

การสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากรำข้าวหอมนิล
และการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์กุนเชียงหมู

สุพัฒน์ พงษ์ไทย

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

กรกฎาคม 2556

การสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากรำข้าวหอมนิล
และการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์กุนเชียงหมู

สุพัฒน์ พงษ์ไทย

วิทยานิพนธ์นี้เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัยเพื่อเป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
กรกฎาคม 2556

การสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากรำข้าวหอมนิล
และการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์กุนเชียงหมู

สุพัฒน์ พงษ์ไทย

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

.....ณาศินี อัครพันธ์.....ประธานกรรมการ

.....ดร. ธีรณพ.....

อาจารย์ ดร.มล.ณาศินี อัครพันธ์

อาจารย์ ดร.ธีรณพ เหล่ากุลคิลก

.....ดร. ธีรณพ.....กรรมการ

อาจารย์ ดร.ธีรณพ เหล่ากุลคิลก

.....กษิรา เหมภัทรสุวรรณ.....กรรมการ

อาจารย์ ดร.กษิรา เหมภัทรสุวรรณ

12 กรกฎาคม 2556

© ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเชียงใหม่

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร.พรรณพ เหล่ากุลดิลก อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ซึ่งคอยให้คำปรึกษา คำลั้งใจ แนวทางและข้อเสนอแนะต่างๆ รวมถึงเงินทุนสนับสนุนจนทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.มล.ญาสินี จักรพันธุ์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และอาจารย์ ดร.กันทิรา เหมภัทรสุวรรณ ที่ท่านได้เสียสละเวลาอันมีค่าเพื่อร่วมเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ พร้อมทั้งขอบพระคุณในความกรุณาที่ได้ตรวจ ชี้แนะแนวทางการปรับปรุง และแก้ไขให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ จาก มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ, Kagawa University (ประเทศญี่ปุ่น) และมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ทุกท่าน ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ทางวิชาการ และเพิ่มพูนทักษะต่างๆ ที่เป็นประโยชน์สำหรับงานวิจัยเล่มนี้ รวมถึงเจ้าหน้าที่ นักศึกษาปริญญาโท และเอก คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ทุกคน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในทุกๆ ด้านที่เกี่ยวข้องกับวิทยานิพนธ์เล่มนี้

ขอขอบพระคุณ คุณพิทยา และคุณกุลิสรา พงษ์ไทย คุณศิวะระพล คุณาพรรักษ์ คุณนิตยาภรณ์ นิลคำ พญ.กัญญารัตน์ อินพรหม รวมถึงญาติพี่น้อง หลานๆ และเพื่อนๆ ทุกคน ที่คอยให้กำลังใจ คำปรึกษา และแนวทางการใช้ชีวิต ฯลฯ ตลอดระยะเวลาที่ข้าพเจ้าได้ศึกษาอยู่

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อกิตติวัฒน์ และคุณแม่บัวจันทร์ พงษ์ไทย ที่ได้ให้ชีวิต อบรมสั่งสอน ให้กำลังใจ คำปรึกษา แนวทางการใช้ชีวิต โอกาสทางการศึกษา และเงินทุนสนับสนุนแก่ข้าพเจ้ามาโดยตลอด ประโยชน์อันใดที่เกิดจากงานวิจัยเล่มนี้ ย่อมเป็นผลมาจากความเมตตา กรุณาของท่านที่กล่าวรายนามข้างต้น ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้ง และรู้สำนึกเป็นอย่างยิ่ง จึงใคร่ขอขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

สุพัฒน์ พงษ์ไทย

เอกสารอ้างอิง

กรมการข้าว. 2556. “องค์ความรู้เรื่องข้าว”. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา

<http://brrd.in.th/rkb/varieties/index.php.htm> (20 มกราคม 2556).

กรรณานุช ศรีกอก. “การสกัดโปรตีนและการผลิตไฮโดรไลเสตจากรำข้าวสังข์หยดเมืองพัทลุงที่ผ่านการสกัดน้ำมัน”. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมกระบวนการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2555.

เจนจิรา จิรัมย์ และ ประสงค์ สีหานาม. “อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ: แหล่งที่มาและกลไกการเกิดปฏิกิริยา”. วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยราชภัฏกาฬสินธุ์ ปีที่ 1, 1 (พฤษภาคม-สิงหาคม 2554) : 59-70.

ชนิกาญจน์ จันทรมาทอง. “กิจกรรมต้านออกซิเดชันและปริมาณสารต้านออกซิเดชันบางชนิดในผลไม้เชื้อ”. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2552.

ชัยวุฒิ ไชยชนะ และ ชุตินา กัณหะ. “การสกัดและแยกกรดจากข้าวดำ”. ปัญหาพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2544.

ดำเนิน กาละดี, พันทิพา พงษ์เพียจันทร์ และ ศันสนีย์ จำจด. รายงานการวิจัยเรื่อง พันธุศาสตร์การปรับปรุงพันธุ์และโภชนศาสตร์เกษตรของข้าวเหนียวดำ. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2543.

นิพัทธา ชาติสุวรรณ และ วรวิทย์ อารีกุล. พารามิเตอร์สี ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณแอนโธไซยานินในข้าวสายพันธุ์ต่างๆ. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48 : สาขาอุตสาหกรรมเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2553.

นิธิยา รัตนปนนท์. *เคมีอาหาร*. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพมหานคร : โอเดียนสโตร์, 2553.

นุจิรา ไสภาระดี. “การผลิตข้าวเจ้าหอมนิล (อินทรี) ของเกษตรกร อำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่”. วิทยานิพนธ์ปริญญาบริหารธุรกิจมหาบัณฑิต สาขาวิชาบริหารธุรกิจ สำนักงานบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยแม่โจ้, 2550.

พัชรินทร์ ระวียัน. เอกสารประกอบการสอนรายวิชา อ.วท.789 เรื่อง ผลของการแปรรูปต่อการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของอาหารทะเล สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2555.

พันทิพา พงษ์เพ็ญจันทร์, เพทาย พงษ์เพ็ญจันทร์, ดำเนิน กาละดี และมนตรี ปัญญาทอง. รายงาน-วิจัยเรื่อง ผลของแกมมาโอริซานอล และโปรแอนโทไซยานิดินจากข้าวเหนียวดำต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันเซลล์มะเร็งและการแข็งตัวของเลือด. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2551.

พรทิว ธนสัมพันธ์. “สารสกัดจากโรสแมรี่ เสง และทาร์เพน เพื่อยับยั้งการหืน”. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2548.

พิเชษฐ เทบารุง และ สุกัญญา สายธิ. การสกัดแอนโธไซยานินสีจากเม่า (*Antidesma* sp.). สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรสกลนคร, 2549.

ราชบัณฑิตยสถาน. 2556. “กุนเชียง”. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา

<http://www.royin.go.th/th/knowledge/detail.php?ID=3460> (17 กรกฎาคม 2556).

วนิดา ศรีอินทร์. “ประสิทธิภาพของสารสกัดจากสาหร่ายทะเลบางชนิดในการยับยั้งแบคทีเรียและการเป็นสารกันหืน”. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาผลิตภัณฑ์ประมง บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2545.

วิไล รังสาทอง. เทคโนโลยีการแปรรูปอาหาร. ภาควิชาเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ. กรุงเทพฯ. 2545.

วิไลวรรณ แทนธานี. “การใช้สารต้านอนุมูลอิสระจากข้าวเหนียวดำ (*Oryza sativa* L.) เพื่อยับยั้งการเกิดออกซิเดชัน และเพิ่มสมรรถภาพการผลิตลูกสุกรหลังหย่านม”. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาวิชา สัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2550

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน. 2546. มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน : กุนเชียง มพช.103-2546. กระทรวงอุตสาหกรรม กรุงเทพฯ.

สุกัญญา เขียวสะอาด. “กะเพรากับการต้านอนุมูลอิสระ”. วารสารวิทยาศาสตร์ลาดกระบัง ปีที่ 21, 2 (กรกฎาคม-ธันวาคม 2555) : 54-65.

สุภาภรณ์ ครัวทัพ. เอกสารประกอบการสอนกระบวนวิชา 203236 เรื่อง เทคนิคการแยกพื้นฐาน: การสกัดด้วยตัวทำละลาย และ โครมาโทกราฟีเบื้องต้น. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2549.

อุมาพร ศิริพินทุ์. 2556. “เทคโนโลยีผลิตภัณฑ์เนื้อ”. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา

<http://coursewares.mju.ac.th:81/e-learning46/ft470/chaptert.html> (17 มิถุนายน 2556)

Aguilar-Garcia, C., Gavino, G., Baragano-Mosqueda, M., Hevia, P., and Gavino, V.C. 2007. Correlation of tocopherol, tocotrienol, γ -oryzanol and total polyphenol content in rice bran with different antioxidant capacity assays. *Journal of Food Chemistry*, 102: 1228-1232.

AOAC, 2000. *Official Methods of AOAC International*. 17th ed. The Association of Official Analytical Chemists, USA.

Arab, F., Alemzadeh, I., and Maghsoudi, V. 2011. Determination of antioxidant component and activity of rice bran extract. *Journal of Scientia Iranica*, 18(6): 1402-1406.

Borges, G.D.S.C., and Vieira, F.G.K. 2011. Optimization of extraction of flavonols and anthocyanins from the fruit pulp of *Euturpe edulis* using the response surface methodology. *Journal of Food Research International*, 44: 708-715.

Castaneda-Ovando, A., Pacheco-Hernandez, Ma. L., Paez-Hernandez, Ma. E., Rodriguez, J. A., and Galan-Vidal, C. A. 2009. Chemical studies of anthocyanin: A review. *Journal of Food Chemistry*, 113: 859-871.

Chandrasekhar, J., Madhusudhan, M.C., and Raghavarao, K.S.M.S. 2012. Extraction of anthocyanins from red cabbage and purification using adsorption. *Journal of Food and Bioproducts Processing*, 90: 615-623.

Chang, L. W., Yen, W. J., Huang, S. C., and Duh, P. D. 2002. Antioxidant activity of sesame coat. *Journal of Food Chemistry*, 78: 347-354.

Chen, M.-H., and Bergman, C. J. 2005. A rapid procedure for analyzing rice bran tocopherol, tocotrienol and γ -oryzanol contents. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18: 319-331.

Chotimarkorn, C., Benjakul, S., and Silalai, N. 2008. Antioxidative effects of rice bran extracts on refined tuna oil during storage. *Journal of Food Research International*, 41: 616-622.

Devi, R., and Arumugan, C. 2007. Phytochemical characterization of defatted rice bran and optimization of a process for their extraction and enrichment. *Journal of Food Chemistry*, 836-842.

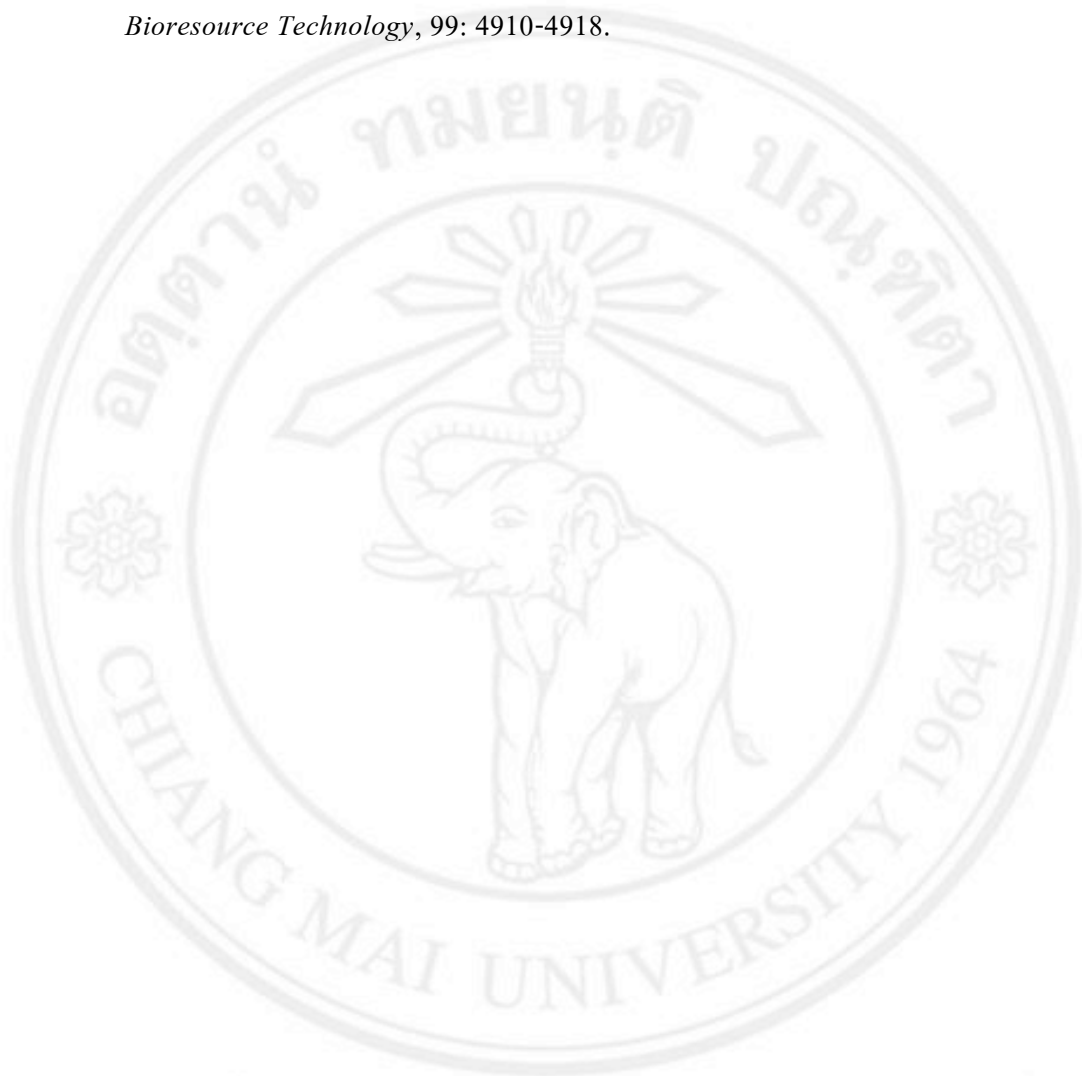
- Escribano-Bailon, M. T., Santos-Buelga, C., and Rivas-Gonzalo, J. C. 2004. Anthocyanins in cereals-A review. *Journal of Chromatography*, 129-141.
- Feng, T., Ye, R., Zhuang, H., Rong, Z., Fang, Z., Wang, Y., Gu, Z., and Jin, Z. 2013. Physicochemical properties and sensory evaluation of *Mesona Blumes* gum/rice starch mixed gels as fat-substitutes in Chinese Cantonese-style sausage. *Journal of Food Research International*, 50: 85-93.
- Fernandez-Lopez, J., Zhi, N., Aleson-Carbonell, L., Perez-Alvarez, J.A., and Kuri, V. 2005. Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs. *Journal of Meat Science*, 69: 371-380.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2556. "Longitudinal section of rice grain". [Online]. Available <http://www.fao.org/docrep/t0567e/T0567E07.htm> (12 March 2013).
- Ghiselli, A., M. Nardini, A. Baldi and C. Scaccini. 1998. Antioxidant activity of different phenolic fraction separated from an Italian red wine. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46(2): 361-367
- Gibbs, J.W. 2013. "Solid-Liquid Extraction". [Online]. Available <http://www.che.boun.edu.tr/Courses/che302/Chapter%208.pdf> (1 May 2013).
- Hargrove, Jr. R.. Processing and utilization of rice bran in the United State. In W.E. Marshall and J. I. Wadsworth. (eds.), *Rice Science and Technology* (pp.384-385), New York : Marcel Dekker, Inc., 1994.
- Health and Consumers Department of European Commission. 2013. "Reports of the scientific committee for food", Eleventh series. [Online]. Available http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/reports/scf_reports_14.pdf (26 June 2013).
- Huang, C. C. J. "Potential functionality and digestibility γ -oryzanol and determined using in vitro cell culture models". M.S. Thesis, Department of Food Science, Louisiana State University, 2003.
- Huang, S.W., Hopia, A., Schwarz, K., Frankel, E. N., and German, J. B. 1996. Antioxidant activity of α -tocopherol and Trolox in different lipid substrates: Bulk oils vs. oil-in-water emulsions. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 44: 444-452.

- Imsanguan, P., Roaysubtawee, A., Borrirak, R., Pongamphai, S., Douglas, S., and Douglas, L. 2008. Extraction of α -tocophrol and γ -oryzanol from rice bran. *Journal of Food Chemistry*, 41: 1417-1424.
- Kong, J. M., Chia, L. S., Goh, N. K., Chia, T. F., and Brouuillard, R. 2003. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Journal of Phytochemistry*, 64: 923-933.
- Lai, P., Youn Li, K., Lu, S., and Chen, H. 2009. Phytochemicals and antioxidant properties of solvent extracts from *Japonica* rice bran. *Journal of Food Chemistry*, 117: 538-544.
- Lee, M. A., Choi, J. H., Choi, Y. S., Kim, H. Y., Kim, H. W., Hwang, K. E., Chung, H. K., and Kim, C. J. 2011. Effects of *kimchi* ethanolic extracts on oxidative stability of refrigerated cooked pork. *Journal of Meat Science*, 89: 405-411.
- Lilitchan, S., Tangprawat, C., and Aryasuk, K. 2008. Partial extraction method for the rapid analysis of total lipids and γ -oryzanol contents in rice bran. *Journal of Food Chemistry*, 106: 752-759.
- Lin, K.W., and Lin, S.N. 2002. Effects of sodium lactate and trisodium phosphate on the physicochemical properties and shelf life of low-fat Chinese-style sausage. *Journal of Meat Science*, 60: 147-154.
- Ling, W. H., L. Wang and J. Ma. 2002. Supplementation of the black rice outer layer fraction to rabbits decreases atherosclerotic plaque formation and increase antioxidant status. *Journal of Nutrition*, 132: 20-26.
- Liu, D.C., Wu, S.W., and Tan, F.J. 2010. Effects of addition of anka rice on the qualities of low-nitrite Chinese sausages. *Journal of Food Chemistry*, 118: 245-250.
- Mao, L.H., Pan, X., Que, F., and Fang, X. H. 2006. Antioxidant properties of water and ethanol extracts from hot air-dried and freeze-dried daylily flowers. *Journal of European Food Research and Technology*, 222: 236-241.
- Matthaus, B., 2002. Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 3444-3452.
- Metivier, R.P., Francis, F.J., and Clydesdale, F.M. 1980. Solvent extraction of anthocyanins from wine pomace. *Journal of Food Science*, 45: 1099-1100.

- Menegas, L. Z., Pimentel, T. C., Garcia, S., and Prudencio, S. H. 2013. Dry-fermented chicken sausage produced with inulin and corn oil: Physicochemical, microbiological, and textural characteristics and acceptability during storage. *Journal of Meat Science*, 93: 501-506.
- Molyneux, P. 2003. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Macrophile Associates, 9 Brewery Lane, Salisbury, Wiltshire, SP1 2LJ, U.K.
- Naczek, M., and Shahidi, F. 2006. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis-Review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41: 1523-1542.
- Nikkhah, E., Khayami, M., Heidari, R., and Jamee, R. 2007. Effect of sugar treatment on stability of anthocyanin pigments in berries. *Journal of Biological Science*, 7(8): 1412-1417.
- Oliveira, R., Oliveira, V., Aracava, K. K., and Rodrigues, C. E. D. C. 2012. Effect of the extraction conditions on the yield and composition of rice bran oil extracted with ethanol-A response surface methodology. *Journal of Food and Bioproducts Processing*, 90: 22-31.
- Patel, M., and Naik, S.N. 2004. "Gamma-oryzanol from rice bran oil-A review". *Journal of Scientific and Industrial Research*, 63: 569-578.
- Patil, G., Madhusudhan, M.C., Ravindra-Babu., B. and Raghavarao., K.S.M.S. 2009. Extraction, dealcoholization and concentration of anthocyanin from red radish. *Journal of Chemical Engineering and Processing*, 48: 364-369.
- Perumalla, A.V.S., Hettiarachchy, N. S. 2011. Green tea and grape seed extracts-Potential applications in food safety and quality. *Journal of Food Research International*, 44: 827-839.
- Pokorny, J., Yanishlieva, N., and Gordon, M. *Antioxidants in Food*. Cambridge, England : Woodhead Publishing Limited, 2001.
- Qi, S., and Zhou, D. 2013. Lotus seed epicarp extract as potential antioxidant and anti-obesity additive in Chinese Cantonese Sausage. *Journal of Meat Science*, 93: 257-262.

- Rodriguez-Rojo, S., Visentin, A., Maestri, D., and Cocero, M. J. 2012. Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents. *Journal of Food Engineering*, 109: 98-103.
- Rydberg, J., Musikas C., Gregory R. 1992. *Principles and solvent extraction*. Marcel Dekker, Inc. The United State of America.
- Schaich., K. M. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*. 6 Vols. Canada : John Wiley and Sons, Inc., 2005.
- Spigno, G., Tramelli, L., and Faveri, D. M. D. 2007. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, 81: 200-208.
- Tananuwong, K., and Tewaruth, W. 2010. Extraction and application of antioxidants from black glutinous rice. *LWT - Food Science and Technology*, 43: 476-481.
- Wang, F. H., Jiang, Y.-N. and Lin, C. H. 1995. Lipid and Cholesterol Oxidation in Chinese-Style Sausage Using Vacuum and Modified Atmosphere Packaging. *Journal of Meat Science*, 40: 93-101.
- Wang, F. H. 2000. Effects of three preservative agents on the shelf life of vacuum packaged chinese-style sausage stored at 20°C. *Journal of Meat Science*, 56: 67-71.
- Wang, H., Nair, M.G., Strasburg, G.M., Chang, Y.C., Booren, A.M., Gray, J.I. and De-Witt, D.L. 1999. Antioxidant and anti-inflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyanidin from tart cherries. *Journal of Natural Products*, 62(5): 802.
- Xu, Z., Hua, N., and Godber, J. S. 2001. Antioxidant activity of tocopherols, tocotrienols, and γ -oryzanol components from rice bran against cholesterol oxidation accelerated by 2,2'-azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride. *Journal of Food Chemistry*, 49 : 2077-2081.
- Yang, A., and Zhai, W. 2010. Identification and antioxidant activity of anthocyanins extracted from the seed and cob of purple corn (*Zea mays L.*). *Journal of Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11: 169-176.
- Zhang, L., Lin, Y.H., Leng, X.J., Huang, M., and G.H. Zhou. 2013. Effect of sage (*Salvia officinalis*) on the oxidative stability of Chinese-style sausage during refrigerated storage. *Journal of Meat Science*, 95: 145-150.

Zignoneanu, I.G., Williams, L., and Sabliov, C.M. 2008. Determination of antioxidant components in rice bran oil extracted by microwave-assisted method. *Journal of Bioresource Technology*, 99: 4910-4918.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

5.1.1 เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากรำข้าวหอมนิลของตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ เมทานอล เอทานอล และเอทิลอะซิเตท พบว่า เมทานอล เป็นตัวทำละลายที่สกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากรำข้าวหอมนิล ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด แกมมา-ออริซานอล แอลฟา-โทโคฟีรอล และแอนโทไซยานิน ได้ปริมาณสูงสุด และสารสกัดดังกล่าวยังสามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) อีกด้วย (EC_{50} ต่ำสุด เท่ากับ 100.39 ± 18.27 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) อย่างไรก็ตาม ด้วยความเป็นพิษของสารละลายดังกล่าว จึงไม่เหมาะสมที่จะใช้สำหรับผลิตภัณฑ์อาหาร แต่ถือว่าเป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมเป็นอย่างยิ่งสำหรับงานวิเคราะห์ ดังนั้น เอทานอล จึงเป็นตัวทำละลายที่ถูกคัดเลือกเพื่อใช้ในการหาสภาวะการสกัดที่เหมาะสม เนื่องจาก สามารถใช้กับผลิตภัณฑ์อาหารได้ และยังสามารถสกัดสารต้านอนุมูลอิสระ และมีค่า EC_{50} ที่ใกล้เคียงกับเมทานอล

5.1.2 สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระ (สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด แกมมา-ออริซานอล แอลฟา-โทโคฟีรอล และแอนโทไซยานิน) จากรำข้าวหอมนิลในปริมาณสูงสุด ด้วยการสกัดขั้นตอนเดียวที่ได้จากการใช้วิธี โครงร่างพื้นผิวดูดซับสอง คือ เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 72.5 อัตราส่วนของตัวทำละลายต่อรำข้าว เท่ากับ 26.67 มิลลิลิตร ต่อ 1 กรัม และระยะเวลาในการสกัด เท่ากับ 120 นาที พบว่า สามารถสกัดสารต้านอนุมูลอิสระทุกตัวในปริมาณที่สูงกว่าค่าที่ได้จากการทำนาย นอกจากนี้ ยังพบว่าปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระทั้งหมดสูงกว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล เอทานอล และเอทิลอะซิเตท ร้อยละ 49.10, 62.54 และ 87.37 ตามลำดับ

5.1.3 การปรับซ้ำของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากรำข้าวหอมนิล ด้วยการเติมกรดอะซิติก ร้อยละ 1, 2 และ 3 พบว่า สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เนื่องจาก สารต้านอนุมูลอิสระที่สกัดได้แปรผันตามปริมาณกรด

อะซิติกที่เติม ส่วนผลของเวลาที่เติมกรดอะซิติก พบว่า ประสิทธิภาพการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระ จะลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเวลาในการเติมกรดอะซิติกเพิ่มจาก 0 เป็น 90 นาที นั่นคือ การเติมกรดอะซิติกร้อยละ 3 ที่เวลา 0 นาที จะสามารถสกัดสารต้านอนุมูลอิสระ ได้ใน สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด แกมมา-อริซานอล แอลฟา-โทโคฟีรอล และแอนโทไซยานิน ได้ใน ปริมาณสูงสุด เท่ากับ $12,380.37 \pm 82.38$, 278.70 ± 10.59 , 11.46 ± 1.20 และ $3,090.38 \pm 34.07$ ไมโครกรัมต่อกรัม ตามลำดับ

5.1.4 สารสกัดจากรำข้าวหอมมะลิมีคุณสมบัติในการต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน เนื่องจาก สามารถทดสอบด้วยวิธี DPPH radical scavenging, metal chelating activity และ inhibition of linoleic acid peroxidation ซึ่งมีค่า EC_{50} เท่ากับ 0.11 ± 0.01 และ 0.25 ± 0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และค่าร้อยละการยับยั้ง เท่ากับ 42.96 ± 2.80 ตามลำดับ นอกจากนี้ สารสกัดดังกล่าวยังแสดง คุณสมบัติในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันในผลิตภัณฑ์กุ้งเชียงใหม่ พบว่า สารสกัดความเข้มข้น 600 พีพีเอ็ม ยับยั้งการเกิดออกซิเดชัน ได้สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ค่า TBARs ต่ำสุด) แต่อย่างไรก็ตาม สารสกัดความเข้มข้น 400 พีพีเอ็ม ก็มีความเหมาะสมเช่นกัน เนื่องจาก สามารถยับยั้งการเกิดออกซิเดชันได้ไม่แตกต่างกับ BHT (พิจารณาจากปริมาณ TBARs) อย่างมี นัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) อีกทั้งยังมีค่าคะแนนความชอบของการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้าน สี ลักษณะปรากฏ กลิ่น และการยอมรับโดยรวมที่สูง และเป็นที่ยอมรับของผู้ทดสอบเช่นเดียวกับ ตัวอย่างที่เติมสารสกัด 600 พีพีเอ็ม

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรมีการศึกษาถึงปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลต่อการสกัด เช่น อัตราการกวน อุณหภูมิ หรือตัวทำ ละลายชนิดอื่นๆ เพิ่มเติม

5.2.2 ควรมีการตรวจวัดคุณสมบัติอื่นๆ ของวิตามินอีเพิ่มเติม นอกเหนือจากแอลฟา-โทโคฟีรอล เพื่อที่จะทราบความหลากหลายของสารต้านอนุมูลอิสระในรำข้าวมากขึ้น

5.2.3 เพื่อยืนยันแนวโน้ม และความถูกต้องแม่นยำของข้อมูลที่ได้จากการศึกษา ควรมีการวัด ติดตามค่าทางเคมีอื่นๆ ที่แสดงถึงการเสื่อมเสียของไขมันในผลิตภัณฑ์ เช่น ค่าเปอร์ออกไซด์ (peroxide value, PV) หรือ ค่าความเป็นกรด (acid value, AV)

5.2.4 ข้อมูลที่ได้จากการวัดค่าสี (L^* , a^* , b^*) ของผลิตภัณฑ์กุ้งเชียงใหม่ ก่อนข้างมีค่าความ คลาดเคลื่อนสูง เนื่องจาก ผลิตภัณฑ์กุ้งเชียง มีสีที่ไม่สม่ำเสมอ เพราะยังมีชิ้นของไขมัน และเนื้อ หนูแทรกตัวกระจายกระจายทั่วทั้งชิ้น ดังนั้น ควรเลือกผลิตภัณฑ์ทดสอบที่มีเนื้อสัมผัส และมีสีที่

สม่ำเสมอมากขึ้น หรือส่วนผสมของผลิตภัณฑ์นั้นๆ ได้ผ่านขั้นตอนการปั่นผสมที่ละเอียด ให้เป็นเนื้อเดียวกัน เช่น ไข่กรอก หรือ มายองเนส เป็นต้น

5.2.5 ควรมีการตรวจวัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่คงเหลือ หลังจากกระบวนการผลิต หรือ การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ทดสอบ



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทที่ 4

ผลการทดลอง และวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ศึกษาผลของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด

ผลของตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ เมทานอล เอทานอล และเอทิลอะซิเตท ที่มีต่อประสิทธิภาพการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระ และค่าการกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดจากรำข้าวหอมนิล มีดังนี้

4.1.1 ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด แกมมา-ออริซานอล แอลฟา-โทโคฟีรอล แอนโทไซยานิน และร้อยละผลผลิตของสารสกัดที่ได้จากการสกัดรำข้าวหอมนิลด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ เมทานอล เอทานอล และเอทิลอะซิเตท แสดงดังตาราง 4.1

ตาราง 4.1 ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ และร้อยละผลผลิตที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด

สารต้านอนุมูลอิสระ (ไมโครกรัมต่อกรัม)	ตัวทำละลายที่ใช้สกัด		
	เมทานอล	เอทานอล	เอทิลอะซิเตท
สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด	3,410.95 ^a ±64.44	2,196.63 ^b ±30.88	378.38 ^c ±15.25
แกมมา-ออริซานอล	2,153.75 ^a ±13.38	1,748.07 ^b ±14.70	1,001.04 ^c ±5.29
แอลฟา-โทโคฟีรอล	60.28 ^a ±2.08	44.60 ^b ±1.27	38.30 ^c ±4.15
แอนโทไซยานิน	220.29 ^b ±7.27	312.34 ^a ±12.72	32.89 ^c ±1.12
ร้อยละผลผลิตที่ได้ (%)	12.9 ^c ±0.03	14.7 ^b ±0.03	18.9 ^a ±0.06

ตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละแถว แสดงถึงค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

จากตาราง 4.1 พบว่า เมทานอล เป็นตัวทำละลายที่สามารถสกัดสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดได้ในปริมาณสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เท่ากับ 3,410.95±64.44 ไมโครกรัมต่อกรัม รองลงมา คือ เอทานอล (2,196.63±30.88 ไมโครกรัมต่อกรัม) และเอทิลอะซิเตท (378.38±15.25 ไมโครกรัมต่อกรัม) เนื่องจาก ความสามารถในการละลายของสารประกอบ-

ฟีนอลิกทั้งหมดขึ้นอยู่กับสภาพข้าวของตัวทำละลายที่ใช้สกัด นั่นคือ ภายในโครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกส่วนใหญ่ประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group, -OH) จำนวนมาก จึงแสดงความเป็นขั้วที่สูง (Nacz and Shahidi., 2006) ส่งผลให้ความสามารถในการละลายในตัวทำละลายที่มีขั้วสูงทั้งเมทานอล และเอทานอลเกิดได้ดีกว่าเอทิลอะซิเตท (ตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำกว่า) ประมาณ 5 ถึง 9 เท่า สอดคล้องกับการทดลองของ Arab *et al.* (2011) ซึ่งรายงานไว้ว่า ตัวทำละลายที่มีขั้วสูง เช่น เมทานอล และเอทานอล สามารถสกัดสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากรำข้าวอิหร่าน (Iranian rice) พันธุ์ Fajr และ Tarem ได้สูงกว่าตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำ (เอทิลอะซิเตท) ประมาณ 2 ถึง 5 เท่า

ในขณะเดียวกัน พบว่า สารแกมมา-ออริซานอล และแอลฟา-โทโคฟีรอลที่สกัดโดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย มีปริมาณสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เท่ากับ $2,153.75 \pm 13.38$ และ 60.28 ± 2.08 ไมโครกรัมต่อกรัม ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจากเอทานอล มีปริมาณสารแกมมา-ออริซานอล และแอลฟา-โทโคฟีรอล เท่ากับ $1,748.07 \pm 14.70$ และ $1,001.04 \pm 5.29$ ไมโครกรัมต่อกรัม นอกจากนี้ เมื่อใช้เอทิลอะซิเตทเป็นตัวทำละลาย จะสามารถสกัดสารแกมมา-ออริซานอล และแอลฟา-โทโคฟีรอล ได้เท่ากับ 44.60 ± 1.27 และ 38.30 ± 4.15 ไมโครกรัมต่อกรัม ตามลำดับ นั่นคือ ความสามารถในการสกัดสารกลุ่มนี้จะเพิ่มขึ้น เมื่อความเป็นขั้วของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดเพิ่มสูงขึ้น ทั้งนี้ เนื่องมาจากโครงสร้างของสารกลุ่มดังกล่าวมีคุณสมบัติแอมฟิพาติก (amphipatic property) คือ มีทั้งส่วนที่เป็นมีขั้ว (hydrophilic) และไม่มีขั้ว (hydrophobic) ซึ่งประกอบด้วย หมู่เมทิล (methyl group, $-\text{CH}_3$) บนวงแหวนโครแมน (chroman ring) และหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group, $-\text{OH}$) บนวงแหวนอะโรมาติก (aromatic ring) ในโครงสร้างพื้นฐานของแอลฟา-โทโคฟีรอล และหมู่คาร์บอกซิลิก (carboxylic group, $-\text{COOH}$) บนส่วนเฟอร์ูลเลท (ferulated moiety) หมู่เมทิลบนส่วนไฮโดรไพราโน (hydropyrano moiety) และหมู่สเตอรอล ในโมเลกุลของออริซานอล (Lai *et al.*, 2009 และ Lilitchan *et al.*, 2008) เป็นผลทำให้สารแกมมา-ออริซานอล และแอลฟา-โทโคฟีรอลถูกสกัดในตัวทำละลายแอลกอฮอล์ได้ดีกว่าเอทิลอะซิเตท ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Chen and Bergman (2005) และ Zigoneanu *et al.* (2008) ที่พบว่า ตัวทำละลายที่มีขั้วสูง ได้แก่ เมทานอล และไอโซโพรพานอล มีประสิทธิภาพในการสกัดสารกลุ่มโทโคฟีรอล และออริซานอลสูงกว่าเฮกเซน ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำ และใกล้เคียงกับเอทิลอะซิเตท

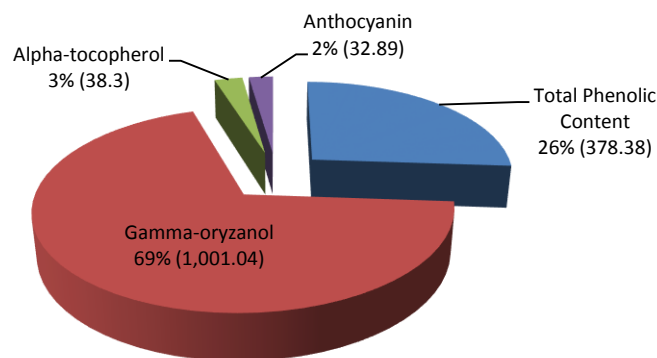
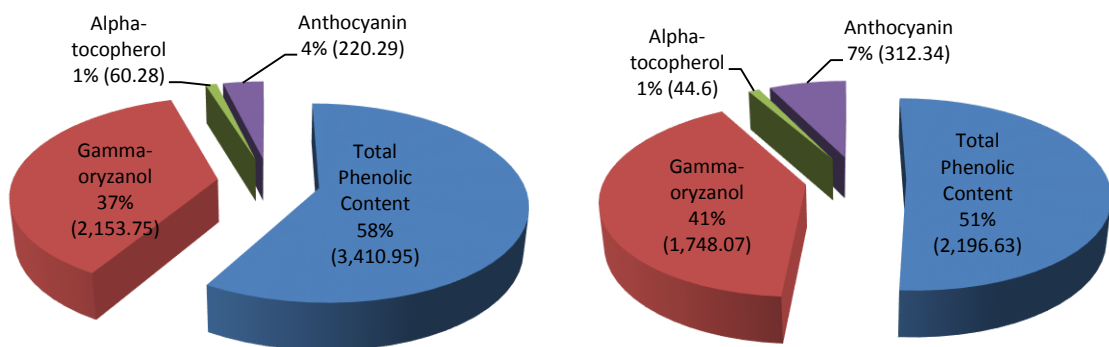
ในขณะที่ แอนโทไซยานิน จะสกัดได้ในปริมาณสูงสุดเมื่อใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย (312.34 ± 12.72 ไมโครกรัมต่อกรัม) ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อทำการเปรียบเทียบกับสารสกัดโดยใช้เมทานอล (220.29 ± 7.27 ไมโครกรัมต่อกรัม) และเอทิล-

อะซิเตท (32.89 ± 1.12 ไมโครกรัมต่อกรัม) ตามลำดับ นั่นคือ ขั้วของตัวทำละลายมีผลต่อการสกัดแอนโทไซยานิน เนื่องจาก ตัวทำละลายที่มีขั้วสูงกว่าสามารถสกัดแอนโทไซยานินซึ่งเป็นโมเลกุลมีขั้วสูงออกมาได้ดีกว่าตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำกว่า อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าเอทานอล มีประสิทธิภาพในการสกัดแอนโทไซยานินมากกว่าเมทานอลซึ่งมีขั้วสูงกว่า อาจเป็นไปได้ว่าเมทานอลสกัดเอสารอื่นๆ เช่น น้ำตาล เป็นต้น ออกมาได้ดีกว่าเอทานอล ซึ่งส่งผลทำให้ความคงตัวของแอนโทไซยานินลดลง (Nikkhah *et al.*, 2007) จึงทำให้ตรวจวัดปริมาณแอนโทไซยานินในสารสกัดจากเมทานอลได้น้อยกว่าเอทานอล นั่นเอง นอกจากนี้ ยังมีปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลต่อการสกัด เช่น ความสามารถในการแพร่ (diffusivity) ของตัวทำละลาย ชนิด และโครงสร้างของวัตถุดิบที่นำมาสกัด รวมถึงอัตราการถ่ายเทมวลสารในระหว่างการสกัด เป็นต้น (Thananu Wong *et al.*, 2010) และผลการศึกษาที่ยังสอดคล้องกับการทดลองของ Borges *et al.* (2011) ที่พบว่า เอทานอลมีประสิทธิภาพในการสกัดแอนโทไซยานินจากเปลือกผลไม้สายพันธุ์ *Enterpe edulis* ที่สูงกว่าเมทานอล อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งเอทานอล และเมทานอลสามารถสกัดแอนโทไซยานินได้ เท่ากับ 21.60 ± 1.35 และ 17.74 ± 1.56 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ตามลำดับ

สำหรับร้อยละผลผลิตที่สกัดได้ พบว่า เมื่อใช้เอทิลอะซิเตทเป็นตัวทำละลายจะมีปริมาณร้อยละผลผลิตที่สกัดได้สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) คือ ร้อยละ 18.9 ± 0.06 แต่เมื่อใช้ตัวทำละลายเป็นเอทานอล และเมทานอล ปริมาณร้อยละผลผลิตจะมีค่าลดลงเหลือร้อยละ 14.7 ± 0.03 และ 12.9 ± 0.03 ตามลำดับ ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวอาจเป็นผลจากการที่เอทิลอะซิเตทเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำได้สกัดเอสารที่มีขั้วต่ำประเภทไขมัน และน้ำมันที่มีอยู่ในรำข้าวออกมาด้วย จึงทำให้ปริมาณร้อยละผลผลิตมีค่าสูง

จากผลการศึกษาข้างต้น พบว่า ปัจจัยหลักที่ส่งผลโดยตรงต่อความสามารถในการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระ คือ สภาพขั้วของตัวทำละลาย เนื่องจาก ตัวทำละลายแต่ละชนิดมีสภาพขั้วที่แตกต่างกัน ทำให้มีความจำเพาะเจาะจงต่อสารต้านอนุมูลอิสระแต่ละชนิดแตกต่างกันไปด้วย ดังนั้น การสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากรำข้าว ซึ่งประกอบด้วยสารที่มีความเป็นขั้วต่ำ (แกมมา-ออริซานอล และแอลฟา-โทโคฟีรอล) และสารที่มีความเป็นขั้วสูง (สารประกอบฟีนอลิก และแอนโทไซยานิน) ด้วยตัวทำละลายที่สภาพขั้วต่างกัน จึงมีผลทำให้สัดส่วนของสารแต่ละชนิดที่สกัดได้ มีค่าแตกต่างกันด้วย (รูป 4.1) การสกัดโดยใช้เมทานอล ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วสูง พบว่าสามารถสกัดสารที่มีขั้วสูงกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสัดส่วนสูงสุด เท่ากับ ร้อยละ 58 รองลงมา คือ แกมมา-ออริซานอล (ร้อยละ 37) แอนโทไซยานิน (ร้อยละ 4) และแอลฟา-โทโคฟีรอล (ร้อยละ 1) ตามลำดับ ในขณะที่เอทานอล สามารถสกัดสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสัดส่วนที่สูงสุดเช่นกัน เท่ากับ ร้อยละ 51 รองลงมา คือ แกมมา-ออริซานอล (ร้อยละ

41) แอนโทไซยานิน (ร้อยละ 7) และแอลฟา-โทโคฟีรอล (ร้อยละ 1) ส่วนเอทิลอะซิเตท ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำ พบว่า สามารถสกัดสารต้านอนุมูลอิสระกลุ่มที่มีขั้วต่ำ ได้แก่ แกมมา-ออริซานอล และแอลฟา-โทโคฟีรอล ในสัดส่วนที่สูงขึ้น คือ ร้อยละ 69 และ 3 ตามลำดับ ส่วนสารต้านอนุมูลอิสระกลุ่มที่มีขั้วสูง ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และแอนโทไซยานิน จะมีสัดส่วนที่ลดลงเมื่อเทียบกับเมทานอล และเอทานอล คือ ร้อยละ 26 และ 2 ตามลำดับ



ค. สารสกัดจากเอทิลอะซิเตท

รูป 4.1 สัดส่วนของสารต้านอนุมูลอิสระแต่ละชนิดที่ได้จากการสกัดด้วย (ก) เมทานอล (ข) เอทานอล และ (ค) เอทิลอะซิเตท

4.1.2 ค่าการกำจัดอนุมูลอิสระ

ค่าการกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดแต่ละชนิด พิจารณาจาก ค่า EC_{50} คือ ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถกำจัดอนุมูล DPPH ได้ร้อยละ 50 ดังนั้น ค่า EC_{50} ที่ต่ำ จะแสดงถึงประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระที่สูง

จากตาราง 4.2 พบว่า สารสกัดที่ได้จากการใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายมีประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระได้สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เนื่องจากมีค่า EC_{50} ที่ต่ำที่สุดเท่ากับ 100.39 ± 18.27 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ สารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอล และเอทิลอะซิเตท มีค่า EC_{50} เท่ากับ 303.04 ± 22.62 และ $2,207.24 \pm 58.04$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Arab *et al.* (2011) ที่พบว่า สารสกัดจากรำข้าวที่ใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย มีประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระ และยับยั้งการเกิดเปอร์ออกซิเดชันของกรดไขมันสูงกว่าการใช้เอทานอล และเอทิลอะซิเตท ตามลำดับ ทั้งนี้ประสิทธิภาพดังกล่าวของสารสกัดจะขึ้นอยู่กับปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในสารสกัด

เมื่อเปรียบเทียบค่าการกำจัดอนุมูล DPPH ของสารสกัดทั้ง 3 ชนิด กับสารแอนติออกซิแดนท์สังเคราะห์ คือ BHT พบว่า สารสกัดจากเมทานอลมีประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูล DPPH ใกล้เคียงกับ BHT ที่สุด (น้อยกว่าประมาณ 1 เท่า) ส่วนสารสกัดจากเอทานอล และเอทิลอะซิเตท มีประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูล DPPH น้อยกว่า BHT ประมาณ 5 และ 43 เท่า ตามลำดับ

ตาราง 4.2 ค่า EC_{50} ของสารสกัดจากตัวทำละลาย 3 ชนิด เปรียบเทียบกับ BHT

	สารสกัดจากทำละลาย 3 ชนิด			
	เมทานอล	เอทานอล	เอทิลอะซิเตท	BHT
EC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	$100.39^b \pm 18.27$	$303.04^c \pm 22.62$	$2,207.24^d \pm 58.04$	$49.55^a \pm 2.40$

ตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละคอลัมน์ แสดงถึงค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ และค่าการกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดจากตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด พบว่า เมทานอล เป็นตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดสำหรับงานด้านการวิเคราะห์ เนื่องจากสามารถสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากรำข้าวได้ในปริมาณสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ และสารสกัดดังกล่าว ยังมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระได้ใกล้เคียงกับ BHT ซึ่งเป็นต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์

อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาในด้านความเป็นพิษ และความปลอดภัยเมื่อใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารแล้ว พบว่า เอทานอล เป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมกว่าเมทานอล เนื่องจากเป็นตัวทำละลาย

ได้รับอนุญาตให้ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร มีความเป็นพิษต่ำ (Reports of the scientific committee for food; eleventh series, 2013) และยังมีประสิทธิภาพในการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระได้ใกล้เคียงกับเมทานอลอีกด้วย ดังนั้น เอทานอล จึงเป็นตัวทำละลายที่ถูกคัดเลือกไปใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากรำข้าวหอมนิลต่อไป

4.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากรำข้าวหอมนิล

สภาวะที่เหมาะสมสำหรับสกัดสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด แกมมา-ออร์ซานอล แอลฟา-โทโคฟีรอล แอนโทไซยานิน และร้อยละผลผลิตที่ได้ ในปริมาณสูงสุด ด้วยการสกัดแบบขั้นตอนเดียว ได้จากการศึกษา 3 ปัจจัย ได้แก่ ความเข้มข้นของตัวทำละลาย อัตราส่วนของตัวทำละลายต่อรำข้าว และเวลาในการสกัด ร่วมกับการใช้วิธีโครงร่างพื้นผิวตอบสนอง ให้ผลดังนี้

4.2.1 ผลของปัจจัย และสภาวะการสกัดต่อปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ

