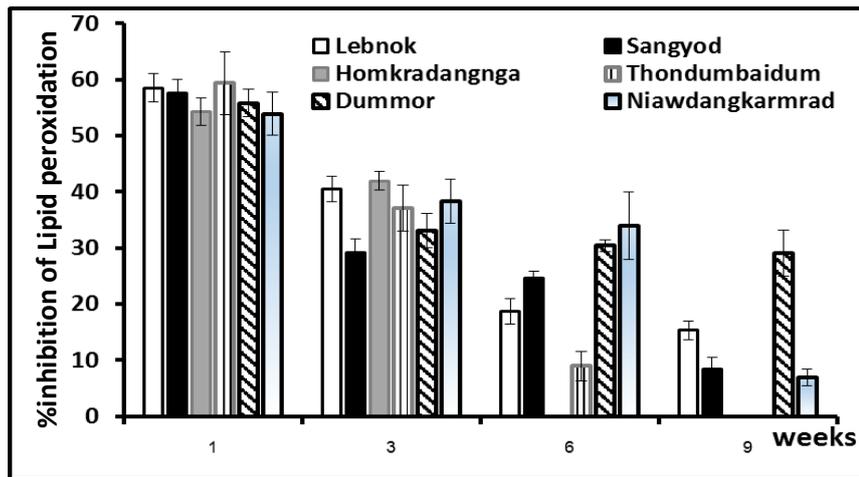
ส่วนเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง FRAP assay พบว่าที่อุณหภูมิ 4±2°C รำข้าวทุกสายพันธุ์มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง FRAP assay สูงกว่ารำข้าวเล็บนก ซึ่งเป็นรำข้าวไม่มีสี (รำข้าวควบคุม) ดัง Figure8 แสดงให้เห็นว่าทางด้านการจัดการด้านอนุมูลอิสระ FRAP assay มีอิทธิพลต่อรำข้าวทั้ง 5 สายพันธุ์ที่นำมาศึกษาซึ่งเกี่ยวข้องกับอนุมูลอิสระ $\bullet\text{OH}$ และ $\text{O}_2\bullet^-$

ทำนองเดียวกับ lipid peroxidation, กิจกรรมการด้านอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} assay พบว่าทุกอุณหภูมิ รำข้าวทุกสายพันธุ์มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งไม่แตกต่างจากรำข้าวเล็บนก ดัง Figure9

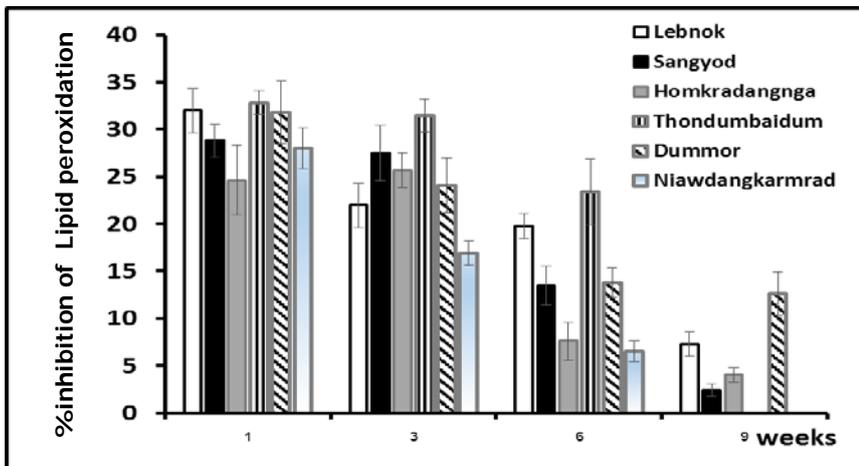
จากข้อมูลที่ผ่านมา สามารถสรุปได้ว่า ที่อุณหภูมิการเก็บรำข้าว 4±2°C เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บรำข้าว จึงเลือกอุณหภูมิ 4±2°C เป็นอุณหภูมิในการวิเคราะห์กิจกรรมการด้านอนุมูลอิสระของส่วนสกัด hydrophilic substances พบว่า ที่ระยะเวลาการเก็บ 1 สัปดาห์ กิจกรรมการด้านอนุมูลอิสระ FRAP assay ของรำข้าวทุกสายพันธุ์มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่สูงกว่ารำข้าวเล็บนก ดัง Figure10