จากการศึกษาผลของความเข้มข้นของตัวทำละลาย คือ เอทานอล (X_1) อัตราส่วนของตัวทำละลายต่อรำข้าว (X_2) และระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด (X_3) แสดงดังตาราง 4.3 พบว่า สามารถสกัดสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด แกมมา-ออร์ซานอล แอลฟา-โทโคฟีรอล แอนโทไซยานิน และร้อยละผลผลิตที่ได้ อยู่ในช่วง $2,233.97 \pm 74.47$ ถึง $10,176.99 \pm 67.16$ ไมโครกรัมต่อกรัม, ไม่สามารถตรวจวัดได้ ถึง $1,401.7 \pm 12.28$ ไมโครกรัมต่อกรัม, 12.20 ± 0.74 ถึง $43,781.58 \pm 458.17$ ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม, 229.60 ± 49.16 ถึง $2,109.86 \pm 94.01$ ไมโครกรัมต่อกรัม และร้อยละ 3.3 ถึง 39.0 ตามลำดับ

ตาราง 4.3 ผลของความเข้มข้นของตัวทำละลาย อัตราส่วนของตัวทำละลายต่อรำข้าว และเวลาในการสกัดต่อปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่สกัดได้จากรำข้าวหอมนิล

สิ่ง ทดลอง	ปัจจัยที่ศึกษา			ค่าตอบสนอง				
	X_1^a	X_2^a	X_3^a	สารประกอบ ฟีนอลิกทั้งหมด	แกมมา- ออริซานอล	แอลฟา- โทโคฟีรอล	แอนโท ไซยานิน	ร้อยละ ผลผลิต
	(%)	(มล.)	(นาที)	($\mu\text{g GAE/g}$) ^c	($\mu\text{g/g}$) ^c	($\mu\text{g/kg}$) ^c	($\mu\text{g/g}$) ^c	(%) ^c
1	55.0	20	90.0	9,630.91±22.75	13.20±0.09	508.92±4.35	1,571.22±37.37	15.3
2	80.0	30	120.0	8,697.60±82.92	121.06±0.50	3,375.98±112.04	1,857.29±110.83	16.6
3	55.0	20	90.0	9,635.87±53.70	13.31±0.47	515.18±8.86	1,522.20±14.22	15.5
4	97.0	20	90.0	2,233.97±74.47	1,401.7±12.28	43,781.58±458.17	229.60±49.16	16.0
5	55.0	20	39.5	9,849.34±34.39	1.41±0.04	237.40±1.99	1,594.80±54.25	8.4
6	55.0	20	90.0	9,695.44±14.89	13.43±0.72	500.41±5.64	1,564.40±65.59	15.3
7	80.0	30	60.0	8,921.00±89.36	84.82±0.83	1,369.74±33.18	1,715.81±83.43	16.5
8	55.0	20	90.0	9,675.59±22.75	13.38±0.74	502.58±4.36	1,592.94±19.11	15.1
9	30.0	10	120.0	9,253.61±8.60	ND ^b	24.81±0.71	1,098.37±87.66	19.3
10	30.0	10	60.0	7,580.62±89.36	ND ^b	12.73±0.80	1,059.27±47.50	13.0
11	55.0	20	90.0	9,675.59±22.75	13.36±0.49	507.25±3.47	1,558.81±49.58	15.1
12	30.0	30	60.0	9,918.84±64.92	ND ^b	12.20±0.74	1,576.81±54.85	39.0
13	80.0	10	120.0	8,161.45±59.57	79.60±1.04	8,327.36±183.30	1,249.16±35.52	10.9
14	55.0	36.8	90.0	10,117.42±37.48	36.66±0.67	835.22±18.46	2,004.98±91.83	16.6
15	13.0	20	90.0	9,491.90±37.00	ND ^b	24.68±1.61	1,632.04±3.88	20.1
16	55.0	3.18	90.0	5,867.90±74.47	ND ^b	69.33±3.36	753.65±13.04	6.2
17	55.0	20	90.0	9,680.55±39.40	13.41±0.73	505.46±5.87	1,580.53±17.95	15.1
18	30.0	30	120.0	10,176.99±67.16	ND ^b	55.61±3.37	1,684.78±53.02	26.3
19	55.0	20	140.5	9,804.66±70.38	19.40±0.41	488.91±17.14	2,109.86±94.01	15.8
20	80.0	10	60.0	7,828.84±31.00	54.21±0.62	3273.71±81.45	1,404.29±68.81	3.3

a ; X_1 = ความเข้มข้นของเอทานอล, X_2 = อัตราส่วนของตัวทำละลายต่อรำข้าว, X_3 = เวลาการสกัด

b ; ND = ไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ และ c ; คำนวณเทียบกับน้ำหนักรำข้าวในรูปฐานแห้ง

จากผลการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้ด้วยโปรแกรม Design Expert version 6.0 โดยประมวลผลด้วยวิธีโครงร่างพื้นผิวตอบสนองเพื่อหาแบบจำลองทางคณิตศาสตร์สำหรับการทำนายปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่สกัดได้ ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด แกมมา-ออริซานอล แอลฟา-โทโคฟีรอล และแอนโทไซยานิน ทำให้ได้แบบจำลองสำหรับแต่ละค่าตอบสนอง (สมการ 4.1-4.5) และอิทธิพลของแต่ละปัจจัยที่มีผลต่อค่าตอบสนองทั้ง 5 ค่า (ตาราง 4.4)

อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาค่า lack of fit ของแต่ละแบบจำลอง พบว่า ทุกแบบจำลองมีค่า lack of fit ที่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งผลดังกล่าวอาจเกิดจากมีปัจจัยอื่นๆ นอกเหนือจากปัจจัยที่ศึกษามีอิทธิพลต่อการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระในรำข้าว แต่เมื่อพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) พบว่า แต่ละแบบจำลองมีค่า R^2 ที่เพียงพอต่อการทำนายค่าตอบสนองที่สนใจศึกษา ซึ่งค่า R^2 ดังกล่าว มีค่าอยู่ในช่วง 0.613 ถึง 0.790

ตาราง 4.4 ผลรวมของปัจจัยในการสกัดที่มีผลต่อปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ และร้อยละผลผลิต

ปัจจัย	ค่าตอบสนอง				
	สารประกอบฟีนอลิก	แกมมา-ออริซานอล	แอลฟา-โทโคฟีรอล	แอนโทไซยานิน	ร้อยละผลผลิต
Linear					
X_1	-	+	+	-	-
X_2	+	n.s.	n.s.	+	+
X_3	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Quadratic					
X_1^2	-	+	+	-	n.s.
X_2^2	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
X_3^2	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Interaction					
X_1X_2	-	n.s.	n.s.	-	-
X_1X_3	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
X_2X_3	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

(+) : positive effect, (-) : negative effect, n.s. : effect not significant

ผลของปัจจัยการสกัดที่มีต่อปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ และร้อยละผลผลิตที่ได้ อธิบายได้ดังนี้

ผลของปัจจัยการสกัดต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic content) วิเคราะห์โดยใช้สารละลาย Folin-Ciocalteu และคำนวณเป็นสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในรูปฐานสมมูลของกรดแกลลิก (gallic acid equivalents) ผลแสดงในตาราง 4.3 พบว่า การสกัดโดยใช้เอทานอลเข้มข้นร้อยละ 13.00 ถึง 97.00 อัตราส่วนของตัวทำละลายต่อรำข้าว 3.18 ถึง 36.82 และระยะเวลาในการสกัดตั้งแต่

39.55 ถึง 140.45 นาที จะทำให้ได้สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดอยู่ในช่วง $2,233.97 \pm 74.47$ ถึง $10,176.99 \pm 67.16$ ไมโครกรัมต่อกรัม (ฐานแห้ง)

จากการใช้โปรแกรม Design Expert Version 6.0 สามารถแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอิทธิพลของตัวแปรอิสระที่ศึกษา (dependent variable) ด้วยแบบจำลองชนิดสมการกำลังสอง (quadratic model) ดังสมการ

$$Y = 9.64 - 1.14(X_1) + 0.89(X_2) - 1.13(X_1^2) - 0.38(X_2^2) - 0.20(X_1X_2) \quad (4.1)$$

เมื่อ $R^2 = 0.775$ และ Y คือ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด, X_1 คือ ความเข้มข้นของเอทานอล และ X_2 คือ อัตราส่วนของตัวทำละลายต่อรำข้าว

จากแบบจำลองข้างต้น ค่า R^2 มีค่าเท่ากับ 0.775 แสดงว่าแบบจำลองนี้สามารถใช้อธิบายอิทธิพลของปัจจัยที่ศึกษาต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่สกัดได้ดี นั่นคือ ถ้าความเข้มข้นของเอทานอลในตัวทำละลายที่ใช้สกัดเพิ่มขึ้น จะสามารถสกัดสารประกอบฟีนอลิกได้ลดลง ในขณะที่ การเพิ่มอัตราส่วนของตัวทำละลายต่อรำข้าวให้สูงขึ้น จะสามารถสกัดสารประกอบฟีนอลิกได้ในปริมาณที่สูงขึ้นเช่นกัน ส่วนผลของความเข้มข้นของเอทานอลกำลังสอง อัตราส่วนของตัวทำละลายต่อรำข้าวกำลังสอง และอิทธิพลร่วมระหว่างความเข้มข้นของเอทานอลและอัตราส่วนของตัวทำละลายต่อรำข้าว จะมีผลทำให้ปริมาณผลผลิตลดลง แต่มีผลค่อนข้างน้อย เมื่อเทียบกับความเข้มข้นของเอทานอล

การลดความเข้มข้นของเอทานอลในตัวทำละลายลง จะมีผลทำให้ความเป็นขี้ของตัวทำละลายดังกล่าวเพิ่มสูงขึ้น ส่งผลให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่สกัดได้มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นด้วย (รูป 4.2) เนื่องจาก โครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group, -OH) จำนวนมาก จึงแสดงความเป็นขี้ที่สูง (Tananuwong *et al.*, 2010) ทำให้สามารถละลายได้ดีในสารละลายที่มีขี้สูงกว่า และ Rodriguez-Rojo *et al.* (2012) ได้ศึกษาการสกัดสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากใบโรสแมรี่ โดยใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิด ได้แก่ น้ำ และเอทานอล พบว่า น้ำมีประสิทธิภาพในการสกัดสูงกว่าเอทานอลถึง 1.2 เท่า เช่นเดียวกับการศึกษาของ Spigno *et al.* (2007) ที่ศึกษาการสกัดสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากกากองุ่นโดยใช้เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 40 ถึง 90 (ในน้ำ) เป็นตัวทำละลาย พบว่า เมื่อลดความเข้มข้นของเอทานอลจากร้อยละ 90 เป็นร้อยละ 50 จะส่งผลให้ความสามารถในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเพิ่มขึ้นร้อยละ 57.65 แต่อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่า เมื่อลดความเข้มข้นของเอทานอลลงให้ต่ำกว่าร้อยละ 40 จะทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่สกัดได้มีปริมาณลดลงเช่นกัน

ในขณะเดียวกัน การเพิ่มอัตราส่วนของตัวทำละลายต่อรำข้าวจะส่งผลให้สามารถสกัดสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเพิ่มขึ้น เนื่องจากอัตราส่วนที่เพิ่มขึ้นนี้จะมีผลทำให้อัตราการถ่ายเทมวลของสารเพิ่มสูงขึ้น (Spigno *et al.*, 2007) Devi and Arumughan (2007) ได้ศึกษาการสกัดสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากรำข้าว โดยใช้อัตราส่วนของตัวทำละลายต่อน้ำหนักรำข้าว 4 ระดับ ได้แก่ 7.5:1, 10:1, 15:1 และ 30:1 พบว่า อัตราส่วนที่เหมาะสมต่อการสกัดสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด คือ 30:1 เช่นเดียวกับผลการศึกษาในครั้งนี้ ที่พบว่า การใช้อัตราส่วนของตัวทำละลายต่อรำข้าวเท่ากับ 30:1 จะสามารถสกัดสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดได้ในปริมาณสูงสุด

DESIGN-EXPERT Plot

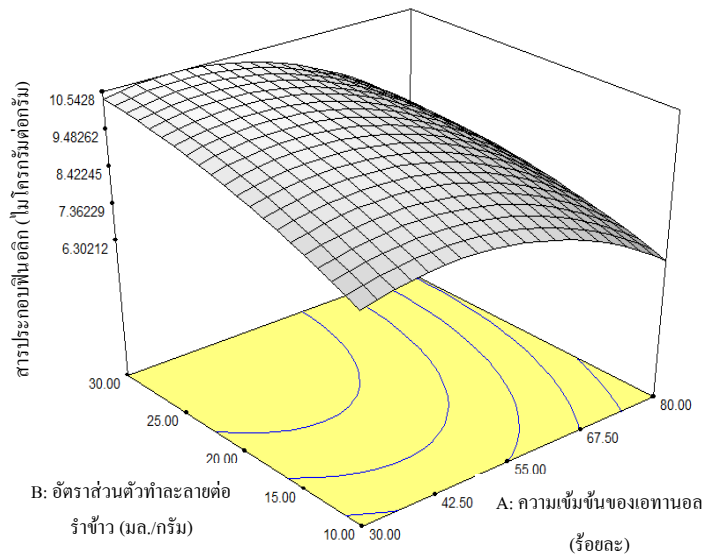
Total phenolic content

X = A: %Etanol

Y = B: Solvent/sample

Actual Factor

C: Extraction time = 90.00



รูป 4.2 พื้นผิวตอบสนองค่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่สกัดได้ โดยกำหนดให้เวลาในการสกัดคงที่ ณ 90 นาที

ผลของปัจจัยการสกัดต่อปริมาณสารแกมมา-ออริซานอล

ปริมาณสารแกมมา-ออริซานอลทำการวิเคราะห์โดยใช้ HPLC ผลแสดงในตาราง 4.3 พบว่า การสกัดโดยใช้ตัวทำละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 12.96 ถึง 97.04 (ในน้ำ) อัตราส่วนของตัวทำละลายต่อรำข้าว 3.18 ถึง 36.82 และระยะเวลาในการสกัดตั้งแต่ 39.55 ถึง 140.45 นาที จะทำให้ได้สารแกมมา-ออริซานอล อยู่ในช่วง ไม่สามารถตรวจวัดได้ ถึง $1,401.7 \pm 12.28$ ไมโครกรัมต่อกรัม (ฐานแห้ง)

จากการใช้โปรแกรม Design Expert Version 6.0 สามารถแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอิทธิพลของตัวแปรอิสระที่ศึกษา (dependent variable) ด้วยแบบจำลองชนิดสมการกำลังสอง (quadratic model) ดังสมการ

$$Y = 21.04 + 183.65(X_1) + 192.78(X_1^2) \quad (4.2)$$

เมื่อ $R^2 = 0.613$ และ Y คือ ปริมาณสารแกมมา-ออริซานอลที่สกัดได้ และ X_1 คือ ความเข้มข้นของเอทานอล

จากแบบจำลองข้างต้น ค่า R^2 มีค่าเท่ากับ 0.613 แสดงว่าแบบจำลองนี้สามารถใช้อธิบายอิทธิพลของปัจจัยที่ศึกษาต่อปริมาณสารแกมมา-ออริซานอลที่สกัดได้ในระดับพอใช้ นั่นคือ ถ้าความเข้มข้นของเอทานอลในตัวทำละลายที่ใช้สกัดเพิ่มสูงขึ้น จะมีผลทำให้สารแกมมา-ออริซานอลถูกสกัดออกมาได้มากขึ้น นอกจากนี้ ความเข้มข้นของเอทานอลกำลังสองนั้น มีอิทธิพลทำให้ปริมาณสารแกมมา-ออริซานอลเพิ่มสูงขึ้นเช่นกัน

การเพิ่มความเข้มข้นของเอทานอล เป็นการลดความเป็นขี้ของตัวทำละลายลง จึงทำให้สารแกมมา-ออริซานอลถูกสกัดออกมาในปริมาณเพิ่มสูงขึ้น (รูป 4.3) เนื่องจาก โครงสร้างของสารดังกล่าว (รูป 2.6) ประกอบด้วยกลุ่มของไตรเทอร์ปีนแอลกอฮอล์ (triterpene alcohol) หรือ สเตอรอล (sterols) และกรดฟูร์รูริก (fururic acid) (Imsanguan *et al.*, 2008) ทำให้สามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ หรือเอทานอลสูงกว่า สอดคล้องกับการศึกษาของ Devi and Arumughan (2007) ที่รายงานว่า เอทานอล สามารถสกัดสารกลุ่มออริซานอลจากรำข้าวได้สูงถึง 236 พีพีเอ็ม ในขณะที่ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท และเฮกเซนสกัดได้เพียง 59 และ 31 พีพีเอ็ม ตามลำดับ นอกจากนี้ Chen and Bergman (2005) ยังพบว่า ตัวทำละลายแอลกอฮอล์ เช่น เมทานอล และไอโซโพรพานอล มีประสิทธิภาพในการสกัดสารแกมมา-ออริซานอลจากรำข้าวพันธุ์ Cypress สูงกว่าเฮกเซนถึง 1.15 และ 1.09 เท่า ตามลำดับ

อิทธิพลของระยะเวลาในการสกัด และอัตราส่วนของตัวทำละลายต่อรำข้าว มีผลค่อนข้างน้อยต่อปริมาณสารแกมมา-ออริซานอลที่สกัดได้ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Lilitchan *et al.* (2008) ที่ได้ทำการสกัดสารแกมมา-ออริซานอลจากรำข้าวโดยใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลายพบว่า เมื่อเพิ่มอัตราส่วนระหว่างเฮกเซนต่อตัวอย่างรำข้าว จาก 2:1 เป็น 5:1 และ 10:1 (v/w) ความสามารถในการสกัดจะเพิ่มขึ้นจาก 72.5 เป็น 93.0 และ 96.0% ตามลำดับ แต่เมื่อเพิ่มอัตราส่วนดังกล่าวให้สูงกว่า 10:1 (15:1 ถึง 60:1) พบว่า ความสามารถในการสกัดเริ่มคงที่ในช่วงร้อยละ 97 ถึง 99 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองในครั้งนี้ที่พบว่า อัตราส่วนของตัวทำละลายต่อตัวอย่างรำข้าว

ในช่วง 10:1, 20:1 และ 30:1 ไม่มีผลต่อการสกัดอย่างนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) นอกจากนี้ อิทธิพลของปัจจัยรวมทั้งสามปัจจัยนั้น ไม่มีผลต่อการสกัด จึงทำการตัดตัวแปรในแบบจำลองออก เนื่องจากมีผลทำให้ค่า R^2 ของแบบจำลองข้างต้นสูงขึ้น

DESIGN-EXPERT Plot

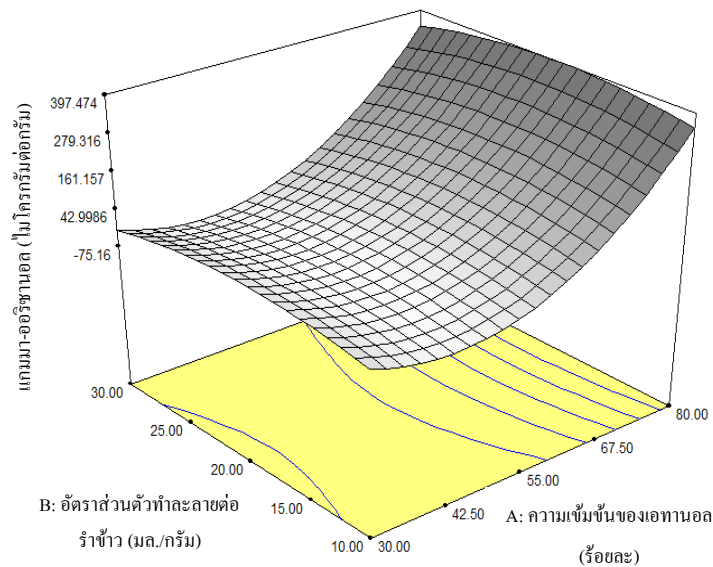
Gamma-oryzanol

X = A: %Etanol

Y = B: Solvent/sample

Actual Factor

C: Extraction time = 90.00



รูป 4.3 พื้นผิวตอบสนองค่าปริมาณสารแกมมา-อริซานอลที่สกัดได้ โดยกำหนดให้เวลาในการสกัดคงที่ ณ 90 นาที

ผลของปัจจัยการสกัดต่อปริมาณสารแอลฟา-โทโคฟีรอล

วิเคราะห์ปริมาณสารแอลฟา-โทโคฟีรอลที่สกัดได้จากรำข้าวหอมนิลโดยใช้ HPLC ผลแสดงในตาราง 4.3 พบว่า การสกัดโดยใช้ตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 12.96 ถึง 97.04 (ในน้ำ) อัตราส่วนของตัวทำละลายต่อรำข้าว 3.18 ถึง 36.82 และระยะเวลาในการสกัดตั้งแต่ 39.55 ถึง 140.45 นาที จะทำให้ได้สารแอลฟา-โทโคฟีรอล อยู่ในช่วง 12.20 ± 0.74 ถึง $43,781.58 \pm 458.17$ ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ฐานแห้ง)

จากการใช้โปรแกรม Design expert version 6.0 สามารถแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอิทธิพลของตัวแปรอิสระที่ศึกษา (dependent variable) ด้วยแบบจำลองชนิดสมการกำลังสอง (quadratic model) ดังสมการ

$$Y = 6.98 + 65.78(X_1) + 63.10(X_1^2) \quad (4.3)$$

เมื่อ $R^2 = 0.771$ และ Y คือ ปริมาณสารแอลฟา-โทโคฟีรอล และ X_1 คือ ความเข้มข้นของเอทานอล

จากแบบจำลองข้างต้น ค่า R^2 มีค่าเท่ากับ 0.771 แสดงว่าแบบจำลองนี้สามารถใช้อธิบายอิทธิพลของปัจจัยที่ศึกษาต่อปริมาณสารแอลฟา-โทโคฟีรอลที่สกัดได้ดี นั่นคือ ถ้าความเข้มข้นของเอทานอลในตัวทำละลายที่ใช้สกัดเพิ่มสูงขึ้น จะมีผลทำให้สารแอลฟา-โทโคฟีรอลถูกสกัดออกมาได้มากขึ้น ส่วนความเข้มข้นของเอทานอลกำลังสองนั้น มีอิทธิพลทำให้ปริมาณสารแอลฟา-โทโคฟีรอลเพิ่มสูงขึ้นเช่นเดียวกับสารแกมมา-ออริซานอล

การเพิ่มความเข้มข้นของเอทานอลให้สูงขึ้น จะมีผลทำให้ความเป็นขั้วของตัวทำละลายลดลง ดังนั้น ปริมาณสารแอลฟา-โทโคฟีรอลที่สกัดได้จึงมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น (รูป 4.4) เนื่องจาก หมู่เมทิล (methyl group, $-CH_3$) 3 หมู่ บนตำแหน่ง Chroman ring ของโครงสร้างพื้นฐานของวิตามินอี (vitamin E-homologs) เป็นหมู่ที่ทำให้โมเลกุลของแอลฟา-โทโคฟีรอลแสดงความเป็นขั้วต่ำ (hydrophobicity) (Chen and Bergman, 2005) ดังนั้น ความสามารถในการละลายของแอลฟา-โทโคฟีรอลในสารละลายที่มีเอทานอลความเข้มข้นมากกว่า (มีขั้วต่ำกว่าน้ำ) จึงสูงกว่าสารละลายที่มีเอทานอลน้อยกว่า

แต่อย่างไรก็ตาม หากสารละลายที่ใช้ในการสกัดแอลฟา-โทโคฟีรอลมีความเป็นขั้วต่ำเกินไป เช่น เฮกเซน จะมีผลทำให้ประสิทธิภาพในการสกัดสารดังกล่าวลดลง ดังรายงานวิจัยของ Zigoneanu *et al.* (2008) ที่พบว่า สารละลายแอลกอฮอล์ เช่น ไอโซโพรพานอล มีประสิทธิภาพในการสกัดสารแอลฟา-โทโคฟีรอลจากรำข้าวที่สูงกว่าสารละลายเฮกเซนประมาณ 1.6 เท่า ในขณะที่ Lai *et al.* (2009) ได้รายงานว่า เอทิลอะซิเตต และเมทานอลสามารถสกัดแอลฟา-โทโคฟีรอลจากรำข้าวญี่ปุ่น พันธุ์ Koshihikari ได้ในปริมาณที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ซึ่งอยู่ในช่วง 46-48 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

สำหรับระยะเวลาในการสกัด (X_3) และอัตราส่วนของตัวทำละลายต่อรำข้าว (X_2) มีผลน้อยต่อปริมาณสารแอลฟา-โทโคฟีรอลที่สกัดได้ รวมถึงผลของปัจจัยร่วมระหว่างอัตราส่วนของตัวทำละลายต่อรำข้าว และระยะเวลาในการสกัด จึงทำการตัดตัวแปรในแบบจำลองข้างต้นออกเพื่อให้ได้ค่า R^2 ที่สูงขึ้น

DESIGN-EXPERT Plot

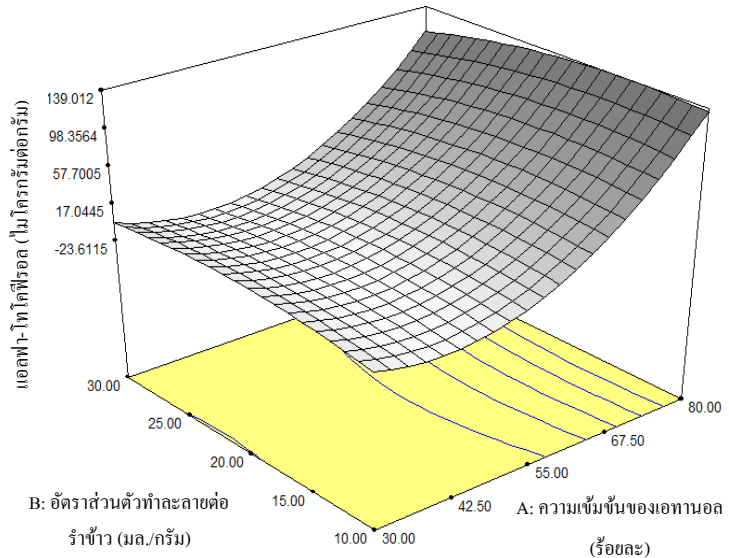
Alpha-tocopherol

X = A: %Etanol

Y = B: Solvent/sample

Actual Factor

C: Extraction time = 90.00



รูป 4.4 พื้นผิวตอบสนองค่าปริมาณสารแอลฟา-โทโคฟีรอลที่สกัดได้ โดยกำหนดให้เวลาในการสกัดคงที่ ณ 90 นาที

ผลของปัจจัยการสกัดต่อปริมาณสารแอนโทไซยานิน

ปริมาณสารแอนโทไซยานิน ทำการวิเคราะห์โดยวิธี pH-differential ผลแสดงในตาราง 4.3 พบว่า การสกัดโดยใช้ตัวทำละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 12.96 ถึง 97.04 (ในน้ำ) อัตราส่วนของตัวทำละลายต่อรำข้าว 3.18 ถึง 36.82 และระยะเวลาในการสกัดตั้งแต่ 39.55 ถึง 140.45 นาที จะทำให้ได้สารแอนโทไซยานิน อยู่ในช่วง 229.60 ± 49.16 ถึง $2,109.86 \pm 94.01$ ไมโครกรัมต่อกรัม (ฐานแห้ง)

จากการใช้โปรแกรม Design expert version 6.0 สามารถแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอิทธิพลของตัวแปรอิสระที่ศึกษา (dependent variable) ด้วยแบบจำลองชนิดสมการกำลังสอง (quadratic model) ดังสมการ

$$Y = 1.56 - 0.11(X_1) + 0.30(X_2) - 0.21(X_1^2) - 0.021(X_1X_2) \quad (4.4)$$

เมื่อ $R^2 = 0.703$ และ Y คือ ปริมาณสารแอนโทไซยานิน, X_1 คือ ความเข้มข้นของเอทานอล และ X_2 คือ อัตราส่วนของตัวทำละลายต่อรำข้าว

จากแบบจำลองข้างต้น ค่า R^2 มีค่าเท่ากับ 0.703 แสดงว่าแบบจำลองนี้สามารถใช้อธิบายอิทธิพลของปัจจัยที่ศึกษาต่อปริมาณสารแอนโทไซยานินที่สกัดได้ดี นั่นคือ ถ้าความเข้มข้นของเอทานอลในตัวทำละลายที่ใช้สกัดเพิ่มขึ้น จะสามารถสกัดสารแอนโทไซยานินได้น้อยลง ในขณะที่การเพิ่มอัตราส่วนของตัวทำละลายต่อรำข้าวให้สูงขึ้น จะสามารถสกัดสารแอนโทไซยานินได้ในปริมาณที่สูงขึ้น ส่วนผลของความเข้มข้นของเอทานอลกำลังสอง และอิทธิพลร่วมระหว่างความเข้มข้นของเอทานอลและอัตราส่วนของตัวทำละลายต่อรำข้าว จะมีผลทำให้ปริมาณผลผลิตลดลง แต่มีผลค่อนข้างน้อย เมื่อเทียบกับอัตราส่วนของตัวทำละลายต่อรำข้าว และความเข้มข้นของเอทานอล

การเพิ่มอัตราส่วนของตัวทำละลายต่อรำข้าวให้สูงขึ้น จะมีผลทำให้ปริมาณสารแอนโทไซยานินที่สกัดได้มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นด้วย (รูป 4.5) เนื่องจากอัตราส่วนที่เพิ่มขึ้นนี้ จะมีผลทำให้อัตราการถ่ายเทมวลของสารเพิ่มสูงขึ้น (Spigno *et al.*, 2007) ในขณะเดียวกันการลดความเข้มข้นของเอทานอลลงก็ให้ผลเช่นเดียวกัน เนื่องจาก โครงสร้างของสารแอนโทไซยานิน ประกอบไปด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) จำนวนมากบนวงแหวนเบนซีน (benzene rings) จึงแสดงความเป็นขั้วที่สูง (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009) แต่อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นของเอทานอลเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการสกัดแบบยกกำลังสอง ดังนั้น การลดความเข้มข้นของเอทานอลลงมากเกินไป จะส่งผลให้ประสิทธิภาพในการสกัดลดลงด้วย เช่นเดียวกับการศึกษาของ Metivier *et al.* (1980) ที่สกัดสารแอนโทไซยานินจากเปลือกองุ่น ด้วยเมทานอล และน้ำ พบว่า การสกัดโดยใช้เมทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 73 เป็นตัวทำละลาย มีประสิทธิภาพในการสกัดสูงกว่าการใช้น้ำเพียงอย่างเดียว

สำหรับผลของปัจจัยร่วมระหว่าง ความเข้มข้นของเอทานอล และระยะเวลาในการสกัด มีผลน้อยมากต่อค่าตอบสนองที่ได้ จึงทำการตัดตัวแปรในแบบจำลองออกข้างต้น เพื่อให้ได้ค่า R^2 ที่สูงขึ้น

DESIGN-EXPERT Plot

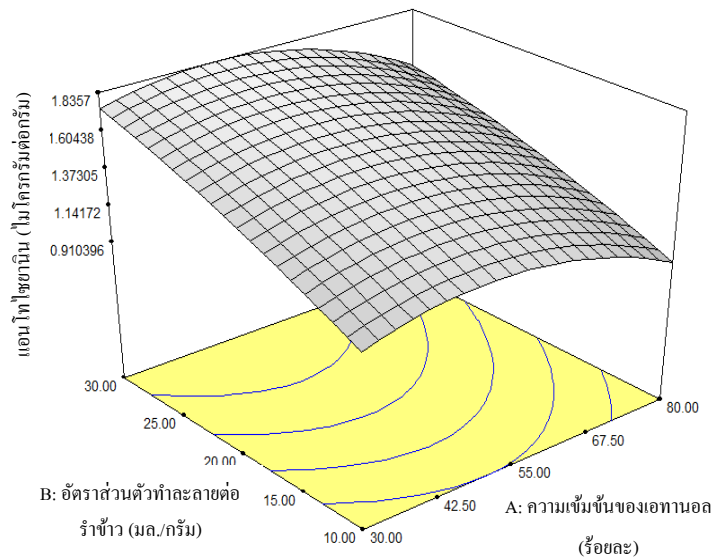
Anthocyanin

X = A: %Etanol

Y = B: Solvent/sample

Actual Factor

C: Extraction time = 90.00



รูป 4.5 พื้นผิวตอบสนองค่าปริมาณสารแอนโทไซยานินที่สกัดได้ โดยกำหนดให้เวลาในการสกัดคงที่ ณ 90 นาที

ผลของปัจจัยการสกัดต่อปริมาณสารสกัดหยาบ (Extract yields)

ปริมาณสารสกัดหยาบที่ได้ แสดงไว้ในตาราง 4.3 พบว่า การสกัดโดยใช้ตัวทำละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 12.96 ถึง 97.04 (ในน้ำ) อัตราส่วนของตัวทำละลายต่อรำข้าว 3.18 ถึง 36.82 และระยะเวลาในการสกัดตั้งแต่ 39.55 ถึง 140.45 นาที จะทำให้ได้ปริมาณสารสกัดอยู่ในช่วงร้อยละ 3.3 ถึง 39.0 (ฐานแห้ง)

จากการใช้โปรแกรม Design expert version 6.0 สามารถแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอิทธิพลของตัวแปรอิสระที่ศึกษา (dependent variable) ด้วยแบบจำลองชนิดสมการปฏิสัมพันธ์ (interaction model) ดังสมการ

$$Y = 1.50 - 0.42(X_1) + 0.51(X_2) - 0.18(X_1X_2) \quad (4.5)$$

เมื่อ $R^2 = 0.790$ และ Y คือ ปริมาณสารสกัด, X_1 คือ ความเข้มข้นของเอทานอล และ X_2 คือ อัตราส่วนของตัวทำละลายต่อรำข้าว

แบบจำลองข้างต้น มีค่า R^2 เท่ากับ 0.790 แสดงว่าแบบจำลองนี้สามารถใช้อธิบายอิทธิพลของปัจจัยที่ศึกษาต่อปริมาณสารสกัดหยาบที่สกัดได้ดี นั่นคือ ถ้าความเข้มข้นของเอทานอล

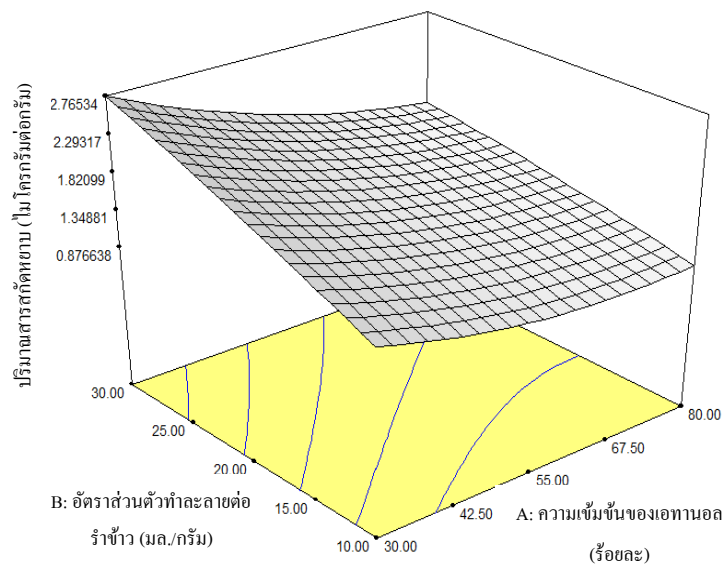
ในตัวอย่างที่ใช้สกัดเพิ่มขึ้น จะมีผลทำให้ได้ปริมาณสารสกัดหยابน้อยลง ในขณะที่ การเพิ่มอัตราส่วนของตัวทำละลายต่อรำข้าว มีผลทำให้ปริมาณสารสกัดหยابที่ได้เพิ่มสูงขึ้น ส่วนอิทธิพลร่วมระหว่างความเข้มข้นของเอทานอลและอัตราส่วนของตัวทำละลายต่อรำข้าว มีผลทำให้ปริมาณสารสกัดหยابลดลง แต่มีผลน้อยมากเมื่อเทียบกับความเข้มข้นของเอทานอล และอัตราส่วนของตัวทำละลายต่อรำข้าว

การเพิ่มอัตราส่วนของตัวทำละลายต่อรำข้าว และระยะเวลาในการสกัด จะมีผลทำให้ปริมาณสารสกัดหยابที่สกัดได้มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น (รูป 4.6) เนื่องจาก อัตราส่วน และระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นนี้ จะมีผลทำให้อัตราการถ่ายเทมวลของสารเพิ่มสูงขึ้น (Spigno *et al.*, 2007) Devi and Arumughan (2007) ได้ศึกษาการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากรำข้าว โดยใช้อัตราส่วนของตัวทำละลายต่อน้ำหนักรำข้าว 4 ระดับ ได้แก่ 7.5:1, 10:1, 15:1 และ 30:1 พบว่า ที่อัตราส่วน 30:1 ให้ปริมาณสาร-สกัดสูงที่สุด ในขณะเดียวกัน การลดความเข้มข้นของเอทานอลลงก็มีผลเช่นเดียวกัน เพราะความเป็นขี้ของตัวทำละลายที่สูงขึ้นนี้ ทำให้สารประกอบต่างๆ ที่สามารถละลายในน้ำได้ เช่น น้ำตาล หรือ โปรตีนบางชนิด เป็นต้น (Matthaus *et al.*, 2002) สามารถละลายออกมาในระหว่างขั้นตอนการสกัด เป็นผลทำให้สารสกัดหยามีปริมาณสูง

DESIGN-EXPERT Plot

Extracts yield
X = A: %Etanol
Y = B: Solvent/sample

Actual Factor
C: Extraction time = 90.00



รูป 4.6 พื้นผิวตอบสนองค่าปริมาณสารสกัดที่สกัดได้ โดยกำหนดให้เวลาในการสกัดคงที่ ณ 90 นาที

4.2.2 สถานะที่เหมาะสมในการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระ และการยืนยันความเหมาะสมของ

แบบจำลอง

จากผลการถดถอยได้จากข้อ 4.2.1 ทั้ง 5 สมการ เมื่อนำมาสร้างกราฟพื้นที่ตอบสนองหาสถานะที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด แกมมา-ออริซานอล แอลฟา-โทโคฟีรอล แอนโทไซยานิน และร้อยละผลผลิตที่ได้ในปริมาณสูงสุดด้วยการสกัดขั้นตอนเดียว จะได้สถานะการสกัดดังตาราง 4.5

ตาราง 4.5 สถานะที่เหมาะสมในการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากการ optimization

ความเข้มข้นของ เอทานอล (%)	อัตราส่วนตัวทำละลายต่อรำข้าว (มิลลิลิตรต่อกรัม)	เวลาการสกัด (นาที)
72.50	26.67	120

ซึ่งสถานะดังกล่าวข้างต้นได้จากการคัดเลือกจุดที่เหมาะสมจากพื้นที่ที่แสดงในรูป 4.7

DESIGN-EXPERT Plot

Overlay Plot

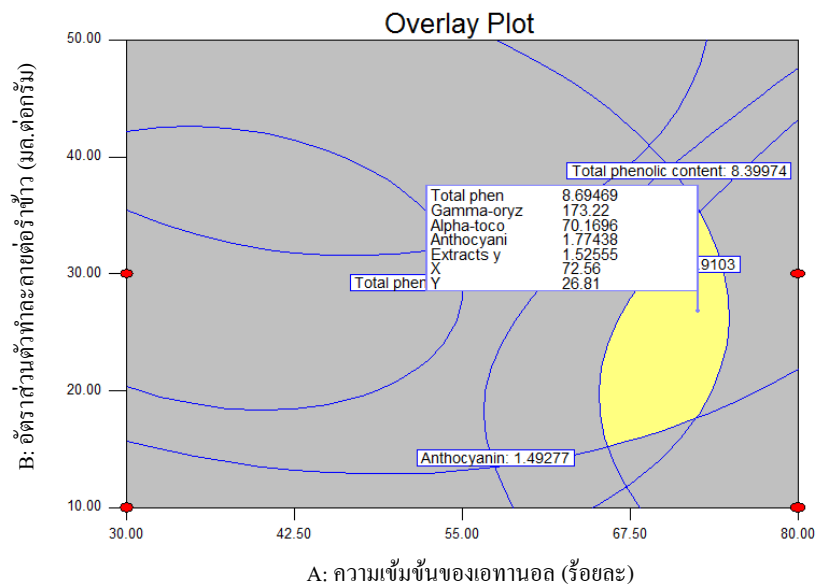
● Design Points

X = A: %Etanol

Y = B: Solvent/sample

Actual Factor

C: Extraction time = 120.00



รูป 4.7 พื้นที่แสดงสถานะที่เหมาะสมในการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากรำข้าวหอมนิล

ทำการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากรำข้าว โดยใช้สถานะที่เหมาะสมที่ได้ คือ สารละลายเอทานอลร้อยละ 72.5 อัตราส่วนของตัวทำละลายต่อรำข้าว เท่ากับ 26.67 มิลลิลิตรต่อกรัม และเวลา

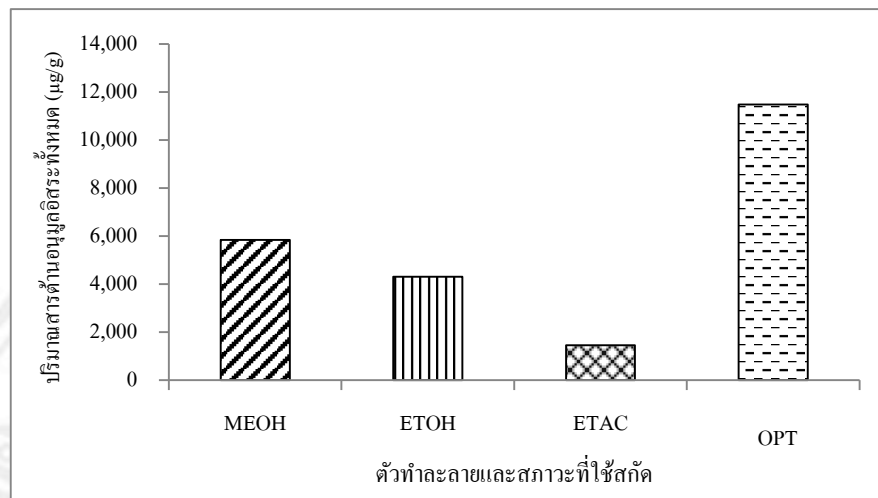
ในการสกัด 120 นาที เพื่อยืนยันความเหมาะสมของแบบจำลอง พบว่า ค่าตอบสนองที่สกัดได้จริง และจากการทำนายมีค่าที่แตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตาราง 4.6) อย่างไรก็ตาม ค่าความคลาดเคลื่อนที่เกิดขึ้น เป็นไปในทิศทางที่ดี เนื่องจากปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด แกมมา-ออริซานอล แอลฟา-โทโคฟีรอล และ แอนโทไซยานิน รวมถึงปริมาณสารสกัด มีค่าสูงกว่าค่าจากการทำนายร้อยละ 7.05, 31.70, 28.05 4.84 และ 14.04 ตามลำดับ

นอกจากนี้ พบว่า การสกัดสารต้านอนุมูลอิสระทั้งหมด (ผลรวมของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด แกมมา-ออริซานอล แอลฟา-โทโคฟีรอล และแอนโทไซยานิน) ด้วยสภาวะที่เหมาะสม มีประสิทธิภาพในการสกัดสูงกว่าการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายเมทานอล เอทานอล และเอทิลอะซิเตท ถึงร้อยละ 49.10, 62.54 และ 87.37 ตามลำดับ (รูป 4.8) ดังนั้น การสกัดสารต้านอนุมูลอิสระทั้งชนิดที่มีความเป็นขั้วสูง และค่าจากราค้าวในปริมาณสูงสุดแบบขั้นตอนเดียว สามารถใช้สารละลายผสมระหว่างน้ำ และเอทานอลเป็นตัวทำละลายที่มีความเหมาะสมกว่าการใช้ตัวทำละลายเพียงชนิดเดียว

อย่างไรก็ตาม ผู้ศึกษาได้นำสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองนี้ไปศึกษาการปรับหัวของตัวทำละลายเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดให้สูงขึ้น ดังการทดลองต่อไปนี้

ตาราง 4.6 ค่าตอบสนองของปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ และสารสกัดที่สกัดได้จริง และค่าจากการทำนาย ณ สภาวะที่เหมาะสม

	สารประกอบ ฟีนอลิก (g/kg)	แกมมา- ออริซานอล (mg/kg)	แอลฟา- โทโคฟีรอล (ug/kg)	แอนโทไซยานิน (mg/kg)	ปริมาณสาร สกัด (g/ 10 g)
ค่าจากการ ทำนาย	8.70	173.05	70.16	1.77	1.53
ค่าจากการ ทดลอง	9.36 ±0.03	253.34 ±7.73	97.52 ±3.72	1.86 ±0.07	1.78
%คลาดเคลื่อน	7.05	31.70	28.05	4.84	14.04



รูป 4.8 ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระทั้งหมดจากรำข้าวหอมนิลที่สกัดโดยใช้เมทานอล (MEOH) เอทานอล (ETOH) เอทิลอะซิเตท (ETAC) และสภาวะที่ได้จากการ optimization (OPT)

4.3 ศึกษาผลของการปรับชั่วตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด

ผลของการปรับชั่วตัวทำละลายด้วยการเติมกรดอะซิติก ที่ 3 ระดับ ได้แก่ ร้อยละ 1, 2 และ 3 และผลของเวลาในการเติมกรดอะซิติก 4 ระดับ ได้แก่ เติมในขั้นตอนเริ่มต้นสกัด (0 นาที) และเติมเมื่อเวลาในการสกัดผ่านไป 30, 60 และ 90 นาที พบว่า ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด แกมมา-ออริซานอล แอลฟา-โทโคฟีรอล และแอนโทไซยานิน รวมถึงร้อยละผลผลิตที่ได้จากการสกัด มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นตามร้อยละของกรดอะซิติกที่เติมลงไปในตัวทำละลายที่ใช้สกัด ส่วนเวลาที่เติมกรดอะซิติกนั้นมีผลต่อการสกัด คือ สารต้านอนุมูลอิสระกลุ่มดังกล่าว และร้อยละผลผลิตจะแปรผกผันกับเวลาที่เติมกรดอะซิติกลงไปในระหว่างการสกัด นั่นคือ ระยะเวลาการเติมกรดอะซิติกร้อยละ 3 ที่ 0 นาที (เติมตั้งแต่เริ่มสกัด) จะให้ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด แกมมา-ออริซานอล แอลฟา-โทโคฟีรอล และแอนโทไซยานิน และร้อยละผลผลิตสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เท่ากับ $12,380.37 \pm 82.38$, $3,090.38 \pm 34.07$, 278.70 ± 10.59 , 11.46 ± 1.20 ไมโครกรัมต่อกรัม และร้อยละ 2.48 ± 0.01 ตามลำดับ (ตาราง 4.7)

ปริมาณสารแกมมา-ออริซานอล และแอลฟา-โทโคฟีรอล มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับสารตัวอื่น เนื่องจาก สภาพชั่วที่เพิ่มขึ้นส่งผลค่อนข้างน้อยต่อประสิทธิภาพการสกัด อย่างไรก็ตาม กรดที่เติมลงไปส่งผลต่อการย่อยสลายผนังเซลล์ของรำข้าว และทำลายโมเลกุล

เชิงซ้อน (complex molecule) ระหว่างสารแกมมา-ออริซานอล และแอลฟา-โทโคฟีรอล กับสารประกอบอื่นในรำข้าว (Naczka and Shahidi, 2006) ทำให้สารแกมมา-ออริซานอล และแอลฟา-โทโคฟีรอลถูกปลดปล่อยออกมาในตัวอย่างได้มากขึ้น เช่นเดียวกับปริมาณร้อยละผลผลิตที่ได้

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และแอนโทไซยานิน มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นอย่างชัดเจนเนื่องจาก สภาพข้าวของตัวอย่างที่ใช้สกัดสูงขึ้นจากการแตกตัวของกรดอะซิติก ทำให้สภาพข้าวเหมาะสมต่อการสกัดสารโมเลกุลขี้สูง ทั้งสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และแอนโทไซยานิน (Naczka and Shahidi, 2006) รวมถึงผนังเซลล์ของรำข้าวบางส่วนถูกย่อยสลายด้วยกรดอะซิติกส่งผลให้สารดังกล่าวถูกปลดปล่อยออกมาในสารละลายได้มากขึ้นเช่นกัน นอกจากนี้ สภาพที่มีความเป็นกรดจะส่งผลให้ความคงตัวของแอนโทไซยานินเพิ่มสูงขึ้นด้วย (Tananuwong *et al.*, 2010 and Chandrasekhar *et al.*, 2012) สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Patil *et al.* (2009) ที่รายงานว่าการสกัดแอนโทไซยานินจากหัวไชเท้าแดงโดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลายร่วมกับการเติมกรดไฮโดรคลอริกมีประสิทธิภาพในการสกัดสูงกว่าการสกัดด้วยน้ำเพียงอย่างเดียว เนื่องจาก การสกัดโดยใช้น้ำร่วมกับกรดไฮโดรคลอริกร้อยละ 2 ให้ปริมาณแอนโทไซยานินสูงสุด คือ 30.0 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร รองลงมา คือ การสกัดโดยใช้น้ำร่วมกับกรดไฮโดรคลอริกร้อยละ 1 และการสกัดโดยใช้น้ำ ซึ่งให้ปริมาณแอนโทไซยานิน เท่ากับ 29.0 และ 26.2 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ตามลำดับ

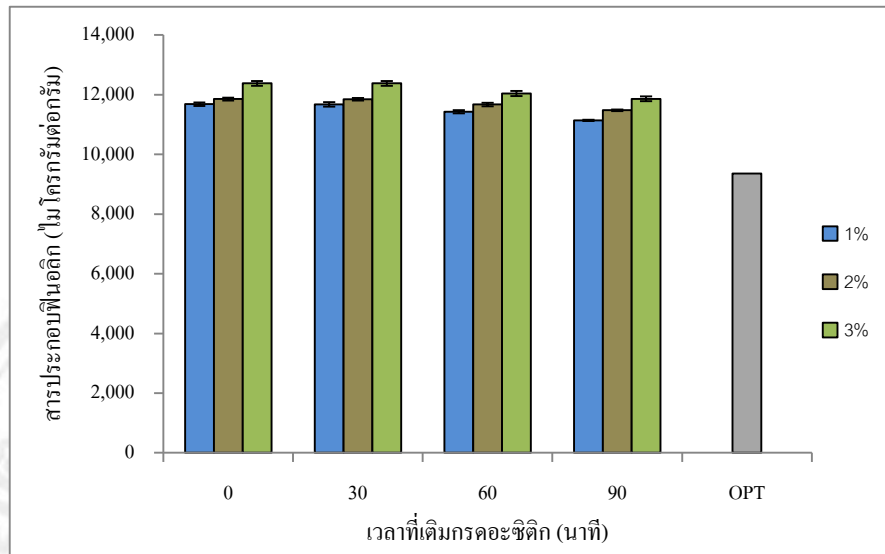
จากผลการทดลองที่ได้ พบว่า การปรับข้าวตัวอย่างด้วยการเติมกรดอะซิติกสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระ และร้อยละผลผลิตที่ได้จากรำข้าวหอมนิลได้ดีกว่าการสกัดโดยไม่เติมกรด (รูป 4.9-4.13) นอกจากนี้ เวลาในการเติมกรดอะซิติกที่ 0 นาที จะมีประสิทธิภาพในการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่าการเติมที่เวลา 30, 60 และ 90 นาทีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังนั้น ผู้ศึกษาจึงทำการเลือกสภาวะการสกัดที่เติมกรดอะซิติกร้อยละ 3 และระยะเวลาในการเติมกรดอะซิติกที่ 0 นาที ไปสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากรำข้าวหอมนิล เพื่อศึกษากิจกรรมการต้านออกซิเดชัน รวมถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันในผลิตภัณฑ์กุนเชียงหมูในการทดลองถัดไป

ตาราง 4.7 ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระและสารสกัดที่ได้จากการปรับข้าวตัวทำละลาย

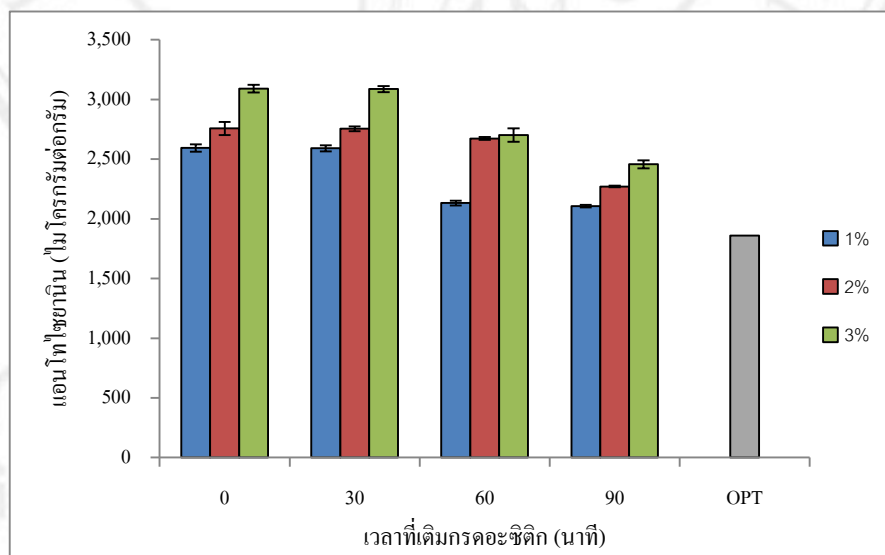
กรดอะซิติก ที่เติม	เวลาที่ เติมกรด (นาที่ที่)	ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ (ไมโครกรัมต่อกรัม)				ร้อยละ ผลผลิตที่ได้ (%)
		สารประกอบ ฟีนอลิก ทั้งหมด	แอนโท ไซยานิน	แกมมา- ออริซานอล	แอลฟา- โทโคฟีรอล	
1%	0	11,682.97	2,593.38	255.07	10.40	2.46
		±18.30 ^d	±11.68 ^d	±13.55 ^{abc}	±0.60 ^{abc}	±0.01 ^{bc}
	30	11,676.23	2,591.40	253.80	10.36	2.45
		±49.40 ^d	±19.08 ^d	±8.61 ^{abc}	±0.62 ^{abc}	±0.01 ^{cd}
	60	11,429.67	2,131.99	251.39	9.43	2.41
		±77.78 ^c	±25.83 ^g	±5.73 ^{bc}	±0.90 ^{cd}	±0.01 ^c
	90	11,140.08	2,106.75	247.74	9.40	2.23
		±62.75 ^f	±31.40 ^g	±17.04 ^c	±0.40 ^{cd}	±0.02 ^h
2%	0	11,854.63	2,756.99	266.84	10.92	2.47
		±23.87 ^c	±7.03 ^b	±6.22 ^{abc}	±0.45 ^{ab}	±0.01 ^{bc}
	30	11,848.33	2,754.71	264.35	10.86	2.47
		±58.69 ^c	±11.88 ^b	±9.92 ^{abc}	±0.39 ^{ab}	±0.01 ^{bc}
	60	11,671.27	2,673.58	260.23	10.46	2.43
		±40.10 ^d	±20.86 ^c	±15.36 ^{abc}	±0.38 ^{abc}	±0.02 ^d
	90	11,479.31	2,270.99	257.75	9.84	2.27
		±46.97 ^c	±55.74 ^f	±23.00 ^{abc}	±0.52 ^{bcd}	±0.02 ^g
3%	0	12,380.37	3,090.38	278.70	11.46	2.48
		±82.38 ^a	±34.07 ^a	±10.59 ^a	±1.20 ^a	±0.01 ^{ab}
	30	12,379.52	3,087.21	277.48	11.42	2.49
		±87.72 ^a	±55.26 ^a	±16.20 ^{ab}	±1.10 ^a	±0.02 ^a
	60	12,041.94	2,701.65	266.59	11.32	2.47
		±84.28 ^b	±25.47 ^c	±16.11 ^{abc}	±0.47 ^a	±0.01 ^{bc}
	90	11,863.23	2,456.51	261.71	10.54	2.32
		±82.96 ^c	±32.73 ^c	±12.10 ^{abc}	±0.69 ^{abc}	±0.02 ^f
Control		9,362.83	1,859.15	253.34	9.02	1.78
		±22.75 ^g	±71.53 ^h	±7.73 ^{abc}	±0.72 ^d	±0.01 ⁱ

ตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละคอลัมน์ แสดงถึงค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

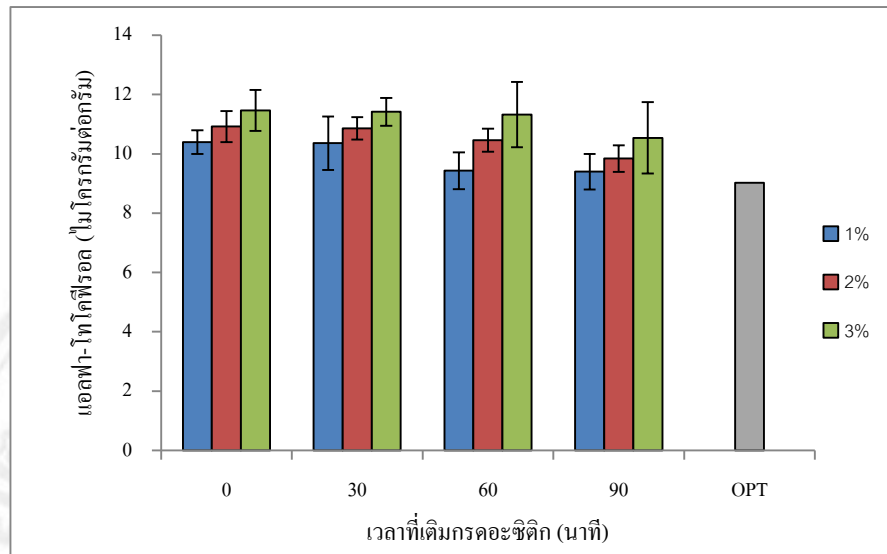
Control คือ สารสกัดที่ได้จากการสกัดที่ยังไม่มีการปรับข้าวตัวทำละลายโดยการเติมกรดอะซิติก



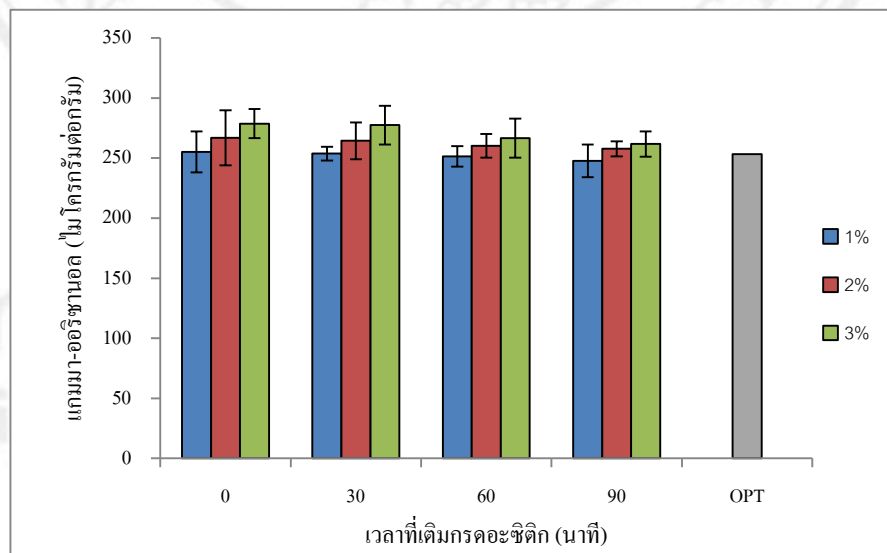
รูป 4.9 การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดระหว่างการสกัดที่เติมกรดอะซิติก ณ เวลาที่ 0, 30, 60 และ 90 นาที เปรียบเทียบกับสภาวะที่ได้จากการ optimization (OPT)



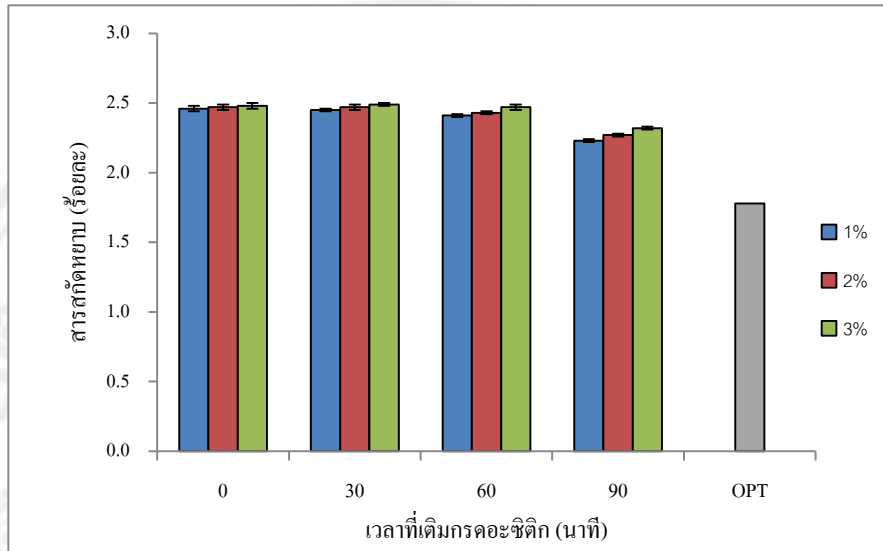
รูป 4.10 การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารแอนโทไซยานินระหว่างการสกัดที่เติมกรดอะซิติก ณ เวลาที่ 0, 30, 60 และ 90 นาที เปรียบเทียบกับสภาวะที่ได้จากการ optimization (OPT)



รูป 4.11 การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารแอลฟา-โทโคฟีรอลระหว่างการสกัดที่เติมกรดอะซิติก ณ เวลาที่ 0, 30, 60 และ 90 นาที เปรียบเทียบกับสถานะที่ได้จากการ optimization (OPT)



รูป 4.12 การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารแกมมา-ออริซานอลระหว่างการสกัดที่เติมกรดอะซิติก ณ เวลาที่ 0, 30, 60 และ 90 นาที เปรียบเทียบกับสถานะที่ได้จากการ optimization (OPT)



รูป 4.13 การเปลี่ยนแปลงปริมาณร้อยละผลผลิตที่ได้ระหว่างการสกัดที่เติมกรดอะซิติก ณ เวลาที่ 0, 30, 60 และ 90 นาที เปรียบเทียบกับสถานะที่ได้จากการ optimization (OPT)

4.4 ศึกษากิจกรรม และประสิทธิภาพการต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากรำข้าวหอมนิล

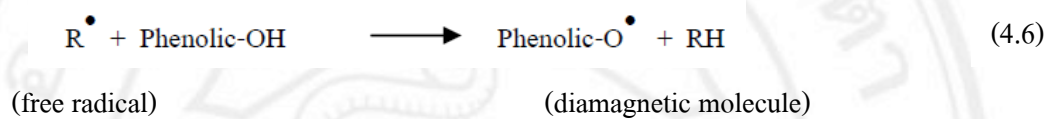
สารสกัดจากรำข้าวหอมนิลที่ได้จากการสกัดด้วยสถานะที่เหมาะสม ร่วมกับการเติมกรดอะซิติกร้อยละ 3 ถูกนำมาทดสอบกิจกรรมการต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity, metal chelating activity และ inhibition of linoleic acid peroxidation รวมถึงทดสอบประสิทธิภาพการต้านออกซิเดชันในผลิตภัณฑ์กุนเชียงหมู ได้ผลดังนี้

4.4.1 กิจกรรมการต้านออกซิเดชัน

4.4.1.1 DPPH radical scavenging activity

ทดสอบกิจกรรมการต้านออกซิเดชันของสารสกัดด้วยการวัดความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH เปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (BHT) โดยพิจารณาจากค่า EC_{50} พบว่า สารสกัดจากรำข้าวหอมนิลมีค่า EC_{50} เท่ากับ 0.11 ± 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตาราง 4.8) ในขณะที่สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (BHT) มีค่า EC_{50} เท่ากับ 0.05 ± 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นั่นคือ สารสกัดจากรำข้าวหอมนิลมีประสิทธิภาพการกำจัดอนุมูล DPPH ต่ำกว่า BHT

ราว 2.2 เท่า จากผลการศึกษาที่ได้ พบว่า สารสกัดจากรำข้าวหอมนิลมีแนวโน้มในการเป็นต้านอนุมูลอิสระที่มีคุณสมบัติในการกำจัดอนุมูลอิสระได้ เนื่องจาก ในสารสกัดดังกล่าวมีสารกลุ่มฟีนอลิกที่มีคุณสมบัติเป็นตัวให้อิเล็กตรอนอะตอม (hydrogen donor) และถ่ายเทอิเล็กตรอน (electron transfer) แก่อนุมูลอิสระได้ดี (Tananuwong *et al.*, 2010) ทำให้อนุมูล DPPH ถูกรีดิวซ์ให้อยู่ในรูปสารเชิงซ้อน DPPH-H (diamagnetic molecule) ซึ่งมีความเสถียรมากขึ้น เป็นผลทำให้ปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระหยุดลง (Molyneux., 2003) แสดงกลไกดังสมการ (4.6) (สุกัญญา, 2555)



รายงานการศึกษาเกี่ยวกับความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ และค่า EC_{50} ของสารสกัดจากรำข้าวของ Chotimakorn *et al.* (2008) ที่ได้ศึกษาคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากรำข้าวจำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ ข้าวดอกมะลิ 105 ข้าวปทุมธานี 60 ข้าวสุพรรณบุรี 90 ข้าวชัยนาท 1 และข้าว กข 13 พบว่า สารสกัดจากรำข้าวดังกล่าว มีค่า EC_{50} ที่ทดสอบโดยการวัดความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH ที่มากกว่าสารสกัดจากรำข้าวหอมนิล (0.38 ถึง 0.74 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) นอกจากนี้ Tananuwong *et al.* (2010) ยังรายงานว่า สารสกัดจากรำข้าวเหนียวดำพันธุ์กำดอยสะเก็ด มีค่า EC_{50} อยู่ในช่วง 0.46-0.78 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบกับ ค่า EC_{50} ของรำข้าวหอมนิลที่สกัดได้จากการทดลองนี้ พบว่า สารสกัดจากรำข้าวหอมนิลมีค่า EC_{50} ที่ต่ำกว่า แสดงถึงความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระที่สูงกว่า นั่นเอง

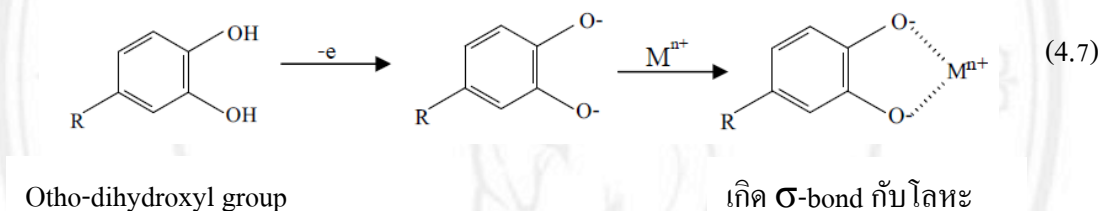
ตาราง 4.8 ค่า EC_{50} ของสารสกัดจากรำข้าวหอมนิล BHT และ EDTA

วิธีทดสอบ	EC_{50} (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	
	สารสกัดจากรำข้าวหอมนิล	สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์
DPPH radical scavenging	0.11±0.01	BHT = 0.05±0.01
Metal chelating	0.25±0.02	EDTA = 0.03±0.01

4.4.1.2 Metal chelating activity

ทดสอบกิจกรรมการต้านออกซิเดชันของสารสกัดด้วยการวัดความสามารถในการจับไอออนของโลหะ (Fe^{2+}) เปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (EDTA) โดย

พิจารณาจากค่า EC_{50} พบว่า สารสกัดจากรำข้าวหอมนิลมีค่า EC_{50} เท่ากับ 0.25 ± 0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตาราง 4.8) ในขณะที่สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (EDTA) มีค่า EC_{50} เท่ากับ 0.03 ± 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นั่นคือ สารสกัดจากรำข้าวหอมนิลมีประสิทธิภาพการจับไอออนของโลหะที่ต่ำกว่า EDTA ประมาณ 8.3 เท่า อย่างไรก็ตาม สารสกัดจากรำข้าวหอมนิลมีแนวโน้มที่จะเป็นสารดักจับไอออนของโลหะ (metal chelating agent) เพื่อชะลอการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ เนื่องจาก สารสกัดดังกล่าวมีสารต้านอนุมูลอิสระบางชนิดที่มีโครงสร้างแบบ ortho-dihydroxyl group ซึ่งสามารถเกิดพันธะ σ -bond กับโลหะทรานซิชัน ให้อยู่ในรูปที่ถูกออกซิไดซ์และมีความเสถียรสูงขึ้น เนื่องจากมีค่ารีดอกซ์โพเทนเชียล (redox potential) ลดลง (Mao *et al.*, 2006) กลไกการดักจับโลหะ แสดงดังสมการ (4.7) (สุกัญญา, 2555)



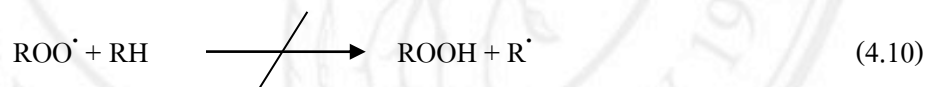
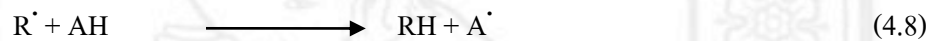
นอกจากนี้ มีรายงานเกี่ยวกับการศึกษาความสามารถในการดักจับโลหะ (Fe^{2+}) ของสารสกัดจากรำข้าวจำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ข้าวปทุมธานี 60 ข้าวสุพรรณบุรี 90 ข้าวชัยนาท 1 และข้าว กข 13 โดยรายงานเป็นค่า EC_{50} พบว่า สารสกัดจากรำข้าวดังกล่าว มีค่า EC_{50} อยู่ในช่วง 0.11 ถึง 0.55 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Chotimakorn *et al.*, 2008) ในขณะที่ Mao *et al.* (2006) พบว่า สารสกัดจากดอกกลีมีคุณสมบัติในการดักจับโลหะได้ดี เนื่องจาก สารสกัดดังกล่าวมีค่า EC_{50} อยู่ในช่วง 0.04 และ 0.16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งแสดงถึงประสิทธิภาพในการดักจับไอออนโลหะที่สูงกว่าสารสกัดจากรำข้าว

4.4.1.3 Inhibition of linoleic acid peroxidation

ทดสอบกิจกรรมการต้านออกซิเดชันของสารสกัดด้วยการวัดความสามารถในการยับยั้งการเกิดเปอร์ออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก เปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (BHT) โดยพิจารณาจากค่าร้อยละการยับยั้งการเกิดเปอร์ออกซิเดชัน พบว่า สารสกัดจากรำข้าวหอมนิล ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าร้อยละการยับยั้ง เท่ากับร้อยละ 42.96 ± 2.80 ในขณะที่สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (BHT) ที่ความเข้มข้นเท่ากัน มีค่าร้อยละการยับยั้งสูงถึง

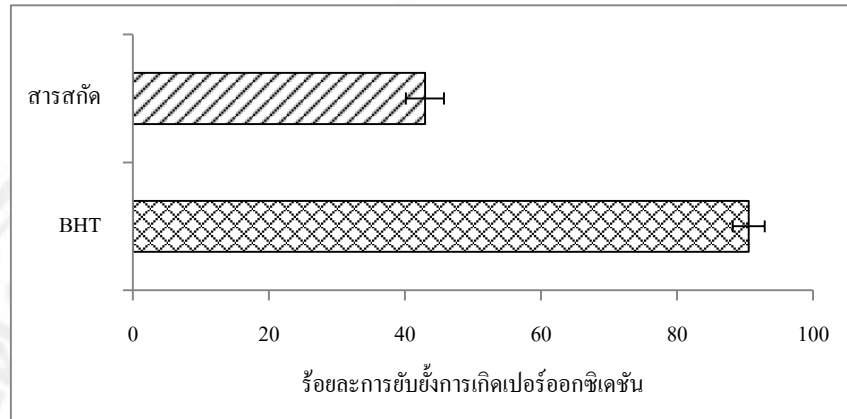
ร้อยละ 90.55 ± 2.35 (รูป 4.14) นั่นคือ สารสกัดจากรำข้าวหอมนิลมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดเปอร์ออกซิเดชันของกรดไขมันต่ำกว่า BHT ประมาณ 2.10 เท่า

ทั้งนี้ กลไกการยับยั้งการเกิดเปอร์ออกซิเดชันของสารสกัดจากรำข้าวหอมนิลเกิดได้ 2 กลไก ได้แก่ การหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระ (chain-breaking) ที่เกิดจากการแตกตัวของกรดไขมันไม่อิ่มตัว โดยการให้ไฮโดรเจนอะตอม (hydrogen donor) แก่อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นทำให้อนุมูลดังกล่าวกลายเป็นอนุมูลที่มีความเสถียรมากขึ้น ปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระจึงหยุดลง ดังสมการ (4.8) นอกจากนี้ ยังทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอน (electron-acceptor antioxidants) จากอนุมูลเปอร์ออกซี (peroxy radical, $\text{ROO}\cdot$) ทำให้สามารถหยุดกลไกการเกิดสารไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (hydroperoxide) ได้ กลไกที่เกิดขึ้น แสดงดังสมการ (4.9) และ (4.10) (นิธิยา, 2545 และ เจริญ, 2554)



รายงานวิจัยที่สอดคล้องของ Chotimakorn *et al.* (2008) พบว่า สารสกัดจากรำข้าวพันธุ์ปทุมธานี 60 ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร มีความสามารถในการยับยั้งการเกิดเปอร์ออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัว ร้อยละ 46.7 ในขณะที่ข้าวขาวดอกมะลิ 105 กข 13 และ ข้าวสุพรรณบุรี 90 ยับยั้งการเกิดเปอร์ออกซิเดชันได้เพียงร้อยละ 17.8, 17.4 และ 13.3 ตามลำดับ นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่า สารสกัดจากดอกกลีบลี ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร สามารถยับยั้งการเกิดเปอร์ออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัวได้มากกว่าร้อยละ 70 (Mao *et al.*, 2006)

Arab *et al.* (2011) ยังพบว่า สารสกัดจากรำข้าวพันธุ์ Fair และ Terem ของประเทศอิหร่าน ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร สามารถยับยั้งการเกิดเปอร์ออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัวได้ประมาณร้อยละ 35 ซึ่งมีประสิทธิภาพต่ำกว่าสารสกัดจากรำข้าวหอมนิลที่ได้จากการทดลองนี้



รูป 4.14 ค่าร้อยละการยับยั้งการเกิดเปอร์ออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิกของสารสกัดจากรำข้าวหอมนิล และสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (BHT) ความเข้มข้น 0.1 มก./มล.

จากการศึกษากิจกรรมการต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากรำข้าวหอมนิล ในด้านความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH การจับไอออนของโลหะ และการยับยั้งการเกิดเปอร์ออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก สามารถสรุปได้ว่า สารสกัดดังกล่าวมีคุณสมบัติด้านการเกิดอนุมูลอิสระ หรือปฏิกิริยาออกซิเดชันได้เป็นอย่างดี จึงได้มีการศึกษาประสิทธิภาพการต้านออกซิเดชันในผลิตภัณฑ์กุนเชียงหมูในการทดลองตอนถัดไป

4.4.2 ประสิทธิภาพการต้านออกซิเดชัน และการเปลี่ยนแปลงในผลิตภัณฑ์กุนเชียงหมู

ระหว่างการเก็บรักษา

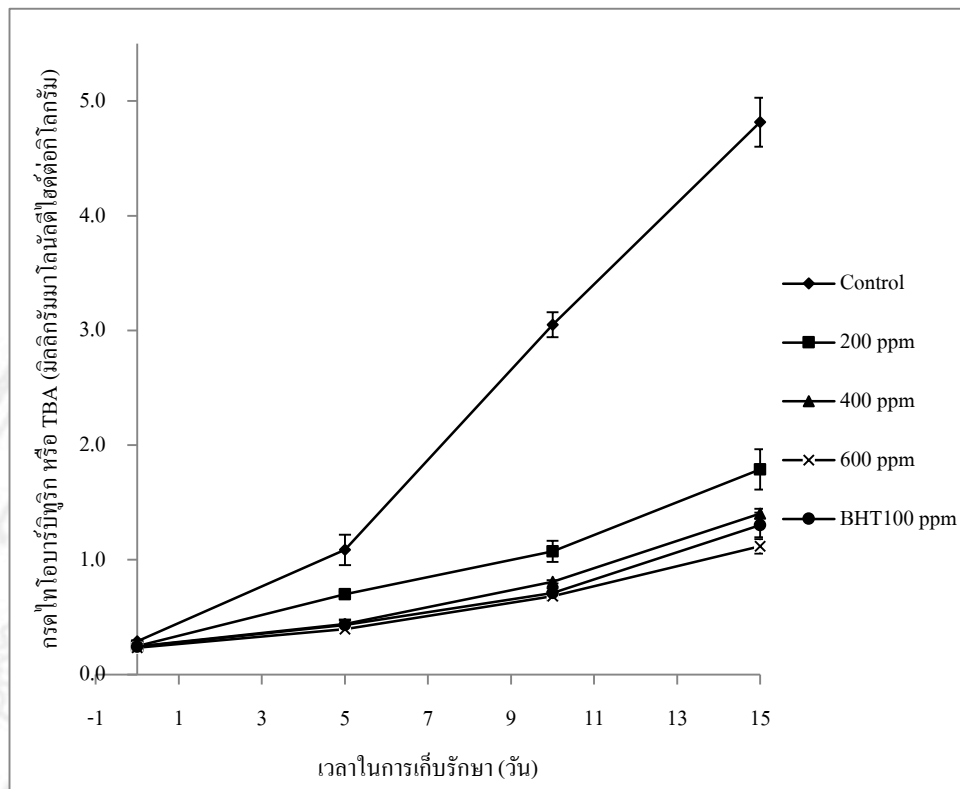
การเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางเคมี และทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์กุนเชียงหมูที่เติมสารสกัดจากรำข้าวหอมนิล ความเข้มข้น 0, 200, 400, 600 พีพีเอ็ม และสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (BHT) ความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม เก็บรักษาเป็นระยะเวลา 15 วัน ติดตามการเปลี่ยนแปลงผลิตภัณฑ์ด้วยการวัดปริมาณ TBARs (thiobarbituric acid reactive substance) การเปลี่ยนแปลงค่าสี (L^* , a^* และ b^*) ค่าน้ำที่เป็นประโยชน์ (water activity, a_w) และการทดสอบทางประสาทสัมผัส ได้แก่ ลักษณะปรากฏ สี กลิ่น และการยอมรับโดยรวม ได้ผลดังนี้

4.4.2.1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณ TBARs (Thiobarbituric acid reactive substance)

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณ TBARs ของผลิตภัณฑ์กุ้งเชียงหมูที่เดิม สารสกัดจากรำข้าวหอมนิล พบว่า สารสกัดจากรำข้าวหอมนิล และระยะเวลาในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ มีผลต่อค่า TBA ของกุ้งเชียงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เนื่องจาก เมื่อระยะเวลาในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้นจาก 0 วัน เป็น 15 วัน ค่า TBARs ของผลิตภัณฑ์กุ้งเชียงทุกตัวอย่างมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นตามระยะเวลาการเก็บรักษา (ตารางภาคผนวก ข-1) เนื่องจาก กรดไขมันในผลิตภัณฑ์กุ้งเชียงถูกออกซิไดส์ และเปลี่ยนเป็นสารมาโลนัลดีไฮด์ (malonaldehyde) มากขึ้น (นิธิยา, 2545) โดยเฉพาะตัวอย่างที่ไม่เดิมสารสกัด จะมีค่า TBARs สูงขึ้นอย่างรวดเร็วจาก 0.289 ± 0.009 จนถึง 4.816 ± 0.213 มิลลิกรัมมาโลนัลดีไฮด์ต่อกิโลกรัม (รูป 4.15) ในขณะที่ ตัวอย่างที่เดิมสารสกัดจากรำข้าว นั้น ประสิทธิภาพการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดที่เดิม นั่นคือ ค่า TBARs ของตัวอย่างที่เดิมสารสกัด ความเข้มข้น 600 พีพีเอ็ม มีค่า TBARs ต่ำที่สุด (1.117 ± 0.062 มิลลิกรัมมาโลนัลดีไฮด์ต่อกิโลกรัม) ซึ่งมีประสิทธิภาพดีกว่า BHT ความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่ชุดตัวอย่างที่เดิมสารสกัดจากรำข้าวหอมนิล ความเข้มข้น 400 พีพีเอ็ม และชุดตัวอย่างที่เดิม BHT พบว่า มีปริมาณ TBARs ที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ระหว่างการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 15 วัน นั่นคือ ปริมาณ TBARs ค่อยๆ เพิ่มขึ้นจาก 0.246 ± 0.024 เป็น 1.402 ± 0.044 และ 0.242 ± 0.017 เป็น 1.303 ± 0.107 มิลลิกรัมมาโลนัลดีไฮด์ต่อกิโลกรัม ตามลำดับ

นอกจากนี้ ยังพบอิทธิพลร่วมระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดที่เดิม และระยะเวลาในการเก็บรักษาอีกด้วย (ตารางภาคผนวก ข-2)

จากผลการศึกษาดังกล่าว สรุปได้ว่า สารสกัดจากรำข้าวหอมนิล ความเข้มข้น 400 ถึง 600 พีพีเอ็ม สามารถใช้ทดแทนสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ หรือ BHT ความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในผลิตภัณฑ์กุ้งเชียงหมูได้ แต่อย่างไรก็ตาม การใช้สารสกัดจากรำข้าวหอมนิลอาจส่งผลกระทบต่อคุณลักษณะอื่นๆ เช่น สี หรือลักษณะปรากฏของผลิตภัณฑ์กุ้งเชียงหมู เนื่องจากสารสกัดมีสีเข้มเป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัว ดังนั้น จึงได้มีการศึกษาผลดังกล่าวในส่วนของการทดลองถัดไป



รูป 4.15 การเปลี่ยนแปลงค่า TBARs ของผลิตภัณฑ์กุ้งแช่แข็งระหว่างเก็บรักษา

4.4.2.2 การเปลี่ยนแปลงค่าสี (L^* , a^* และ b^*)

การเปลี่ยนแปลงสีของผลิตภัณฑ์กุ้งแช่แข็งทุกตัวอย่าง ถูกวัดติดตามด้วยเครื่องวัดสี (colorimeter รุ่น MINOLTA CR-300) แล้วรายงานผลเป็นค่าความสว่าง (L^*), ค่าสีแดง-เขียว (a^*) และค่าสีเหลือง-น้ำเงิน (b^*) ซึ่งแต่ละค่ามีการเปลี่ยนแปลง ดังนี้

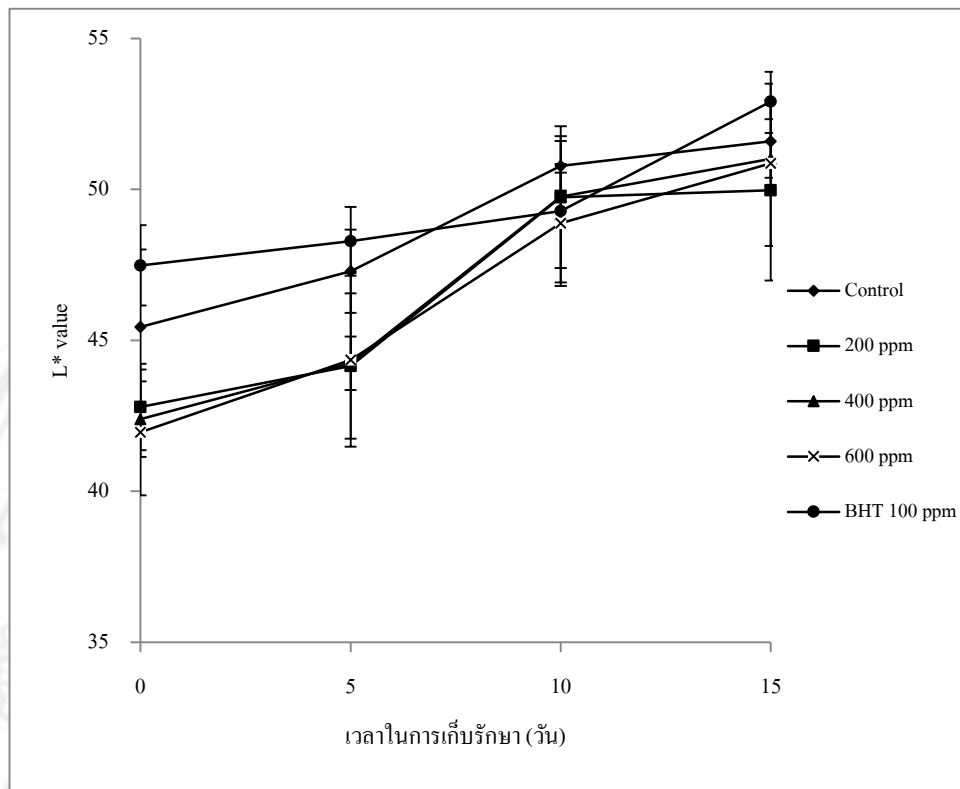
การเปลี่ยนแปลงค่าความสว่าง (L^*)

ตัวอย่างผลิตภัณฑ์กุ้งแช่แข็งหุ้ดควบคุม (ไม่เติมสารสกัด) และหุ้ดที่เติม BHT ความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม มีค่า L^* ใกล้เคียงกัน แต่เมื่อเติมสารสกัดจากร้าข้าวหอมมะลิลงไปในระดับ 200, 400 และ 600 พีพีเอ็ม จะทำให้ค่า L^* ลดลง โดยลดลงตามความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม ตัวอย่างที่เติมสารสกัดจากร้าข้าวหอมมะลิทั้ง 3 ความเข้มข้น มีค่า L^* ที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

การเปลี่ยนแปลงค่า L^* ของผลิตภัณฑ์กุ้งแช่แข็งหุ้ดเติมสารสกัดจากร้าข้าวหอมมะลิ ความเข้มข้น 0, 200, 400, 600 พีพีเอ็ม และเติมสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (BHT) ความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม ที่เก็บรักษาเป็นเวลา 15 วัน แสดงดังรูป 4.16 และตารางภาคผนวก ข-1 พบว่า ทั้ง

ปริมาณสารสกัดที่เดิม และระยะเวลาการเก็บรักษา มีผลต่อค่า L^* ของผลิตภัณฑ์กุ้งแช่แข็งหมูอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เนื่องจาก ทุกตัวอย่างมีค่า L^* เพิ่มขึ้น เมื่อระยะเวลาในการเก็บรักษาผ่านไป 15 วัน โดยตัวอย่างที่เดิม BHT มีค่า L^* สูงสุด เท่ากับ 47.48 ± 1.33 เพิ่มขึ้นเป็น 52.91 ± 0.59 ส่วนตัวอย่างที่เดิมสารสกัดจากรำข้าวหอมนิล พบว่า ค่า L^* ของทุกตัวอย่างมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเช่นกัน ชุดตัวอย่างที่ไม่เติมสารสกัดมีค่า L^* (45.44 ± 2.57 ถึง 51.59 ± 1.21) สูงกว่าชุดตัวอย่างที่เติมสารสกัด ความเข้มข้น 200, 400 และ 600 พีพีเอ็ม เนื่องจาก สารสกัดที่เดิมมีสีม่วงเข้มส่งผลทำให้ผลิตภัณฑ์กุ้งแช่แข็งหมูมีค่า L^* ที่ต่ำกว่า นั่นเอง สำหรับตัวอย่างที่เติมสารสกัด ความเข้มข้น 200, 400 และ 600 พีพีเอ็ม พบว่า ค่า L^* ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ค่า L^* ที่เพิ่มขึ้น หรือการที่ผลิตภัณฑ์มีสีซีดจางลง อาจเกิดจาก 3 ขั้นตอน คือ (1) สารไนไตรต์ที่เดิมลงไปเกิดการแตกตัวเปลี่ยนเป็นสารไนตริกออกไซด์ (nitricoxide) และรวมกับไมโอโกลบิน (myoglobin) หรือการที่รงควัตถุเมตามิโกลบิน (metmyoglobin) เกิดการรีดักชันหมู่ไนตริกออกไซด์ ได้เป็นสารสีแดงที่เรียกว่า ไนโตรซิลไมโอโกลบิน (nitrosylmyoglobin) ซึ่งไม่เสถียร (2) เมื่อรงควัตถุดังกล่าวอยู่ในสภาวะที่อุณหภูมิสูงประมาณ 54–60 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิอบกุ้งแช่แข็ง) จะทำให้ไนโตรซิลไมโอโกลบินเปลี่ยนเป็นรงควัตถุสีชมพูที่คงทนที่เรียกว่า ไนโตรโซฮีโมโครม (nitrosohemochrome) ซึ่งเป็นสีของผลิตภัณฑ์เนื้อทั่วไป แต่อย่างไรก็ตาม (3) ไนโตรโซฮีโมโครมเป็นรงควัตถุที่ไวต่อแสง และออกซิเจน จึงสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ง่าย ทำให้สีของผลิตภัณฑ์เนื้อเปลี่ยนเป็นสีเทาถึงไม่มีสีของรงควัตถุที่เรียกว่า ฮีโมโครม (hemochromes) (พัชรินทร์, 2555) นอกจากนี้ อาจเกิดจากการที่จุลินทรีย์ที่เหลือรอดระหว่างการผลิต สร้างสารพวกเปอร์-ออกไซด์ ซึ่งเป็นสารออกซิไดส์ (oxidizing agent) ที่รุนแรง ทำปฏิกิริยากับเมตามิโกลบิน ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของผลิตภัณฑ์ได้ (อุมาพร, 2556)

อย่างไรก็ตาม พบว่า อิทธิพลร่วมระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดที่เดิม และระยะเวลาในการเก็บรักษา ไม่มีผลต่อค่า L^* ของผลิตภัณฑ์กุ้งแช่แข็งหมูอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) (ตารางภาคผนวก ข-2)



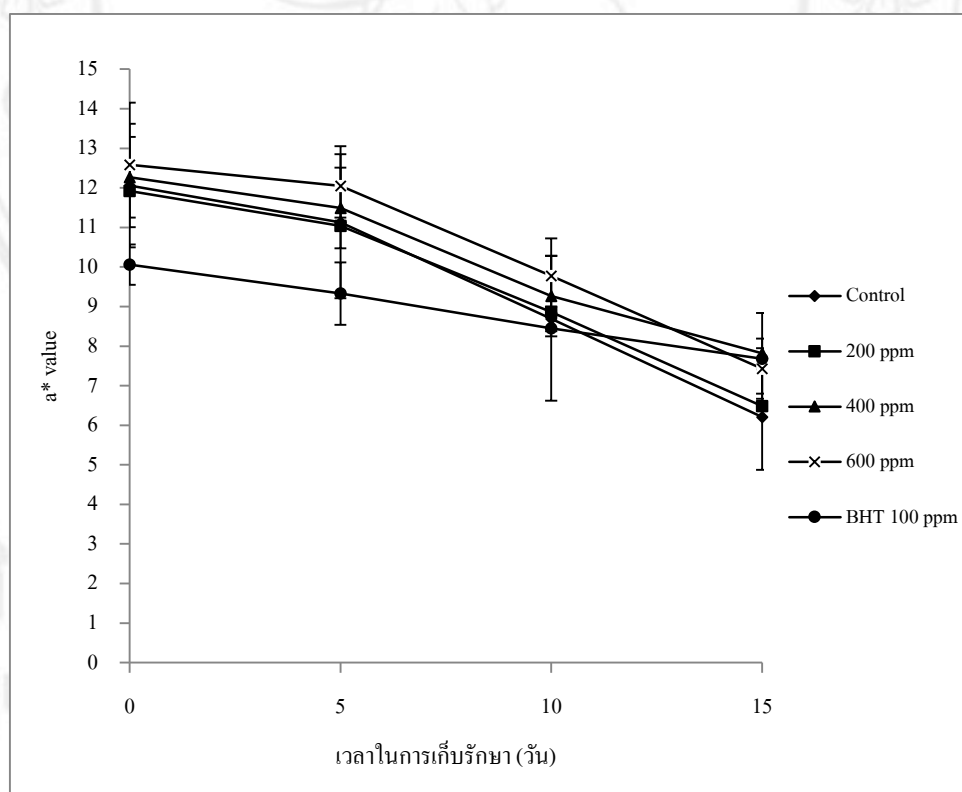
รูป 4.16 การเปลี่ยนแปลงค่าความสว่าง (L^*) ของผลิตภัณฑ์กุ้งแช่แข็งระหว่างเก็บรักษา

การเปลี่ยนแปลงค่าสีแดง-เขียว (a^*)

การเปลี่ยนแปลงค่า a^* ของผลิตภัณฑ์กุ้งแช่แข็งห่อเติมสารสกัดจากข้าวหอมนิล ความเข้มข้น 0, 200, 400, 600 พีพีเอ็ม และเติมสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (BHT) ความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม ที่เก็บรักษาเป็นเวลา 15 วัน แสดงดังรูป 4.17 และตารางภาคผนวก ข-1 พบว่า ทั้งปริมาณสารสกัดที่เติม และระยะเวลาการเก็บรักษา มีผลต่อค่า a^* ของผลิตภัณฑ์กุ้งแช่แข็งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยตัวอย่างที่เติม BHT ณ วันแรก มีค่า a^* ต่ำกว่าทุกตัวอย่าง เท่ากับ 10.06 ± 0.51 และค่อยๆ ลดลงถึง 7.68 ± 0.27 ณ วันสุดท้ายของการเก็บรักษา ในขณะที่ตัวอย่างที่เติมสารสกัด ความเข้มข้น 600 พีพีเอ็ม มีค่า a^* สูงที่สุด คือ 12.58 ± 1.57 รองลงมาคือ ตัวอย่างที่เติมสารสกัด ความเข้มข้น 400 พีพีเอ็ม มีค่า a^* เท่ากับ 12.27 ± 1.24 ณ วันแรกของการเก็บรักษา และมีแนวโน้มลดลงเหลือ 7.43 ± 0.76 และ 7.82 ± 0.40 ตามลำดับ สำหรับตัวอย่างที่เติมสารสกัด ความเข้มข้น 200 พีพีเอ็ม และตัวอย่างที่ไม่เติมสารสกัด พบว่า ค่า a^* ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา อย่างไรก็ตาม การที่ค่า a^* หรือสีแดงมีค่าลดลง อาจเกิดจากหลายสาเหตุ เช่น กระบวนการหมักไม่สมบูรณ์ เนื่องจากการเติมสารไนไตรท์