มีรายงานการวิจัยที่ผ่านมา ได้แสดงถึงน้ำมันรำข้าวมีผลดีต่อสุขภาพ อย่างเช่น สามารถลดปริมาณคอเลสเตอรอล (hypcholesteremic) และปริมาณไขมัน (hypolipidemic) ในกระแสเลือด (γ -oryzanol และ Tocols), anticancer (Tocotrienol), anti-inflammatory (Tocotrienol) และคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ (Tocotrienol) (Arumughan et al., 2004; Mayamol et al., 2004) เมื่อเปรียบเทียบสารต้านอนุมูลอิสระประเภทละลายไขมันในธัญญาพืชชนิดต่างๆ (cereals and grains) พบว่าสารประกอบต้านอนุมูลอิสระประเภทละลายไขมันในรำข้าวมีความแตกต่างจากธัญญาพืชทั่วไป เช่น α - และ γ -tocopherol พบในธัญญาพืชทั่วไป ขณะที่ α - และ γ -tocotrienol พบมากในน้ำมันรำข้าว (Moreau and Lampi, 2012) ซึ่งสารประกอบ tocotrienol มีความสามารถสนับสนุนให้เกิดการลดระดับคอเลสเตอรอลในเซรัม (serum) ของการศึกษาในระดับสัตว์ทดลองและคลินิก (Godber and Juliano, 2004) นอกจากสารประกอบประเภทละลายไขมันแล้ว ยังพบสารประกอบ hydrophilic antioxidant อื่นๆ เช่น anthocyanins (Jang and Xu, 2009) ซึ่งมีคุณสมบัติในการป้องกันและยืดเวลาการเกิดโรคเรื้อรัง เช่น cardiovascular diseases, obesity, diabetes และ cancers (Canter and Ernst, 2004; Prior and Joseph, 2004; Tsuda, Horio, Uchida, Aoki and Osawa, 2003; Youdim, McDonald, Kalt and Joseph, 2002)