น้อยเกินไป (0.056 กรัม) มีรายงานว่า ในผลิตภัณฑ์แฟรงค์เฟิร์ตเตอร์ (frankfurter) สีชมพูของผลิตภัณฑ์จะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อสัมผัสกับออกซิเจนในสถานะที่มีแสงเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งออกซิเจนจะไปมีผลทำให้ไนโตรโซฮีโมโครมเกิดการออกซิเดชันไปเป็นสารประกอบอื่น นอกจากนี้ อาจเกิดจากการที่จุลินทรีย์ที่เหลืรอดระหว่างการผลิต สร้างสารพวกเปอร์ออกไซด์ ซึ่งเป็นสารออกซิไดส์ (oxidizing agent) ที่รุนแรง สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูลเฟอร์รัสในโครงสร้างวงแหวนพอไพรินของเม็คซีไมโอโกลบิน ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของผลิตภัณฑ์ได้ (อุมาพร, 2556) หรือ อาจเกิดจากการที่ไขมันมีค่าเปอร์ออกไซด์สูง มีผลทำให้ผลิตภัณฑ์มีสีที่ไม่คงทน (นิธิยา, 2548)

นอกจากนี้ ยังพบว่า อิทธิพลร่วมระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดที่เติม และระยะเวลาในการเก็บรักษา มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่า a^* เช่นกัน (ตารางภาคผนวก ข-2)

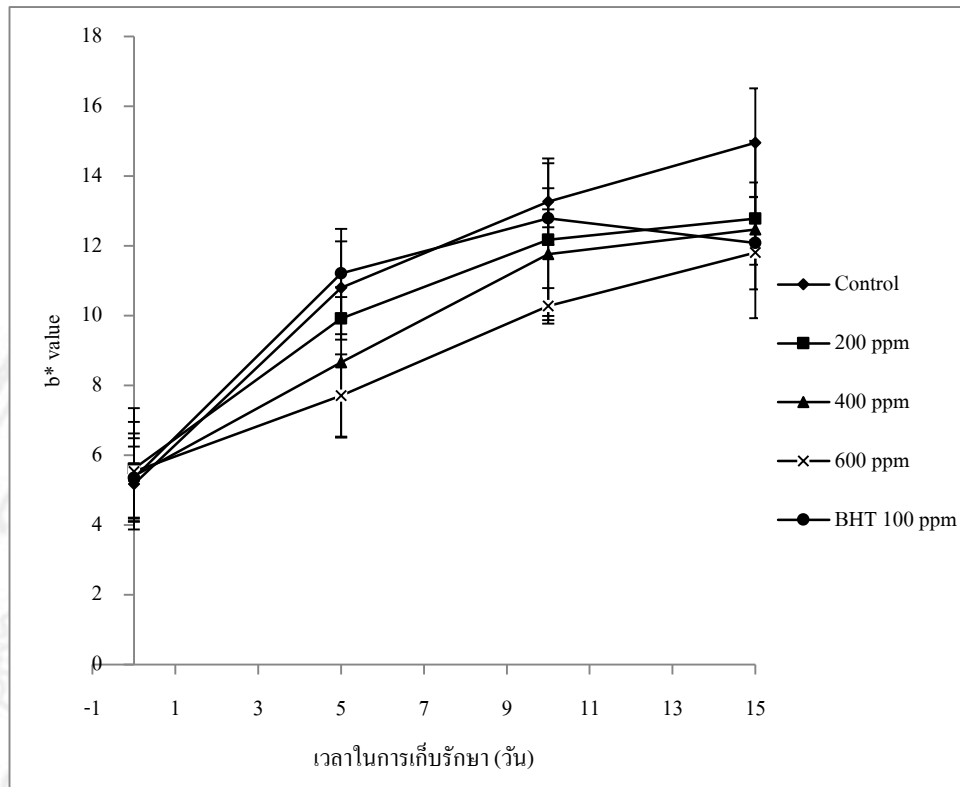


รูป 4.17 การเปลี่ยนแปลงค่าสีแดง-เขียว (a^*) ของผลิตภัณฑ์กุนเชียงหมูระหว่างเก็บรักษา

การเปลี่ยนแปลงค่าสีเหลือง-น้ำเงิน (b^*)

การเปลี่ยนแปลงค่า b^* ของผลิตภัณฑ์กุ้งแช่แข็งห่อเดิมสารสกัดจากรำข้าวหอมนิล ความเข้มข้น 0, 200, 400, 600 พีพีเอ็ม และเติมสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (BHT) ความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม ที่เก็บรักษาเป็นเวลา 15 วัน แสดงดังรูป 4.18 พบว่า ระยะเวลาการเก็บรักษา มีผลต่อค่า b^* ของผลิตภัณฑ์กุ้งแช่แข็งห่ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในขณะที่ปริมาณสารสกัดที่เติมไม่มีผลทำให้ค่า b^* ของแต่ละตัวอย่างแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) (ตารางภาคผนวก ข-1) ซึ่ง ณ วันแรกของการเก็บรักษา ค่า b^* ของทุกตัวอย่างไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่เมื่อระยะเวลาผ่านไป ค่า b^* จะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยตัวอย่างที่ไม่เติมสารสกัดจะมีค่า b^* สูงสุด อยู่ระหว่าง 5.71 ± 1.08 ถึง 14.96 ± 1.56 รองลงมาคือ ตัวอย่างที่เติมสารสกัด 200 พีพีเอ็ม มีค่า b^* อยู่ระหว่าง 5.61 ± 1.74 ถึง 12.78 ± 1.04 สำหรับตัวอย่างที่เติมสารสกัด 400 และ 600 พีพีเอ็ม มีค่า b^* อยู่ระหว่าง 5.40 ± 1.22 ถึง 12.47 ± 2.54 และ 5.53 ± 0.42 ถึง 11.81 ± 0.35 ตามลำดับ นอกจากนี้ พบว่า ตัวอย่างที่เติม BHT 100 พีพีเอ็ม จะมีค่า b^* จะสูงกว่าทุกตัวอย่างในช่วงการเก็บรักษา 5 วันแรก เท่ากับ 11.21 ± 1.28 และหลังจากนั้นจะเริ่มคงที่ (12.08 ± 1.33 ถึง 12.79 ± 0.26) จากแนวโน้มดังกล่าว แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่า สีของผลิตภัณฑ์กุ้งแช่แข็งห่อจะมีสีค่อนข้างเหลือง กล่าวคือ สีน้ำเงินเข้มของสารสกัดที่เติมลงไปมีสีจางลง เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้น เนื่องจาก แอนโทไซยานินสลายตัวในระหว่างการเก็บรักษา (Tananuwong *et al.*, 2008) ซึ่งผลดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับค่า L^* ที่เพิ่มขึ้น หรือการที่ผลิตภัณฑ์มีสีที่ซีดลงนั่นเอง

นอกจากนี้ อิทธิพลร่วมระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดที่เติม และระยะเวลาในการเก็บรักษา ยังส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่า b^* นี้ด้วย (ตารางภาคผนวก ข-2)



รูป 4.18 การเปลี่ยนแปลงค่าสีเหลือง-น้ำเงิน (b^*) ของผลิตภัณฑ์กุ้งเชียงห่มระหว่างเก็บรักษา

4.4.2.3 การเปลี่ยนแปลงค่า a_w ที่ป็นประโยชน์ (water activity, a_w)

การเปลี่ยนแปลงค่า a_w ของผลิตภัณฑ์กุ้งเชียงห่มเติมสารสกัดจากร้าขาวหอมนิล ความเข้มข้น 0, 200, 400, 600 พีพีเอ็ม และเติมสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (BHT) ความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม ที่เก็บรักษาเป็นเวลา 15 วัน แสดงดังตาราง 4.9

ตาราง 4.9 การเปลี่ยนแปลงค่า a_w ของผลิตภัณฑ์กุ้งเชียงห่มระหว่างเก็บรักษา

สิ่งทดลอง	ระยะเวลาการเก็บรักษา (วัน)			
	0	5	10	15
ตัวอย่างควบคุม (0 พีพีเอ็ม)	0.857±0.005 ^a	0.838±0.006 ^b	0.816±0.003 ^c	0.810±0.006 ^d
เติมสารสกัด 200 พีพีเอ็ม	0.856±0.004 ^a	0.839±0.010 ^b	0.821±0.003 ^c	0.813±0.006 ^d
เติมสารสกัด 400 พีพีเอ็ม	0.860±0.016 ^a	0.839±0.010 ^b	0.819±0.002 ^c	0.810±0.006 ^d
เติมสารสกัด 600 พีพีเอ็ม	0.857±0.007 ^a	0.840±0.003 ^b	0.817±0.003 ^c	0.809±0.004 ^d
เติม BHT 100 พีพีเอ็ม	0.857±0.007 ^a	0.836±0.006 ^b	0.820±0.005 ^c	0.808±0.006 ^d

ตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละแถว แสดงถึงค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

จากการศึกษา พบว่า ระยะเวลาการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์กุ้งเชียงใหม่มีผลทำให้ค่า a_w ของแต่ละตัวอย่างมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยที่ ณ วันแรกของการเก็บรักษา ค่า a_w ของตัวอย่างอยู่ระหว่าง 0.856 ± 0.004 ถึง 0.860 ± 0.016 และมีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่อง เมื่อถึงวันสุดท้ายของการเก็บรักษา พบว่า ค่า a_w ลดลงเหลือ 0.808 ± 0.006 ถึง 0.813 ± 0.006 ซึ่งตัวอย่างที่เติม BHT 100 พีพีเอ็ม มีค่า a_w ต่ำที่สุด แนวโน้มดังกล่าว แสดงให้เห็นว่าระยะเวลาในการเก็บรักษาที่นานขึ้น มีผลทำให้ค่า a_w ลดลง ส่วนปริมาณสารสกัดที่เติมลงไป และอิทธิพลร่วมกับระยะเวลาการเก็บรักษานั้น ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่า a_w อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางภาคผนวก ข-2)

ค่า a_w ที่ลดลงในแต่ละตัวอย่างอาจเกิดจากหลายสาเหตุ เช่น บรรจุภัณฑ์ที่ใช้ คือ ถุงพลาสติกชนิดโพลีเอทิลีน ใอน้ำจึงสามารถซึมผ่านได้ ดังนั้น ในสภาวะบรรยากาศปกติที่ความชื้นต่ำกว่าความชื้นในอาหาร จะเกิดการเคลื่อนที่ของน้ำไปยังบรรยากาศรอบได้ๆ ซึ่งมีผลทำให้ a_w ในอาหารลดลง นอกจากนี้ น้ำอิสระบางส่วนจะถูกใช้ไปเพื่อการเจริญเติบโตหรือ เมตาบอลิซึมต่างๆ ของจุลินทรีย์บางกลุ่มที่เหลืรอดจากกระบวนการผลิต เป็นต้น (วิไล, 2545)

อย่างไรก็ตาม การที่ค่า a_w ของแต่ละตัวอย่างมีค่าแตกต่างกันไปนั้น อาจเกิดจากปัจจัยภายนอกอีกหลายปัจจัย เช่น ในระหว่างการอบ ผลิตภัณฑ์ทดสอบแต่ละชิ้นได้รับความร้อนที่ไม่สม่ำเสมอ ทำให้ปริมาณความชื้น และน้ำอิสระภายในผลิตภัณฑ์ทดสอบมีค่าต่างกัน เป็นต้น

4.4.2.4 ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัส

ผลจากการทดสอบทางประสาทสัมผัสผลิตภัณฑ์กุ้งเชียงใหม่เดิมสารสกัดจากร้าข้าวหอมนิล และ BHT ด้วยผู้ทดสอบจำนวน 30 คน ใน 4 คุณลักษณะ ได้แก่ ความชอบด้านสี กลิ่น ลักษณะปรากฏ และการยอมรับโดยรวม โดยใช้ 7-point hedonic scale ได้ผลดังนี้

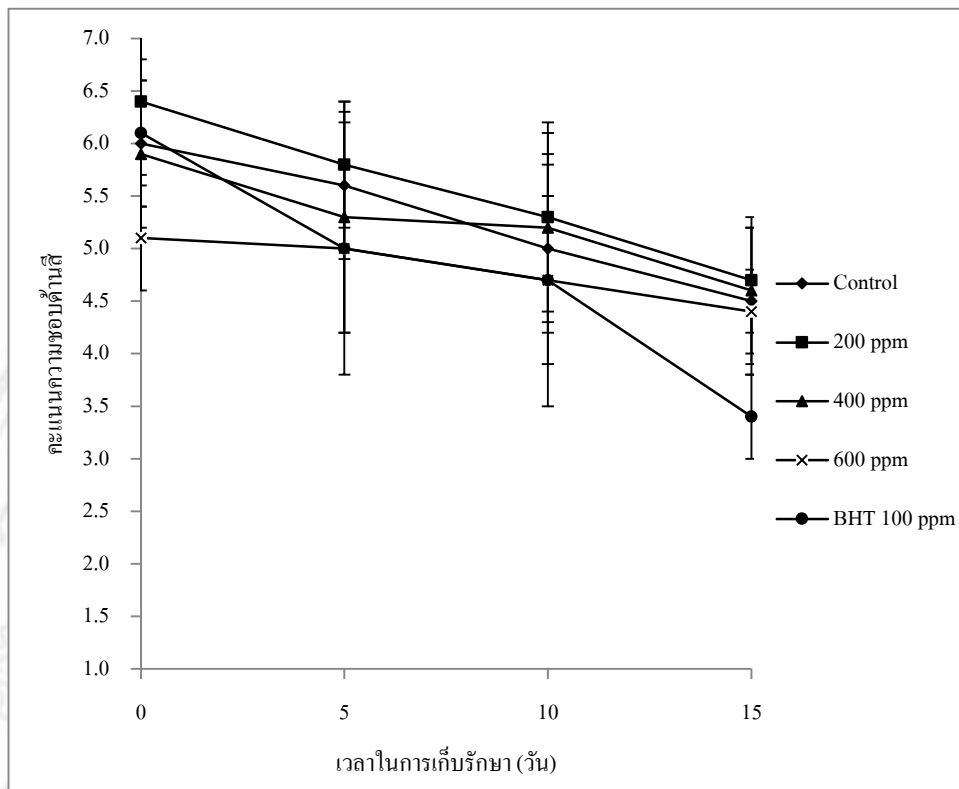
ความชอบด้านสีของผลิตภัณฑ์

การเปลี่ยนแปลงค่าคะแนนความชอบด้านสีของผลิตภัณฑ์กุ้งเชียงใหม่เดิมสารสกัดจากร้าข้าวหอมนิล ความเข้มข้น 0, 200, 400, 600 พีพีเอ็ม และเดิมสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (BHT) ความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม ที่เก็บรักษาเป็นเวลา 15 วัน แสดงดังรูป 4.19 และตารางภาคผนวก ข-3 พบว่า ปริมาณสารสกัดที่เติม และระยะเวลาในการเก็บรักษามีผลต่อคะแนนความชอบด้านสีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) คือ เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้นจะทำให้คะแนนความชอบด้านสีลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยตัวอย่างที่เติมสารสกัด ความเข้มข้น 200 พีพีเอ็ม มีค่าคะแนนความชอบด้านสีสูงสุดตลอดระยะเวลาในการเก็บรักษา คือ 6.4 ± 0.7 และค่อยๆ ลดลงถึง

4.7 ± 0.5 ในวันสุดท้ายของการเก็บรักษา รองลงมา คือ ตัวอย่างที่ไม่เติมสารสกัด และตัวอย่างที่เติมสารสกัด 400 และ 600 พีพีเอ็ม ตามลำดับ สำหรับตัวอย่างที่เติม BHT ผู้ทดสอบให้คะแนนความชอบด้านสีในวันแรกมีค่าสูงเป็นอันดับสอง เท่ากับ 6.1 ± 0.7 จากนั้น มีแนวโน้มลดลงอย่างรวดเร็วในหลังจากเก็บรักษาเพียง 5 วัน (5.0 ± 1.2) และมีคะแนนความชอบต่ำสุดในวันที่ 15 เท่ากับ 3.4 ± 0.4 แสดงให้เห็นว่า เมื่อเก็บรักษาผลิตภัณฑ์นานขึ้น ค่าคะแนนความชอบด้านสีจะลดลงอย่างเห็นได้ชัด เนื่องจากผลิตภัณฑ์กุนเชียงเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีองค์ประกอบของไขมันสูง ปฏิกริยาทางเคมีต่างๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการผลิต และเก็บรักษาย่อมส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของผลิตภัณฑ์

นอกจากนี้ อิทธิพลร่วมระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดที่เติม และระยะเวลาในการเก็บรักษา ยังส่งผลต่อค่าคะแนนความชอบด้านสีของผู้ทดสอบ (ตารางภาคผนวก ข-4)

จากผลการศึกษาดังกล่าว สามารถสรุปได้ว่า ผู้ทดสอบให้การยอมรับคุณลักษณะด้านสีของผลิตภัณฑ์กุนเชียงหมูที่เติมสารสกัดจากร้าข้าวหอมนิล ความเข้มข้น 200 พีพีเอ็ม ณ วันแรกของการเก็บรักษามากที่สุด ซึ่งตัวอย่างดังกล่าวมีค่า L^* , a^* และ b^* เท่ากับ 42.79 ± 1.43 , 11.92 ± 1.07 และ 5.61 ± 1.74 ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตาม ณ วันสุดท้ายของการเก็บรักษา ผู้ทดสอบยังให้การยอมรับด้านสีของทุกตัวอย่าง ยกเว้นตัวอย่างที่เติม BHT ความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม เนื่องจาก ตัวอย่างดังกล่าวมีสีซีดกว่าตัวอย่างอื่นๆ อย่างชัดเจน ซึ่งมีความสัมพันธ์กับค่าความสว่าง (L^*) ที่มีค่าสูงสุด เท่ากับ 52.91 ± 0.59 จึงทำให้ตัวอย่างดังกล่าวได้คะแนนการยอมรับด้านสีเพียง 3.4 ± 0.4 คะแนน



รูป 4.19 การเปลี่ยนแปลงค่าคะแนนความชอบด้านสีของผลิตภัณฑ์กุนเชียงหมูระหว่างเก็บรักษา

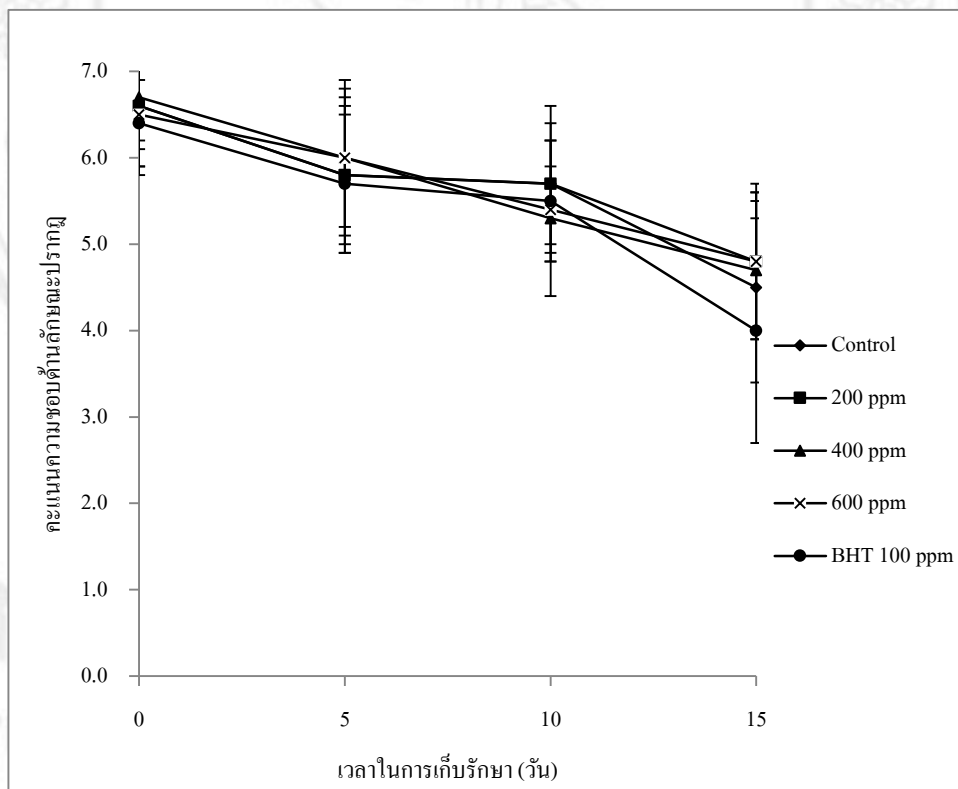
ความชอบด้านลักษณะปรากฏของผลิตภัณฑ์

การเปลี่ยนแปลงค่าคะแนนความชอบด้านลักษณะปรากฏของผลิตภัณฑ์กุนเชียงหมูเดิมสารสกัดจากรำข้าวหอมนิล ความเข้มข้น 0, 200, 400, 600 พีพีเอ็ม และเดิมสารแอนติออกซิแดนท์สังเคราะห์ (BHT) ความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม ที่เก็บรักษาเป็นเวลา 15 วัน แสดงดังรูป 4.20 และตารางภาคผนวก ข-3 พบว่า ปริมาณสารสกัดที่เติม และระยะเวลาในการเก็บรักษามีผลต่อคะแนนความชอบด้านลักษณะปรากฏอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) คุณลักษณะนี้ผู้ทดสอบใช้ทักษะการสังเกตทั้งสี ความแน่นเนื้อ ลักษณะผิวหน้าของตัวอย่าง เป็นเกณฑ์ในการให้คะแนนพบว่า ณ วันแรกของการเก็บรักษา ผู้ทดสอบให้ค่าคะแนนความชอบด้านลักษณะปรากฏที่ใกล้เคียงกันทุกตัวอย่าง แต่เมื่อทำการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 5 วัน คะแนนความชอบต่อคุณลักษณะดังกล่าวมีแนวโน้มลดลงในทุกตัวอย่าง แต่ตัวอย่างที่มีคะแนนสูงสุดคือ ตัวอย่างที่เติมสารสกัด 400 และ 600 พีพีเอ็ม เท่ากับ 6.0 ± 0.8 และ 6.0 ± 0.9 ตามลำดับ ซึ่งคะแนนความชอบของทั้งสองตัวอย่างนี้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) รองลงมา คือ ตัวอย่างที่เติมสารสกัด 0 และ 200 พีพีเอ็ม

นอกจากนี้ ตัวอย่างที่เติม BHT มีคะแนนความชอบด้านลักษณะปรากฏน้อยที่สุดตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา และมีค่าต่ำสุด เท่ากับ 4.0 ± 1.3 ณ วันสุดท้ายของการเก็บรักษา ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการที่ผู้ทดสอบสังเกตเห็นของเหลวคล้ายน้ำมันบริเวณผิวหน้าตัวอย่าง และสีของตัวอย่างดังกล่าวชัดเจนกว่าทุกตัวอย่างทดสอบ ซึ่งสอดคล้องกับค่า L^* ที่มีค่าสูงสุด

อย่างไรก็ตาม อิทธิพลร่วมระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดที่เติม และระยะเวลาในการเก็บรักษา ไม่มีผลต่อค่าคะแนนความชอบด้านลักษณะปรากฏอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) (ตารางภาคผนวก ข-4)

จากผลการศึกษาดังกล่าว สังเกตได้ว่า ผู้ทดสอบยังให้การยอมรับคุณลักษณะด้านลักษณะปรากฏของผลิตภัณฑ์กุนเชียงหมูที่เติม และไม่เติมสารสกัดจากร้าข้าวหอมนิล ณ วันสุดท้ายของการเก็บรักษา ยกเว้นตัวอย่างที่เติม BHT



รูป 4.20 การเปลี่ยนแปลงค่าคะแนนความชอบด้านลักษณะปรากฏของผลิตภัณฑ์กุนเชียงหมูระหว่างเก็บรักษา

ความชอบด้านกลิ่นของผลิตภัณฑ์

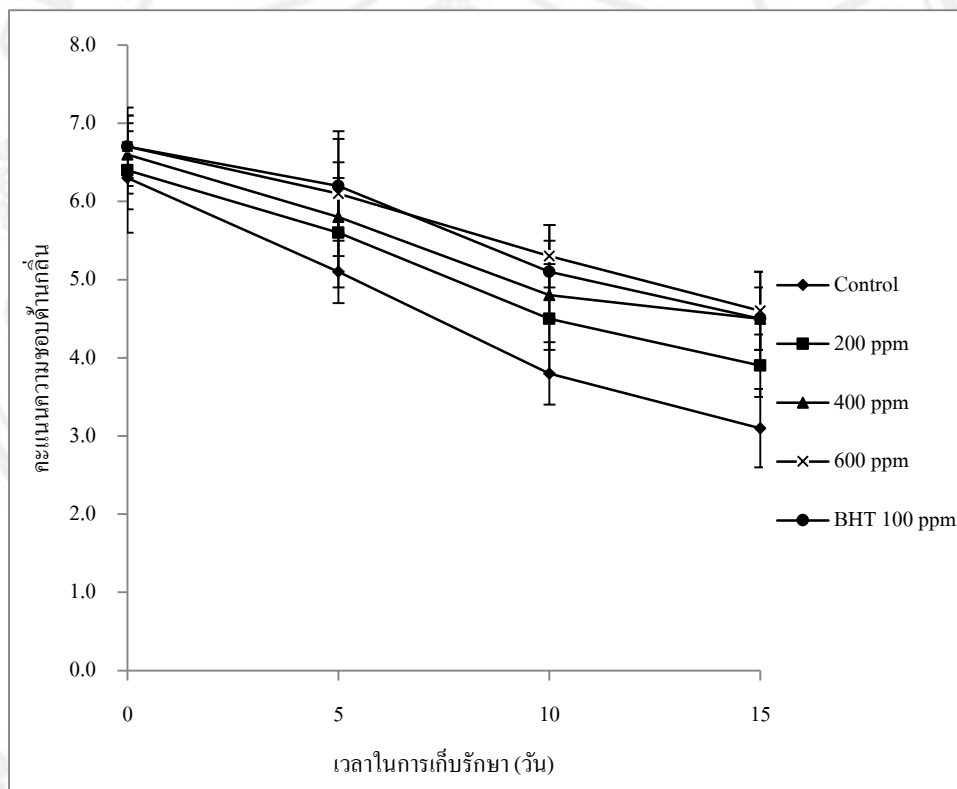
การเปลี่ยนแปลงค่าคะแนนความชอบด้านกลิ่นของผลิตภัณฑ์กุนเชียงหมูเติมสารสกัดจากร้าข้าวหอมนิล ความเข้มข้น 0, 200, 400, 600 พีพีเอ็ม และเติมสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (BHT) ความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม ที่เก็บรักษาเป็นเวลา 15 วัน แสดงดังรูป 4.21 และตารางภาคผนวก ข-3 พบว่า ปริมาณสารสกัดที่เติม และระยะเวลาในการเก็บรักษามีผลต่อคะแนนความชอบด้านกลิ่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เนื่องจาก เมื่อระยะเวลาในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์นานขึ้น จะมีผลทำให้ค่าคะแนนความชอบด้านกลิ่นลดลง เช่นเดียวกับผลของปริมาณสารสกัดที่เติม คือ ตัวอย่างที่เติมสารสกัดปริมาณในปริมาณน้อย จะส่งผลให้มีค่าคะแนนความชอบด้านกลิ่นน้อยด้วยเช่นกัน เมื่อพิจารณาวันแรกของการทดสอบ เห็นได้ว่า คะแนนความชอบด้านกลิ่นมีค่าสูงมาก ประมาณ 6.3 ± 0.7 ถึง 6.7 ± 0.4 เนื่องจาก ไหม้นในตัวอย่างยังไม่เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันมากนัก (มีปริมาณ TBARs ต่ำกว่า 0.5 มิลลิกรัมมาโลนัลดีไฮด์ต่อกิโลกรัม) ซึ่งตัวอย่างที่เติมสารสกัด 600 พีพีเอ็ม และเติม BHT 100 พีพีเอ็ม มีคะแนนสูงที่สุด และไม่มี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

หลังจากการเก็บรักษา 5 วันแรก พบว่า ค่าคะแนนความชอบด้านกลิ่นของทุกตัวอย่างมีแนวโน้มลดลงอย่างเห็นได้ชัด โดยเฉพาะตัวอย่างที่ไม่เติมสารสกัด มีค่าคะแนนความชอบด้านกลิ่นลดลงเหลือเพียง 5.1 ± 0.4 เนื่องจาก ปริมาณ TBARs ของตัวอย่างนี้เพิ่มขึ้นเป็น 1.086 ± 0.132 มิลลิกรัมมาโลนัลดีไฮด์ต่อกิโลกรัม ซึ่งเป็นระดับที่ผู้ทดสอบเริ่มรับรู้ได้ถึงกลิ่นหืน (Menegas *et al.*, 2013) ในขณะที่ตัวอย่างอื่นๆ ค่าคะแนนความชอบลดลงเล็กน้อย เนื่องจากผู้ทดสอบยังไม่ได้กลิ่นหืนที่ชัดเจน (TBARs ต่ำกว่า 0.7 มิลลิกรัมมาโลนัลดีไฮด์ต่อกิโลกรัม) จนกระทั่งวันที่ 10 ของการเก็บรักษา พบว่า ค่าคะแนนความชอบของทุกตัวอย่างลดลงอย่างรวดเร็ว โดยตัวอย่างที่ไม่เติมสารสกัดมีคะแนนต่ำสุด เนื่องจากค่า TBARs ของตัวอย่างนี้สูงถึง 3.050 ± 0.109 มิลลิกรัมมาโลนัลดีไฮด์ต่อกิโลกรัม ซึ่งอยู่ในระดับที่ผู้บริโภคไม่ยอมรับ (วนิดา, 2545) ส่วนตัวอย่างที่เติมสารสกัด 600 พีพีเอ็ม มีค่าคะแนนความชอบด้านกลิ่นสูงที่สุด เท่ากับ 5.3 ± 0.05 รองลงมา คือ ตัวอย่างที่เติม BHT ตัวอย่างที่เติมสารสกัด 400 และ 200 พีพีเอ็ม ซึ่งมีค่าคะแนนความชอบ เท่ากับ 5.1 ± 0.6 , 4.8 ± 0.4 และ 4.5 ± 0.7 ตามลำดับ

ณ วันสุดท้ายของการเก็บรักษา พบว่า ตัวอย่างที่เติมสารสกัด ความเข้มข้น 400, 600 พีพีเอ็ม และ ตัวอย่างที่เติม BHT มีค่าคะแนนความชอบสูงสุดซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) รองลงมาคือ ตัวอย่างที่เติมสารสกัด 200 พีพีเอ็ม และตัวอย่างที่ไม่เติมสารสกัด ตามลำดับ

อย่างไรก็ตาม อิทธิพลร่วมระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดที่เดิม และระยะเวลาในการเก็บรักษา ยังส่งผลต่อค่าคะแนนความชอบด้านกลิ่นของผลิตภัณฑ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางภาคผนวก ข-4)

จากผลการศึกษาดังกล่าว สามารถสรุปได้ว่า สามารถใช้สารสกัดจากรำข้าวหอม นิล ความเข้มข้น 400 ถึง 600 พีพีเอ็ม ทดแทนการใช้สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (BHT) ได้ เนื่องจาก ผู้ทดสอบยังให้การยอมรับคุณลักษณะด้านกลิ่นของผลิตภัณฑ์กุนเชียงหมูชุดดังกล่าว ณ วันสุดท้ายของการเก็บรักษา



รูป 4.21 การเปลี่ยนแปลงค่าคะแนนความชอบด้านกลิ่นของผลิตภัณฑ์กุนเชียงหมูระหว่างเก็บรักษา

ความการยอมรับโดยรวมของผลิตภัณฑ์

การเปลี่ยนแปลงค่าคะแนนการยอมรับโดยรวมของผลิตภัณฑ์กุนเชียงหมูเติมสารสกัดจากรำข้าวหอม นิล ความเข้มข้น 0, 200, 400, 600 พีพีเอ็ม และเติมสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (BHT) ความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม ที่เก็บรักษาเป็นเวลา 15 วัน แสดงดังรูป 4.22 และ ตารางภาคผนวก ข-3 พบว่า ปริมาณสารสกัดที่เดิม และระยะเวลาในการเก็บรักษามีผลต่อคะแนน

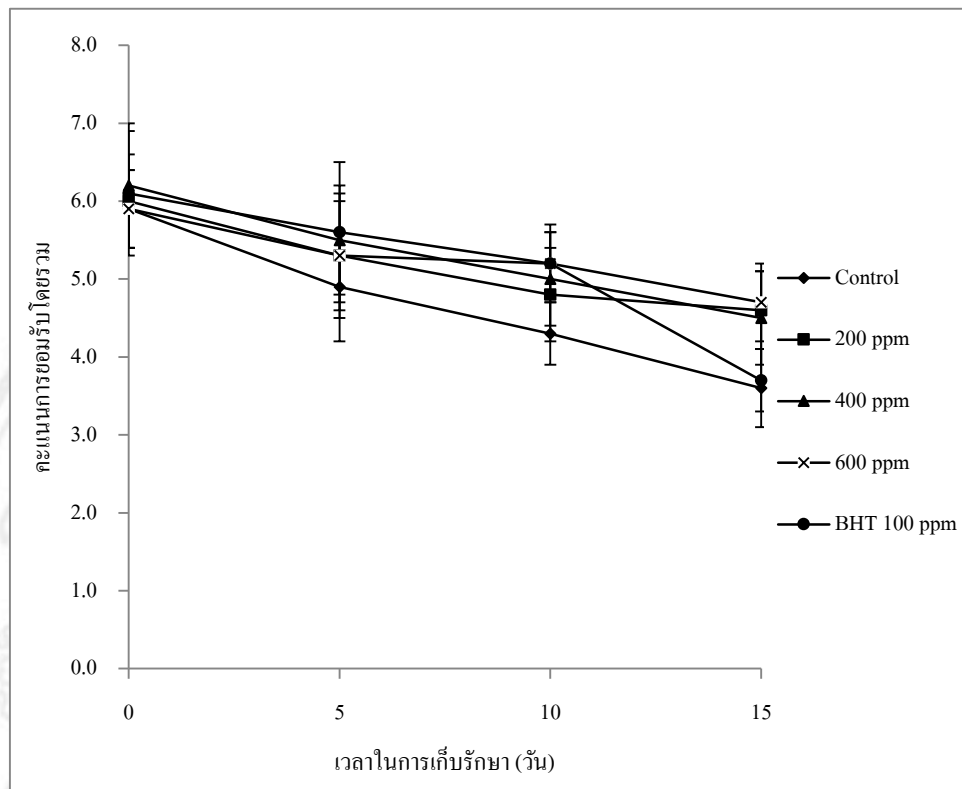
การยอมรับโดยรวมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เนื่องจาก ระยะเวลาการเก็บที่นานขึ้น ส่งผลให้คะแนนการยอมรับโดยรวมมีแนวโน้มลดลง ส่วนผลของปริมาณสารสกัดที่เดิม พบว่า การทดสอบวันแรก ผู้ทดสอบให้คะแนนการยอมรับโดยรวมของตัวอย่างที่เดิมสารสกัด 400 พีพีเอ็ม สูงที่สุด เท่ากับ 6.2 ± 0.8 รองลงมา คือ ตัวอย่างที่เดิม BHT มีคะแนนความชอบ เท่ากับ 6.1 ± 0.8 สำหรับตัวอย่างที่ไม่ได้เติมสารสกัด และที่เติมสารสกัด ความเข้มข้น 200 และ 600 พีพีเอ็ม มีคะแนนความชอบที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

หลังจากการเก็บรักษาช่วง 5 ถึง 15 วัน พบว่า ตัวอย่างที่ไม่ได้เติมสารสกัด มีคะแนนต่ำที่สุด และลดลงจนถึง 3.6 ± 0.5 ซึ่งอยู่ในระดับที่ผู้บริโภคไม่ยอมรับ เช่นเดียวกับ ตัวอย่างที่เติม BHT ซึ่งมีค่าคะแนนการยอมรับโดยรวมลดลงอย่างรวดเร็วจนถึง 3.7 ± 0.4 สำหรับตัวอย่างที่เติมสารสกัด ความเข้มข้น 200, 400 และ 600 พีพีเอ็ม นั้น ผู้ทดสอบยังให้การยอมรับได้ มีคะแนนเท่ากับ 4.6 ± 0.5 , 4.5 ± 0.6 และ 4.7 ± 0.5 ตามลำดับ ซึ่งค่าคะแนนดังกล่าว ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

อย่างไรก็ตาม อิทธิพลร่วมระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดที่เติม และระยะเวลาในการเก็บรักษา ยังส่งผลต่อค่าคะแนนการยอมรับโดยรวมของผลิตภัณฑ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางภาคผนวก ข-4)

จากผลการศึกษาดังกล่าว สามารถสรุปได้ว่า สามารถใช้สารสกัดจากรำข้าวหอมชนิด ความเข้มข้น 200-600 พีพีเอ็ม ในผลิตภัณฑ์กุนเชียงหมูได้ เนื่องจากช่วงความเข้มข้นดังกล่าวมีคะแนนการยอมรับโดยรวมจากผู้บริโภคสูงที่สุด

เมื่อพิจารณาผลของการใช้สารสกัดจากรำข้าวที่ความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกับการใช้สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (BHT) ที่มีต่อคุณลักษณะทางเคมี และประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์กุนเชียงหมู พบว่า การใช้สารสกัดจากรำข้าวหอมชนิด ความเข้มข้น 400 และ 600 พีพีเอ็ม มีความเหมาะสมมากที่สุด เนื่องจาก สามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ใกล้เคียงกับ BHT (พิจารณาจากปริมาณ TBARs) อีกทั้งยังมีค่าคะแนนความชอบของการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านสี ลักษณะปรากฏ กลิ่นหืน และการยอมรับโดยรวมที่สูง และเป็นที่ยอมรับของผู้ทดสอบ



รูป 4.22 การเปลี่ยนแปลงค่าคะแนนการยอมรับโดยรวมของผลิตภัณฑ์กุ้งเชียงห่มระหว่างเก็บรักษา

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบ

- 3.1.1 ข้าวพันธุ์หอมนิล (สถานีวิจัยเกษตรเขตชลประทาน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่)
- 3.1.2 เนื้อหมูแดง ไขมันหมู น้ำตาล แป้งมันสำปะหลัง และ เกลือ (ห้างสรรพสินค้าแม็คโคร)
- 3.1.3 ผงเพรค และอิริทอร์เบต (ร้านปิ่นทิพย์, เชียงใหม่)
- 3.1.4 ไข่เทียม (ร้านปิ่นทิพย์, เชียงใหม่)

3.2 สารเคมี

- 3.2.1 สารมาตรฐานแกมมา-ออริซานอล (γ -Oryzanol standard, Oryza Oil & Chemicals, Japan)
- 3.2.2 สารมาตรฐานแอลฟา-โทโคฟีรอล (α -Tocopherol standard, Sigma-Aldrich, USA)
- 3.2.3 กรดแกลลิก (Gallic acid, Sigma-Aldrich, USA)
- 3.2.4 บิวทิลเลต ไฮดรอกซีโทลูอิน (Butylated hydroxytoluene, RFCL, India)
- 3.2.5 กรดไทโอบาบิทูริก (Thiobarbituric Acid, Sigma-Aldrich, USA)
- 3.2.6 เมทานอล เอทานอล และเอทิลอะซิเตต (Methanol, ethanol and ethyl acetate, AR Grade, RCI Labscan, Thailand)
- 3.2.7 เมทานอล อะซิโตรไนล์ ไตรล และไอโซโพรพานอล (Methanol, acetonitrile and isopropanol, HPLC Grade, RCI Labscan, Thailand)
- 3.2.8 สารละลายโฟลีน (Folin-Ciocateu reagent, Merk, Germany)
- 3.2.9 น้ำกลั่น (Distilled water, RCI Labscan, Thailand)
- 3.2.10 DPPH radical (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, Sigma, Germany)
- 3.2.11 โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate, RFCL, India)
- 3.2.12 กรดลิโนเลอิก (Linoleic acid, Sigma-Aldrich, USA)
- 3.2.13 ทวิน 20 (Tween 20, Sigma, Germany)

3.2.14 โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Sodium dihydrogen phosphate, NaH_2PO_4 , QReC, Newzealand)

3.2.15 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Disodium hydrogen phosphate, Na_2HPO_4 , QReC, Newzealand)

3.2.16 โพแทสเซียมคลอไรด์ (Potassium chloride, KCl, Merk, Germany)

3.2.17 โซเดียมอะซิเตทไตรไฮเดรต (Sodium acetate trihydrate, $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, LOBA, India)

3.2.18 กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid, HCl, RCI Labscan, Thailand)

3.2.19 กรดอะซิติก (Acetic acid, CH_3COOH , Merk, Germany)

3.2.20 เฟอโรซีน (Ferrozine, Sigma-Aldrich, USA)

3.2.21 ไอรอนคลอไรด์เตตระไฮเดรต (Iron (II) chloride tetrahydrate, $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich, USA)

3.2.22 กรดเอทิลีนไดเอมีนเตตระอะซิติก (Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA, Sigma-Aldrich, USA)

3.3 อุปกรณ์ และเครื่องมือ

3.3.1 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (2 decimal point analytical balance, ARC120, USA)

3.3.2 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (4 decimal point analytical balance, A1205 Germany)

3.3.3 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer, Biomate5, England)

3.3.4 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter, AD-35-0620, China)

3.3.5 เครื่องวัดสี (Colorimeter, Minolta CR-400, Japan)

3.3.6 เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid

Chromatography, Shimadzu, Japan)

3.3.7 เครื่องกลั่นระเหยระบบสุญญากาศ (Rotary Evaporator)

3.3.8 เตาให้ความร้อน (Furnace, Carbolite, England)

3.3.9 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven, Memmert, Germany)

3.3.10 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath, Memmert, Germany)

3.3.11 เทอร์โมมิเตอร์ (Thermometer, 11063, Delta Trak Inc., USA)

3.3.12 โถดูดความชื้น (Desiccators)

3.3.13 กระป๋องอบความชื้น (Moisture can)

3.3.14 เครื่องปิดผนึก (PFS-300, China)

3.3.15 เครื่องกะเทาะเปลือก และขัดสี (สาขาวิชาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่)

3.3.16 ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำกว่า -18 องศาเซลเซียส (HCFC28-2, Thailand)

3.3.17 เครื่องตีส่วนผสม (5K5SS, USA)

3.3.18 เครื่องโสมจิไนซ์ (RW20D, Thailand)

3.3.18 ชุดกลั่นด้วยไอน้ำ

3.3.19 อุปกรณ์อื่นๆ เช่น ซ้อนดักสาร ปีกเกอร์ ขวดรูปชมพู่ กระบอกตวง ไมโครปิเปต บิวเรต กรวยแก้ว ขวดวัดปริมาตร หลอดทดลอง แท่งแก้วคนสาร กระดาษฟลอยด์ กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และ 4 ตะแกรงร่อน ขนาด 20 meshes และพาราฟิน เป็นต้น

3.4 วิธีการทดลอง

วิธีการทดลองแบ่งออกเป็น 4 ตอน มีรายละเอียด ดังนี้

ตอนที่ 1 การเลือกตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด

ศึกษาการใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ เมทานอล เอทานอล และเอทิลอะซิเตทในการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด แกมมา-ออร์ซานอล แอลฟา-โทโคฟีรอล และแอนโทไซยานิน

นำรำข้าวหอมนิลที่ผ่านการร่อนด้วยตะแกรงขนาด 20 meshes จำนวน 10 กรัม มาสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ข้างต้น ปริมาตร 200 มิลลิลิตร และเขย่าในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เวลา 1 ชั่วโมง แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำส่วนของรำที่เหลืออยู่บนกระดาษกรองไปสกัดซ้ำอีกครั้ง สารสกัดที่ได้จะถูกกำจัดตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ซึ่งน้ำหนักและหาร้อยละผลผลิตที่ได้ (% yield) จากนั้น ละลายสารสกัดหยาบ และปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 50 มิลลิลิตร ด้วยเมทานอล (HPLC Grade) ก่อนนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ (ภาคผนวก ก) ดังนี้

- สารแกมมา-ออร์ซานอล และแอลฟา-โทโคฟีรอล วิเคราะห์โดยใช้เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

- สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดวิเคราะห์โดยทำปฏิกิริยากับ Folin-Ciocalteu reagent แล้วคำนวณในรูปมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก และ

- สารแอนโทไซยานิน วิเคราะห์โดยวิธี pH differential

นอกจากนี้ สกัดดังกล่าวจะถูกนำไปทดสอบเพื่อหาค่าความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการกำจัดอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (EC_{50}) ด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity

ขั้นตอนนีวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำข้อมูลไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Rang Test (DMRT)

ตอนที่ 2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระ

หาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากรำข้าวหอมนิล โดยใช้วิธีโครงร่างพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology, RSM) วางแผนการทดลองแบบ CCD (Central Composite Design) ทำซ้ำที่จุดกึ่งกลาง 5 ซ้ำ โดยศึกษา 3 ปัจจัย ได้แก่ ความเข้มข้นของตัวทำละลายในน้ำ อัตราส่วนของตัวทำละลายต่อรำข้าว และระยะเวลาในการสกัด แต่ละปัจจัยศึกษาที่ 5 ระดับ รายละเอียดแสดงดังตาราง 3.1 และแผนการทดลองสำหรับหาสภาวะในการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระ แสดงดังตาราง 3.2

ตาราง 3.1 ปัจจัย และระดับของปัจจัยที่ใช้ศึกษา

ปัจจัย	สัญลักษณ์	ระดับของปัจจัย				
		$-\alpha$	-1	0	1	α
ความเข้มข้นของตัวทำละลาย (%)	X_1	12.96	30	50	80	97.04
อัตราส่วนของตัวทำละลายต่อรำข้าว (มล. ต่อกรัม)	X_2	3.18	10	20	30	36.82
ระยะเวลาการสกัด (นาที)	X_3	39.55	60	90	120	140.45

นำสารสกัดที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ สารแกมมา-ออร์ซานอล แอลฟา-โทโคฟีรอล แอนโทไซยานิน และสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และนำผลที่ได้ไปสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ ชนิดสมการกำลังสอง (quadratic model) ดังสมการ (3.1) สมการดังกล่าวจะสามารถแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอิทธิพลของตัวแปรอิสระที่ศึกษา (dependent variable) ได้แก่ ความเข้มข้นของตัวทำละลายในน้ำ อัตราส่วนระหว่างตัวทำละลายต่อรำข้าว และระยะเวลาการสกัด

$$Y_n = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_4X_1X_2 + b_5X_2X_3 + b_6X_1X_3 + b_7X_1^2 + b_8X_2^2 + b_9X_3^2 \quad (3.1)$$

เมื่อ Y_n = ค่าตอบสนองที่เกิดจากการแปรค่าของตัวแปร
 b_0 = ค่าคงที่
 b_n = ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficients)
 X_n = ตัวแปรอิสระที่ศึกษา

จากนั้น ใช้โปรแกรม Design Expert version 6.0 สำหรับวิเคราะห์หาสถานะที่เหมาะสมสำหรับการสกัด เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป และสร้างกราฟความสัมพันธ์ของปัจจัยในการสกัดต่อปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้ response surface methodology plot

ตาราง 3.2 แผนการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระ

รหัสชุดทดลอง	ลำดับการทดลอง	ปัจจัยที่ศึกษา		
		X_1 (ร้อยละ)	X_2 (มล. ต่อกรัม)	X_3 (นาที)
16	1	55.0	20	90.0
8	2	80.0	30	120.0
17	3	55.0	20	90.0
10	4	97.0	20	90.0
13	5	55.0	20	39.5
19	6	55.0	20	90.0
4	7	80.0	30	60.0
15	8	55.0	20	90.0
5	9	30.0	10	120.0
1	10	30.0	10	60.0
18	11	55.0	20	90.0
3	12	30.0	30	60.0
6	13	80.0	10	120.0
12	14	55.0	36.8	90.0
9	15	13.0	20	90.0
11	16	55.0	3.18	90.0
20	17	55.0	20	90.0
7	18	30.0	30	120.0
14	19	55.0	20	140.5
2	20	80.0	10	60.0