4°C



14°C



29°C

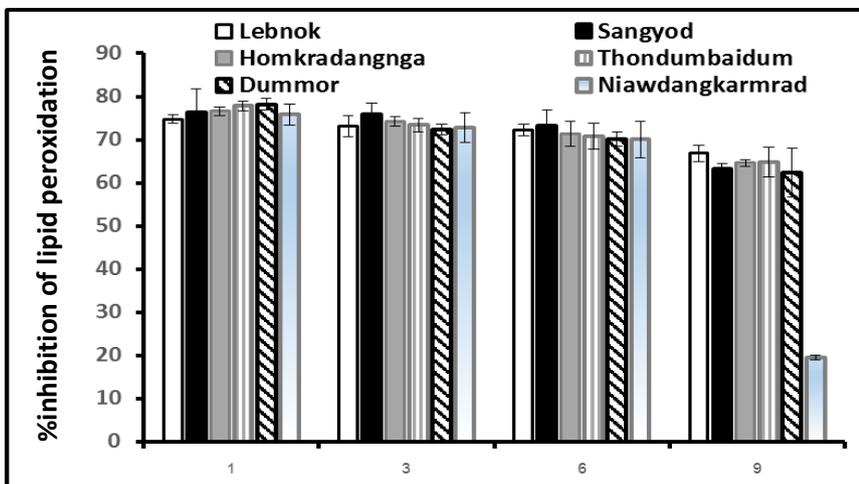
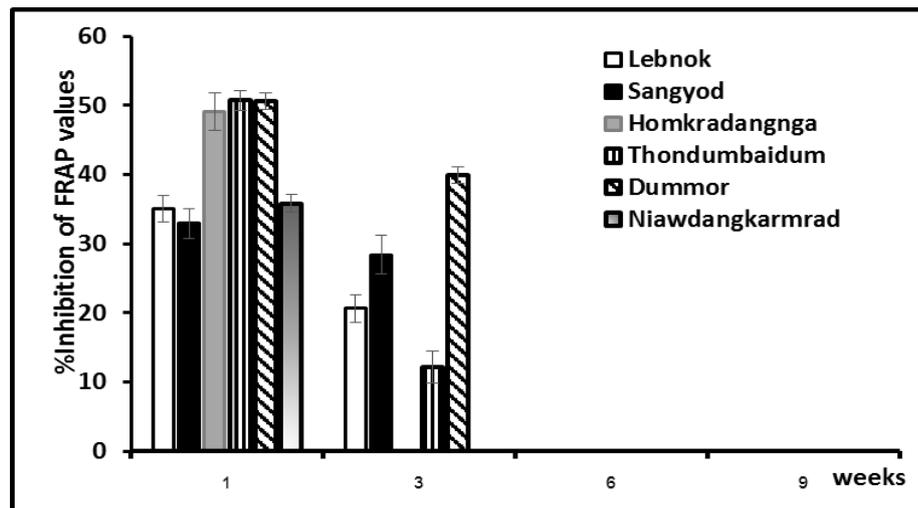
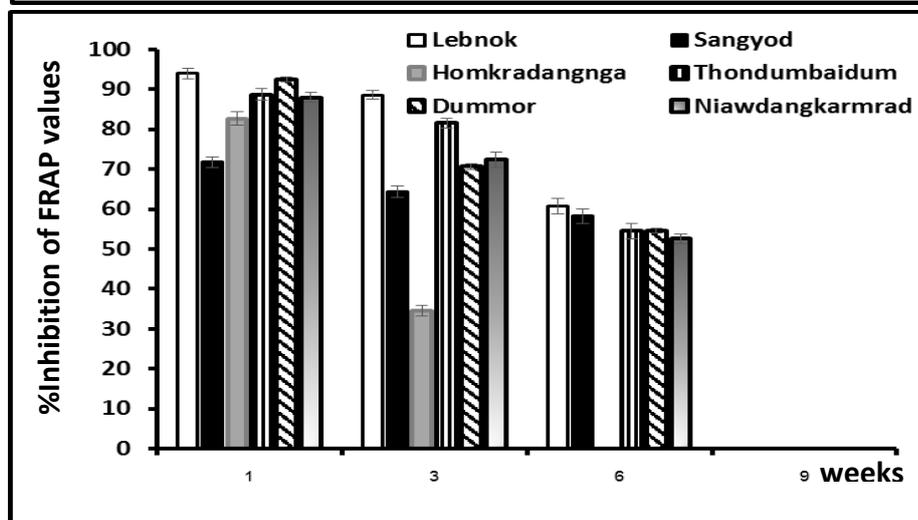


Figure7 ผลของระยะเวลาการเก็บรักษารำข้าว (1, 3, 6 และ 9 สัปดาห์) ที่อุณหภูมิต่างๆ(4±2°C, 14±2°C และอุณหภูมิห้อง 29±2°C) กับความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ Lipid peroxidation ของสารกลุ่มชอบไขมัน (lipophilic part substances)

4°C



14°C



29°C

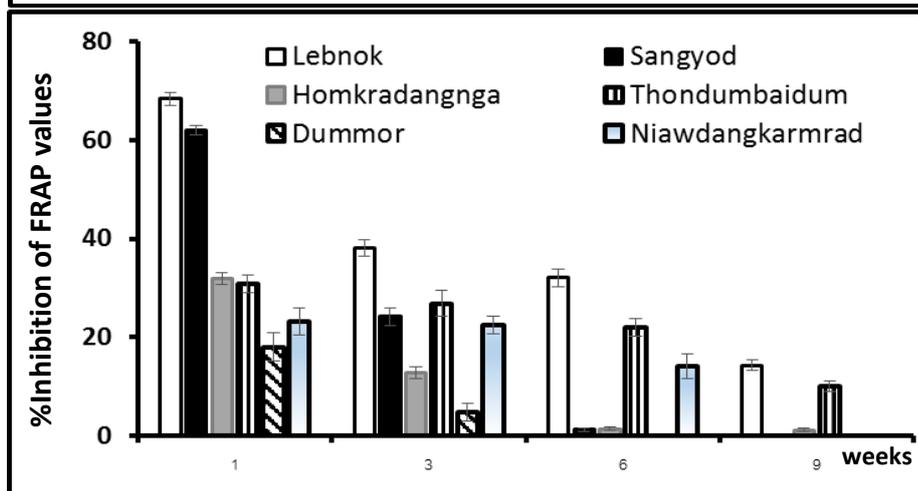


Figure8 ผลของระยะเวลาการเก็บรักษารำข้าว (1, 3, 6 และ 9 สัปดาห์) ที่อุณหภูมิต่างๆ (4±2°C, 14±2°C และอุณหภูมิห้อง 29±2°C) กับความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของ Ferric reducing power assay (FRAP) ของสารกลุ่มชอบไขมัน (lipophilic part substances)