เมื่อ X_1 คือ ความเข้มข้นของเอทานอล, X_2 คือ อัตราส่วนของตัวทำละลายต่อรำข้าว และ X_3 คือ เวลาที่ใช้ในการสกัด

ตอนที่ 3 การเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดโดยการปรับสภาพขั้วของตัวทำละลาย

จากผลการทดลอง ตอนที่ 2 เมื่อทราบสถานะที่เหมาะสมในการสกัดที่ได้สารด้านอนุมูลอิสระในปริมาณสูงแล้ว จะนำสถานะการสกัดดังกล่าวมาศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดโดยการปรับสภาพขั้วของตัวทำละลายที่ใช้สกัด เพื่อให้สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดให้ได้สารแกมมา-ออริซานอล แอลฟา-โทโคฟีรอล แอนโทไซยานิน และสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในปริมาณที่สูงขึ้น

การทดลองนี้ทำการศึกษา 2 ปัจจัย ได้แก่ ระดับการเติมกรดอะซิติก 3 ระดับ คือ ร้อยละ 1, 2 และ 3 และระยะเวลาการเติมกรดอะซิติก 4 ระดับ คือ เติมในขั้นตอนเริ่มต้นของการสกัด (0 นาที) และเติมเมื่อระยะเวลาการสกัดผ่านไป 30, 60 และ 90 นาที

ขั้นตอนนี้นำแผนการทดลองแบบ 3×4 Factorial in CRD (Completely Randomized Design) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำข้อมูลไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Rang Test (DMRT)

หลังจากการกำจัดตัวทำละลายด้วยกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze drying) สารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายปรับสภาพขั้วด้วยกรดอะซิติกที่มีปริมาณสารด้านอนุมูลอิสระทั้งสารแกมมา-ออริซานอล แอลฟา-โทโคฟีรอล แอนโทไซยานิน และสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในปริมาณสูง จะถูกทดสอบกิจกรรมการต้านออกซิเดชัน และประสิทธิภาพการต้านออกซิเดชันในผลิตภัณฑ์กุนเชียงหมูในตอนที่ 4

ตอนที่ 4 การศึกษากิจกรรม และประสิทธิภาพการต้านออกซิเดชันของสารสกัดหยาบ

4.1 การทดสอบกิจกรรมการต้านออกซิเดชัน

นำสารสกัดหยาบที่ได้จากการตอนที่ 3 ซึ่งมีสารด้านอนุมูลอิสระในปริมาณสูง (ทั้งแกมมา-ออริซานอล แอลฟา-โทโคฟีรอล แอนโทไซยานิน และสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด) มาทำการทดสอบกิจกรรมการต้านออกซิเดชันเปรียบเทียบกับสารด้านอนุมูลอิสระที่ใช้ในเชิงการค้า คือ BHT โดยวัดประสิทธิภาพการยับยั้งการเกิดเปอร์ออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก, DPPH radical scavenging activity และ metal chelating activity และรายงานค่ากิจกรรมการต้านออกซิเดชันในรูป 50% Effective Concentration (EC_{50})

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำข้อมูลไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Rang Test (DMRT)

4.2 การทดสอบประสิทธิภาพการต้านออกซิเดชันในผลิตภัณฑ์กุนเชียงหมู

นำสารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดด้วยสภาวะที่เหมาะสมซึ่งมีสารต้านอนุมูลอิสระในปริมาณสูง (สารแกมมา-ออร์ซานอล แอลฟา-โทโคฟีรอล แอนโทไซยานิน และสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด) มาเติมในผลิตภัณฑ์กุนเชียงหมูในขั้นตอนการผสม จากนั้นบรรจุลงในถุงโพลีเอทิลีน ปิดผนึกด้วยเครื่องปิดผนึก เก็บผลิตภัณฑ์ทดสอบไว้ในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 วัน (ขั้นตอนการผลิตแสดงในภาคผนวก ง) เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการต้านออกซิเดชันของสารสกัดที่ได้จากร้าข้าวหอมมะลิเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (BHT) และตัวอย่างควบคุม (ไม่เติมสารต้านอนุมูลอิสระ) ด้วยการวัดติดตามค่า TBARs (thiobarbituric acid reactive substance) ที่เปลี่ยนไป ทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านลักษณะปรากฏ สี กลิ่น และการยอมรับโดยรวมด้วยผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝน จำนวน 30 คน และวัดการเปลี่ยนแปลงค่าสีของผลิตภัณฑ์ ด้วยค่า L^* , a^* และ b^*

ขั้นตอนนี้ทำการศึกษา 2 ปัจจัย ได้แก่ ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่เติม 5 ระดับ คือ สารสกัดความเข้มข้น 0, 200, 400 และ 600 พีพีเอ็ม และ BHT 100 พีพีเอ็ม และระยะเวลาในการเก็บรักษา 4 ระดับ คือ 0, 5, 10 และ 15 วัน

วางแผนการทดลองแบบ 5×4 Factorial in CRD (Completely Randomized Design) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำข้อมูลไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Rang Test (DMRT)

บทที่ 2

เอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้าว

ข้าว เป็นพืชเศรษฐกิจ และเป็นอาหารหลักของคนไทย และชาวเอเชียมาช้านาน เนื่องจากเป็นแหล่งของสารอาหารที่สำคัญที่ให้พลังงานแก่ร่างกาย คือ คาร์โบไฮเดรต ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักอยู่ประมาณร้อยละ 80-90 โดยน้ำหนัก นอกจากนี้ยังมีสารอาหารอื่นๆ อีกมากมาย อาทิเช่น โปรตีน ไขมัน ใยอาหาร วิตามิน และแร่ธาตุ เป็นต้น

ข้าว มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า “*Oryza Sativa* L.” ในวงศ์ *Gramineae* เป็นพันธุ์ไม้ล้มลุกจำพวกหญ้า มีลักษณะภายนอกบางอย่างคล้ายต้นหญ้า เช่น กาบ ใบ ลำต้น และราก ข้าวที่ปลูกเพื่อการบริโภคเป็นอาหารมีสองชนิด คือ ชนิดที่หนึ่ง *Oryza sativa* ซึ่งมีปลูกทั่วไปในหลายประเทศ โดยแยกออกเป็นอินดิกา (indica) มีทั้งข้าวเจ้าและข้าวเหนียว ปลูกมากในเขตร้อนและประเทศไทย กับจาโปนิกา (japonica) ปลูกมากในเขตอบอุ่น และ ชนิดที่สอง *Oryza glaberrima* ซึ่งนิยมปลูกกันมากในประเทศแอฟริกา (กรมการข้าว, 2556)

2.1.1 โครงสร้างของเมล็ดข้าว

เมล็ดข้าว สามารถแบ่งโครงสร้างได้เป็นส่วนต่างๆ (รูป 2.1) ดังนี้ (กรรณานุช, 2555)

2.1.1.1 เปลือกแข็งหุ้มเมล็ด หรือ แกลบ (hull) ทำหน้าที่หุ้มเมล็ดเอาไว้ภายใน มีน้ำหนักประมาณร้อยละ 20 ของน้ำหนักเมล็ดข้าว มีปริมาณเซลลูโลส (cellulose) และเฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) ประมาณร้อยละ 68 ลิกนิน (lignin) ร้อยละ 19.2-24.5 แพนโทแซน (pantosans) ประมาณร้อยละ 15 และเถ้า (ash) ร้อยละ 13.2-29.0 ซึ่งเป็นส่วนของซิลิกา (silica) ร้อยละ 86.9-97.3

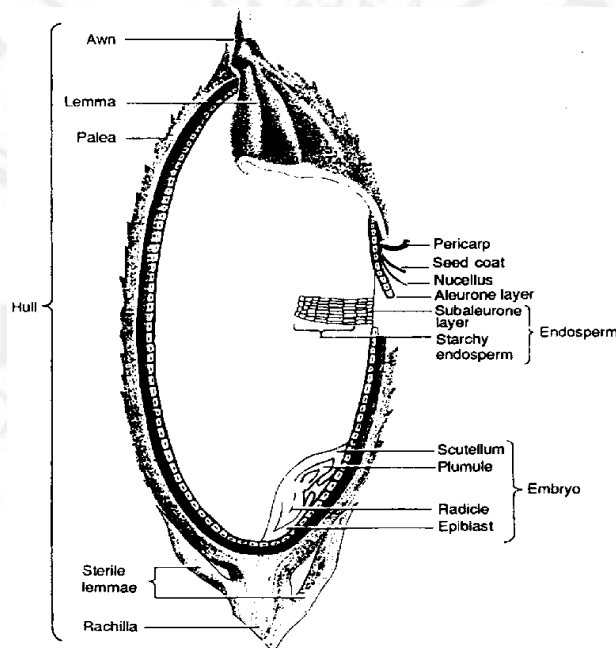
2.1.1.2 เปลือกหุ้มผล (pericap) เป็นเซลล์รูปแท่งห่อหุ้มรอบเมล็ด มีอยู่ด้วยกัน 6 ชั้น มีผนังเซลล์บางอยู่ชั้นนอกสุด มีองค์ประกอบทางเคมีเป็นคาร์โบไฮเดรตที่ทำให้เกิดโครงสร้าง เช่น เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส โปรตีน ไขมัน และแร่ธาตุต่างๆ เป็นต้น

2.1.1.3 เมล็ด (grain) ภายในเมล็ดข้าวยังประกอบไปด้วยส่วนต่างๆ อีก 3 ส่วน ได้แก่ ส่วนที่หนึ่ง คือ เปลือกหุ้มผล (tegmen หรือ seed coat) เป็นผนังเซลล์บาง รูปร่างยาวรี อุดมไปด้วย

ไขมัน จึงทำหน้าที่ในการป้องกันความชื้นไม่ให้เข้าสู่เนื้อเมล็ด ส่วนที่สอง คือ ชั้นเยื่อโปร่งใส (hyaline layer หรือ nucellus) อยู่ติดกับชั้นเปลือกหุ้มเมล็ด มีลักษณะโปร่งใส ประกอบด้วยสารให้สี เช่นเดียวกับในชั้นเปลือกหุ้มเมล็ด และส่วนที่สาม คือ ชั้นเยื่อหุ้มเมล็ด (aleurone layer) มีลักษณะเป็นเซลล์รูปสี่เหลี่ยม และมีนิวเคลียสอยู่ตรงกลางประกอบด้วยโปรตีน เซลลูโลส และเฮมิ-เซลลูโลส ซึ่งในเมล็ดข้าวทั่วไป ประกอบด้วยเซลล์ชั้นนี้ 1 ถึง 7 ชั้น

2.1.1.4 คัพภะ (germ หรือ embryo) เป็นส่วนที่เรียกว่า จมูกข้าว เป็นตำแหน่งรวมของส่วนที่จะงอกเป็นข้าวต้นใหม่ ซึ่งประกอบด้วยส่วนของยอดอ่อน (plumule) และส่วนรากกำเนิด (radicle) ทั้งสองส่วนนี้ยึดติดกันด้วยปล้องที่สั้นมากเรียกว่า มีโซคอติล (mesocotyl) ยอดอ่อนจะห่อหุ้มลักษณะที่คล้ายใบเรียกว่า เยื่อหุ้มยอดอ่อน (coleoptile) ส่วนของคัพภะทั้งหมดอยู่ในชั้นเยื่อหุ้มเมล็ด และอยู่ติดกับส่วนที่เป็นแบ่งทางด้านท้องเมล็ด (ventral side) ในส่วนนี้จะอุดมไปด้วยสารอาหาร แร่ธาตุ และวิตามิน เพื่อการเจริญเติบโตของลำต้น

2.1.1.5 เนื้อเมล็ด (endosperm) มีประมาณร้อยละ 68-70 ของเมล็ดข้าว ภายในเซลล์ประกอบด้วยสตาร์ช (starch) และโปรตีนเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งสตาร์ชของข้าวมีขนาดเล็กมาก (3-5 ไมครอน) เป็นรูปเหลี่ยม ลักษณะเม็ดส่วนใหญ่อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม (compound granule) มากถึง 150 เม็ดต่อกลุ่ม โปรตีนที่พบในเนื้อเมล็ดมักอยู่รวมกับเม็ดสตาร์ช โดยเกาะรวมกันเป็นรูปร่างกลม ซึ่งพบอยู่ในชั้นติดกับชั้นเยื่อหุ้มเมล็ดเป็นส่วนใหญ่



รูป 2.1 โครงสร้างของเมล็ดข้าว

ที่มา : <http://www.fao.org/docrep/t0567e/T0567E07.htm>

2.1.1.6 รำข้าว (rice bran) เป็นส่วนที่ได้จากการขัดสีเมล็ดข้าวที่ผ่านการกะเทาะส่วนเปลือกออก โดยเชื่อกันว่ามีสีน้ำตาลอ่อน เป็นส่วนที่หุ้มด้านในติดกับเมล็ดข้าว ประกอบด้วยส่วนของเยื่อหุ้มผล เยื่อหุ้มเมล็ด เยื่ออะลูโรน จมูกข้าว และผิวส่วนนอกของข้าว ซึ่งจะแบ่งเป็นรำข้าวหยาบ (coarse bran) และรำข้าวละเอียด คิดเป็นปริมาณร้อยละ 10 ของน้ำหนักเมล็ด และยังเป็นส่วนที่มีคุณค่าทางโภชนาการ เนื่องจากประกอบด้วย โปรตีน ไขมัน เกลือแร่ วิตามิน และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอีกหลายชนิด เป็นต้น

2.1.2 ข้าวหอมนิล (นุจิรา, 2550)

2.1.2.1 ลักษณะทั่วไป ข้าวเจ้าหอมนิลเป็นข้าวที่ได้รับการคัดเลือก และพัฒนาสายพันธุ์จนได้ข้าวที่มีเมล็ดข้าวกล้องเรียวยาว สีม่วงเข้ม เมื่อหุงสุกจะนุ่มเหนียว และมีกลิ่นหอม ที่สำคัญคือมีปริมาณโปรตีนสูงถึงร้อยละ 12.5 คาร์โบไฮเดรตร้อยละ 70 อะมิโลส (amylose) ร้อยละ 12 และยังคงมีไปด้วยธาตุเหล็ก สังกะสี ทองแดง แคลเซียม และโพแทสเซียม ในปริมาณที่สูงกว่าข้าวหอมดอกมะลิ 105

2.1.2.2 ลักษณะประจำพันธุ์ ข้าวหอมนิลเป็นข้าวนาสวน ไม่ไวต่อแสง สามารถปลูกได้ตลอดทั้งปี การแตกหน่อ/กอดี ไม่ด้านทานโรคขอบใบแห้งและแมลงทั่วไป

ความสูงของลำต้น	75 เซนติเมตร
สีของใบ ลำต้น เปลือกและเมล็ด	เข้มนมม่วง
ความยาวเมล็ดข้าว	6.5 มิลลิเมตร
อายุการเก็บเกี่ยว	95-100 วัน
ผลผลิตเฉลี่ย	400-700 กิโลกรัมต่อไร่
ปริมาณอะมิโลส	ร้อยละ 12
น้ำมันรำข้าว	ร้อยละ 18
เส้นใยจากรำข้าว	ร้อยละ 10
ต้านทานต่อโรคไหม้ ทนทานต่อสภาพแล้ง และดินเค็ม	

2.1.2.3 ลักษณะทางโภชนาการ ข้าวเจ้าหอมนิลเป็นข้าวที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง โดยมีปริมาณโปรตีน ร้อยละ 10.0-12.5 อะมิโลส ร้อยละ 12.0-13.0 สาร 2-acetyl-1-pyrroline ปานกลาง ร่วมกับสารหอมระเหยจำเพาะกลุ่ม cyclohexanone ในปริมาณสูง แคลเซียม 4.2 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมข้าว นอกจากนี้ ยังมีแร่ธาตุอื่นๆ แสดงดังตาราง 2.1

ข้าวเจ้าหอมนิลมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระสูงประมาณ 293 ไมโครกรัมต่อกรัม ในส่วนของเยื่อหุ้มเมล็ดที่เป็นสีม่วงเข้มประกอบไปด้วยสารแอนโทไซยานิน โปรแอนโทไซ-

ยานิดิน แกมมา-ออริซานอล สารประกอบฟีนอลิก ไบโอฟลาโวนอยด์ และวิตามินอี ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และสืพสมอาหารตามธรรมชาติ

ในส่วนของรำ และจมูกข้าว มีวิตามินอี วิตามินบี และกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง ในส่วนของรำมีปริมาณเส้นใยอาหารสูงถึงร้อยละ 10 ปริมาณน้ำมันร้อยละ 18 ซึ่งร้อยละ 80 เป็นกรดไขมันชนิด C18:1 และ C18:2 เหมือนกับน้ำมันที่ได้จากถั่วเหลือง และข้าวโพด นอกจากนี้ยังพบว่า มีโอเมกา 3 (omega-3) ประมาณร้อยละ 1-2 จากข้อมูลทางโภชนาการดังกล่าว นับได้ว่าข้าวเจ้าหอมนิลเป็นข้าวที่มีศักยภาพสูง เหมาะแก่การนำมาแปรรูปทางอุตสาหกรรมอาหาร

ตาราง 2.1 คุณค่าทางโภชนาการของข้าวเจ้าหอมนิล

คุณค่าทางโภชนาการ	ข้าวเจ้าหอมนิล
โปรตีน (ร้อยละ)	12.56
คาร์โบไฮเดรต (ร้อยละ)	70.00
ธาตุเหล็ก (มิลลิกรัม/ 100 กรัม)	3.26
สังกะสี (มิลลิกรัม/ 100 กรัม)	2.90
แคลเซียม (มิลลิกรัม/ 100 กรัม)	4.20
โพแทสเซียม (มิลลิกรัม/ 100 กรัม)	339.40
ทองแดง (มิลลิกรัม/ 100 กรัม)	0.10
ที่มา ; นุจิรา (2550)	

2.1.2.4 สีม่วงในข้าวเจ้าหอมนิล

ข้าวหอมนิลมีเมล็ดสีม่วงถึงม่วงดำ เมื่อวิเคราะห์ปริมาณสีของเมล็ด พบว่าประกอบไปด้วย สีม่วงเข้มของไซยานิดิน (cyanidin) สีชมพูอ่อนของพีโอนิดิน (peonidin) และสีน้ำตาลของโปรไซยานิดิน (procyanidin) ซึ่งสีที่เห็นทั่วไปนั้น เป็นสารประกอบกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoid) เรียกว่า แอนโทไซยานิน (anthocyanin) ที่ประกอบด้วยไซยานิดิน และพีโอนิดิน ในขณะที่สารโปรแอนโทไซยานิดิน (proanthocyanidin) ประกอบด้วยสารโปรไซยานิดิน

สารดังกล่าวข้างต้นล้วนเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำหน้าที่จับกับอนุมูลอิสระมีผลทำให้กลไกการทำงานของร่างกายดำเนินไปอย่างปกติ นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยอีกมากมายเกี่ยวกับคุณประโยชน์ของสารสีนี้ อาทิเช่น ลดการอักเสบของกล้ามเนื้อ ลดไขมันอุดตันในเส้นเลือดที่หัวใจและสมอง และยังสามารถยับยั้งการก่อตัวของเซลล์มะเร็งอีกด้วย (Patel and Naik, 2004)

2.2 อนุมูลอิสระ และปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน

2.2.1 อนุมูลอิสระ (ชนิกาญจน์, 2552)

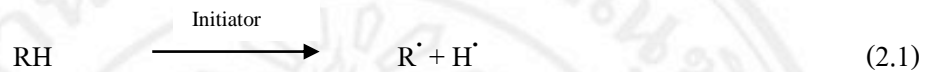
อนุมูลอิสระ คือ อะตอม โมเลกุล หรือสารประกอบที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยวอยู่ในออร์บิทัลวงนอกสุดที่มีระดับพลังงานสูง ในที่นี้รวมถึงอะตอมของไฮโดรเจนและไอออนของโลหะทรานซิชัน นอกจากนี้ยังรวมถึงโมเลกุลของออกซิเจนด้วย อนุมูลอิสระมีทั้งที่อยู่ในสถานะเป็นกลางทางไฟฟ้าและสถานะที่มีประจุไฟฟ้า โดยมีทั้งประจุบวกและประจุลบ สัญลักษณ์ทางเคมีของอนุมูลอิสระ คือ อิเล็กตรอนเดี่ยวของอนุมูลซึ่งจะแสดงด้วยจุดในตำแหน่งข้างบนของสัญลักษณ์ทางเคมี โดยมีสัญลักษณ์ทั่วไปคือ R^\cdot อนุมูลอิสระที่มีประจุบวก (cation radical) เช่น อนุมูลอิสระของ pyridinyl cation radical ($NAD^{\cdot+}$) อนุมูลอิสระที่มีประจุลบ (anion radical) เช่น อนุมูลอิสระของ superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$) และอนุมูลอิสระที่เป็นกลาง (neutral radical) เช่น อนุมูลอิสระของ peroxy radical (ROO^\cdot) เป็นต้น

อนุมูลอิสระเป็นสารที่มีความเสถียรต่ำจึงว่องไวในการทำปฏิกิริยาสูง เนื่องจากมีอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวเข้าทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของสารอื่นๆ เพื่อให้ตัวอนุมูลอิสระเปลี่ยนไปเป็นโมเลกุลที่เสถียร โดยจะทำปฏิกิริยาได้ 3 วิธี คือ ดึงอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวจากโมเลกุลปกติ หรือเพิ่มอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวให้กับโมเลกุลปกติ หรือสร้างพันธะโคเวเลนต์กับโมเลกุลปกติแล้วยังมีอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยว (unpaired electron) เหลืออยู่ โดยเมื่อทำปฏิกิริยาแล้วจะมีอนุมูลอิสระชนิดใหม่เกิดขึ้นและจะเกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่เช่นนี้ต่อไปเรื่อยๆ ซึ่งสามารถตรวจสอบและวิเคราะห์อนุมูลอิสระโดยคุณสมบัติจากอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวที่สามารถดึงดูดในสนามแม่เหล็กอย่างอ่อน เรียกเทคนิคนี้ว่า Electron Paramagnetic Resonance (EPR) Scopy แต่วิธีดังกล่าวสามารถตรวจสอบอนุมูลอิสระได้เฉพาะโมเลกุลที่เสถียรเท่านั้น ดังนั้นจึงนิยมใช้เทคนิค Spin Trapping ช่วยให้อนุมูลอิสระมีความเสถียรมากขึ้นเรียกว่า Spin Adduct แล้วนำไปตรวจสอบด้วยเทคนิค EPR ดังกล่าว

2.2.2 ปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน

การเกิดออกซิเดชัน เป็นปฏิกิริยาทางเคมีระหว่างออกซิเจน และกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวอิสระ หรือที่เป็นองค์ประกอบในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ที่อยู่ในลิพิด หรืออาหารที่มีลิพิด ทำให้อาหารเสื่อมคุณภาพ (deterioration) ปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้นเป็นไปอย่างต่อเนื่องเมื่อลิพิดหรืออาหารสัมผัสกับออกซิเจนในอากาศ อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นเนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องของอนุมูลอิสระ (free-radical chain reaction) (นิธิยา, 2553) ซึ่งมีกลไกการเกิดปฏิกิริยา 3 ขั้นตอน (Perumalla *et al.*, 2011) ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 : Initiation หรือ การเกิดอนุมูลอิสระ ขั้นตอนนี้จะเกิดขึ้นเมื่อไขมันชนิดไม่อิ่มตัวในอาหารสูญเสียไฮโดรเจนอะตอม (hydrogen, H) ทำให้เกิดอนุมูลไฮโดรคาร์บอนอิสระ (hydrocarbon radical, R[•]) ขึ้น อนุมูลนี้จะทำปฏิกิริยาต่อเนื่องกับออกซิเจน (oxygen, O₂) ในอากาศ ในสถานะที่มีแสง ความร้อน หรือ โลหะ ทำให้เกิดเป็นอนุมูลเพอร์ออกซี (peroxyl radicals, ROO[•]) ดังสมการ (2.1) และ (2.2)



ขั้นตอนที่ 2 : Propagation หรือ การเกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องของอนุมูลอิสระ ขั้นตอนนี้ อนุมูลเพอร์ออกซี (ROO[•]) จะทำปฏิกิริยากรดไขมันไม่อิ่มตัวอื่นๆ จนเกิดเป็นไฮโดรเพอร์ออกไซด์ (hydroperoxides, ROOH) ดังสมการ (2.3)



ขั้นตอนที่ 3 : Termination หรือ ขั้นสุดท้าย ในขั้นตอนนี้ปฏิกิริยาออกซิเดชันจะสิ้นสุดลง เมื่อเกิดปฏิกิริยาระหว่างอนุมูลเพอร์ออกซี หรืออนุมูลไฮโดรคาร์บอน ทำให้เกิดสารประกอบชนิดใหม่ที่ไม่ใช่อนุมูลอิสระ ดังสมการ (2.4) ถึง (2.6)



อย่างไรก็ตาม ปฏิกิริยาออกซิเดชันสามารถชะลอ หรือยับยั้งการออกซิเดชันของไขมัน หรือโมเลกุลอื่นโดยการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในขั้นตอนที่ 1 (initiation) และขั้นตอนที่ 2 (propagation) โดยการเติมสารแอนติออกซิเดชัน (AH) เพื่อทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ ซึ่งจะได้สารประกอบที่มีความเสถียรมากขึ้น และไม่ใช่อนุมูลอิสระ ดังสมการ (2.7)



2.2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในอาหาร

อาหารโดยทั่วไปมีองค์ประกอบของลิพิดหลากหลายชนิด และมีปริมาณที่แตกต่างกันไป ดังนั้นกลไกการเกิดปฏิกิริยาในอาหารแต่ละชนิดย่อมมีความสลับซับซ้อน และว่องไวต่างกัน (รูป 2.2) ดังนั้น ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในอาหาร สามารถสรุปได้ (นิธิยา, 2553) ดังนี้

2.2.4.1 ชนิดของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบ เนื่องจากชนิดของกรดไขมันในโมเลกุลของไขมัน และน้ำมันมีผลกระทบต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยาออกซิเดชัน กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเท่านั้นที่สามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ทั้งนี้อัตราเร็วการเกิดปฏิกิริยาจะแตกต่างกันไป คือ กรดไขมันที่มีพันธะคู่มากกว่าจะเกิดปฏิกิริยาได้เร็วกว่า อย่างไรก็ตาม กรดไขมันที่อยู่ในรูปซิส-ไอโซเมอร์ เกิดการออกซิไดส์ได้เร็วกว่าทรานส์-ไอโซเมอร์ และตำแหน่งที่เป็น conjugated double bond จะเกิดได้ไวกว่า non-conjugated double bond การเก็บรักษาอาหารที่อุณหภูมิห้อง กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวจะไม่เกิดออกซิเดชัน จะเกิดเฉพาะกับกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเท่านั้น แต่ในขณะเดียวกัน ที่อุณหภูมิสูงกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวก็อาจเกิดออกซิเดชันได้

2.2.4.2 กรดไขมันอิสระ กรดไขมันในอาหารที่อยู่ในรูปอิสระจะถูกออกซิไดส์ได้ง่ายกว่า กรดไขมันที่อยู่ในรูปเอสเทอร์กับกลีเซอรอล

2.2.4.3 ความเข้มข้นของออกซิเจน ในสภาวะที่มีออกซิเจนมาก อัตราการเกิดออกซิเดชันจะไม่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของออกซิเจน แต่ในสภาวะที่มีออกซิเจนน้อย อัตราการเกิดออกซิเดชันจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของออกซิเจน อย่างไรก็ตาม ผลของการเกิดออกซิเดชันยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆ ด้วย เช่น อุณหภูมิ และพื้นที่ผิวสัมผัสกับออกซิเจน เป็นต้น

2.2.4.4 อุณหภูมิ อัตราเร็วของการเกิดออกซิเดชันจะเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น และอุณหภูมิยังมีอิทธิพลต่อความดันย่อยของออกซิเจนด้วย เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นการเปลี่ยนแปลงความดันย่อยของออกซิเจนจะมีอิทธิพลเพียงเล็กน้อยต่ออัตราเร็วการเกิดออกซิเดชัน เนื่องจากการละลายของออกซิเจนในลิพิด และน้ำจะลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น

2.2.4.5 พื้นที่ผิว อัตราเร็วของการเกิดออกซิเดชันจะเพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงต่อพื้นที่ผิวของลิพิดที่สัมผัสกับอากาศ ดังนั้น หากอัตราส่วนของพื้นที่ผิวต่อปริมาตรเพิ่มขึ้นการเกิดออกซิเดชันจะเร็วขึ้น สำหรับอาหารที่เป็นอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ การเกิดออกซิเดชันจะขึ้นอยู่กับอัตราการแพร่กระจายของออกซิเจนเข้าไปยังส่วนที่เป็นน้ำมัน

2.2.4.6 ความชื้น อัตราเร็วของการเกิดออกซิเดชันขึ้นอยู่กับค่าแอกติวิตี (water activity, a_w) อาหารที่มีความชื้นต่ำมาก (a_w ประมาณ 0.1) ปฏิกิริยาออกซิเดชันจะเกิดได้อย่างรวดเร็ว เมื่อค่า a_w เพิ่มขึ้นถึงประมาณ 0.3 จะยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของลิพิดให้เกิดขึ้นน้อยที่สุด อย่างไรก็ตาม

ก็ตาม เมื่อค่า a_w เพิ่มขึ้นอยู่ในช่วง 0.55-0.85 อัตราการเกิดออกซิเดชันจะเพิ่มขึ้นอีกครั้งหนึ่ง เนื่องจากมีปริมาณน้ำมากพอที่จะทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของตัวเร่งปฏิกิริยาและออกซิเจน

2.2.4.7 การเกิดอิมัลซิฟิเคชัน ในอาหารที่เป็นอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ หยกน้ำมันจะกระจายตัวอยู่ในตัวกลางที่เป็นน้ำ ออกซิเจนจะต้องแพร่กระจายผ่านตัวกลางที่เป็นน้ำเข้าไปยังหยกน้ำมันผ่านชั้นระหว่างผิวของน้ำกับน้ำมัน ดังนั้น อัตราการเกิดออกซิเดชัน จึงขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆ ร่วมด้วย เช่น ชนิดและความเข้มข้นของอิมัลซิฟิเอเจนต์ ขนาดของอนุภาคหยกน้ำมัน พื้นที่ผิวของ interface ความหนืดของตัวกลางที่เป็นน้ำ ค่าพีเอช ส่วนประกอบ และ porosity ของตัวกลาง

2.2.4.8 Pro-oxidant แร่ธาตุ หรือโลหะบางชนิด เช่น โคบอลต์ ทองแดง เหล็ก แมงกานีส และนิกเกิล เป็นต้น มีสมบัติเป็น Pro-oxidant ได้ ที่ความเข้มข้นต่ำเพียง 0.1 พีพีเอ็ม ซึ่งจะเร่งอัตราการเกิดออกซิเดชันได้ แร่ธาตุ หรือโลหะเหล่านี้ได้มาจากดินที่ปลูก และปนเปื้อนอยู่ในน้ำมันพืช หรือมาจากสัตว์ และอุปกรณ์โลหะที่ใช้ในกระบวนการแปรรูป และเก็บรักษา

2.2.4.9 Radiant energy แสง และรังสีต่างๆ เช่น Visible light แสงอัลตราไวโอเลต และแกมมาเรดิเอชัน เป็นต้น มีผลช่วยเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันให้เกิดเร็วขึ้น

2.2.4.10 สารต้านอนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระจะช่วยยับยั้ง หรือชะลอการเกิดออกซิเดชันได้ ซึ่งมีทั้งสารต้านอนุมูลอิสระในธรรมชาติ เช่น วิตามินอีในน้ำมันพืช เป็นต้น และสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นสารสังเคราะห์ที่ได้รับอนุญาตให้ใช้กับอาหารได้ เช่น โพรพิลแกลเลต (propylgallate) บิเอชเอ (butylated hydroxyanisole, BHA) และ บิเอชที (butylated hydroxytoluene, BHT) เป็นต้น

2.2.5 การหืน (rancidity)

การหืน เป็นการเปลี่ยนแปลงทางปฏิกิริยาเคมีของไขมัน และน้ำมัน ทำให้มีกลิ่นที่ผิดปกติ และสมบัติทั้งทางเคมี และกายภาพเปลี่ยนไป การหืนเกิดขึ้นได้ 3 แบบ (นิริยา, 2553) ดังนี้

2.2.5.1 ลิพอลิซิส (lipolysis) เป็นปฏิกิริยาลิพอลิซิสที่พันธะเอสเทอร์ในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ หรือลิพิดด้วยเอนไซม์ไลเปส ความร้อน กรด ด่าง และความชื้น หรือปฏิกิริยาทางเคมีใดๆ ก็ตาม ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเรียกว่า ลิพอลิซิส หรือ lipolytic rancidity หรือ hydrolytic rancidity ตัวอย่างเช่น ปฏิกิริยาลิพอลิซิสของไขมันนม ซึ่งมักจะเกิดขึ้นกับน้ำมันดิบที่มีเอนไซม์ไลเปส ทำให้มีผลต่อกลิ่นของน้ำมันและผลิตภัณฑ์นม กรดไขมันที่มีผลทำให้เกิดกลิ่นในไขมันนมคือ กรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอน 4-12 อะตอม เป็นกรดที่ระเหยได้ง่าย เช่น กรดบิวทิริก จึงทำให้เกิดกลิ่นหืน และส่งผลต่อคุณภาพของไขมัน หรือน้ำมันที่นำไปใช้ปรุงอาหาร หรือ แปรรูปเป็น

ผลิตภัณฑ์อาหารด้วย การเกิดลิพอลิซิสจะเป็นปฏิกิริยาหลักที่เกิดขึ้นขณะทอดอาหารที่มีน้ำ หรือมีความชื้นสูงที่อุณหภูมิสูง ปริมาณกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาลิพอลิซิส ยังมีผลทำให้ อุณหภูมิที่เกิดควันและแรงตึงผิวของน้ำมันลดต่ำลงด้วย น้ำมันจะเกิดควันได้ง่ายขณะทอดอาหาร เช่น การทอดโดนัท จะได้โดนัทที่มีผิวสีคล้ำ ผิวแตก และคุดน้ำมันไว้มาก ทำให้โดนัท หรืออาหาร ที่ทอดนั้นมีคุณภาพต่ำ กรดไขมันที่อยู่ในรูปอิสระยังมีความไวต่อการเกิดออกซิเดชันมากกว่าที่อยู่ในรูปเอสเทอร์กับกลีเซอรอล

Hydrolytic rancidity เป็นการหืนที่เกิดจากปฏิกิริยาการไฮโดรไลซิสของไขมัน และน้ำมันด้วยเอนไซม์ไลเปส และความชื้น ทำให้ไขมันและน้ำมันเกิดการสลายตัวได้เป็นกรดไขมันอิสระ โดยเฉพาะกรดไขมันที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ มีจำนวนคาร์บอน 4-12 อะตอม จะมีกลิ่นเหม็น หืนมาก เช่น การหืนของน้ำมันมะพร้าว เนย และน้ำมันหมู เมื่อเกิดการหืนจะทำให้ไขมัน และน้ำมันมีกลิ่น และรสชาติเปลี่ยนไป

อย่างไรก็ตาม ไขมัน และน้ำมันบางชนิดเมื่อเกิด hydrolytic rancidity แล้วไม่สามารถ สังเกตได้ด้วยการดมกลิ่น หรือชิมรส ต้องตรวจวิเคราะห์โดยวิธีทางเคมี คือ ต้องวิเคราะห์หา ปริมาณกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้น ค่าที่ได้เรียกว่า Acid Value (AV)

ค่า AV ของไขมัน หรือน้ำมัน คือ จำนวนมิลลิกรัมของโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ใน การทำให้กรดไขมันอิสระที่มีอยู่ในไขมัน หรือน้ำมันจำนวน 1 กรัม เป็นกลางพอดี ซึ่งนิยมเทียบ เป็นร้อยละของกรดโอเลอิก ดังนั้น ค่า AV จะเป็นตัวบ่งชี้ภาวะ หรือระดับการหืนของไขมัน และน้ำมัน ถ้าค่า AV สูง แสดงว่า ไตรกลีเซอไรด์ถูกไฮโดรไลซ์เป็นกรดไขมันอิสระมาก แสดงว่าเกิด การหืนแบบ hydrolytic มาก

2.2.5.2 การหืนเนื่องจากออกซิเดชัน (oxidative rancidity) เป็นการหืนที่เกิดขึ้นเนื่องจาก ปฏิกิริยาออกซิเดชันที่พันธะคู่ของกรดไขมันไม่อิ่มตัวกับออกซิเจนในอากาศ เกิดเป็น peroxide linkage ขึ้นระหว่างพันธะคู่ ออกซิเดชันจะเกิดขึ้นเองแบบต่อเนื่องตลอดเวลาเมื่อ ไขมัน และน้ำมันสัมผัสกับออกซิเจนในอากาศ ทำให้มีกลิ่น และรสชาติผิดปกติ การหืนด้วย ปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นอาหารที่มีไขมัน และน้ำมันผสมอยู่ด้วย โดยเฉพาะในไขมัน และน้ำมันที่ใช้ปรุงอาหารจะเกิดมากที่สุด การมีโลหะ เช่น ทองแดง และตะกั่ว จะเป็นตัวเร่งให้เกิดปฏิกิริยาได้เร็ว ขึ้น นอกจากนั้น ความร้อน และแสงก็มีผลช่วยเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วย

ปฏิกิริยาการเกิด peroxide linkage ดังสมการ



การเกิดการหืนโดยปฏิกิริยานี้ทำให้กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว ซึ่งเป็นกรดไขมันจำเป็นต่อร่างกายถูกทำลาย มีผลทำให้คุณค่าทางโภชนาการของไขมัน และน้ำมันลดลงด้วย และยังทำลายวิตามินต่างๆ ที่ละลายในไขมัน และน้ำมันอีกด้วย

การหืนที่เกิดโดยปฏิกิริยาออกซิเดชันนี้ยังอาจเกิดขึ้นได้เมื่อมีเอนไซม์ไลพอกซิเดส (lipoxidase) ช่วยเร่งปฏิกิริยา ซึ่งจะเป็นแบบ enzymatic oxidation

ไขมัน และน้ำมันที่เกิดการหืนเนื่องจากออกซิเดชัน สามารถตรวจสอบโดยการหาค่าเพอร์ออกไซด์ (Peroxide Value, PV) คือ การหาปริมาณสารเพอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นในไขมัน หรือน้ำมัน โดยที่ค่า PV หมายถึง จำนวนมิลลิกรัมของสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต ความเข้มข้น 0.002 นอร์มัล ที่ใช้ในการไทเทรตไขมัน หรือน้ำมัน 1 กรัม หรือหมายถึง จำนวนมิลลิกรัมสมมูลของเพอร์ออกไซด์ออกซิเจน (peroxide oxygen) ที่มีในน้ำมัน หรือไขมัน 1 กิโลกรัม ถ้าค่า PV สูง แสดงว่า น้ำมัน หรือ ไขมันเกิดการหืนเนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชันมาก

การเกิดการหืนเนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน ยังทดสอบได้โดยใช้ Kreis test คือ ปฏิกิริยาของ Kreis reagent ซึ่งเป็นสารละลาย Phloroglucinol กับไขมัน หรือน้ำมันที่ถูกออกซิไดซ์ในภาวะที่เป็นกรด จะทำให้เกิดสีแดง

2.2.5.3 Ketonic rancidity เป็นปฏิกิริยา enzymatic oxidation ที่โมเลกุลของกรดไขมันชนิดอิ่มตัว ได้เป็นสารประกอบจำพวกคีโตน (ketone)

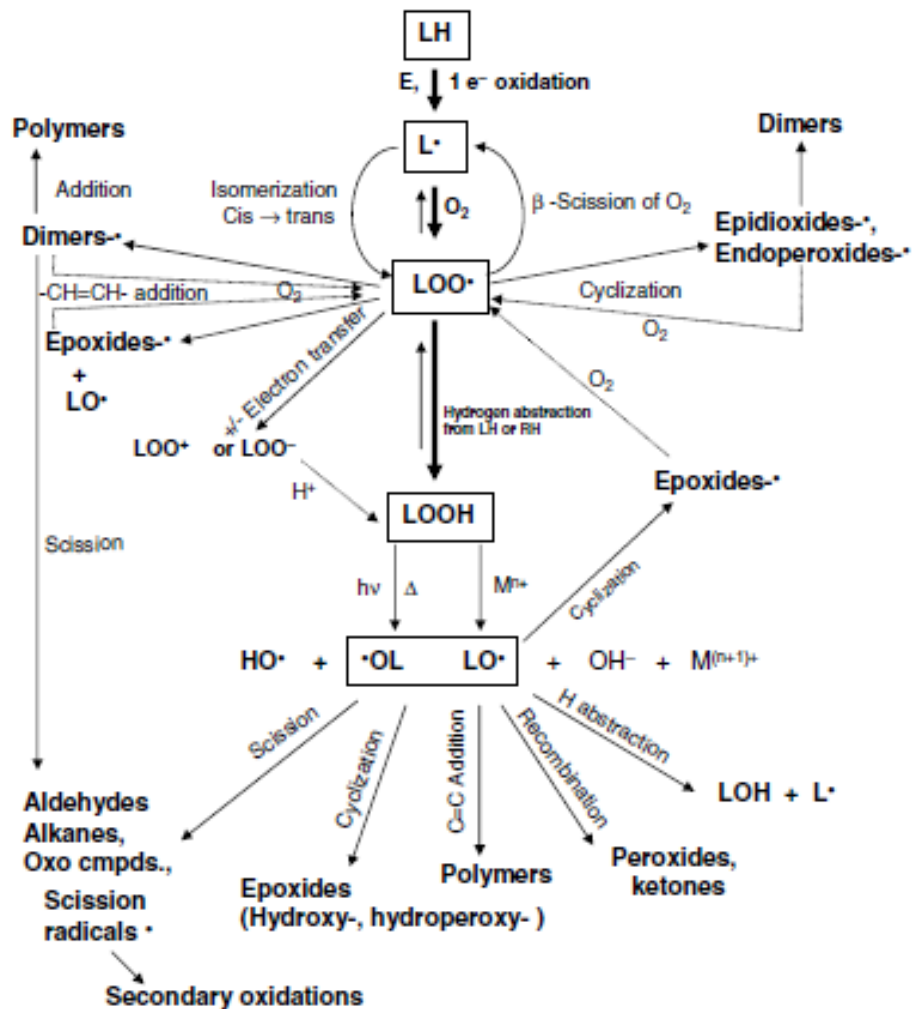
2.2.6 ผลของการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันต่อผลิตภัณฑ์อาหาร (พรทวิ, 2548)

2.2.6.1 โปรตีนในอาหารถูกทำลาย

โปรตีน เปปไทด์ และกรดอะมิโน เป็นสารประกอบที่ค่อนข้างไวต่อสารเคมี และภาวะต่างๆ ได้ง่าย ซึ่งมีผลทำให้โครงสร้างของโปรตีนเปลี่ยนไป ปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยมีแสงรังสี และไอออนโลหะเป็นตัวเร่ง จะทำให้เกิดสารไฮโดรเปอร์ออกไซด์ขึ้น มีผลโดยตรงต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีน ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเนื้อสัมผัส และสีของอาหาร ความสามารถในการละลายน้ำของโปรตีนลดลง นอกจากนี้ยังทำให้สูญเสียคุณค่าทางอาหาร เนื่องจากกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกายถูกทำลาย

2.2.6.2 การเกิดกลิ่นไม่พึงประสงค์

การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัว เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดกลิ่นเหม็นหืนในอาหารที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบ กลิ่นเหม็นหืนที่เกิดขึ้นเกิดจากสารจำพวกอัลดี-



รูป 2.2 สรุปกลไกในระหว่างการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Schaich, 2005)

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และกลีโกล สารเหล่านี้เกิดจากการสลายตัวของสารไฮโดรเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน ซึ่งเป็นกลิ่นที่ผู้บริโภคไม่ยอมรับ

2.2.6.3 สูญเสียวิตามิน

วิตามินที่ทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ เช่น วิตามินเอ เบต้าแคโรทีน วิตามินอี และซี เป็นต้น วิตามินเหล่านี้จะทำหน้าที่จับกับออกซิเจนที่ว่องไวต่อปฏิกิริยา ทำให้เกิดอนุมูลอิสระจากปฏิกิริยาออกซิเดชันขึ้นเริ่มต้นกลายเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่คงตัว ทำให้สามารถหยุดปฏิกิริยาถูกโซ่ขึ้นต่อเนื่องได้ อย่างไรก็ตาม วิตามินเอ และซี ก่อนข้างว่องไวต่อออกซิเจน และแสง ดังนั้น สภาวะที่ปราศจากตัวกระตุ้นดังกล่าวสามารถลดการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน และการสูญเสียวิตามิน

2.2.6.4 การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของรงควัตถุ

การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในผลิตภัณฑ์อาหาร ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงมากมายกับสารประกอบในอาหาร โดยเฉพาะรงควัตถุ ซึ่งมีผลต่อลักษณะปรากฏของอาหารโดยตรง ในผลิตภัณฑ์จำพวกพืชผัก และผลไม้ เมื่อได้รับการกระตุ้นจากแสง หรือออกซิเจนในอากาศจะทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของรงควัตถุ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นสีน้ำตาล เรียกว่า browning reaction

2.3 สารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระ หรือสารแอนติออกซิแดนท์หมายถึง สารที่สามารถป้องกัน หรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลอิสระชนิดต่างๆ ได้ โดยสารเหล่านี้มีกลไกการทำงานเพื่อกำจัดอนุมูลอิสระด้วยกันหลายแบบ เช่น การดักจับอนุมูลอิสระโดยตรง ชัยยั้งการสร้างอนุมูลอิสระ และป้องกันการสร้างอนุมูลอิสระ เป็นต้น นอกจากนี้สารแอนติออกซิเดชันยังสามารถรักษาคุณภาพ และชะลอการเสื่อมเสียของอาหารด้านกลิ่น หิน หรือการเปลี่ยนแปลงของสีได้โดยการขัดขวางการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน (กรรกาญจ, 2555)

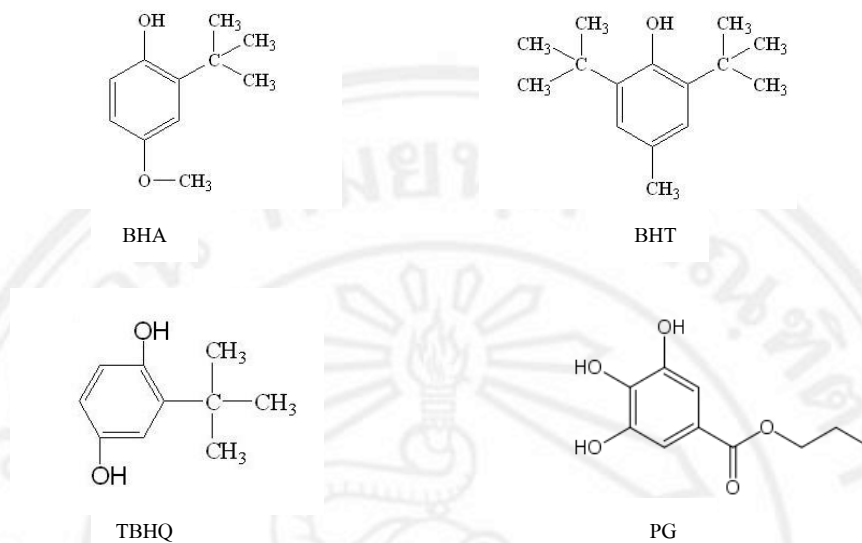
2.3.1 ประเภทของสารต้านอนุมูลอิสระ

ประเภทของสารต้านอนุมูลอิสระ สามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

2.3.1.1 สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (synthetic antioxidants)

เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่ได้เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ ส่วนมากเป็นสารประกอบฟีนอลิก วัตถุประสงค์ของการสังเคราะห์สารกลุ่มนี้ขึ้นมาเพื่อที่จะใช้เติมลงไป ในอาหารประเภทไขมัน น้ำมัน หรือมีไขมันเป็นองค์ประกอบ เพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ตัวอย่าง เช่น butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT), tert-butylhydroquinone (TBHQ) and propyl gallate (PG) มีโครงสร้างทางเคมี ดังรูป 2.3

โดยทั่วไป BHA, BHT, TBHQ และ PG จะใช้ในปริมาณความเข้มข้น 100-200 พีพีเอ็ม ส่วน PG จะใช้ในปริมาณที่สูงกว่า คือ 200-250 พีพีเอ็ม เนื่องจากการเติมสารเหล่านี้ลงในผลิตภัณฑ์อาหารในปริมาณที่มากเกินไป จะทำให้เกิดความผิดปกติแก่ผู้บริโภคได้



รูป 2.3 โครงสร้างสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ที่นิยมใช้ (Porkony *et al.*, 2001)

2.3.1.2 สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (natural antioxidants)

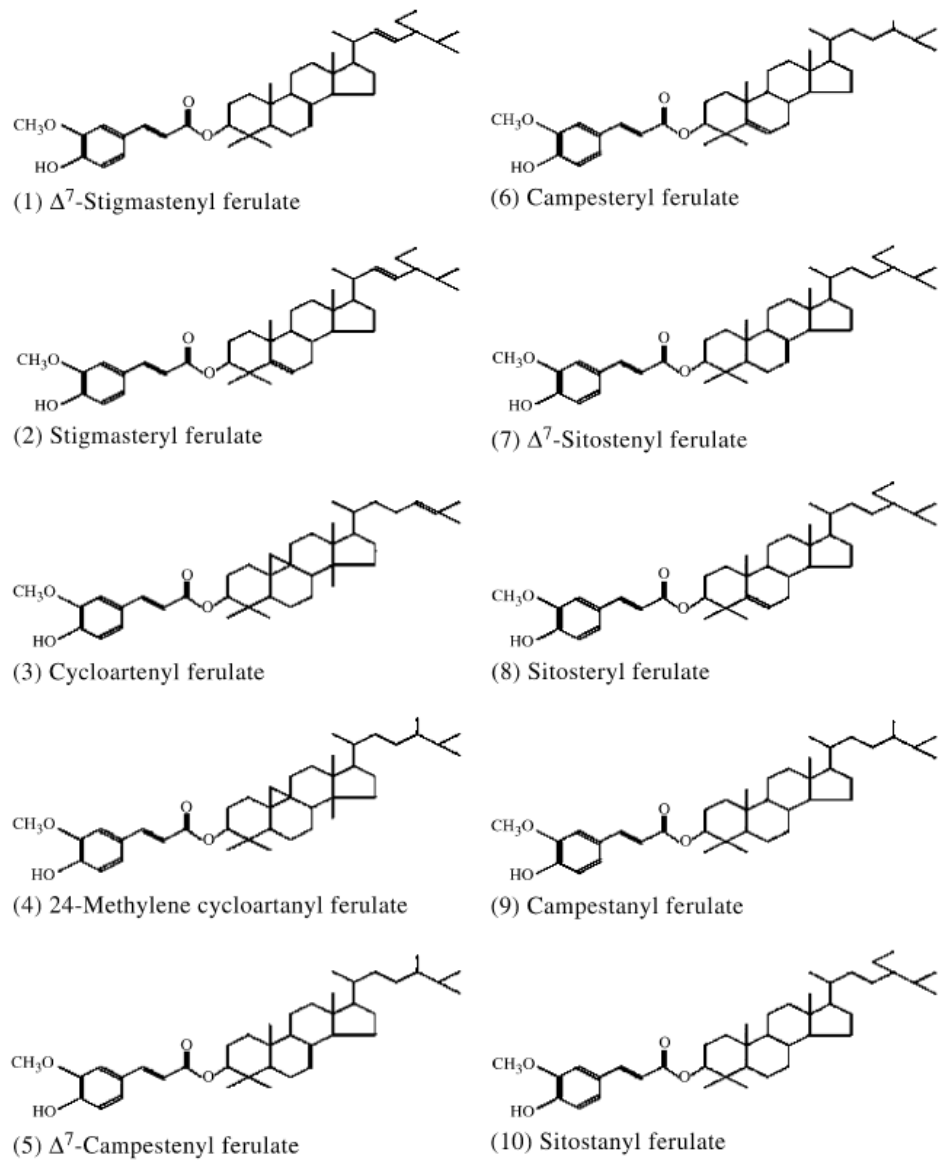
สารต้านอนุมูลอิสระกลุ่มนี้พบได้ตามธรรมชาติทั่วไป ส่วนใหญ่จะพบสารเหล่านี้ในส่วนเปลือกผล เมล็ด ใบ หรือลำต้นของพืชทั่วไป เครื่องเทศ อีกทั้งยังสามารถพบได้ในสัตว์ และจุลินทรีย์บางชนิดด้วย ซึ่งสารดังกล่าวมีคุณสมบัติในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน ตัวอย่างเช่น วิตามินเอ และอี พบมากในพืชเมล็ดจำพวกงา นอกจากนี้ งานวิจัยจำนวนมาก (Lai *et al.*, 2009; Aguilar-Garcia *et al.*, 2007; Devi and Arumughan, 2007 and Tananuwong *et al.*, 2010) พบว่า ในส่วนของรำข้าวขาว อุดมไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระกลุ่มแกมมา-ออริซานอล แอลฟา-โทโคฟีรอล ประมาณร้อยละ 9.8-13.8 และ 0.018-0.046 กรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ นอกจากนี้ ยังพบว่า ในรำข้าวที่มีสีประกอบด้วยสารกลุ่มแอนโทไซยานินอยู่ในปริมาณที่สูงกว่า 350 ไมโครกรัมต่อกกรัม

2.3.2 สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในข้าว

2.3.2.1 แกมมา-ออริซานอล (γ-oryzanol)

แกมมา-ออริซานอล เป็นกลุ่มของสารประกอบเอสเทอร์ระหว่างกรดเฟอรูลิก (ferulic acid) และสเตอรอล (sterols) หรือไตรเทอร์ปีนแอลกอฮอล์ (triterpene alcohol) ชนิดต่างๆ

ในธรรมชาติพบมากถึง 10 อนุพันธ์ ซึ่งอนุพันธ์หลักที่พบได้แก่ cycloartenyl ferulate, 24-methylene cycloartenyl ferulate และ campestanyl ferulate (Imsanguan *et al.*, 2008) (ดังรูป 2.4)



รูป 2.4 โครงสร้างทางเคมีของสารแกมมา-ออริซานอล (Imsanguan *et al.*, 2008)

สารกลุ่มนี้สามารถให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูลอิสระ เพื่อให้อยู่ในรูปที่เสถียรมากขึ้น (Arab *et al.*, 2011) แกมมา-ออริซานอล ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม รองลงมาเป็น

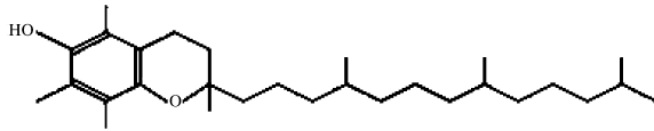
อีเทอร์ ละลายได้เล็กน้อยในเฮปแทน และไม่ละลายในน้ำ มีจุดหลอมเหลวสูงประมาณ 161.2 องศาเซลเซียส พบมากในรำข้าวขาว และรำข้าวเหนียวดำ โดยพบว่าข้าวสายพันธุ์ต่างๆ มีปริมาณสารแกมมา-ออริซานอลที่แตกต่างกัน โดยแกมมา-ออริซานอลเป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติเช่นเดียวกับโทโคฟีรอล และโทโคไตรอีนอล และพบว่าในรำข้าวมีสารแกมมา-ออริซานอลสูงถึงร้อยละ 2-4 ซึ่งสูงกว่าโทโคฟีรอลถึง 30-40 เท่า (Chen and Bergman., 2005 and Aguilar-Garcia *et al.*, 2007) นอกจากนั้น ประสิทธิภาพต้านออกซิเดชันในคอเรสเตอรอล พบว่าแกมมา-ออริซานอลมีประสิทธิภาพสูงกว่าโทโคฟีรอล (Xu *et al.*, 2001) สารแกมมา-ออริซานอลยังมีคุณสมบัติในการลดระดับคอเลสเตอรอล และไตรกลีเซอไรด์ในกระแสเลือด กระตุ้นการทำงานของต่อมไธมัส ยับยั้งการอักเสบในกระเพาะอาหาร ยับยั้งการรวมตัวของเกล็ดเลือด ลดน้ำตาลในเลือด และเพิ่มระดับของฮอร์โมนอินซูลินในเลือดของคนเป็นโรคเบาหวาน นอกจากนั้นแล้วยังทำหน้าที่ในการต้านการหืนของไขมันในรำข้าวอีกด้วย (พันทิพา และคณะ, 2551)

Huang *et al.* (2003) ได้ทำการศึกษาการวัดประสิทธิภาพของแกมมา-ออริซานอลในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเปรียบเทียบกับวิตามินอี โดยการนำสารดังกล่าวมาบ่มกับเซลล์ในหลอดทดลอง จากนั้นทำการกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน พบว่า จำนวนเซลล์ที่อยู่รอดเมื่อบ่มกับแกมมา-ออริซานอลสูงถึงร้อยละ 81.8 เนื่องจาก สารแกมมา-ออริซานอลนี้มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าวิตามินอี ถึง 10 เท่า

2.3.2.2 วิตามินอี (vitamin E)

วิตามินอี มี 2 ชนิด คือ กลุ่มของโทโคฟีรอล มี 4 อนุพันธ์ ได้แก่ แอลฟา เบต้า แกมมา และเดลต้า-โทโคฟีรอล และกลุ่มของโทโคไตรอีนอลมีอีก 4 อนุพันธ์ ได้แก่ แอลฟา เบต้า แกมมา และเดลต้า-โทโคไตรอีนอล โครงสร้างภายในโมเลกุลของแอลฟา-โทโคฟีรอลเป็นโครงสร้างที่มีคุณสมบัติแบบแอมฟิฟิลิก (amphiphilic) เนื่องจากประกอบไปด้วยส่วนที่มีขั้ว คือ Chromanol ring และส่วนที่ไม่มีขั้ว คือ Isoprenoid side chain (ดังรูป 2.5) โทโคฟีรอลเหล่านี้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติที่สำคัญ และพบมากในรำข้าว อาจสูงถึง 100-150 ไมโครกรัมต่อกรัม (Hargrove, 1994) แต่โทโคฟีรอลที่ได้จากธรรมชาติจะถูกออกซิไดส์ได้ง่าย และไวต่อการถูกทำลายด้วยความร้อน จึงมีการสูญเสียวิตามินอีในกระบวนการแปรรูปอาหารได้ โทโคฟีรอลมีความสามารถต้านออกซิเดชันเพิ่มขึ้นจากแอลฟาไปยังเดลตา-โทโคฟีรอล โทโคฟีรอลที่ได้จากธรรมชาติทั้งหมดเป็น D-form แต่โทโคฟีรอลสังเคราะห์จะเป็นส่วนผสมของ D และ L-form ในอัตราส่วน 50 ต่อ 50 และวิตามิน-อีที่ขายในท้องตลาดจะอยู่ในรูปอะซิเตตเอส-เทอร์ ซึ่งจะทำให้มีความคงตัวเพิ่มขึ้น เมื่อสัมผัสกับแสงและอากาศ อัลฟา-โทโคฟีรอลยังช่วยป้องกัน

ไขมันชนิด Low Density Lipoproteins (LDLs) จากขบวนการออกซิเดชัน ซึ่ง LDLs ที่ถูกออกซิไดซ์ จากอนุมูลอิสระเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีส่วนทำให้เกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดได้ มีหลายงานวิจัย รายงานว่าการรับประทานวิตามินอีเพิ่มมากขึ้น สามารถลดความเสี่ยงของการเกิดหัวใจวายและลด การตายจากโรคหัวใจได้ (นิธิยา, 2553)



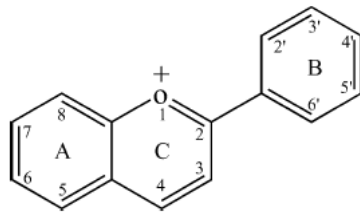
รูป 2.5 โครงสร้างทางเคมีของแอลฟา-โทโคฟีรอล (Imsanguan *et al.*, 2008)

2.3.2.3 แอนโทไซยานิน (anthocyanin)

แอนโทไซยานิน จัดอยู่ในกลุ่มของสารประกอบฟีนอลเป็นสารประกอบไกลโคไซด์ หรือเอซิลไกลโคไซด์ ซึ่งเป็นกลุ่มรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ พบได้ทั่วไปในธัญพืช ผัก และผลไม้ชนิดต่างๆ ที่มีสีแดงถึงดำ โดยพบอยู่บริเวณเยื่อหุ้มชั้นนอก (pericarp) และเยื่อหุ้มชั้นใน (aleurone layer) ของเมล็ดพืช เช่น ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ และ ฟิโอนิดิน-3-กลูโคไซด์ แอนโทไซยานินส่วนใหญ่จะมีโครงสร้างที่เป็นไซยานิดิน (cyanidin skeleton) เกิดจากรวมตัวกันของสารกลุ่มคูมาริน (coumarin) กรดเฟอร์ูลิก (ferulic acid) และกรดไซนาปิก (sinapic acid) นอกจากนี้ สีและความคงทนของแอนโทไซยานินนั้นขึ้นอยู่กับค่าความเป็นกรดและด่าง (pH) หากอยู่ในสภาพสารละลายจะให้สีที่แตกต่างกัน เช่น สีแดงในสถานะที่เป็นกรด สีนํ้าเงินถึงสีเหลืองในสถานะที่เป็นด่าง โดยการเกิดสีขึ้นอยู่กับหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) และหมู่เมทอกซิล (-OCH₃) ที่เกาะบนโครงสร้างหลักของแอนโทไซยานิน (รูป 2.6)

นอกจากนั้น ยังมีหมู่นํ้าตาล หรือหมู่เอซิล (R-C-) หรืออะซิติก (acetic) เกาะอยู่บนหมู่ไฮดรอกซิลอีกด้วย แต่นํ้าตาลและหมู่เอซิลมีผลต่อการเกิดสีน้อยมาก สีส่วนใหญ่เกิดจากการเกิดการเรโซแนนซ์ในโครงสร้างพื้นฐานกับหมู่ต่างๆ ที่มาเกาะบนโครงสร้างนั้น แอนโทไซยานิน ถ้ามีนํ้าตาล 1 หรือ 2 โมเลกุลมาเกาะบนคาร์บอนใดก็ตาม จะเรียกว่า แอนโทไซยานิดิน (anthocyanidine) ซึ่งมีความเสถียรภาพน้อยกว่า แอนโทไซยานิน (พิเชษฐ และสุกัญญา, 2549) โดยลักษณะสีที่ปรากฏ ความเข้มของสีเมล็ดธัญพืชจะแตกต่างกันออกไป เช่น สีเหลือง นํ้าตาล แดง ม่วง และดำ ซึ่งขึ้นอยู่กับองค์ประกอบ ชนิดและปริมาณของรงควัตถุที่มีอยู่ในเมล็ดธัญพืช รวมทั้งความแตกต่างของสายพันธุ์ การเพาะปลูก ความอ่อนแก่ และระยะเวลาการงอก (นิพัทธา และ

วริพัทธ์, 2553) ในรำข้าวดำมีปริมาณแอนโทไซยานินสูงถึงร้อยละ 7.07-10.70 (Kong *et al.*, 2003) โดย Yang and Zhai (2010) พบว่า สารสกัดแอนโทไซยานินจากข้าวสาลีสีม่วงมีประสิทธิภาพการต้านออกซิเดชัน (วิธี DPPH, TEAC และ FRAP) สูงกว่า BHT ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์



Anthocyanidins	Substitution pattern
Delphinidin	3,5,7,3',4',5'-OH
Cyanidin	3,5,7,3',4'-OH
Pelargonidin	3,5,7,4'-OH
Petunidin	3,5,7,4',5'-OH; 3'-OMe
Peonidin	3,5,7,4'-OH; 3'-OMe
Malvidin	3,5,7,4'-OH; 3',5'-OMe

รูป 2.6 โครงสร้างทางเคมีของแอนโทไซยานินในรูปแบบต่างๆ (Escribano-Bailon *et al.*, 2004)

วิไลวรรณ (2550) อ้างถึงการทดลองของ Ghiselli *et al.* (1998) ซึ่งได้ทำการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารที่พบในไวน์แดง พบว่า แอนโทไซยานิน มีผลต่อการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของลิโปโปรตีน (lipoprotein oxidation) และยังช่วยลดระดับลิโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำ (LDLs) ที่ถูกออกซิไดส์อีกด้วย ส่วนการทดลองของ Ling *et al.* (2001) ที่ทำการทดลองในกระต่ายโดยให้อาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง ร่วมกับการเสริมรำข้าวธรรมดาเปรียบเทียบกับกับรำข้าวสีแดงและดำ พบว่า ระดับคอเลสเตอรอลในเลือดของกลุ่มที่ได้รับรำข้าวสีแดงและดำจะมีระดับที่ต่ำกว่ากลุ่มที่ได้รับรำข้าวธรรมดา ซึ่งบ่งชี้ได้ว่าการเสริมรำข้าวที่มีสีสามารถลดการเกิดเปอร์ออกซิเดชันของลิพิด (lipid oxidation) ภายในตัวสัตว์ได้ จึงสรุปได้ว่าแอนโทไซยานินเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติที่สามารถควบคุมการเกิดออกซิเดชันได้

2.3.3 กลไกการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระสามารถแบ่งได้ตามกลไกการทำงานได้ 5 ประเภท (พรทวี, 2548) ดังนี้

2.3.3.1 สารป้องกันการหืนปฐมภูมิ (primary antioxidant) สารป้องกันการหืนกลุ่มนี้ทำหน้าที่เป็นตัวให้ไฮโดรเจนอะตอม หรืออิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ ซึ่งจะยับยั้ง หรือชะลอปฏิกิริยาออกซิเดชันในขั้นตอนเริ่มต้น

2.3.3.2 สารจับออกซิเจน (oxygen scavenger) เป็นสารที่ทำหน้าที่หยุดปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระ โดยเข้าทำปฏิกิริยากับออกซิเจน จึงทำให้เกิดอนุมูลอิสระลดลง สารจับออกซิเจนนี้

ทำหน้าที่เป็นสารเสริมฤทธิ์ คือ ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพสารป้องกันการหืน แต่อย่างไรก็ตาม สารจับออกซิเจนไม่มีความสามารถในการเป็นการกันหืน หรือมีน้อยมาก เช่น กรดแอสคอร์บิก กรดอิทธิธอร์เบท และโซเดียมอิทธิธอร์เบท เป็นต้น

2.3.3.3 สารป้องกันการหืนทุติยภูมิ (secondary antioxidant) เป็นสารที่ทำหน้าที่ในการชะลออัตราการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน สารเหล่านี้จะทำหน้าที่จับไอออนโลหะออกซิเจน และดูดซับสารรังสีอัลตราไวโอเลต ซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน อีกทั้งยังทำหน้าที่สลายสารไฮโดรเปอร์ออกไซด์ไปเป็นอนุมูลที่เสถียรและคงตัว

2.3.3.4 ตัวจับโลหะไอออน (chelating agents) โลหะไอออนของเหล็ก ทองแดง แมงกานีส โครเมียม นิกเกิล และอะลูมิเนียม เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดอนุมูลอิสระในปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน ตัวจับโลหะไอออนใช้เติมลงไปเพื่อเป็นสารเสริมฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น กรดซิตริก และกรดทาร์ทาริก เป็นต้น

2.3.3.5 เอนไซม์ที่ทำหน้าที่เป็นสารป้องกันการหืน (enzymatic antioxidant) ได้แก่ กลูตาไธโอนออกซิเดส ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส คะตะเลส และกลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดส โดยทำหน้าที่เป็นตัวกำจัดออกซิเจน ทำให้การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันเกิดได้ยากขึ้น

แต่อย่างไรก็ตาม นอกจากกลไกในการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระแต่ละประเภทข้างต้นแล้ว สภาวะแวดล้อมขณะที่สารเกิดกลไกต้านออกซิเดชันถือว่าเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญเช่นกัน จากรายงานของ Huang (1996) พบว่า ในอาหารที่เป็นน้ำมันข้าวโพดปกติ Trolox จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดลิพิดออกซิเดชันได้ดีกว่าแอลฟา-โทโคฟีรอล แต่เมื่อนำน้ำมันข้าวโพดไปทำเป็นอิมันชันแล้วทำการทดสอบอีกครั้ง ปรากฏว่า แอลฟา-โทโคฟีรอล จะมีประสิทธิภาพสูงกว่า Trolox เนื่องมาจากว่าความเป็นขี้ของต้านอนุมูลอิสระส่งผลต่อประสิทธิภาพในการทำงาน

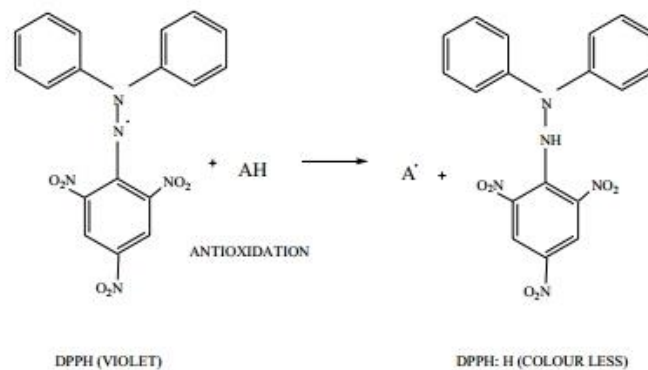
Tananuwong *et al.* (2010) รายงานว่า การเติมสารสกัดที่ได้จากข้าวกล้า 1,000 พีพีเอ็ม ลงในผลิตภัณฑ์มายองเนส พบว่า สามารถช่วยลดการเกิดออกซิเดชันของไขมัน เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 30 วัน

2.3.4 วิธีทดสอบคุณสมบัติต้านออกซิเดชัน

การทดสอบคุณสมบัติต้านออกซิเดชันของสารมีหลายวิธี ซึ่งแตกต่างกันไปตามคุณสมบัติที่ต้องการทดสอบ เช่น คุณสมบัติในการจับกับอนุมูลอิสระ การตกตะกอนโลหะซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน หรือการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน เป็นต้น วิธีที่นิยมทดสอบ มีดังนี้

2.3.4.1 DPPH radical scavenging

เป็นวิธีการตรวจวัดคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากพืช หรือสารสังเคราะห์ โดยอาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่างสารละลาย 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl หรือ DPPH ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่ค่อนข้างเสถียรกับสารที่ต้องการทดสอบ อิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยว (unpaired electron) ในโมเลกุลของอนุมูล DPPH สามารถดูดกลืนพลังงานแสงได้ที่มีความยาวคลื่นสูงสุด 517 นาโนเมตร ทำให้มองเห็นเป็นสีม่วง และเมื่ออนุมูลดังกล่าวถูกรีดิวซ์โดยสารต้านอนุมูลอิสระที่มีคุณสมบัติเป็น hydrogen donor อนุมูล DPPH จะเปลี่ยนไปอยู่ในรูป DPPH-H ซึ่งการสูญเสียอิเล็กตรอนดังกล่าว ทำให้สารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ส่งผลให้ความสามารถในการดูดกลืนแสงลดลง (พรทวี, 2548 และกรรกาญจ, 2555) ดังรูป 2.7



รูป 2.7 ปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงของอนุมูล DPPH (Molyneux., 2003)

2.3.4.2 Metal chelating

เป็นวิธีการทดสอบความสามารถของการจับกับโลหะของสารทดสอบ เนื่องจากโลหะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันให้เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว วิธีนี้อาศัยหลักการทำปฏิกิริยาระหว่างสารทดสอบกับเฟอร์รัสไอออน (ferrous ion, Fe^{2+}) แล้ววัดความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร นิยมใช้ EDTA เป็นตัวอย่างอ้างอิง (Chang *et al.*, 2002)

2.3.4.3 Inhibition of lipid peroxidation

วิธีนี้จะทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารทดสอบในระบบที่ประกอบด้วยไขมันในสารละลายบัฟเฟอร์ โดยทั่วไปนิยมใช้กรดลิโนเลอิก (linoleic acid) และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) พีเอช 7.0 วิธีนี้อาศัยหลักการวัด

ค่าการดูดกลืนแสงของ conjugated diene ที่เกิดขึ้นในระหว่างปฏิกิริยาออกซิเดชัน ที่ความยาวคลื่น 234 นาโนเมตร (Tananuwong *et al.*, 2010)

2.4 การสกัดด้วยตัวทำละลาย (solvent extraction)

การสกัด (extraction) หมายถึง การดึงเอาสารที่สนใจที่อยู่ในเฟสหนึ่งไปสู่อีกเฟสหนึ่ง โดยในขั้นตอนดังกล่าว สารเจือปนอื่นๆ ไม่ควรถูกดึงมาด้วย หรือหากคิดมาด้วยก็ต้องสามารถกำจัดออกได้ เพื่อจะได้สารที่มีความบริสุทธิ์มากขึ้นกว่าเดิม ตัวอย่างที่สนใจจะศึกษาจะต้องมีความสามารถในการละลายได้ต่างกันในตัวทำละลายที่เป็นของเหลวสองชนิดที่ไม่ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน (immiscible liquids) (สุภาภรณ์, 2548)

การสกัดของแข็งด้วยตัวทำละลาย หรือการชะ (solid-liquid extraction หรือ leaching) หมายถึง การแยกสารที่ต้องการ หรือตัวถูกละลายออกจากเฟสที่เป็นของแข็งโดยใช้ตัวทำละลาย โดยอาศัยหลักการที่ว่า สารแต่ละชนิดมีความสามารถในการละลายในตัวทำละลายต่างชนิดกัน ได้ไม่เท่ากัน การสกัดจะทำได้ดีหรือไม่ขึ้นอยู่กับ การละลายของตัวถูกละลายในตัวสกัด หรือตัวทำละลายของเหลว และเวลาที่ใช้ในการสกัด ซึ่งเวลาที่ใส่จะสั้น หรือนาน ขึ้นอยู่กับลักษณะของตัวถูกละลายที่อยู่ในสารตัวอย่างของแข็ง ถ้าตัวถูกละลายเพียงดูดซับที่ผิวของของแข็ง การสกัดจะใช้เวลาสั้น แต่ถ้าวถูกละลายอยู่ภายในของแข็ง จะต้องใช้เวลามากกว่า และถ้าปรากฏว่า การกระจายของตัวทำละลายภายในของแข็งเกิดขึ้นได้ช้ามาก จำเป็นต้องบดของแข็งให้ละเอียดก่อนทำการสกัด (Rydberg, 1992)

2.4.1 วิธีการสกัดของแข็งด้วยตัวทำละลาย (Gibbs, 2013)

โดยทั่วไป ในระหว่างขั้นตอนการสกัด หรือการชะ มี 3 กระบวนการหลักที่เกิดขึ้น ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 : การแพร่ผ่านของตัวทำละลายที่ใช้สกัดเข้าสู่ช่อง หรือรูพรุนของเฟสที่เป็นของแข็งที่ต้องการสกัด

ขั้นตอนที่ 2 : ตัวทำละลายที่แพร่ผ่านเข้าไปภายในเฟสของของแข็งจะชะ หรือละลายตัวถูกละลายออกมา ทั้งนี้ความเป็นขั้วของตัวทำละลาย และตัวถูกละลายจะต้องมีคุณสมบัติคล้ายคลึงกัน (like dissolve like)

ขั้นตอนที่ 3 : การถ่ายเทตัวทำละลายที่อิ่มด้วยตัวถูกละลายภายในเฟสของแข็งออกสู่สารละลายภายนอก

วิธีการสกัดของแข็งสามารถทำได้ 2 วิธี คือ

1. ถ้าตัวถูกละลายอยู่ในสารตัวอย่างที่อยู่ในเฟสของแข็งเพียงแค่นวดซับที่ผิว และการละลายของตัวถูกละลายในตัวสกัด หรือตัวทำละลายมีค่าสูง การสกัดสามารถทำได้ง่าย คือ นำสารตัวอย่างใส่ลงในบีกเกอร์ หรือขวดปากกว้าง แล้วเติมตัวสกัด หรือตัวทำละลายลงไป จากนั้นคนด้วยเครื่องคน หรือถ้าใช้ขวดปากกว้างที่มีฝาปิดสนิทก็สามารถใช้เครื่องเขย่า (shaker) เมื่อคนเป็นเวลานานพอจนแน่ใจว่าตัวถูกละลายได้ละลายในตัวสกัดหมดแล้ว จากนั้นกรองแยกเอาของแข็งออกจากสารละลาย จากนั้นค่อยทำการกำจัดตัวทำละลายซึ่งอาจจะใช้เครื่องระเหยแบบสุญญากาศ

2. ถ้าตัวถูกละลายเป็นสารประกอบอินทรีย์ หรือสารทางชีวภาพ ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีการละลายในตัวสกัดต่ำ หรือการสกัดจะสมบูรณ์ได้จะต้องใช้เวลานานๆ จำเป็นต้องใช้เทคนิคของการสกัดอย่างต่อเนื่อง ซึ่งเครื่องมือที่ใช้สำหรับทำการสกัดอย่างต่อเนื่องมีอยู่ 2 แบบ คือ Continuous Infusion Extractor และ Discontinuous-infusion Extractor ซึ่งมีชื่อเรียกที่รู้จักกันดีคือ เครื่องสกัดของซอกเลต (soxhlet extractor)

2.4.2 การเลือกใช้ตัวทำละลาย

สิ่งที่สำคัญที่จะทำให้การสกัดได้ผลอย่างไร่นั้น สาเหตุหนึ่งอยู่ที่การเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสม ตัวทำละลายที่ดีควรมีคุณสมบัติดังนี้ คือ เป็นตัวทำละลายที่สามารถละลายสารที่ต้องการสกัดได้ ไม่ระเหยง่ายหรือยากเกินไปต้องคำนึงถึงจุดเดือดของสาร ไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการสกัด ไม่เป็นพิษ และราคาไม่แพง (ชัยวุฒิ และชุติมา, 2544)

หลักเกณฑ์ที่ต้องคำนึงถึงในการเลือกตัวทำละลาย ได้แก่

2.4.2.1 ตัวถูกละลาย และตัวทำละลายมีคุณสมบัติความเป็นขั้วที่คล้ายคลึง หรือใกล้เคียงกัน (like dissolve like)

2.4.2.2 ตัวทำละลายต้องละลายสารที่ต้องการออกมามากที่สุด และละลายสารที่ไม่ต้องการออกมาน้อยที่สุด (selectivity) โดยความสามารถในการละลายของสารที่ต้องการสกัดแยกออกมาในตัวทำละลายที่เลือกใช้นั้น คือ อัตราส่วนของการแพร่กระจายของสารนั้นจะต้องมีค่าสูง จึงจะทำให้สารที่ถูกแยกออกมาได้โดยง่ายและเร็ว ในขณะเดียวกันสารชนิดอื่นที่ปนอยู่จะต้องมีอัตราส่วนการแพร่กระจายต่ำ จึงจะทำให้สามารถแยกออกจากกันได้

2.4.2.3 แรง (force) ซึ่งเกี่ยวข้องในการละลายที่สำคัญ ได้แก่

- Dispersion force เป็นแรงที่เกิดจากการเหนี่ยวนำของประจุในโมเลกุลตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว จะประกอบด้วยโมเลกุลซึ่งเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ ทำให้สารพวกที่ไม่มีขั้วเข้าไปแทรกตัวอยู่ระหว่างโมเลกุลได้ง่าย

- Dipole/dipole force เป็นแรงที่พบในตัวทำละลายที่มีขั้วเกิดการเหนี่ยวนำในโมเลกุล เกิดเป็นขั้วบวกและขั้วลบ พวกนี้จะทำให้โมเลกุลของตัวทำละลายที่มีขั้วจับกันแน่น สารที่ไม่มีขั้วจะแทรกตัวเข้าไปได้ยาก

- Hydrogen bonding สารที่สามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนกับตัวทำละลายได้ดี จะทำให้สามารถละลายได้ดีขึ้น

2.4.2.4 ในการสกัดบางกรณีการเลือกใช้ตัวทำละลายผสม จะช่วยให้การสกัดแยกสารทำได้ดียิ่งขึ้น ตัวทำละลายอาจจะจัดเรียงตามลำดับความมีขั้วจากน้อยไปมากได้ดังนี้ ไฮโดรคาร์บอนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (เช่น petroleum ether และ hexane) ไซโคลเฮกเซน (cyclohexane) คาร์บอนเตตระคลอไรด์ (carbon tetrachloride) เอทิลีนไตรคลอไรด์ (ethylene trichloride) โทลูอีน (toluene) เบนซีน (benzene) ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane) คลอโรฟอร์ม (chloroform) อะซิโตน (acetone) เอทิลอะซิเตต (ethyl acetate) โพรพานอล (propanol) เอทานอล (ethanol) เมทานอล (methanol) น้ำ สารละลายกรด และสารละลายเบส ตามลำดับ

2.4.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดด้วยตัวทำละลาย

2.4.2.1 ตัวทำละลาย

Lai *et al.* (2009) ได้ทำการศึกษาการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระกลุ่มแกมมา-ออริซานอล โทโคฟีรอล และโทโคไตรอีนอลจากรำข้าว พบว่าตัวทำละลายที่สกัดได้ร้อยละผลผลิตมากที่สุด คือ เมทานอล เอทิลอะซิเตต และเฮกเซน ตามลำดับ จากนั้นนำสารสกัดจากตัวทำละลายต่างๆ ไปทดสอบสมบัติการต้านออกซิเดชัน พบว่า สารสกัดที่ใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย มีความสามารถในการยับยั้งการเกิดเปอร์ออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิกดีที่สุด (ร้อยละ 57) รวมถึงผลจากการทดสอบ DPPH scavenging radical, reducing power และ metal chelating activities พบว่า มีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้ตัวทำละลายเฮกเซน และเอทิลอะซิเตต

Meltivier *et al.* (1980) ได้ทำการศึกษาการสกัดสารแอนโทไซยานินในกากองุ่นที่เหลือจากกระบวนการผลิตไวน์แดง โดยใช้ตัวทำละลายในการสกัด ได้แก่ เมทานอล เอทานอล และน้ำ พบว่า เมทานอลสามารถสกัดสารแอนโทไซยานินออกมาได้มากกว่าเอทานอล และน้ำ ตามลำดับ โดยประสิทธิภาพการสกัดของเมทานอลสูงกว่าเอทานอล และน้ำ ถึงร้อยละ 20 และร้อยละ 73 ตามลำดับ

Chen and Bergman (2005) ได้ศึกษาการใช้ตัวทำละลาย 4 ชนิด ได้แก่ ไอโซ - โพรพานอล เมทานอล เฮกเซน และตัวทำละลายผสมระหว่างไอโซโพรพานอลและเฮกเซน (1:1) ในการสกัดสารแกมมา-ออริซานอล และแอลฟา-โทโคฟีรอลจากรำข้าว พบว่า ตัวทำละลายผสมระหว่างไอโซโพรพานอลและเฮกเซน (1:1) เป็นตัวทำละลายที่สกัดสารแอลฟา-โทโคฟีรอลได้ในปริมาณสูงสุด (73.7 มิลลิกรัมต่อกรัม) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในขณะที่ ปริมาณสารแกมมา-ออริซานอลที่สกัดได้จากตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิดไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (3.4-3.9 มิลลิกรัมต่อกรัม)

2.4.2.2 อุณหภูมิ

Zigoneanu *et al.* (2008) ได้ทำการศึกษาผลของอุณหภูมิ (40-120 องศาเซลเซียส) ที่มีต่อการสกัดวิตามินอีจากน้ำมันรำข้าวโดยใช้ไอโซโพรพานอล และเฮกเซนเป็นตัวทำละลาย พบว่า ปริมาณวิตามินอีที่สกัดได้จะเพิ่มตามอุณหภูมิที่สูงขึ้น ซึ่งอุณหภูมิที่สามารถสกัดวิตามินอีได้สูงสุด คือ 120 องศาเซลเซียส เมื่อใช้ไอโซโพรพานอล และเฮกเซนเป็นตัวทำละลาย จะได้วิตามินอีในปริมาณสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เท่ากับ 152.31 และ 248.50 ไมโครกรัมต่อกรัม ตามลำดับ

Imsanguan *et al.* (2008) ได้ทำการศึกษาการสกัดสารแกมมา-ออริซานอล จากรำข้าว โดยใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลาย อุณหภูมิระหว่างการสกัด คือ 32 และ 55-60 องศาเซลเซียส พบว่า ปริมาณสารแกมมา-ออริซานอลโดยการสกัดที่อุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส สูงกว่าการสกัดที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส ถึง 1.4 เท่า

2.4.2.3 ระยะเวลาการสกัด

Devi *et al.* (2007) ได้ทำการศึกษาการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพกลุ่มแกมมา-ออริซานอลในรำข้าวที่ถูกกำจัดไขมันออก โดยใช้ระยะเวลาในการสกัดทั้งหมด 10 ชั่วโมง พบว่า ที่เวลาในการสกัด 1 ชั่วโมง จะสามารถสกัดสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดได้ร้อยละ 53 และเมื่อเวลาในการสกัดเพิ่มขึ้นเป็น 5 ชั่วโมง สารประกอบฟีนอลิกที่สกัดได้จะเพิ่มขึ้นสูงถึงร้อยละ 95 แต่หลังจากการสกัด 5 ชั่วโมงถัดไป พบว่า สารประกอบฟีนอลิกที่สกัดได้จะเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

Imsanguan *et al.* (2008) ได้ศึกษาผลของระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดสารแกมมา-ออริซานอล และแอลฟา-โทโคฟีรอล ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พบว่า การสกัดช่วง 3 ชั่วโมงแรก ปริมาณสารแกมมา-ออริซานอลจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจาก 0 ถึง 9,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม หลังจากนั้น ช่วงเวลาสกัดชั่วโมงที่ 3 ถึง 7 ปริมาณสารแกมมา-ออริซานอลจะเริ่มคงที่

ในขณะเดียวกัน การสกัดสารแอลฟา-โทโคฟีรอล จะมีปริมาณสูงสุด เท่ากับ 130 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในช่วง 4 ชั่วโมงแรก และจะเริ่มคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 7

Tananuwong *et al.* (2010) ได้ศึกษาการสกัดสารแอนโทไซยานิน โดยใช้ตัวทำละลายเมทานอลที่มีค่า pH เท่ากับ 6.8 พบว่า เมื่อระยะเวลาการสกัดเพิ่มขึ้นจาก 2 ถึง 8 ชั่วโมง ปริมาณสารแอนโทไซยานินที่สกัดได้จะเพิ่มขึ้นจาก 275 ถึง 298 ไมโครกรัมต่อกรัม แต่เมื่อปรับค่า pH ของสารละลายลง เท่ากับ 2.0 การสกัดโดยใช้เวลา 4 ชั่วโมง จะให้ปริมาณแอนโทไซยานินสูงสุด เท่ากับ 352 ไมโครกรัมต่อกรัม

2.4.2.4 อัตราส่วนของวัตถุดิบต่อตัวทำละลาย

Devi *et al.* (2007) ได้ทำการศึกษาการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างรำข้าวต่อตัวทำละลายที่ใช้สกัด คือ เมทานอล ในอัตราส่วนดังนี้ 1:5, 1:10, 1:15 และ 1:20 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ใช้ระยะเวลาในการสกัด 12 ชั่วโมง พบว่า อัตราส่วนที่เหมาะสมในการสกัดให้ได้สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และแกมมา-ออริซานอลในปริมาณสูง คือ 1:15 เนื่องจาก ให้ผลที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการสกัดด้วยอัตราส่วน 1 : 20 ($p>0.05$)

Oliveira *et al.* (2012) ได้ศึกษาผลของอัตราส่วนของตัวทำละลายต่อรำข้าวเพื่อใช้สกัดสารแกมมา-ออริซานอล และแอลฟา-โทโคฟีรอล พบว่า อัตราส่วน 4:4 สามารถสกัดสารแกมมา-ออริซานอล และแอลฟา-โทโคฟีรอล เท่ากับ 3,292 และ 195 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในขณะที่อัตราส่วน 3:3 จะได้สารทั้งสองในปริมาณต่ำกว่า ซึ่งมีค่าเท่ากับ 3,241 และ 143 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

2.4.2.5 ความเป็นกรด-ด่าง

Meltivier *et al.* (1980) ได้ทำการศึกษาการสกัดสารแอนโทไซยานินในกาบองุ่นที่เหลือจากกระบวนการผลิตไวน์แดง โดยใช้ตัวทำละลายในการสกัด คือ เมทานอล และชนิดของกรดที่ใช้ร่วมกับตัวทำละลาย ได้แก่ กรดไฮโดรคลอริก กรดซิตริก กรดทาร์ทาริก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และกรดโพรพิโอนิก พบว่า การสกัดด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้นร้อยละ 10 ในเมทานอลสามารถสกัดสารแอนโทไซยานินได้ในปริมาณสูงที่สุด ส่วนการใช้กรดร่วมกับน้ำเป็นตัวทำละลาย พบว่า กรดอะซิติก มีประสิทธิภาพการสกัดสูงที่สุด

Patil *et al.* (2009) ได้ศึกษาการสกัดแอนโทไซยานินจากหัวไชเท้าแดง โดยใช้ น้ำเป็นตัวทำละลาย และใช้กรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้นร้อยละ 1 และ 2 ช่วยในการสกัด พบว่า การสกัดโดยใช้น้ำร่วมกับกรดไฮโดรคลอริกร้อยละ 2 ให้ปริมาณแอนโทไซยานินสูงสุด คือ 30.0 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร รองลงมา คือ การสกัดโดยใช้น้ำร่วมกับกรดไฮโดรคลอริกร้อยละ 1 และ

การสกัดโดยใช้น้ำ ซึ่งให้ปริมาณแอนโทไซยานิน เท่ากับ 29.0 และ 26.2 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ตามลำดับ

Chandrasekhar *et al.* (2012) ได้รายงานว่าการสกัดสารแอนโทไซยานินจาก กระหล่ำปลีม่วงด้วยน้ำร่วมกับกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้นร้อยละ 4 จะให้ปริมาณแอนโทไซยานินสูงสุด เท่ากับ 311 มิลลิกรัมต่อลิตร รองลงมา คือ การใช้น้ำร่วมกับกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้นร้อยละ 3, 2, 1 และน้ำ ซึ่งมีปริมาณแอนโทไซยานิน เท่ากับ 280, 275, 258 และ 230 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

2.5 โครงสร้างพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology) (กรรณานุช, 2555)

วิธีโครงสร้างพื้นผิวตอบสนอง หรือ RSM เป็นวิธีการทางคณิตศาสตร์ และสถิติที่ใช้ในการสร้างแบบจำลอง และวิเคราะห์ปัญหาซึ่งแสดงผลตอบสนองต่อผลจากตัวแปรต่างๆ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อหาจุด หรือความเหมาะสมต่อผลนั้น ในอุตสาหกรรมอาหารทั่วไป นิยมใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการผลิตอาหาร (process optimization) หรือใช้ในการหาสมการที่เหมาะสมสำหรับงานวิจัย และพัฒนาผลิตภัณฑ์ (food formulation or product optimization)

2.5.1 หลักการสำคัญของการใช้โครงสร้างพื้นผิวตอบสนอง

มีหลักการดังนี้

2.5.1.1 การนำเสนอโครงสร้างพื้นผิวตอบสนองต้องมีแผนการทดลองที่เหมาะสม อย่างน้อยต้องมีตัวแปรอิสระ 2 ตัวขึ้นไป และต้องเป็นตัวแปรเชิงปริมาณ ต้องมีตัวแปรตามอย่างน้อย 1 ตัวขึ้นไป และต้องเป็นตัวแปรเชิงปริมาณด้วย ดังนั้น แผนการทดลองที่สามารถสร้างพื้นที่ผิวตอบสนองได้ ได้แก่ Factorial Design, Mixture Design, Central Composite Design (CCD), Placket and Burman Design และ Box-behnken Design เป็นต้น

2.5.1.2 ระดับของตัวแปรอิสระที่ต้องผันแปร ไปนั้น จำเป็นต้องครอบคลุมพื้นที่ที่ต้องการศึกษา

2.5.1.3 ข้อมูลของตัวแปรอิสระแต่ละตัว (X_i) ต้องสัมพันธ์กับข้อมูลของตัวแปรตาม (Y_i) เพื่อสร้างเป็นแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ ซึ่งอาจมีทั้งความสัมพันธ์ในเชิงเส้นตรง (linear model) ความสัมพันธ์ในเชิงปฏิสัมพันธ์ (interaction model) และความสัมพันธ์ในเชิงเส้นโค้ง (quadratic model)

2.5.1.4 การสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่เป็นภาพสามมิติ หรือที่เรียกว่าสร้างพื้นผิว
ผลตอบสนอง มีหลายรูปแบบ เช่น

$$\text{Linear effect} : Y = a_0 + a_1X_1 + \epsilon$$

$$\text{Quadratic effect} : Y = a_0 + a_1X_1 + a_{11}X_{12} + \epsilon$$

$$\text{Interaction effect} : Y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_{12}X_1X_2 + a_{11}X_{12} + a_{22}X_{22} + \epsilon$$

ดังนั้น สมการทางคณิตศาสตร์พจน์ทั่วไป จึงเขียนได้ดังนี้

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \sum \beta_{ij} X_i X_j + \epsilon$$

2.5.2 รูปแบบการวางแผนการทดลองสำหรับวิธีโครงสร้างพื้นผิวตอบสนอง

รูปแบบแผนการทดลองที่นิยมใช้ร่วมกับวิธีโครงสร้างพื้นผิวตอบสนอง มีหลายชนิด
ได้แก่

2.5.2.1 Factorial Design

แผนการทดลองแบบแฟกทอเรียล ประกอบด้วยตำแหน่งการทดลองของ 2^n
factorial design เมื่อ n คือ ตัวแปรอิสระ 2 ตัว ดังนั้น 2^2 มีตำแหน่งการทดลองทั้งหมด 4 ตำแหน่ง
ได้แก่ $(-1,-1)$, $(+1,-1)$, $(+1,+1)$ และ $(-1,+1)$ ดังรูป 2.8 (ก)