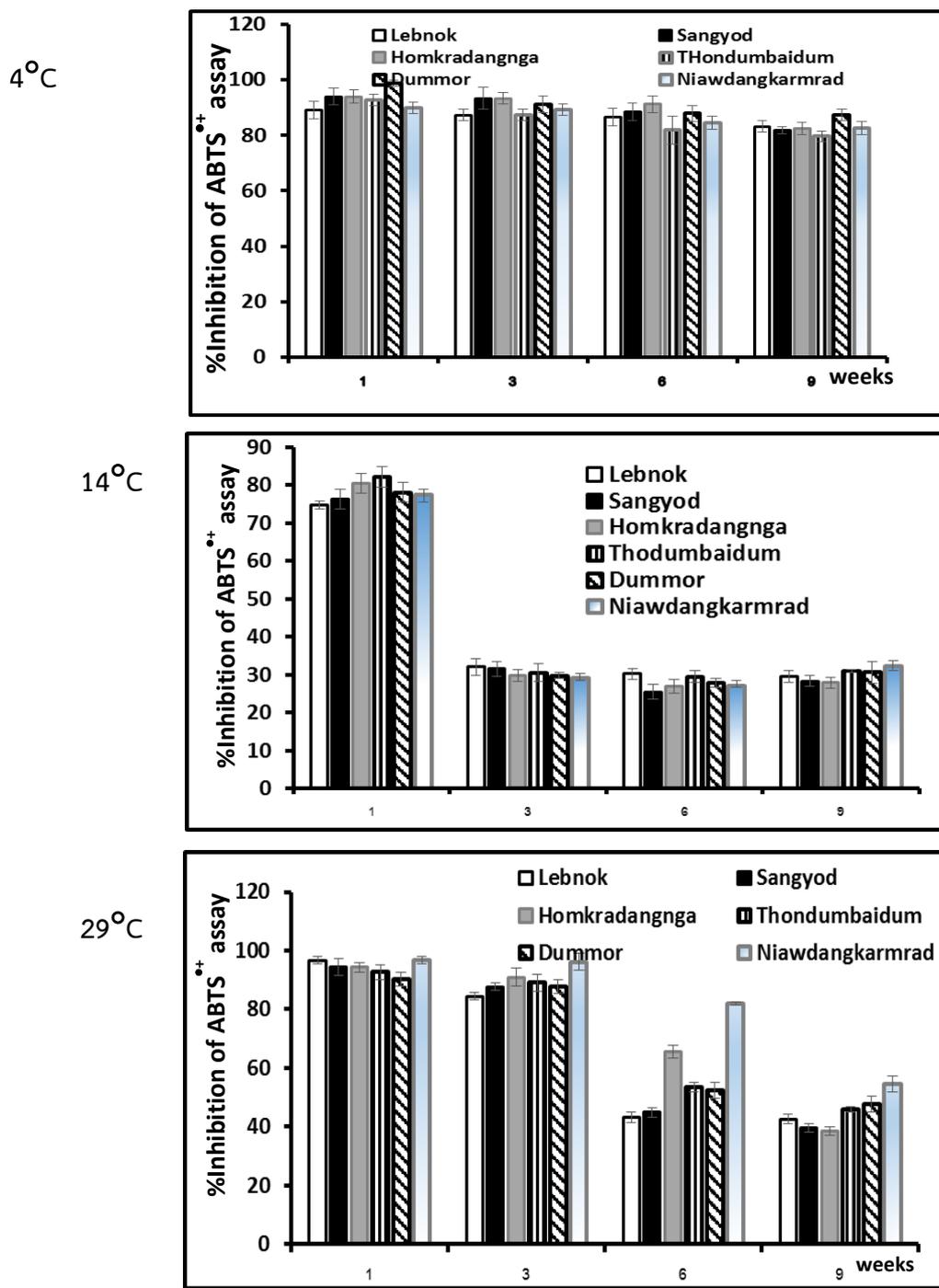
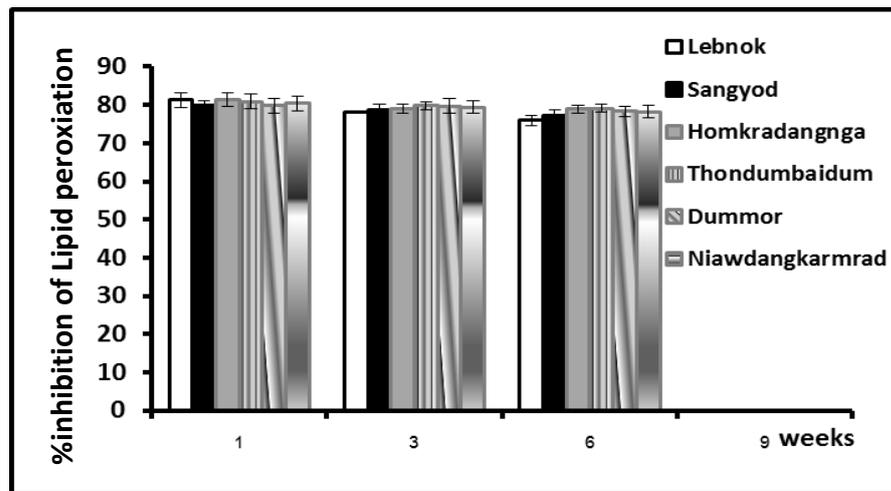
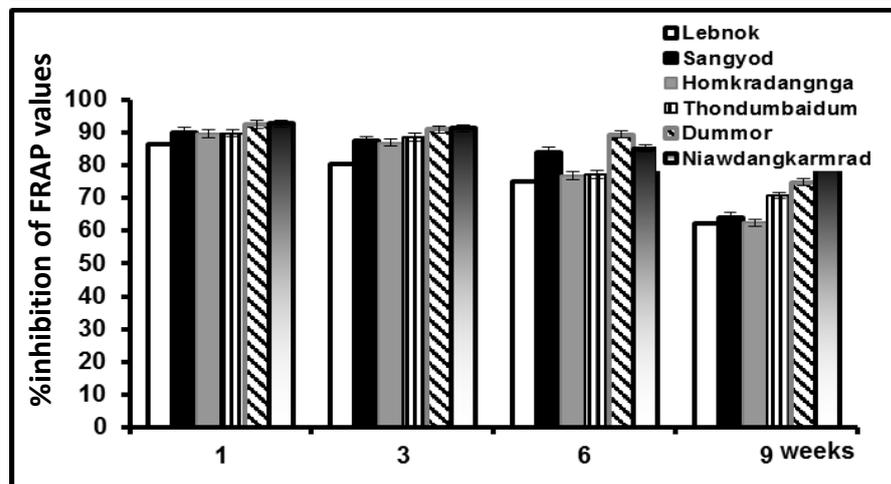


Figure9 ผลของระยะเวลาการเก็บรักษารำข้าว (1, 3, 6 และ 9 สัปดาห์) ที่อุณหภูมิต่างๆ (4±2°C, 14±2°C และอุณหภูมิห้อง 29±2°C) กับความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของ ABTS^{•+} assay ของสารกลุ่มชอบไขมัน (lipophilic part substances)

4°C



4°C



4°C

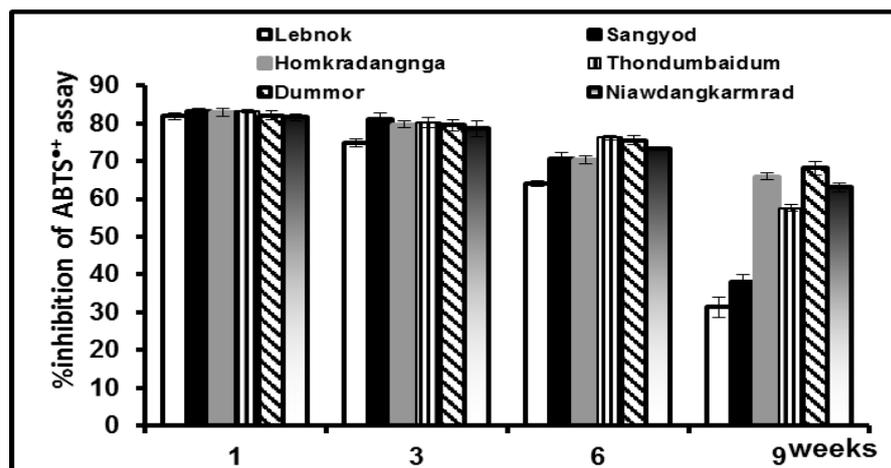


Figure10 ผลของระยะเวลาการเก็บรักษารำข้าว (1, 3, 6 และ 9 สัปดาห์) ที่อุณหภูมิ 4±2°C กับความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของ Lipid peroxidation, Ferric reducing power (FRAP) และ ABTS^{•+} assays ของสารกลุ่ม hydrophilic substances (cyaniding 3-O-glucoside และ peonidin 3-O-glucoside)

เอกสารอ้างอิง (กรณีที่ไม่มีใน Reprint หรือ Proceeding ตามที่แนบในภาคผนวกข้อ 7.1)