2.5.2.2 Box-Behnken Design (BBD)

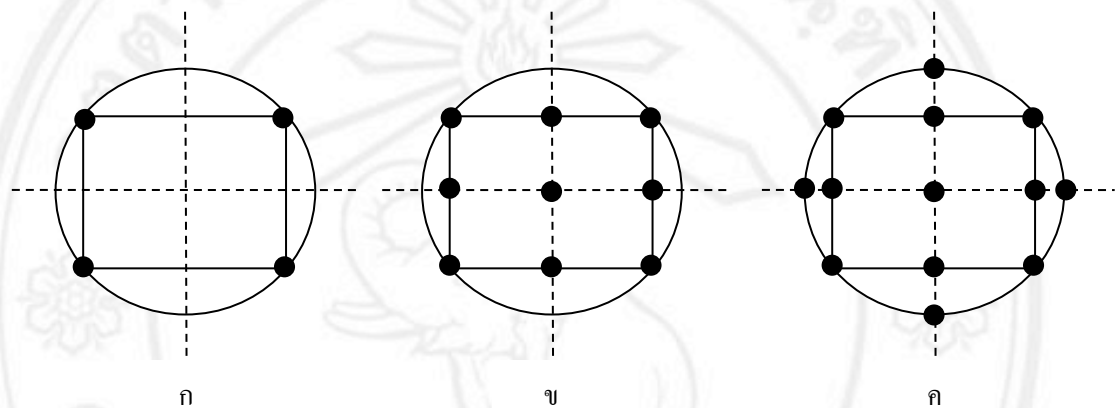
แผนการทดลองแบบนี้ ประกอบด้วยตำแหน่งการทดลองของ 2^n factorial design
เมื่อ n คือ ตัวแปรอิสระ 2 ตัว ดังนั้น 2^2 มีตำแหน่งการทดลองทั้งหมด 4 ตำแหน่ง ได้แก่ $(-1,-1)$,
 $(+1,-1)$, $(+1,+1)$ และ $(-1,+1)$ แต่จะมีตำแหน่งการทดลองที่เพิ่มขึ้นมาอีก 4 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งที่
เป็นแนวระนาบ ได้แก่ $(+1,0)$, $(-1,0)$, $(0,+1)$ และ $(0,-1)$ และตำแหน่งตรงกลางของพื้นที่การทดลอง
(center point) อีก 1 ตำแหน่ง คือ $(0,0)$ แต่ละปัจจัยมี 3 ระดับ คือ -1 , 0 และ $+1$ ดังรูป 2.8 (ข)

2.5.2.3 Central Composite Design (CCD)

แผนการทดลองนี้ คล้ายกับแผนการทดลองแบบ factorial design และ box-
behken design โดยแผน CCD ประกอบด้วย ตำแหน่งการทดลองของ 2^n factorial design เมื่อ n คือ
ตัวแปรอิสระ 2 ตัว ดังนั้น 2^2 มีตำแหน่งการทดลองทั้งหมด 4 ตำแหน่ง ได้แก่ $(-1,-1)$, $(+1,-1)$,
 $(+1,+1)$ และ $(-1,+1)$ แต่จะมีตำแหน่งการทดลองที่เพิ่มขึ้นมาอีก 4 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งที่เป็นแนว
 $+\alpha$ หรือ $-\alpha$ ได้แก่ $(+\alpha,0)$, $(-\alpha,0)$, $(0,+\alpha)$ และ $(0,-\alpha)$ และตำแหน่งตรงกลางของพื้นที่การทดลอง

(center point) อีก 1 ตำแหน่ง คือ (0,0) แต่ละปัจจัยมี 3 ระดับ คือ -1.414 , -1 , 0 , 1 และ $+1.414$ ดังรูป 2.8 (ก)

ดังนั้น การทดลองแบบ CCD จึงเป็นการทดลองแบบที่ครอบคลุมพื้นที่ที่ต้องการศึกษาได้มากกว่า factorial design และ box-behnken design สำหรับแผนการทดลองแบบ CCD นั้น สามารถกำหนดตำแหน่งของการทดลองได้ดังตาราง 2.2



รูป 2.8 ตำแหน่งการทดลองของ (ก) Factorial Design (ข) Box-behnken Design (BBD) และ (ค) Central Composite Design (CCD)

ตาราง 2.2 ตำแหน่งของการทดลองแบบ CCD

จำนวนตัวแปรอิสระ (X_i) = n	2	3	4	5
จำนวนตำแหน่งการทดลองทั้งหมด	9	15	25	43
ระดับของค่า $\alpha = 2^{n/4}$	1.4142	1.6818	2	2.3784

เมื่อพิจารณาแผนการทดลองสำหรับวิธีโครงสร้างพื้นผิวตอบสนอง ทั้ง 3 แผนการทดลอง พบว่า แผนการทดลองแบบ CCD มีความเหมาะสมในการนำไปใช้กับการศึกษาครั้งนี้มากที่สุด เนื่องจาก แผนการทดลองนี้มีการกระจายระดับของข้อมูลออกจากศูนย์กลางเพื่อศึกษาระดับของปัจจัยที่ส่งผลต่อค่าตอบสนองสูงสุด และลักษณะตำแหน่งและการกระจายระดับของปัจจัยยังครอบคลุมพื้นที่ที่ต้องการศึกษาได้มากกว่าแบบแฟกทอเรียล และ BBD นั้นเอง ถึงแม้การวางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียลจะครอบคลุมพื้นที่สำหรับศึกษาที่น้อยกว่า แต่ว่าถือเป็นการทดลองที่ใช้เมื่อต้องการพิจารณาถึงผลที่เกิดจากการรวมกันของระดับของปัจจัยทั้งหมดที่เป็นไปได้ในการทดลองนั้นๆ และมีประโยชน์ในด้านการหลีกเลี่ยงปัญหาที่เกิดจากอันตรกิริยาของปัจจัยที่จะก่อให้เกิดข้อสรุปที่

ผิดพลาดได้ เนื่องจากเป็นแผนการทดลองที่มีประสิทธิภาพเหนือกว่าการทดลองที่ละปัจจัย และสะดวกต่อการประมาณผลของปัจจัยหนึ่งที่ระดับต่างๆ ของปัจจัยอื่นได้ รวมทั้งทำให้สามารถหาข้อสรุปที่สมเหตุสมผลตลอดเงื่อนไขของการทดลองได้

ส่วนแผนการทดลองแบบ BBD นั้น เป็นแบบการทดลองที่ทุกจุดที่ศึกษาวางอยู่บนรูปทรงกลม และไม่ได้รวมเอาจุดใดๆ ที่เป็นจุดยอดของรูปลูกบาศก์ที่สร้างขึ้นจากขีดจำกัดบนและล่างของแต่ละตัวแปรเอาไว้ ซึ่งแผนการทดลองชนิดนี้จะมีประโยชน์มากเมื่อจุดที่อยู่บนมุมของลูกบาศก์เป็นการรวมเอาปัจจัยระดับที่แพงมาก หรือเป็นไปได้ที่จะทำการทดลอง อันเนื่องมาจากข้อจำกัดทางด้านกายภาพของกระบวนการ

2.6 กุนเชียง และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กุนเชียง มาจากภาษาจีนแต้จิ๋วว่า กุ้งเชียง แปลว่า ไส้กรอก ซึ่งกุนเชียง คือ ไส้กรอกแบบจีนดั้งเดิม (ราชบัณฑิตยสถาน, 2556) ส่วนกุนเชียงหมูในปัจจุบัน เป็นผลิตภัณฑ์ไส้กรอกชนิดหนึ่งทำจากเนื้อหมูและมันหมู ที่นำมาบดหยาบแล้วผสมเครื่องปรุง เช่น น้ำตาล เกลือ และส่วนประกอบอื่นที่เหมาะสม เช่น เครื่องเทศและสมุนไพร ซิอิ้ว เป็นต้น แล้วนำไปบรรจุไส้โดยอาจหมักก่อนบรรจุหรือไม่ก็ได้ แล้วทำให้แห้ง (มพช.103-2546) สีของผลิตภัณฑ์สุดท้ายจะมีสีแดงถึงแดงสด (ภาคผนวก ง-6) หรืออาจขึ้นอยู่กับชนิด และปริมาณของสารเจือปนอาหารที่เติมเพื่อรักษาสี หรือยืดอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์

ผลิตภัณฑ์กุนเชียงหมู เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีขั้นตอนการเตรียม และผลิตที่ไม่ยุ่งยาก ใช้วัตถุดิบซึ่งหาได้ง่ายทั่วไปเป็นส่วนผสมหลัก คือ เนื้อหมูและไขมันหมู แต่องค์ประกอบไขมันดังกล่าวทำให้ผลิตภัณฑ์กุนเชียงหมูประเภทนี้มักเกิดการเสื่อมเสียจากปฏิกิริยาทางเคมี หรือ เกิดการออกซิเดชันของไขมันได้ง่ายหากเก็บรักษาไว้ในสถานะที่ไม่เหมาะสม อย่างไรก็ตาม ด้วยข้อได้เปรียบที่ง่ายต่อการเตรียมและผลิต ความเป็นไปได้สูงที่จะศึกษาเกี่ยวกับแนวโน้มของปฏิกิริยาออกซิเดชัน รวมถึงการได้รับความนิยมนในการรับประทานมาเป็นระยะเวลานานทำให้ผลิตภัณฑ์กุนเชียงได้รับความนิยมอย่างมากมาเพื่อการประยุกต์ใช้เป็นแบบจำลองอาหาร (food model) สำหรับงานวิจัยต่างๆ เช่น

Wang *et al.* (1995) ได้ประยุกต์ใช้กุนเชียงหมูเป็นแบบจำลองอาหารเพื่อการศึกษาเปรียบเทียบการเกิดออกซิเดชันของลิพิด และคลอโรสเทอรอลในผลิตภัณฑ์ดังกล่าวที่บรรจุในบรรจุภัณฑ์ 2 ชนิด ระหว่างชนิดสุญญากาศ และชนิดดัดแปรบรรยากาศ (Modified Atmosphere Packaging, MAP) และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 เดือน

Wang (2000) ทำการศึกษาผลของการยืดอายุการเก็บรักษา การเปลี่ยนแปลงทางเคมี และกายภาพของกุ้งแช่แข็งในบรรจุภัณฑ์แบบสุญญากาศที่เก็บรักษา ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 25 วัน เมื่อเติมสารกันบูด 3 ชนิด ได้แก่ โซรบีทอล ความเข้มข้นร้อยละ 3 โซเดียมแลคเตต ความเข้มข้นร้อยละ 3 และไนซิน ความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม

Lin and Lin (2002) ได้ทำการคัดเลือกกุ้งแช่แข็งมาเป็นแบบจำลองอาหารเพื่อศึกษาผลของสาร 3 ชนิด ได้แก่ โซเดียมแลคเตต ความเข้มข้นร้อยละ 3 ไตรโซเดียมฟอสเฟต ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 และโพแทสเซียมซอร์เบต ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติด้านเคมี-กายภาพ และอายุการเก็บรักษา เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์

Liu *et al.* (2010) ทำการศึกษากการทดแทนการใช้สารไนไตรท์ในกุ้งแช่แข็งด้วยการเติมข้าวแดง (anka rice) ความเข้มข้นร้อยละ 0.5, 1.0 และ 1.5 ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 56 วัน แล้ววัดติดตามการเปลี่ยนแปลงค่าสี (L, a และ b) ค่าออกซิเจนเปอร์ออกไซด์ และองค์ประกอบทางเคมีอื่นๆ

Feng *et al.* (2013) ทำการศึกษากผลของการทดแทนไขมันสัตว์ด้วยกิม (Mesona Blumes) ในกุ้งแช่แข็ง ที่เก็บรักษาเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ โดยวัดค่า TBARS value และทดสอบทางประสาทสัมผัสเปรียบเทียบกับกุ้งแช่แข็งที่ใช้ไขมันสัตว์ทั่วไป

Qi and Zhou (2013) ได้ทำการศึกษาความเป็นไปได้ที่จะชะลอ หรือยับยั้งการเกิดออกซิเดชันในกุ้งแช่แข็งเมื่อเติมสารสกัดจากเมล็ดบัว ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 ถึง 2.0 ทดแทนด้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ โดยตรวจวัดตามค่าทางเคมีที่สามารถบ่งชี้แนวโน้มการเกิดออกซิเดชันได้ ได้แก่ ค่า TBARS value, PV value และ AV value เป็นต้น

Zhang *et al.* (2013) ได้ศึกษาผลของความคงตัวต่อการเกิดออกซิเดชันของกุ้งแช่แข็งที่เติมสารสกัดจากเสจ (*salvia officinalis*) ในระหว่างเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 21 วัน โดยตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงทางด้านกายภาพ และเคมี เช่น ค่าสี (L, a และ b) ปริมาณสารกลุ่มคาร์บอนิล (carbonyls) ไทออล (thiol) และค่า TBARS value เป็นต้น

พรทวี (2545) ได้ใช้กุ้งแช่แข็งเป็นแบบอาหารจำลองเพื่อทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของสารสกัดจากโรสแมรี่ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยวัดติดตามค่า PV value และการเปลี่ยนแปลงค่าสี (L, a และ b) และผลการประเมินทางประสาทสัมผัสตลอดระยะเวลาในการเก็บรักษา

วนิดา (2545) ทำการศึกษากประสิทธิภาพการยับยั้งการเกิดออกซิเดชัน และการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียของสารสกัดจากสาหร่ายทะเลบางชนิด โดยใช้กุ้งแช่แข็งเป็น

แบบอาหารจำลอง และวัดติดตามการเปลี่ยนแปลงทางเคมีต่างๆ และผลการประเมินทางประสาทสัมผัสตลอดระยะเวลาในการเก็บรักษา

2.7 การประยุกต์ใช้สารสกัดจากธรรมชาติเพื่อยับยั้ง หรือชะลอการเสื่อมเสียของอาหาร

การประยุกต์ใช้สารสกัดจากธรรมชาติเพื่อยับยั้ง หรือชะลอการเสื่อมเสียของอาหารเนื่องจากปฏิกิริยาทางเคมี เช่น ปฏิกิริยาการเกิดเปอร์ออกซิเดชันของไขมันในอาหาร และการหลีกเลี่ยงความเสี่ยงที่อาจเกิดจากการใช้สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง จึงได้มีรายงานเกี่ยวกับการศึกษาดังกล่าวมากมาย ดังนี้

Fernandez-Lopez *et al.* (2005) ได้ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเกิดกรดไทโอบาร์บิทริก หรือ TBA และกลิ่นหืนของสารสกัดจากมะนาว และส้มในผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นเนื้อ พบว่า สารสกัดทั้งสองสามารถชะลอการเกิด TBA ได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่เติมสารสกัด และจากผลการประเมินกลิ่นหืนของผลิตภัณฑ์โดยผู้บริโภค พบว่า ในวันสุดท้ายของการเก็บรักษา (12 วัน) ตัวอย่างที่เติมสารสกัดจากเปลือกส้มยังได้รับการยอมรับจากผู้บริโภค แต่ในขณะที่ตัวอย่างควบคุมผู้บริโภคสามารถรับรู้กลิ่นหืนได้อย่างชัดเจน

Devi *et al.* (2007) รายงานว่า การใช้สารสกัดจากรำข้าวที่ผ่านการสกัดน้ำมัน (defatted rice bran) สามารถยับยั้งการเกิดสารเปอร์ออกไซด์ (peroxide), สารพี-อะนิซิดีน (*p*-anisidine) และไดอีน (diene) ในน้ำมันพืชที่เก็บรักษาไว้ 15 วัน และพบว่า สารสกัดจากรำข้าวนี้มีประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชันได้ไม่แตกต่างกับ BHT ความเข้มข้น 200 พีพีเอ็ม และมีประสิทธิภาพคิดเป็นร้อยละ 45 เมื่อเปรียบเทียบกับ TBHQ

Chotimakorn *et al.* (2008) พบว่า สารสกัดจากรำข้าวชนิดเมล็ดยาว (long grain rice) ที่สกัดด้วยเมทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 สามารถยับยั้งการเกิดเปอร์ออกซิเดชัน และการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของไขมันในน้ำมันปลาทูน่าที่เก็บรักษาไว้ 30 วัน ได้ใกล้เคียงกับสารแอนติออกซิแดนท์สังเคราะห์ หรือ BHT ความเข้มข้นร้อยละ 0.01 ($p > 0.05$) เนื่องจากสามารถชะลอการเกิดสารเปอร์ออกไซด์ และสารพี-อะนิซิดีนซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นระหว่างการเกิดออกซิเดชันของไขมัน

Tananuwong *et al.* (2010) รายงานว่า สารสกัดจากรำข้าวเหนียวดำพันธุ์กำดอยสะเก็ด ความเข้มข้น 500 และ 1,000 พีพีเอ็ม สามารถยับยั้งการเกิดสารคอนจูเกตเตไดอีน (conjugated diene) ไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (hydroperoxide) และกรดไทโอบาร์บิทริก (thiobarbituric acid, TBA) ในผลิตภัณฑ์มายองเนสเติมน้ำมันปลา ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 วันได้

Lee *et al.* (2011) พบว่า สารสกัดจากกิมจิโดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 สามารถยับยั้งการเกิดสารเปอร์ออกไซด์ กรดไทโอบาร์บิทริก (thiobarbituric acid, TBA) คอนจูเกตเตทไคอิน และ เฮกซานาล (hexanal) ในผลิตภัณฑ์หมูสับปรุงสุกที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน ได้ดีกว่าสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ ได้แก่ กรดแอสคอร์บิก และ BHT ความเข้มข้นร้อยละ 0.02 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

Qi and Zhou (2013) รายงานว่า การเติมสารสกัดจากเมล็ดบัว ความเข้มข้นร้อยละ 0.05, 0.10 และ 0.20 สามารถชะลอ หรือยับยั้งการเกิดสารเปอร์ออกไซด์ และกรดไทโอบาร์บิทริกในผลิตภัณฑ์ไส้กรอก ที่เก็บรักษา 15 วัน ได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่เติมสารสกัด

พรทวี (2545) ได้ทำการศึกษา การประยุกต์ใช้สารสกัดจากโรสแมรี่ด้วยตัวทำละลายอะซิโตน เพื่อยับยั้งการเกิดสารเปอร์ออกไซด์ (peroxide) ในผลิตภัณฑ์กุ้งแช่แข็ง ที่เก็บรักษา 28 วัน พบว่า สารสกัดจากโรสแมรี่ความเข้มข้น 100 ถึง 400 พีพีเอ็ม มีความสามารถในการยับยั้ง หรือชะลอการเกิดสารเปอร์ออกไซด์ได้ และมีค่าที่แตกต่างกับตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มา และความสำคัญของปัญหา

รำข้าว เป็นส่วนที่ถูกแยกออกจากเมล็ดข้าวในระหว่างกระบวนการขัดสี ซึ่งเป็นส่วนที่มนุษย์ไม่นิยมในการบริโภค และเป็นวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตอาหารสัตว์มาช้านาน แต่เมื่อไม่นานมานี้ได้มีการศึกษา วิจัยและยืนยันถึงคุณประโยชน์ทางชีวภาพของสารที่อยู่ในรำข้าวอย่างกว้างขวาง เช่น สารแกมมา-ออริซานอล และโทโคฟีรอล เป็นต้น (Aguilar-Garcia *et al.*, 2007; Devi and Arumughan, 2007 and Lai *et al.*, 2009) ทำให้เกิดกระแสการบริโภคข้าวที่ไม่ผ่านการขัดสีเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง แต่อย่างไรก็ตาม ผู้บริโภคส่วนใหญ่ยังมีความนิยมรับประทานข้าวที่ผ่านการขัดสี ทำให้ส่วนของรำข้าวยังไม่ถูกใช้ให้เกิดประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมอาหารเท่าที่ควร

ในรำข้าวทั่วไป จะมีองค์ประกอบทางเคมี และปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ใกล้เคียงกัน แต่สำหรับรำข้าวที่มีสีนั้นจะมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดหนึ่ง คือ แอนโทไซยานิน (anthocyanin) อยู่ในปริมาณสูง เนื่องจากเป็นสารหลักที่ให้สี (ชัยวุฒิ และชุติมา, 2544 และ Chotimakorn *et al.*, 2008) จากงานวิจัยในปัจจุบัน พบว่า ในข้าวสีมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีบทบาทสำคัญอีกมากมาย อาทิเช่น แกมมา-ออริซานอล (γ -oryzanol) และแอลฟา-โทโคฟีรอล (α -tocopherol) เป็นต้น คำเนิน และคณะ (2543) และพันทิพา และคณะ (2551) รายงานว่า สารดังกล่าวมีคุณสมบัติที่ดีหลายอย่าง ได้แก่ มีฤทธิ์ช่วยป้องกันโรคหัวใจ ลดระดับคอเลสเตอรอล และน้ำตาลในเลือด นอกจากนี้ แอนโทไซยานิน ที่พบมากในข้าวสีม่วงกลุ่มอินดิกา (indica type) ซึ่งรวมถึงข้าวสีของไทย คือ ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ (cyanidin-3-glucoside) ได้รับการพิสูจน์แล้วว่า มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง และการรวมตัวของเกล็ดเลือด (Kong *et al.*, 2003) เป็นต้น

นอกจากนี้ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพกลุ่มแกมมา-ออริซานอล และแอนโทไซยานินยังสามารถแสดงคุณสมบัติในการต้านออกซิเดชันได้ สารแกมมา-ออริซานอลนั้นเป็นส่วนของสาร

อันสaponifiabl matter) และภายในโครงสร้างมีลักษณะของ hydrogen-bonded methoxyphenol ซึ่งอยู่ตำแหน่งที่ใหไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูลอิสระให้ กลายเป็นอนุมูลที่เสถียรได้ดี ทำให้มีคุณสมบัติเด่นในด้านการต้านออกซิเดชัน (Huang, 2003) มีรายงานว่าในรำข้าวคั่วมีปริมาณสารแกมมา-ออริซานอลสูงถึง 3.45-3.94 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ส่วนแอนโทไซยานินนั้นพบว่ามีปริมาณสูงเช่นกัน คือ 7.07-10.70 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (Kong *et al.*, 2010) โดยโครงสร้างของแอนโทไซยานิน ประกอบด้วยสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างพอลิฟีนอล (polyphenol) และหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group, -OH) ในคาร์บอนตำแหน่งต่างๆ ซึ่งสามารถใหไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูลอิสระได้ดีเช่นกัน จึงช่วยยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันได้ นอกจากนี้ Wang *et al.* (1999) รายงานว่า แอนโทไซยานินที่สกัดได้จากผลเชอร์รี่สามารถยับยั้งการเกิดเปอร์ออกซิเดชันของไขมันได้ร้อยละ 39 ถึง 75

จากประโยชน์ทางชีวภาพ และคุณสมบัติต้านออกซิเดชันของสารเหล่านี้ จึงทำให้มีความพยายามในการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากรำข้าวเพื่อใช้ประโยชน์เชิงการค้าจำนวนมาก ในปัจจุบัน วิธีการสกัดที่มีศักยภาพเชิงการค้า และนิยมมากที่สุด คือ การสกัดด้วยตัวทำละลาย เนื่องจาก เป็นวิธีการที่ไม่ยุ่งยาก และค่าใช้จ่ายไม่สูงมากนักเมื่อเทียบกับวิธีการอื่นๆ ตัวทำละลายที่นิยมใช้ ได้แก่ เมทานอล (Aguilar-Garcia *et al.*, 2007) เฮกเซน (Imsanguan *et al.*, 2009) ไอโซโพรพานอล (Chen and Bergman., 2005) และเอทิลอะซิเตท (Devi and Arumughan, 2007 and Lai *et al.*, 2009) เป็นต้น การใช้ตัวทำละลายดังกล่าวข้างต้นในการสกัด พบว่า องค์ประกอบของสารต้านอนุมูลอิสระที่สกัดได้ส่วนมากเป็นสารกลุ่มที่มีความเป็นขี้ดดำ เช่น แกมมา-ออริซานอล และแอลฟา-โทโคฟีรอล เป็นต้น ในขณะที่เดียวกัน แอนโทไซยานิน ซึ่งเป็นสารที่โมเลกุลมีขี้ดสูง (นิธิยา, 2553; Patil *et al.*, 2009 and Chandrasekhar *et al.*, 2012) จะถูกสกัดออกมาได้น้อยเมื่อสกัดด้วยตัวทำละลายดังกล่าว ดังนั้นการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระทั้งกลุ่มที่มีขี้ดดำ และกลุ่มที่มีขี้ดสูงโดยใช้เทคนิคการสกัดด้วยตัวทำละลายแบบขั้นตอนเดียวจึงเป็นสิ่งที่ท้าทายเป็นอย่างมาก จากการค้นคว้าข้อมูลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง พบว่า การศึกษาเกี่ยวกับการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระในรำข้าวสีนั้นยังไม่เป็นที่แพร่หลายมากนัก ทำให้ผู้วิจัยได้เกิดแนวคิดที่จะศึกษาถึงวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมแบบขั้นตอนเดียว เพื่อให้ได้ทั้งสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด แอนโทไซยานิน แกมมา-ออริซานอล และแอลฟา-โทโคฟีรอลในปริมาณสูง โดยคัดเลือกตัวทำละลาย และสภาวะในการสกัดที่เหมาะสม รวมถึงศึกษาการสกัดด้วยตัวทำละลายที่ถูกปรับสภาพขี้ด เพื่อนำไปสู่การประยุกต์ใช้สารสกัดดังกล่าวในการศึกษาประสิทธิภาพการต้านออกซิเดชัน เพื่อชะลอหรือยับยั้งการเกิดออกซิเดชันในผลิตภัณฑ์กุนเชียงหมู

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทำการศึกษาศักยภาพด้านอนุมูลอิสระในรำข้าวพันธุ์หอมนิล โดยคัดเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด เพื่อนำไปหาสภาวะที่สามารถสกัดสารกลุ่มแกมมา-ออร์ซานอล แอลฟา-โทโคฟีรอล แอนโทไซยานิน และสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในปริมาณสูงแบบขั้นตอนเดียวโดยใช้วิธีโครมาตกราฟีผิวดูดซับ พร้อมทั้งศึกษาวิธีการเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดโดยการปรับค่าของตัวทำละลายด้วยกรดอะซิติก รวมถึงการศึกษากิจกรรมการต้านออกซิเดชันของสารสกัดที่ได้ เช่น ความสามารถในการจับกับอนุมูลอิสระ การดักจับไฮดรอกซิล และการศึกษาการเกิดเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน เป็นต้น นอกจากนี้ยังศึกษาถึงประสิทธิภาพการต้านออกซิเดชันในผลิตภัณฑ์กุนเชียงหมูเปรียบเทียบกับสารด้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.2.1 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดสารด้านอนุมูลอิสระจากรำข้าวพันธุ์หอมนิลโดยการสกัดด้วยตัวทำละลาย

1.2.2 เพื่อศึกษาการปรับสภาพค่าของตัวทำละลายเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดสารด้านอนุมูลอิสระจากรำข้าวพันธุ์หอมนิล

1.2.3 เพื่อศึกษากิจกรรมการต้านออกซิเดชัน และประสิทธิภาพการต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากรำข้าวพันธุ์หอมนิลในผลิตภัณฑ์กุนเชียงหมู

1.3 ประโยชน์ที่จะได้รับ

1.3.1 ทราบสภาวะการสกัดด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับสกัดสารด้านอนุมูลอิสระจากรำข้าวพันธุ์หอมนิล

1.3.2 ทราบวิธีการปรับสภาพค่าของตัวทำละลาย เพื่อให้ได้สารด้านอนุมูลอิสระจากรำข้าวพันธุ์หอมนิลในปริมาณสูงขึ้น

1.3.3 ทราบประสิทธิภาพการต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากรำข้าวพันธุ์หอมนิลในผลิตภัณฑ์กุนเชียงหมู

1.4 ขอบเขตงานวิจัย

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาศักยภาพด้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด แอนโทไซยานิน แกมมา-ออร์ซานอล และแอลฟา-โทโคฟีรอล โดยการสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ เมทานอล เอทานอล และเอทิลอะซิเตท ทำการคัดเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมเพื่อ

นำไปหาสภาวะในการสกัดโดยใช้วิธีโครมร่างพื้นผิวตอบสนอง หลังจากนั้นศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดโดยการปรับค่าของตัวทำละลายโดยใช้กรดอะซิติก แล้วนำสารสกัดที่ได้ไปศึกษากิจกรรมการต้านออกซิเดชัน และประสิทธิภาพการต้านออกซิเดชันในผลิตภัณฑ์กุนเชียงหมู ในระหว่างการเก็บรักษาระยะเวลา 15 วัน ที่สภาวะปกติ โดยเปรียบเทียบกับ BHT ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ช
สารบัญ	ณ
สารบัญตาราง	ญ
สารบัญภาพ	ท
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา	3
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
1.4 ขอบเขตงานวิจัย	3
บทที่ 2 เอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 ข้าว	5
2.1.1 โครงสร้างของเมล็ดข้าว	5
2.1.2 ข้าวหอมนิล	7
2.2 อนุมูลอิสระ และปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน	9
2.2.1 อนุมูลอิสระ	9
2.2.2 ปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน	9
2.2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อปฏิกิริยาออกซิเดชันในอาหาร	11
2.2.4 การหืน (rancidity)	12
2.2.4 ผลของการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันต่อผลิตภัณฑ์อาหาร	14
2.3 สารต้านอนุมูลอิสระ	16
2.3.1 ประเภทของสารต้านอนุมูลอิสระ	16

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 2 เอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (ต่อ)	
2.3.2 สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในข้าว	17
2.3.3 กลไกการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ	21
2.3.4 วิธีทดสอบคุณสมบัติการต้านออกซิเดชัน	22
2.4 การสกัดด้วยตัวทำละลาย (solvent extraction)	24
2.4.1 วิธีการสกัดของแข็งด้วยตัวทำละลาย	24
2.4.2 การเลือกใช้ตัวทำละลาย	25
2.4.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดด้วยตัวทำละลาย	26
2.5 โครงสร้างพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology)	29
2.5.1 หลักการสำคัญของการใช้โครงสร้างพื้นผิวตอบสนอง	29
2.5.2 รูปแบบการวางแผนการทดลองสำหรับวิธีโครงสร้างพื้นผิวตอบสนอง	30
2.6 คุณเชิง และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	32
2.7 การประยุกต์ใช้สารสกัดจากธรรมชาติเพื่อยับยั้ง หรือชะลอการเสื่อมเสีย ของผลิตภัณฑ์อาหาร	34
บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง	
3.1 วัตถุดิบ	36
3.2 สารเคมี	36
3.3 อุปกรณ์ และเครื่องมือ	37
3.4 วิธีการทดลอง	38
ตอนที่ 1 การเลือกตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด	38
ตอนที่ 2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระ	39
ตอนที่ 3 การเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดโดยการปรับสภาพขั้วของตัวทำละลาย	42
ตอนที่ 4 การศึกษากิจกรรม และประสิทธิภาพการต้านออกซิเดชัน ของสารสกัดหยาบ	42

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการทดลอง และวิจารณ์ผลการทดลอง	
4.1 ศึกษาผลของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด	44
4.1.1 ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ	44
4.1.2 ค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระ	48
4.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากรำข้าวหอมนิล	49
4.2.1 ผลของปัจจัย และสภาวะการสกัดต่อปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ	49
4.2.2 สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระและ การยืนยันความเหมาะสมของแบบจำลอง	61
4.3 ศึกษาผลของการปรับหัวตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด	63
4.4 ศึกษากิจกรรม และประสิทธิภาพการต้านออกซิเดชันของสารสกัดจาก รำข้าวหอมนิล	68
4.4.1 กิจกรรมการต้านออกซิเดชัน	68
4.4.2 ประสิทธิภาพการต้านออกซิเดชัน และการเปลี่ยนแปลงในผลิตภัณฑ์ กลิ่นเหม็นระหว่างเก็บรักษา	72
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ	
5.1 สรุปผลการทดลอง	88
5.2 ข้อเสนอแนะ	89
เอกสารอ้างอิง	91
ภาคผนวก	99
ภาคผนวก ก วิธีวิเคราะห์ทางกายภาพ และเคมี	100
ภาคผนวก ข ตารางผลการทดลอง ผลวิเคราะห์ทางสถิติ และโครมาโทแกรม	113
ภาคผนวก ค ผลิตภัณฑ์กลิ่นเหม็นในระหว่างการเก็บรักษา	122
ภาคผนวก ง เครื่องมือ วัสดุที่ใช้ในการทดลอง ส่วนผสม และวิธีการผลิตกลิ่น	127
ประวัติผู้เขียน	132

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
2.1 คุณค่าทางโภชนาการของข้าวเจ้าหอมนิล	8
2.2 ตำแหน่งของการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD)	31
3.1 ปัจจัย และระดับของปัจจัยที่ใช้ศึกษา	39
3.2 แผนการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระ	41
4.1 ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ และร้อยละผลผลิตที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด	44
4.2 ค่า EC_{50} ของสารสกัดจากตัวทำละลาย 3 ชนิด เปรียบเทียบกับ BHT	48
4.3 ผลของความเข้มข้นของตัวทำละลาย อัตราส่วนของตัวทำละลายต่อรำข้าว และเวลาในการสกัดต่อปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่สกัดได้จากรำข้าวหอมนิล	50
4.4 ผลรวมของปัจจัยในการสกัดที่มีผลต่อปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ และร้อยละผลผลิต	51
4.5 สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากการ optimization	61
4.6 ค่าตอบสนองของปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ และสารสกัดที่สกัดได้จริง และค่าจากการทำนาย ณ สภาวะที่เหมาะสม	62
4.7 ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระและสารสกัดที่ได้จากการปรับข้าวตัวทำละลาย	65
4.8 ค่า EC_{50} ของสารสกัดจากรำข้าวหอมนิล BHT และ EDTA	69
4.9 การเปลี่ยนแปลงค่า a_w ของผลิตภัณฑ์กุนเชียงหมูระหว่างเก็บรักษา	79
ข-1 การเปลี่ยนแปลงค่า TBARS, L^* , a^* และ b^* ของผลิตภัณฑ์กุนเชียงหมูผสมสารสกัดจากรำข้าวหอมนิล ความเข้มข้น 0, 200, 400, 600 พีพีเอ็ม และสารต้านอนุมูลอิสระ-สังเคราะห์ (BHT) ความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม เก็บรักษาในสภาวะปกติ เวลา 15 วัน	114
ข-2 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของการวัดค่าทางเคมีของผลิตภัณฑ์กุนเชียงหมูผสมสารสกัดจากรำข้าวหอมนิล ความเข้มข้น 0, 200, 400, 600 พีพีเอ็ม และสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (BHT) ความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม เก็บรักษาในสภาวะปกติ เวลา 15 วัน	115

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง	หน้า
ข-3 การเปลี่ยนแปลงค่าคะแนนความชอบด้านสี กลิ่น ลักษณะปรากฏ และการยอมรับ โดยรวมของผลิตภัณฑ์กุนเชียงหมูผสมสารสกัดจากรำข้าวหอมนิล ความเข้มข้น 0, 200, 400, 600 พีพีเอ็ม และสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (BHT) ความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม เก็บรักษาในสภาวะปกติ เวลา 15 วัน	116
ข-4 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของการทดสอบทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ กุนเชียงหมูผสมสารสกัดจากรำข้าวหอมนิล ความเข้มข้น 0, 200, 400, 600 พีพีเอ็ม และสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (BHT) ความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม เก็บรักษาใน สภาวะปกติ เวลา 15 วัน	117

สารบัญภาพ

รูป	หน้า
2.1 โครงสร้างของเมล็ดข้าว	6
2.2 สรุปกลไกในระหว่างการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน	15
2.3 โครงสร้างสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ที่นิยมใช้	17
2.4 โครงสร้างทางเคมีของสารแกมมา-ออร์ซานอล	18
2.5 โครงสร้างทางเคมีของแอลฟา-โทโคฟีรอล	20
2.6 โครงสร้างทางเคมีของแอนโทไซยานินในรูปแบบต่างๆ	21
2.7 ปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงของอนุมูล DPPH	23
2.8 ตำแหน่งการทดลองของแผนการทดลองแบบ Factorial Design, Box-behnken Design และ Central Composite Design	31
4.1 สกัดส่วนของสารต้านอนุมูลอิสระแต่ละชนิดที่ได้จากการสกัดด้วยเมทานอล เอทานอล และเอทิลอะซิเตท	47
4.2 พื้นที่ผิวตอบสนองค่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่สกัดได้ โดยกำหนดให้เวลาในการสกัดคงที่ ณ 90 นาที	53
4.3 พื้นที่ผิวตอบสนองค่าปริมาณสารแกมมา-ออร์ซานอลที่สกัดได้ โดยกำหนดให้เวลาในการสกัดคงที่ ณ 90 นาที	55
4.4 พื้นที่ผิวตอบสนองค่าปริมาณสารแอลฟา-โทโคฟีรอลที่สกัดได้ โดยกำหนดให้เวลาในการสกัดคงที่ ณ 90 นาที	57
4.5 พื้นที่ผิวตอบสนองค่าปริมาณสารแอนโทไซยานินที่สกัดได้ โดยกำหนดให้เวลาในการสกัดคงที่ ณ 90 นาที	59
4.6 พื้นที่ผิวตอบสนองค่าปริมาณสารสกัดที่สกัดได้ โดยกำหนดให้ เวลาในการสกัดคงที่ ณ 90 นาที	60
4.7 พื้นที่ที่แสดงสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากรำข้าวหอมนิล	61
4.8 ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระทั้งหมดจากรำข้าวหอมนิลที่สกัดโดยใช้เมทานอล เอทานอล เอทิลอะซิเตท และสภาวะที่ได้จากการ optimization	63

สารบัญภาพ (ต่อ)

รูป	หน้า
4.9 การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดระหว่างการสกัด ที่เติมกรดอะซิติก ณ เวลาที่ 0, 30, 60 และ 90 นาที เปรียบเทียบกับสภาวะ ที่ได้จากการ optimization (OPT)	66
4.10 การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารแอนโทไซยานินระหว่างการสกัด ที่เติมกรดอะซิติก ณ เวลาที่ 0, 30, 60 และ 90 นาที เปรียบเทียบกับสภาวะ ที่ได้จากการ optimization (OPT)	66
4.11 การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารแอลฟา-โทโคฟีรอลระหว่างการสกัด ที่เติมกรดอะซิติก ณ เวลาที่ 0, 30, 60 และ 90 นาที เปรียบเทียบกับสภาวะ ที่ได้จากการ optimization (OPT)	67
4.12 การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารแกมมา-ออร์ซานอลระหว่างการสกัด ที่เติมกรดอะซิติก ณ เวลาที่ 0, 30, 60 และ 90 นาที เปรียบเทียบกับสภาวะ ที่ได้จากการ optimization (OPT)	67
4.13 การเปลี่ยนแปลงปริมาณร้อยละผลผลิตที่ได้ระหว่างการสกัด ที่เติมกรดอะซิติก ณ เวลาที่ 0, 30, 60 และ 90 นาที เปรียบเทียบกับสภาวะ ที่ได้จากการ optimization (OPT)	68
4.14 ค่าร้อยละการยับยั้งการเกิดเปอร์ออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิกของสารสกัดจาก รำข้าวหอมนิล และสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (BHT) ความเข้มข้น 0.1 มก./มล.	72
4.15 การเปลี่ยนแปลงค่า TBARs ของผลิตภัณฑ์กุ้งเชียงหมีระหว่างเก็บรักษา	74
4.16 การเปลี่ยนแปลงค่าความสว่าง (L*) ของผลิตภัณฑ์กุ้งเชียงหมีระหว่างเก็บรักษา	76
4.17 การเปลี่ยนแปลงค่าสีแดง-เขียว (a*) ของผลิตภัณฑ์กุ้งเชียงหมีระหว่างเก็บรักษา	77
4.18 การเปลี่ยนแปลงค่าสีเหลือง-น้ำเงิน (b*) ของผลิตภัณฑ์กุ้งเชียงหมีระหว่างเก็บรักษา	79
4.19 การเปลี่ยนแปลงค่าคะแนนความชอบด้านสีของผลิตภัณฑ์กุ้งเชียงหมีระหว่างเก็บรักษา	82
4.20 การเปลี่ยนแปลงค่าคะแนนความชอบด้านลักษณะปรากฏของผลิตภัณฑ์กุ้งเชียงหมี ระหว่างเก็บรักษา	83
4.21 การเปลี่ยนแปลงค่าคะแนนความชอบด้านกลิ่นของผลิตภัณฑ์กุ้งเชียงหมี ระหว่างเก็บรักษา	85

สารบัญภาพ (ต่อ)

รูป	หน้า
4.22 การเปลี่ยนแปลงค่าคะแนนการยอมรับโดยรวมของผลิตภัณฑ์กุ้งเชียงใหม่ระหว่างเก็บรักษา	87
ก-1 กราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก	103
ก-2 กราฟมาตรฐานของสารแกมมา-ออริซานอล	106
ก-3 กราฟมาตรฐานของสารแอลฟา-โทโคฟีรอล	106
ก-4 ค่า EC_{50} ของ BHT	108
ข-1 โครมาโทแกรมของสารแอลฟา-โทโคฟีรอลที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท	118
ข-2 โครมาโทแกรมของสารแอลฟา-โทโคฟีรอลที่สกัดด้วยเอทานอล	118
ข-3 โครมาโทแกรมของสารแอลฟา-โทโคฟีรอลที่สกัดด้วยเมทานอล	119
ข-4 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานแอลฟา-โทโคฟีรอล	119
ข-5 โครมาโทแกรมของสารแกมมา-ออริซานอลที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท	120
ข-6 โครมาโทแกรมของสารแกมมา-ออริซานอลที่สกัดด้วยเอทานอล	120
ข-7 โครมาโทแกรมของสารแกมมา-ออริซานอลที่สกัดด้วยเมทานอล	121
ข-8 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานแกมมา-ออริซานอล	121
ค-1 ผลิตภัณฑ์กุ้งเชียงใหม่ที่เก็บรักษา ที่ 0 วัน	123
ค-2 ผลิตภัณฑ์กุ้งเชียงใหม่ที่เก็บรักษา ที่ 5 วัน	124
ค-3 ผลิตภัณฑ์กุ้งเชียงใหม่ที่เก็บรักษา ที่ 10 วัน	125
ค-4 ผลิตภัณฑ์กุ้งเชียงใหม่ที่เก็บรักษา ที่ 15 วัน	126
ง-1 เครื่องกะเทาะเปลือกข้าว	128
ง-2 เครื่องขัดสี	128
ง-3 ตัวอย่างเมล็ดข้าวพันธุ์หอมนิล	129
ง-4 ตัวอย่างรำข้าวพันธุ์หอมนิล	129
ง-5 ตัวอย่างสารสกัดจากรำข้าวพันธุ์หอมนิล	130
ง-6 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์กุ้งเชียงใหม่หลังการอบ	131

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

การสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากรำข้าวหอมนิล และ
การประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์กุนเชียงหมู

ผู้เขียน

นายสุพัฒน์ พงษ์ไทย

ปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
(วิทยาศาสตรและเทคโนโลยีการอาหาร)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ดร.ธรรณพ เหล่ากุลคิลก

บทคัดย่อ

การสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากรำข้าวหอมนิล ด้วยเทคนิคการสกัดด้วยตัวทำละลายโดยใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ เมทานอล เอทานอล และเอทิลอะซิเตท พบว่า เมทานอล มีประสิทธิภาพสูงสุดในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ($3,410.95 \pm 64.44$ ไมโครกรัมต่อกรัม) แกมมา-ออริซานอล ($2,153.75 \pm 13.38$ ไมโครกรัมต่อกรัม) และแอลฟา-โทโคฟีรอล (60.28 ± 2.08 ไมโครกรัมต่อกรัม) ในขณะที่เอทานอล สามารถสกัดสารแอนโทไซยานินได้ในปริมาณสูงสุด (220.29 ± 7.27 ไมโครกรัมต่อกรัม) สำหรับเอทิลอะซิเตทนั้น มีประสิทธิภาพในการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากรำข้าวหอมนิลต่ำที่สุด นอกจากนี้ สารสกัดที่ได้จากเมทานอล ยังมีค่าการกำจัดอนุมูล DPPH สูงสุด ($EC_{50} = 100.39 \pm 18.27$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) รองลงมา คือ สารสกัดจากเอทานอล ($EC_{50} = 303.04 \pm 22.62$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และเอทิลอะซิเตท ($EC_{50} = 2,207.24 \pm 58.04$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ตามลำดับ แต่เมื่อพิจารณาถึงด้านความปลอดภัยเมื่อประยุกต์สารสกัดลงในผลิตภัณฑ์อาหาร ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่สกัดได้ และค่าการกำจัดอนุมูลอิสระ ผู้วิจัยได้ทำการคัดเลือกเอทานอลเป็นตัวทำละลายเพื่อใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดต่อไป

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากรำข้าวหอมนิล โดยใช้วิธีโครงร่างพื้นผิวตอบสนอง (RSM) สำหรับศึกษาผลของแต่ละปัจจัย และหาสภาวะที่เหมาะสมของปัจจัยที่ศึกษา จำนวน 3 ปัจจัย ได้แก่ ความเข้มข้นของเอทานอล (X_1) อัตราส่วนของตัวทำละลายต่อรำข้าว

(X_2) และเวลาที่ใช้ในการสกัด (X_3) พบว่า ปัจจัย X_1 และ X_1^2 มีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด แกมมา-ออร์ซานอล แอลฟา-โทโคฟีรอล และแอนโทไซยานิน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในขณะที่ ปัจจัย X_2 และ X_1X_2 มีผลต่อการสกัดสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และแอนโทไซยานินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และจากการ optimization จะได้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระ คือ เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 72.5 อัตราส่วนของตัวทำละลายต่อรำข้าว เท่ากับ 26.67 มิลลิลิตรต่อกรัม และเวลาที่ใช้ในการสกัด เท่ากับ 120 นาที ซึ่งสามารถสกัดสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด แกมมา-ออร์ซานอล แอลฟา-โทโคฟีรอล แอนโทไซยานิน และปริมาณร้อยละผลผลิต เท่ากับ $9,362.83 \pm 22.75$, 253.34 ± 7.73 , 9.02 ± 0.01 , $1,859.15 \pm 71.53$ ไมโครกรัมต่อกรัม และร้อยละ 17.8 ตามลำดับ และยังพบว่า ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระทั้งหมด มีค่าสูงกว่าการสกัดโดยใช้เมทานอล เอทานอล และเอทิลอะซิเตตถึงร้อยละ 49.1, 62.54 และ 87.37 ตามลำดับ

นอกจากนี้ ได้มีการศึกษาถึงการเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดโดยการนำสภาวะที่เหมาะสมที่ได้มาปรับหัวของตัวทำละลายที่ใช้สกัดด้วยกรดอะซิติก ความเข้มข้นร้อยละ 1, 2 และ 3 และศึกษาผลของระยะเวลาที่เติมกรดอะซิติก ที่ 3 ระดับ ได้แก่ 0, 30, 60 และ 90 นาที พบว่า ปริมาณสารแอนติออกซิแดนท์จะแปรผันตามความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่เติม และพบว่า การเติมกรดอะซิติกที่เวลา 0 นาที จะทำให้การสกัดมีประสิทธิภาพสูงสุด นั่นคือ สภาวะการสกัดที่เติมกรดอะซิติก ร้อยละ 3 ที่เวลา 0 นาที สามารถสกัดสารประกอบฟีนอลิก ($12,380.37 \pm 82.38$ ไมโครกรัมต่อกรัม) แกมมา-ออร์ซานอล (278.70 ± 10.59 ไมโครกรัมต่อกรัม) แอลฟา-โทโคฟีรอล (11.46 ± 1.20 ไมโครกรัมต่อกรัม) และแอนโทไซยานิน ($3,090.38 \pm 34.07$ ไมโครกรัมต่อกรัม) ได้ปริมาณสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

สารสกัดจากรำข้าวหอมนิลที่ได้จากสภาวะการสกัดข้างต้น มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจาก สามารถทดสอบด้วยวิธี DPPH radical scavenging, metal chelating activity และ inhibition of linoleic acid peroxidation ซึ่งมีค่า EC_{50} เท่ากับ 0.11 ± 0.01 และ 0.25 ± 0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และค่าร้อยละการยับยั้ง เท่ากับ 42.96 ± 2.80 ตามลำดับ นอกจากนี้ ได้มีการศึกษาผลของความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่เติม (0, 200, 400, 600 และ BHT 100 พีพีเอ็ม) และระยะเวลาในการเก็บรักษา (15 วัน) ที่มีต่อคุณภาพทางกายภาพ และเคมีของผลิตภัณฑ์กุนเชียงหนู พบว่า ค่า L^* และ b^* มีค่าเพิ่มขึ้น เมื่อระยะเวลาในการเก็บรักษาเพิ่มจาก 0 เป็น 15 วัน ในขณะที่ ค่า a^* และ a_w มีค่าลดลง และพบว่า สารสกัดจากรำข้าวหอมนิลความเข้มข้น 600 พีพีเอ็ม มีประสิทธิภาพยับยั้งการเกิดออกซิเดชันได้สูงสุด สอดคล้องกับปริมาณสาร Thiobarbituric reactive substance (TBARs) ที่ต่ำที่สุด ส่วนผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านสี ลักษณะปรากฏ กลิ่น

และการยอมรับโดยรวมของผลิตภัณฑ์กุ้งเชียงใหม่ พบว่า ผู้ทดสอบส่วนใหญ่ให้การยอมรับตัวอย่าง
ที่เติมสารสกัดจากรำข้าวหอมนิล ความเข้มข้น 400 ถึง 600 พีพีเอ็ม ดังนั้น สารสกัดจากรำข้าวหอม
นิลจึงมีศักยภาพที่จะใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติในผลิตภัณฑ์กุ้งเชียงใหม่ได้



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved

Thesis Title	Extraction of Antioxidants from Black Rice Bran (<i>cv.</i> Hom Nin) and Its Application in Pork Chinese Sausage
Author	Mr. Suphat Phongthai
Degree	Master of Science (Food Science and Technology)
Thesis Advisor	Dr. Thunnop Laokuldilok

ABSTRACT

Solvent extraction was implemented for antioxidants extraction from pigmented rice bran *cv.* Hom Nin using methanol, ethanol and ethylacetate as extractants. The results show that antioxidants including total phenolics, γ -oryzanol and α -tocopherol can be extracted with the highest contents ($3,410.95 \pm 64.44$, $2,153.75 \pm 13.38$, 60.28 ± 2.08 $\mu\text{g/g}$, respectively) by methanol. However, anthocyanin was extracted with the highest content (220.29 ± 7.27 $\mu\text{g/g}$) by ethanol; while, ethylacetate was the unsuitable solvent to extract these antioxidants. Beside, the methanol extract showed the highest DPPH radical scavenging activity (lowest EC_{50} value; 100.39 ± 18.27 $\mu\text{g/mL}$) followed by ethanol (EC_{50} value = 303.04 ± 22.62 $\mu\text{g/mL}$) and ethylacetate (EC_{50} value = $2,207.24 \pm 58.04$ $\mu\text{g/mL}$) extracts, respectively. For food safety reason, ethanol was selected as a extractant in the optimization experiment.