- Arnao, M. B., Cano, A. and Acosta, M. 2001. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*, 73(2):239-244.
- Arumughan, C., Skharia, R. and Arora, R. 2004. Rice bran oil: an untapped health food. *Inform.* 15: 706–707.
- Canter, P. H. and Ernst, E. 2004. Anthocyanosides of *Vaccinium myrtillus* (bilberry) for night visions – a systematic review of placebo-controlled trials. *Survey of Ophthalmology*, 49: 38–50.
- Chen, M.-H. and Bergman, C.J. 2005. A rapid procedure for analysing rice bran tocopherol, tocotrienol and γ -oryzanol contents. *Journal of Food Composition and Analysis* 18: 139–151.
- Chiang, A.N., Wu, H.L., Yeh, H.I. Chu, C.S., Lin, H.C. and Lee, W.C. 2006. Antioxidant effects of black rice extract through the induction of superoxide dismutase and catalase activities. *Lipids*, 41(8):797-803.
- Godber, J. S., and Juliano, B. O. (2004). Rice lipids. In E. T. Champagene (Ed.), *Rice chemistry and technology* (3rd ed., pp. 163–190). Minnesota: American Association of Cereal Chemists Inc.
- Gysin, R., Azzi, A. and Visarius, T. 2002. γ -tocopherol inhibits human cancer cell cycle progression and cell proliferation by down-regulation of cyclins. *FASEB Journal*, 16(12):1952-1954.
- Jang, S. and Xu, Z. 2009. Lipophilic and hydrophilic antioxidants and their antioxidant activities in purple rice bran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 858–862.
- Janna, O.A., Khairul, A.K. and Maziah, M. 2007. Anthocyanin stability studies in *Tibouchina semidecandra* L. *Food Chemistry*, 101: 1640-1646.
- Kerio, L.C., Wachira, F.N., Wanyoko, J.K. and Rotich, M.K. 2012. Characterization of anthocyanins in Kenyan teas: Extraction and identification. *Food Chemistry*, 131: 31–38.
- Mayamol, P.N., Balachandran, C., Samuel, T., Sundaresan, A., Arumughan, C. 2007. Zero trans shortening using rice bran oil, palm oil and palm stearin through interesterification at pilot scale. I.J.F.S.T-2006-01605.R3, in press.
- Moreau, R. A., & Lampi, A. (2012). Analysis methods for tocopherols and tocotrienols. In Z. Xu & L. R. Howard (Eds.), *Analysis of antioxidant-rich phytochemicals* (pp. 353–386). Wiley-Blackwell Publisher.
- Nam, S.H., Choi, S.P., Kang, M.Y., Koh, H. J., Kozukue, N. and Friedman, M. 2005. Bran extracts from pigmented rice seeds inhibit tumor promotion in lymphoblastoid B cells by phorbol ester. *Food and Chemical Toxicology*, 43(5):741-745.
- Nam, S.H., Choi, S.P., Kang, M.Y., Koh, H. J., Kozukue, N. and Friedman, M. 2006. Antioxidative

- activities of bran extracts from twenty one pigmented rice cultivars. *Food Chemistry*, 94(4):613-620.
- Prior, R. L. and Joseph, J. 2004. Berries and fruits in cancer chemoprevention. In D. Bagchi & H. G. Preuss (Eds.), *Phytopharmaceuticals in cancer chemoprevention* (pp. 465–479). CRC Press.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L. and Byrne, D. H. 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*.19: 669–675.
- Tsuda, T., Horio, F., Uchida, K., Aoki, H. and Osawa, T. 2003. Dietary cyanidin 3-O- β -D-glucoside-rich purple corn colour prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. *The Journal of Nutrition*, 133: 2125–2130.
- Youdim, K. A., McDonald, J., Kalt, W. and Joseph, J. A. 2002. Potential role of dietary flavonoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and inflammatory insults. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13: 282–288.
- Zin, Z. M., Hamid, A. A., Osman, A. and Saari, N. 2006. Antioxidative activities of chromatographic fractions obtained from root, fruit and leaf of Mengkudu. *Food Chem.*, 94:169–178.

7. ภาคผนวก

- 7.1 แนบสำเนาบทความที่ได้รับการตีพิมพ์แล้ว (Reprint)
Manuscript อยู่ระหว่างการส่งเข้าวารสาร Maejo International Journal of Science and Technology รอการตอบรับ
- 7.2 ผลการวิจัยส่วนที่ยังไม่ได้ตีพิมพ์หรือตีพิมพ์ไม่ได้ แต่อยู่ในวัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย ประกอบด้วย
- วิธีการ
 - ผลการทดลองและวิจารณ์
 - เอกสารอ้างอิง
- 7.3 ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยต่อไป
ไม่มี
- 7.4 บทความวิจัยที่นำเสนอที่ประชุมวิชาการ(Proceeding) (ถ้ามี)
เสนอผลงานวิจัยแบบ Oral presentation ในงานประชุมวิชาการ the Food Innovation Asia Conference 2013 ไม่มี Proceeding