The response surface methodology (RSM) was used to optimize the independent variables which were ethanol concentration (X_1), ratio of solvent and rice bran (X_2) and extraction time (X_3). The terms of X_1 and X_1^2 had significant effect on total phenolics (TPC), γ -oryzanol, α -tocopherol and anthocyanin contents. In addition, terms of X_2 and X_1X_2 had significant effect on TPC and anthocyanin contents. The optimal condition of antioxidants extraction was demonstrated as follows; 72.5% of ethanol, ratio of solvent and rice bran of 26.67 mL/g rice bran

and extraction time of 120 min, achieving the contents of total phenolic content, γ -oryzanol, α -tocopherol, anthocyanin and extracts yield about $9,362.83 \pm 22.75$ $\mu\text{g GAE/g}$, 253.34 ± 7.73 $\mu\text{g/g}$, 9.02 ± 0.01 $\mu\text{g/g}$, $1,859.15 \pm 71.53$ $\mu\text{g/g}$ and 17.8%, respectively. The total antioxidants in this extract were 49.10, 62.54 and 87.37% higher than the extracts from methanol, ethanol and ethylacetate extraction, respectively.

To improve the extraction efficiency, the optimal extraction condition was acidified by 1, 2 and 3% of acetic acid. Furthermore, the effect of adding time (0, 30, 60 and 90 min) was also studied. It was observed that all antioxidant contents increased with increasing of acetic acid concentration; while, the adding time of 0 min showed higher antioxidant contents than other adding times ($p < 0.05$). The extraction using acidified ethanol with 3% acetic acid and adding time at 0 min showed the highest in extraction efficiency. This crude extract contained the amounts of total phenolics, anthocyanins, γ -oryzanol and α -tocopherol at about $12,380.37 \pm 82.38$, $3,090.38 \pm 34.07$, 278.70 ± 10.59 and 11.46 ± 1.20 $\mu\text{g/g}$, respectively. Moreover, the crude extract was studied for antioxidant activities and the application in Pork Chinese Sausage (PCS).

The extract showed the strong antioxidant activities in all test including DPPH radical scavenging activity ($\text{EC}_{50} = 0.11 \pm 0.01$ mg/mL), metal chelating activity ($\text{EC}_{50} = 0.25 \pm 0.02$ mg/mL) and inhibition of linoleic acid peroxidation (%inhibition = 42.96 ± 2.80). The effects of extract concentration and storage time on physical and chemical changes of PCS were investigated. It was observed that L^* and b^* values increased with increasing of storage time (15 days); while, a^* value and a_w decreased in this period. The extract concentration of 600 ppm showed the higher antioxidant activity than concentration of 0 (control), 200, 400 ppm and BHT 100 ppm, correlating with the TBARs values of each sample. The sensory attributes were evaluated including color, appearance, odor and overall acceptance. The results showed that the most of 30 panelists accepted the samples which were contained the extract concentration between 200 to 600 ppm. Thus, the extract from black rice bran (*cv.* Hom Nin) can be use as a natural antioxidant in PCS.



ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© | University

All rights reserved



ภาคผนวก ก
วิธีวิเคราะห์ทางเคมี และกายภาพ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีวิเคราะห์ทางเคมี และกายภาพ

1. วิเคราะห์ปริมาณความชื้น (AOAC, 2000)

1.1 อุปกรณ์

1.1.1 ตู้อบลมร้อนปรับอุณหภูมิได้ (hot air oven)

1.1.2 ถ้วย crucible (crucible)

1.1.3 คีมคีบ (tongs)

1.1.4 โถดูดความชื้น (dessicator)

1.1.5 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง

1.2 วิธีการ

1.2.1 อบถ้วย crucible ในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 2 ถึง 3 ชั่วโมง

1.2.2 ใช้คีมคีบถ้วย crucible ออกจากตู้อบลมร้อนใส่ไว้ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นจนกระทั่งอุณหภูมิของถ้วย crucible ลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้อง แล้วชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้า

1.2.3 ทำเช่นเดียวกับ ข้อ 1.2.1 และ 1.2.2 จนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งติดต่อกันสองครั้งไม่เกิน 1 ถึง 3 มิลลิกรัม

1.2.4 ชั่งตัวอย่างรำข้าวให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน 1 ถึง 3 กรัม ในถ้วย crucible ที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน แล้วนำไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 5 ถึง 6 ชั่วโมง

1.2.5 ใช้คีมคีบถ้วย crucible ที่มีรำข้าวออกจากตู้อบลมร้อนใส่ไว้ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นจนกระทั่งอุณหภูมิของถ้วย crucible และรำข้าวลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้อง แล้วชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้า

1.2.6 ทำเช่นเดียวกับ ข้อ 1.2.4 และ 1.2.5 จนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งติดต่อกันสองครั้งไม่เกิน 1 ถึง 3 มิลลิกรัม

1.3 การคำนวณ

$$M = \frac{(W_1 - W_2)}{W_1} \times 100$$

เมื่อ M = ปริมาณความชื้น (ร้อยละ)
 W_1 = น้ำหนัก råข้าวก่อนอบ (กรัม)
 W_2 = น้ำหนัก råข้าวหลังอบ (กรัม)

2. วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Aguilar-Garcia *et al.*, 2007)

2.1 อุปกรณ์

- 2.1.1 ขวดปริมาตร (volumetric flask)
- 2.1.2 ไมโครปิเปต (micropipette)
- 2.1.3 หลอดทดลอง (test tube)
- 2.1.4 สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)

2.2 สารเคมี

- 2.2.1 กรดแกลลิก (gallic acid)
- 2.2.2 โซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate)
- 2.2.3 Folin-Ciocateu reagent
- 2.2.4 เมทานอล (methanol)

2.3 วิธีการ

- 2.3.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (gallic acid) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.4, 0.2, 0.1, 0.08, 0.04 และ 0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
- 2.3.2 เตรียมสารละลาย Folin-Ciocateu reagent ต่อน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1 ต่อ 9 โดยปริมาตร
- 2.3.3 เตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 7.5% (โซเดียมคาร์บอเนต 75 กรัมต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร)
- 2.3.4 ผสมสารละลาย Folin-Ciocateu reagent ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลอง
- 2.3.5 เติมสารสกัดที่ต้องการวิเคราะห์ ปริมาตร 60 ไมโครลิตร (หรือสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกแต่ละความเข้มข้น) จากนั้นเขย่าให้เท่ากัน แล้วบ่มในที่มืดนาน 2 นาที

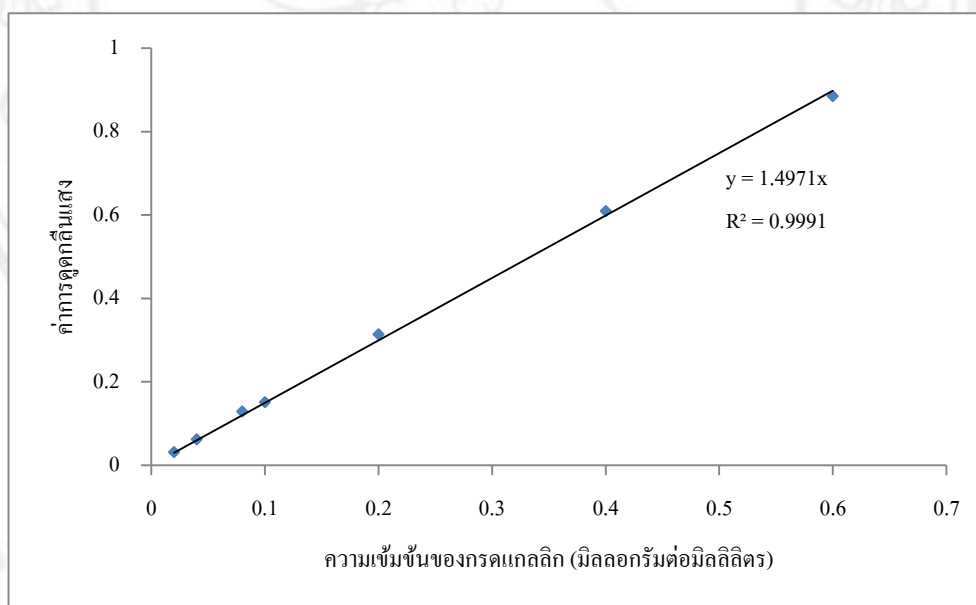
2.3.6 เติมน้ำละลายโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 7.5% ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากัน แล้วบ่มสารละลายผสมที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที และทำให้เย็นลงทันทีด้วยน้ำเย็น

2.3.7 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร (ควรอ่านค่าภายใน 15 นาที)

2.3.8 สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของกรดแกลลิกและค่าการดูดกลืนแสง (absorbance)

2.3.9 ใช้ค่าการดูดกลืนแสงของสารแต่ละหลอดมาหาความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (คำนวณในรูปแบบกรดแกลลิก)

หมายเหตุ ; หลอดทดลองของสารละลายแบลงค์ (blank) ให้เติมเมทานอลแทนสารสกัด



รูป ก-1 กราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก

3. วิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานิน (Tananuwong *et al.*, 2010)

3.1 อุปกรณ์

- 3.1.1 ปีกเกอร์ (beaker)
- 3.1.2 ขวดปริมาตร (volumetric flask)
- 3.1.3 แท่งแก้วคนสาร
- 3.1.4 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง
- 3.1.5 สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)
- 3.1.6 หลอดทดลอง (test tube)

3.2 สารเคมี

- 3.2.1 โพแทสเซียมคลอไรด์ (potassium chloride, KCl)
- 3.2.2 โซเดียมอะซิเตต (sodium acetate, CH_3COONa)
- 3.2.3 ไฮโดรคลอริก (hydrochloric, HCl)
- 3.2.4 น้ำกลั่น (distilled water)

3.3 วิธีการ

3.3.1 เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ พีเอช 1.0 (potassium chloride, 0.025M) : ชั่งโพแทสเซียมคลอไรด์ 1.86 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นประมาณ 980 มิลลิลิตร จากนั้น ปรับพีเอชของสารละลายให้เป็น 1.0 (± 0.05) ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นร้อยละ 38 (ประมาณ 6.3 มิลลิลิตร) และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

3.3.2 เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ พีเอช 4.5 (sodium acetate, 0.4 โมลาร์) : ชั่งโซเดียมอะซิเตต 54.43 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นประมาณ 960 มิลลิลิตร จากนั้น ปรับพีเอชของสารละลายให้เป็น 4.5 (± 0.05) ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นร้อยละ 38 (ประมาณ 20 มิลลิลิตร) และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

3.3.3 เจือจางสารสกัดที่ต้องการวิเคราะห์หาปริมาณแอนโทไซยานินด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ พีเอช 1.0 และ 4.5 ให้ได้ประมาณ 10-20 เท่า

3.3.4 วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายในข้อ 3 ที่ความยาวคลื่น 513 และ 700 นาโนเมตร ภายใน 15-60 นาที หลังจากผสมให้เข้ากันจากข้อ 3

3.3.5 คำนวณหาปริมาณแอนโทไซยานินในรูปไซยาไดนิน-3-กลูโคไซด์ (cyanidin-3-glucoside) โดยใช้สมการ ดังนี้

$$\text{Monomeric anthocyanin pigment (mg/l)} = \frac{[A_{\text{diff}} \times \text{MW} \times \text{DF} \times 1000]}{\epsilon}$$

เมื่อ $A_{\text{diff}} = (A_{513} - A_{700})_{\text{pH}1.0} - (A_{513} - A_{700})_{\text{pH}4.5}$

MW = มวลโมเลกุลของ cyanidin-3-glucoside (449.2 g/mol)

DF = dilution factor

ϵ = molar absorptivity ของ cyanidin-3-glucoside (26,900 l/mol cm)

4. วิเคราะห์ปริมาณแกมมา-ออริซานอล และแอลฟา-โทโคฟีรอล (Aguilar-Garcia *et al.*, 2001)

4.1 วิธีการสกัด

4.1.1 ชั่งน้ำหนักข้าวหอมนิลที่ทราบแน่นอน 10 กรัม ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250-500 มิลลิลิตร เติมน้ำทำละลายที่ใช้สกัดปิดปากขวดด้วยพาราฟิล์ม

4.1.2 เขย่าด้วยเครื่องเขย่า (shaker) ที่ความเร็วระดับ 8 และปิดฝาเครื่องเขย่าทันที

4.1.3 กรองของเหลวที่ได้จากการสกัดด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1

4.1.4 นำสารละลายที่กรองได้ไปกำจัดตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator)

4.1.5 ชั่งน้ำหนัก crude oil ที่ได้เพื่อใช้คำนวณหาร้อยละผลผลิต (% yield) แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยเมทานอล HPLC เกรด ให้ครบ 50 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชาหุ้มด้วยกระดาษฟอยล์ที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส

4.1.6 นำสารสกัดจากข้อ 4.1.5 ไปวิเคราะห์หาปริมาณแกมมา-ออริซานอล และแอลฟา-โทโคฟีรอล ด้วยเครื่อง HPLC เทียบกับกราฟมาตรฐาน

4.2 ระบบ HPLC

4.2.1 Detector :

1. แกมมา-ออริซานอล ใช้ UV-vis diode array detector (325 nm)
2. แอลฟา-โทโคฟีรอล ใช้ Fluorescents detector (emission 328 nm, excited 298 nm)

4.2.2 Column : 250 mm × 4.6 mm diameter column of RESTEX C18

4.2.3 Guard column : Ultra AQ C18, 10 × 40 mm.

4.2.4 Mobile : Gradients elution

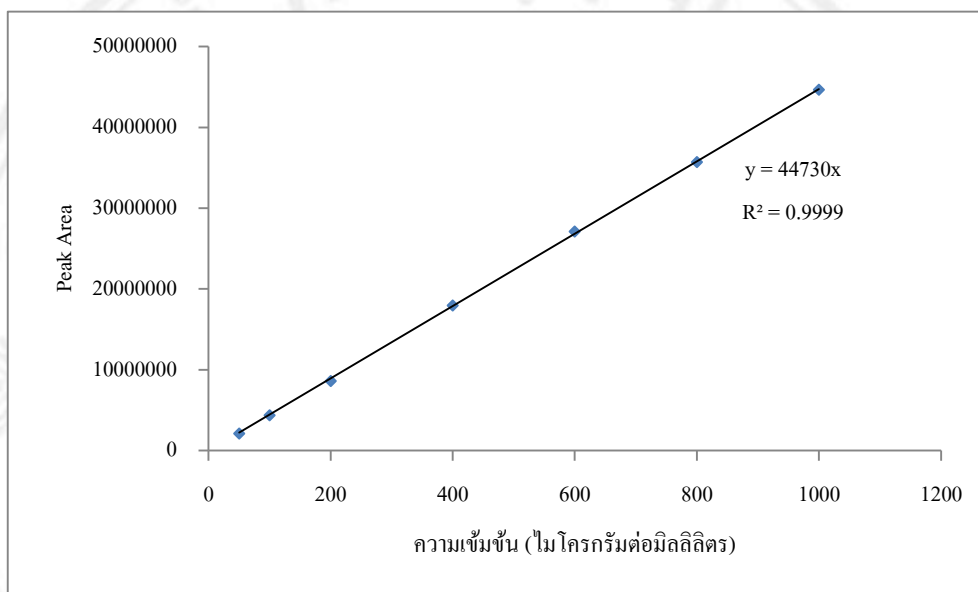
1. Mobile phase A คือ Acetonitrile : Methanol : Isopropanol

ในอัตราส่วน 45:45:10

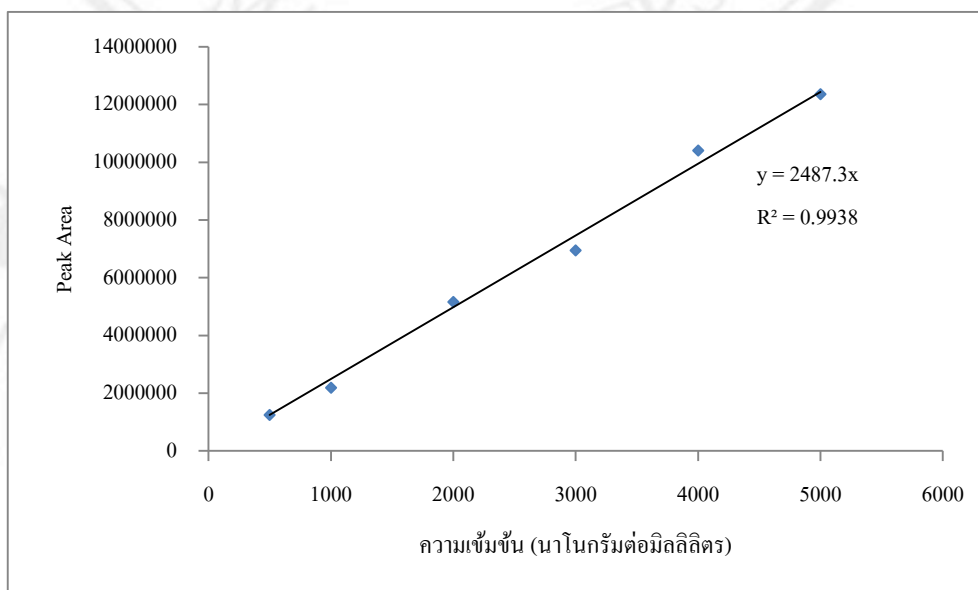
2. Mobile phase B คือ Acetonitrile : Methanol : Isopropanol

ในอัตราส่วน 25:70:5

4.2.5 Flow rate: 1.0 ml/min



รูป ก-2 กราฟมาตรฐานของสารแกมมา-ออริซานอล



รูป ก-3 กราฟมาตรฐานของสารแอลฟา-โทโคฟีรอล

5. DPPH Radical Scavenging Activity (Mao *et al.*, 2006)

5.1 อุปกรณ์

- 5.1.1 หลอดทดลอง (test tube)
- 5.1.2 ไมโครปิเปต (micropipette)
- 5.1.3 สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)
- 5.1.4 ขวดปริมาตร (volumetric flask)

5.2 สารเคมี

- 5.2.1 DPPH radical (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)
- 5.2.2 เอทานอล (ethanol)
- 5.2.3 BHT

5.3 วิธีการ

5.3.1 เตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ โดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย

5.3.2 เตรียม BHT ความเข้มข้น 500, 400, 300, 200, 100 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และเตรียมสารสกัดจากข้าวหอมมะลิที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย

5.3.3 หลอดควบคุม : ผสมสารละลาย DPPH ปริมาตร 2 มิลลิลิตร กับเอทานอล ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

หลอดทดสอบ : ผสมสารละลาย DPPH ปริมาตร 2 มิลลิลิตร กับสารละลาย BHT หรือสารสกัดที่แต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

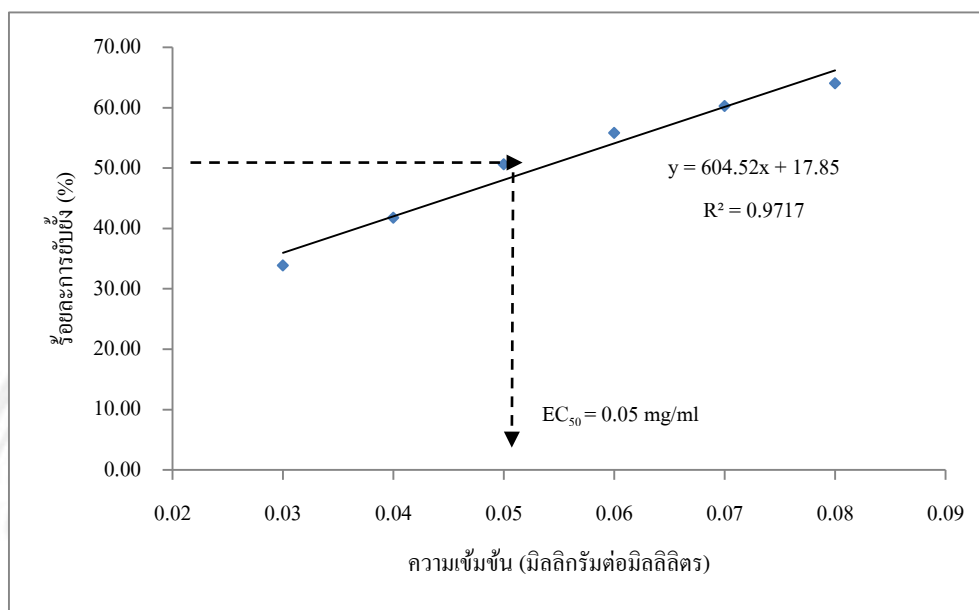
5.3.4 ตั้งหลอดทดลองในข้อ 4 ไว้ในที่มืด เป็นระยะเวลา 30 นาที ณ อุณหภูมิห้อง

5.3.5 นำสารละลายในข้อ 4 ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้เอทานอลเป็นแบล็ก

5.3.6 คำนวณหาค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ (% free radical inhibition) จากสูตร

$$\% \text{ Inhibition} = \left[\frac{\text{Absorbance}_{\text{control}} - \text{Absorbance}_{\text{sample}}}{\text{Absorbance}_{\text{control}}} \right] \times 100$$

5.3.7 นำค่าร้อยละการยับยั้ง และความเข้มข้นของสารสกัด หรือ BHT แต่ละความเข้มข้น มาพลอตกราฟเพื่อหา EC_{50} (median effective concentration) ดังกราฟ



รูป ก-4 ค่า EC_{50} ของ BHT

6. Metal Chelating Activity (Mao *et al.*, 2006)

6.1 อุปกรณ์

- 6.1.1 หลอดทดลอง (test tube)
- 6.1.2 ไมโครปิเปต (micropipette)
- 6.1.3 สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)
- 6.1.4 ขวดปริมาตร (volumetric flask)
- 6.1.5 ปีกเกอร์ (beaker)

6.2 สารเคมี

- 6.2.1 น้ำกลั่นปราศจากไอออน (deionized water)
- 6.2.2 ไอออนคลอไรด์เตตระไฮเดรต (Iron (II) chloride tetrahydrate, $FeCl_2 \cdot 4H_2O$)
- 6.2.3 เฟอโรซีน (ferrozine)
- 6.2.4 กรดเอทิลีนไดอะมีนเตตระอะซิติก (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)

6.3 วิธีการ

- 6.3.1 เตรียมสารละลายไอออนคลอไรด์ ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ : ชั่งไอออนคลอไรด์เตตระไฮเดรต 0.0398 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปราศจากไอออน ปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร
- 6.3.2 เตรียมสารละลายเฟอโรซีน ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ : ชั่งเฟอโรซีน 0.2463 กรัม

ละลายในน้ำกลั่นปราศจากไอออน ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

6.3.3 ผสมสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร น้ำกลั่น ปริมาตร 3.7 มิลลิลิตร สารละลายไอรอนคลอไรด์ 100 ไมโครลิตรและสารละลายเฟอร์โรซีน 200 ไมโครลิตร ให้เข้ากัน

6.3.4 หลอดควบคุม : เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร แทนสารสกัด

หลอดอ้างอิง : เติมสารละลาย EDTA 1 มิลลิลิตร แทนสารสกัด

หลอดแบล็ก : น้ำกลั่นปราศจากไอออน

6.3.5 บ่มสารละลายดังกล่าวทิ้งไว้ 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร

6.3.6 คำนวณหาค่าร้อยละการจับโลหะ จากสูตร

$$\% \text{ Metal chelating activity} = \left[\frac{\text{Absorbance}_{\text{control}} - \text{Absorbance}_{\text{sample}}}{\text{Absorbance}_{\text{control}}} \right] \times 100$$

6.3.7 หาค่า EC_{50} เช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 5.3.7

7. Inhibition of linoleic acid peroxidation (Chotimakorn *et al.*, 2008)

7.1 อุปกรณ์

7.1.1 หลอดทดลอง (test tube)

7.1.2 ไมโครปิเปต (micropipette)

7.1.3 สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)

7.1.4 ขวดปรับปริมาตร (volumetric flask)

7.1.5 บีกเกอร์ (beaker)

7.1.6 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator)

7.1.7 โฮโมจิไนส์เซอร์ (homogenizer)

7.2 สารเคมี

7.2.1 กรดลิโนเลอิก (Linoleic acid)

7.2.2 Tween 20

7.2.3 น้ำกลั่น

7.2.4 โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Sodium dihydrogen phosphate, NaH_2PO_4)

7.2.5 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Disodium hydrogen phosphate, Na_2HPO_4)

7.3 วิธีการ

7.3.1 เตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ พีเอช 7.0 : ชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 2.8392 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร และชั่งโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 3.1202 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายทั้งสองมาผสมกันในสัดส่วน 61 ต่อ 39 ผสมให้เข้ากัน และปรับพีเอชให้เท่ากับ 7.0

7.3.2 เตรียมอิมัลชันกรดคลิโนเลอิก 10 มิลลิโมลาร์ : ชั่งกรดคลิโนเลอิก 0.2805 กรัม และ tween 20 ผสมให้เข้ากันกับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ด้วยโฮโมจิไนเซอร์ นาน 1 นาที

7.3.3 นำสารสกัดที่ต้องการทดสอบ 200 ไมโครลิตร และสารละลายอิมัลชัน (ข้อ 6.3.2) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันในหลอดทดลอง

7.3.4 หลอดควบคุม : เติมเมทานอลแทนสารสกัด

หลอดอ้างอิง : เติม BHT แทนสารสกัด

หลอดแบล็ก : เติมเมทานอลแทนสารสกัด เขย่าให้เข้ากัน และวัดค่าการดูดกลืนแสงทันที

7.3.5 นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 8 ชั่วโมง

7.3.6 เติมเมทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 60 ปริมาตร 6 มิลลิลิตรทุกหลอด ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 234 นาโนเมตร

7.3.7 คำนวณค่าร้อยละการยับยั้งการเกิดเปอร์ออกซิเดชัน จากสูตร

$$\% \text{ Inhibition} = \left[\frac{\text{Absorbance}_{\text{control}} - \text{Absorbance}_{\text{sample}}}{\text{Absorbance}_{\text{control}}} \right] \times 100$$

หมายเหตุ : ต้องนำค่าการดูดกลืนแสงของหลอดแบล็กมาลบกับค่าการดูดกลืนแสงของหลอดควบคุม และหลอดทดสอบก่อนนำมาใช้คำนวณในข้อ 6.3.7

8. Thiobarbituric acid reactive substance (TBARs) determination (วนิดา, 2545)

8.1 อุปกรณ์

8.1.1 ปีกเกอร์ (beaker)

8.1.2 ชุดกลั่น พร้อมขวดกลั่น (distillation set and flask)

8.1.3 หลอดหยดสาร (dropper)

8.1.4 พีเอชมิเตอร์ (pH meter)

8.1.5 ปิเปต (pipette)

8.1.6 หลอดทดลอง (test tube)

8.1.7 เตาให้ความร้อน (hot plate)

8.1.8 เทอร์โมมิเตอร์ (thermometer)

8.1.9 สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)

8.1.10 เครื่องปั่นผสม (mixer)

8.2 สารเคมี

8.2.1 น้ำกลั่น (distilled water)

8.2.2 กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid)

8.2.3 กรดอะซิติก (acetic acid)

8.2.4 กรดไทโอบาร์บิทริก (thiobarbituric acid, TBA)

8.3 วิธีการ

8.3.1 เตรียม TBA-reagent : ชั่งกรดไทโอบาร์บิทริก 0.2883 กรัม ละลายในกรดอะซิติก 90 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

8.3.2 เตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 4.0 โมลาร์ : ปิเปตกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้นร้อยละ 37 ปริมาตร มา 33.12 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 0.1 ลิตร

8.3.3 ชั่งตัวอย่างอาหาร 10 ± 0.01 กรัม เติมน้ำ 20 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นผสมให้เข้ากัน แล้วเทใส่ในขวดกลั่น จากนั้นล้างโบนด้วยน้ำกลั่น 47.5 มิลลิลิตร และเทผสมให้เข้ากัน

8.3.4 เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 4.0 โมลาร์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร

8.3.5 ต่อขวดกลั่น เข้ากับขวดกลั่น แล้วเริ่มกลั่นอย่างรวดเร็ว จนได้ของเหลวประมาณ 50 มิลลิลิตร (ภายหลังจากเดือดประมาณ 10-12 นาที)

8.3.6 ปิเปตของเหลวที่กลั่นได้มา 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่มีฝาปิด แล้วเติม TBA-reagent 5 มิลลิลิตร ปิดฝาและเขย่าให้เข้ากัน

8.3.7 นำหลอดทดลองจากข้อ 8.3.6 ไปต้มในน้ำเดือดนาน 35 นาที แล้วทำให้เย็นลงทันที

8.3.8 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 538 นาโนเมตร

8.3.9 หลอดแบล็ก : เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร แทนส่วนของเหลวที่กลั่นได้ จากนั้นทำการทดลองทุกขั้นตอนเหมือนตัวอย่างทดสอบ

8.3.10 คำนวณหา TBA (as mg. Malonaldehyde/1000 g of sample) จากสมการ

$$\text{TBA (as mg. Malonaldehyde/1000 g of sample)} = 7.8 \times \text{OD}_{538}$$

9. วิธีวัดค่าปริมาณน้ำที่เป็นประโยชน์ (water activity, a_w) (AOAC, 2000)

ขั้นตอนการวัดค่า a_w ด้วยเครื่อง (a_w -box, Aqualab : model CX3TE, USA) มีวิธีดังนี้

9.1 ใส่ตัวอย่างผลิตภัณฑ์กึ่งแข็งที่บดแล้วในตลับพลาสติกสำหรับวัดค่า a_w

9.2 นำตลับพลาสติกตามข้อ 9.1 ใส่ในเครื่องวัด a_w

9.3 หมุนปุ่มควบคุมไปยังตำแหน่งให้เครื่องอ่านค่า a_w

9.4 รอจนกระทั่งมีเสียงเตือนจากตัวเครื่อง หรือไฟกระพริบ แล้วอ่านค่า ทำซ้ำ 3 ครั้ง

10. การวัดค่าสีในระบบ Hunter Lab (MINOLTA; Model CR-300, Japan)

เป็นการวัดสีด้วยเครื่องวัดสี MINOLTA ซึ่งเป็นค่าสีในระบบ Hunter Lab โดยที่ค่า L เป็นค่าความสว่าง (Lightness) ค่า a เป็นค่าสีแดงและสีเขียว (Redness/Greenness) และค่า b เป็นค่าสีเหลืองและน้ำเงิน (Yellowness/Blueness)

เมื่อ L คือ ค่าความสว่าง มีค่าอยู่ในช่วง 0 ถึง 100

a คือ ค่าสีแดง/เขียว เมื่อ a มีค่าบวก เป็นสีแดง

เมื่อ a มีค่าลบ เป็นสีเขียว

b คือ ค่าสีเหลือง/น้ำเงิน เมื่อ b มีค่าบวก เป็นสีเหลือง

เมื่อ b มีค่าลบ เป็นสีน้ำเงิน

ก่อนทำการวัดทุกครั้งต้องทำการปรับค่ามาตรฐานเครื่อง (calibration) โดยใช้แผ่นมาตรฐาน (white blank; $L=97.67$, $a=-0.18$ และ $b=1.84$) แล้วทำการวัดสีของตัวอย่างผลิตภัณฑ์กึ่งแข็งหมู



ภาคผนวก ข

ตารางผลการทดลอง ผลวิเคราะห์ทางสถิติ และโครมาโทแกรม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved

ตารางผลการทดลอง ผลวิเคราะห์ทางสถิติ และโครมาโทแกรม

ตาราง ข-1 การเปลี่ยนแปลงค่า TBARs, L*, a* และ b* ของผลิตภัณฑ์กุ้งแช่แข็งหมูผสมสารสกัดจากรำข้าวหอมนิล ความเข้มข้น 0, 200, 400, 600 พีพีเอ็ม และสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (BHT) ความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม เก็บรักษาในสภาวะปกติ เวลา 15 วัน

ค่าที่วัด	เวลาการเก็บ รักษา (วัน)	เติมสารสกัดจากรำข้าวหอมนิล				เติม BHT
		0 พีพีเอ็ม	200 พีพีเอ็ม	400 พีพีเอ็ม	600 พีพีเอ็ม	100 พีพีเอ็ม
TBARs	0	0.289 ^a ±0.009	0.248 ^b ±0.016	0.246 ^b ±0.024	0.233 ^b ±0.022	0.242 ^b ±0.017
	5	1.086 ^a ±0.132	0.699 ^b ±0.022	0.441 ^c ±0.037	0.395 ^c ±0.009	0.431 ^c ±0.038
	10	3.050 ^a ±0.109	1.074 ^b ±0.092	0.808 ^c ±0.015	0.683 ^c ±0.035	0.711 ^d ±0.040
	15	4.816 ^a ±0.213	1.788 ^b ±0.177	1.402 ^c ±0.044	1.117 ^d ±0.062	1.303 ^c ±0.107
L*	0	45.44 ^a ±2.57	42.79 ^b ±1.43	42.39 ^b ±1.25	41.95 ^b ±2.08	47.48 ^a ±1.33
	5	47.29 ^a ±1.38	44.15 ^b ±2.41	44.24 ^b ±0.89	44.35 ^b ±2.87	48.28 ^a ±1.14
	10	50.78 ^a ±0.82	49.74 ^a ±2.35	49.76 ^a ±0.79	48.88 ^a ±1.96	49.28 ^a ±2.48
	15	51.59 ^a ±1.21	49.97 ^a ±2.99	51.01 ^a ±2.88	50.86 ^a ±1.01	52.91 ^a ±0.59
a*	0	12.06 ^a ±1.56	11.92 ^{ab} ±1.07	12.27 ^a ±1.24	12.58 ^a ±1.57	10.06 ^b ±0.51
	5	11.13 ^{ab} ±1.92	11.04 ^{ab} ±1.65	11.49 ^a ±0.37	12.05 ^a ±0.80	9.33 ^b ±0.79
	10	8.69 ^a ±0.31	8.86 ^a ±1.49	9.27 ^a ±0.92	9.78 ^a ±0.94	8.45 ^a ±1.83
	15	6.21 ^a ±1.34	6.48 ^a ±1.18	7.82 ^a ±0.40	7.43 ^a ±0.76	7.68 ^a ±0.27
b*	0	5.71 ^a ±1.08	5.61 ^a ±1.74	5.40 ^a ±1.22	5.53 ^a ±1.42	5.53 ^a ±1.14
	5	10.80 ^a ±1.33	9.92 ^{ab} ±0.61	8.66 ^{ab} ±2.16	7.71 ^b ±1.18	11.21 ^a ±1.28
	10	13.27 ^a ±1.24	12.18 ^{ab} ±2.19	11.76 ^{ab} ±1.89	10.28 ^b ±0.51	12.79 ^a ±0.26
	15	14.96 ^a ±1.56	12.78 ^{ab} ±1.04	12.47 ^{ab} ±2.54	11.81 ^b ±0.35	12.08 ^{ab} ±1.33

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละแถว แสดงถึงค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)

ตาราง ข-2 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของการวัดค่าทางเคมีของผลิตภัณฑ์กุ้งเชียงใหม่ผสมสารสกัดจากรำข้าวหอมนิล ความเข้มข้น 0, 200, 400, 600 พีพีเอ็ม และสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (BHT) ความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม เก็บรักษาในสภาวะปกติ เวลา 15 วัน

ค่าที่วัด	SOV	df	SS	MS	F
L*	ปริมาณสารสกัด (A)	4	91.018	22.754	4.747*
	ระยะเวลาการเก็บรักษา (B)	3	625.282	208.427	43.485*
	A × B	12	85.064	7.089	1.479 ^{ns}
	Error	40	191.723	4.793	
a*	ปริมาณสารสกัด (A)	4	18.187	4.547	3.239*
	ระยะเวลาการเก็บรักษา (B)	3	194.639	64.880	46.217*
	A × B	12	15.417	1.285	0.915 ^{ns}
	Error	40	56.152	1.404	
b*	ปริมาณสารสกัด (A)	4	11.366	2.842	1.351 ^{ns}
	ระยะเวลาการเก็บรักษา (B)	3	467.928	155.976	74.169*
	A × B	12	54.223	4.519	2.149*
	Error	40	84.119	2.103	
TBARS	ปริมาณสารสกัด (A)	4	24.546	6.137	867.706*
	ระยะเวลาการเก็บรักษา (B)	3	29.166	9.722	1,374.678*
	A × B	12	17.440	1.453	205.506*
	Error	40	0.283	0.007	
A_w	ปริมาณสารสกัด (A)	4	<0.00003	<0.00003	0.144 ^{ns}
	ระยะเวลาการเก็บรักษา (B)	3	0.021	0.007	162.674*
	A × B	12	<0.00005	<0.00005	0.098 ^{ns}
	Error	40	0.002	<0.00005	

ns คือ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ และ * คือ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)

ตาราง ข-3 การเปลี่ยนแปลงค่าคะแนนความชอบด้านสี กลิ่น ลักษณะปรากฏ และการยอมรับโดยรวมของผลิตภัณฑ์กุนเชียงหมูผสมสารสกัดจากรำข้าวหอมนิล ความเข้มข้น 0, 200, 400, 600 พีพีเอ็ม และสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (BHT) ความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม เก็บรักษาในสภาวะปกติ เวลา 15 วัน

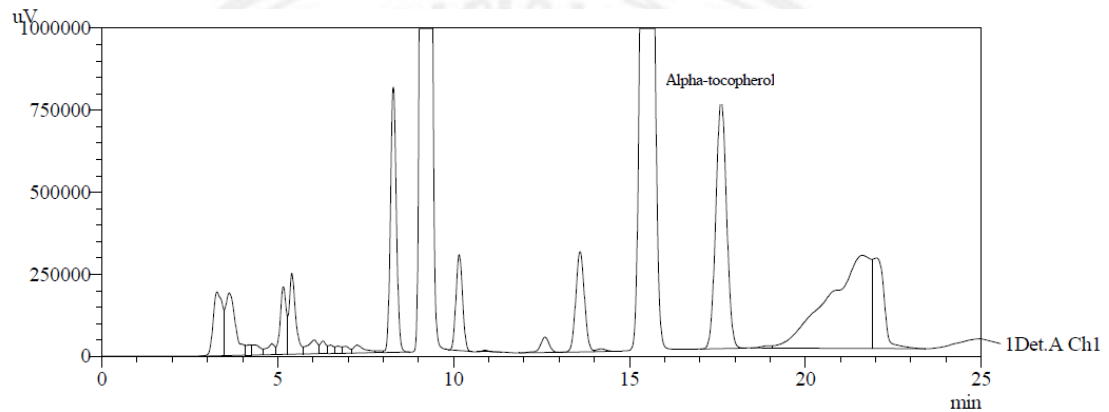
คุณลักษณะ ที่วัด	เวลาการเก็บ รักษา (วัน)	เติมสารสกัดจากรำข้าวหอมนิล				เติม BHT
		0 พีพีเอ็ม	200 พีพีเอ็ม	400 พีพีเอ็ม	600 พีพีเอ็ม	100 พีพีเอ็ม
สี	0	6.0 ^{ab} ±0.6	6.4 ^a ±0.7	5.9 ^{ab} ±0.7	5.1 ^b ±0.5b	6.1 ^{ab} ±0.7
	5	5.6 ^a ±0.7	5.8 ^a ±0.6	5.3 ^a ±1.1	5.0 ^a ±0.8	5.0 ^a ±1.2
	10	5.0 ^a ±0.8	5.3 ^a ±0.9	5.2 ^a ±0.9	4.7 ^a ±0.8	4.7 ^a ±1.2
	15	4.5 ^a ±0.7	4.7 ^a ±0.5	4.6 ^a ±0.7	4.4 ^a ±0.4	3.4 ^b ±0.4
ลักษณะ- ปรากฏ	0	6.6 ^a ±0.7	6.6 ^a ±0.5	6.7 ^a ±0.5	6.5 ^a ±0.7	6.4 ^a ±0.5
	5	5.8 ^a ±0.9	5.8 ^a ±0.8	6.0 ^a ±0.8	6.0 ^a ±0.9	5.7 ^a ±0.8
	10	5.7 ^a ±0.7	5.7 ^a ±0.9	5.3 ^a ±0.9	5.4 ^a ±0.5	5.5 ^a ±0.7
	15	4.5 ^a ±1.1	4.8 ^a ±0.8	4.7 ^a ±0.8	4.8 ^a ±0.9	4.0 ^a ±1.3
กลิ่น	0	6.3 ^a ±0.7	6.4 ^a ±0.5	6.6 ^a ±0.5	6.7 ^a ±0.5	6.7 ^a ±0.4
	5	5.1 ^b ±0.4	5.6 ^{ab} ±0.7	5.8 ^{ab} ±0.8	6.1 ^a ±0.8	6.2 ^a ±0.6
	10	3.8 ^b ±0.4	4.5 ^{ab} ±0.7	4.8 ^a ±0.4	5.3 ^a ±0.5	5.1 ^a ±0.6
	15	3.1 ^b ±0.5	3.9 ^{ab} ±0.4	4.5 ^a ±0.5	4.6 ^a ±0.5	4.5 ^a ±0.6
การยอมรับ โดยรวม	0	5.9 ^a ±0.5	6.0 ^a ±0.6	6.2 ^a ±0.8	5.9 ^a ±0.5	6.1 ^a ±0.8
	5	4.9 ^a ±0.7	5.3 ^a ±0.7	5.5 ^a ±0.7	5.3 ^a ±0.8	5.6 ^a ±0.9
	10	4.3 ^b ±0.4	4.8 ^{ab} ±0.6	5.0 ^{ab} ±0.6	5.2 ^a ±0.4	5.2 ^a ±0.5
	15	3.6 ^b ±0.5	4.6 ^{ab} ±0.5	4.5 ^{ab} ±0.6	4.7 ^b ±0.5	3.7 ^b ±0.4

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละแถว แสดงถึงค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)

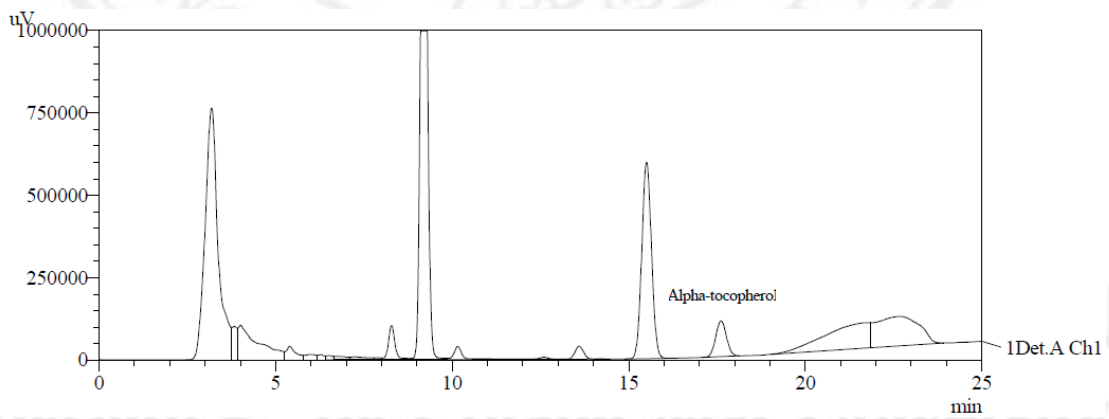
ตาราง ข-4 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของการทดสอบทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์
กุนเชียงหมูผสมสารสกัดจากรำข้าวหอมนิล ความเข้มข้น 0, 200, 400, 600 พีพีเอ็ม และสารต้าน-
อนุมูลอิสระสังเคราะห์ (BHT) ความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม เก็บรักษาในสภาวะปกติ เวลา 15 วัน

ลักษณะที่ทดสอบ	SOV	df	SS	MS	F
สี	ปริมาณสารสกัด (A)	4	51.540	12.885	15.677*
	ระยะเวลาการเก็บรักษา (B)	3	197.325	65.775	80.028*
	A × B	12	34.500	2.875	3.498*
	Error	580	476.700	0.822	
กลิ่น	ปริมาณสารสกัด (A)	4	101.533	25.383	58.701*
	ระยะเวลาการเก็บรักษา (B)	3	527.340	175.780	406.509*
	A × B	12	18.160	1.513	3.500*
	Error	580	250.800	0.432	
ลักษณะปรากฏ	ปริมาณสารสกัด (A)	4	7.950	1.988	3.096*
	ระยะเวลาการเก็บรักษา (B)	3	311.205	103.735	161.607*
	A × B	12	13.170	1.097	1.710 ^{ns}
	Error	580	372.300	0.642	
การยอมรับโดย รวม	ปริมาณสารสกัด (A)	4	63.510	15.878	34.843*
	ระยะเวลาการเก็บรักษา (B)	3	314.565	104.885	230.102*
	A × B	12	20.010	1.667	3.659*
	Error	580	264.300	0.456	

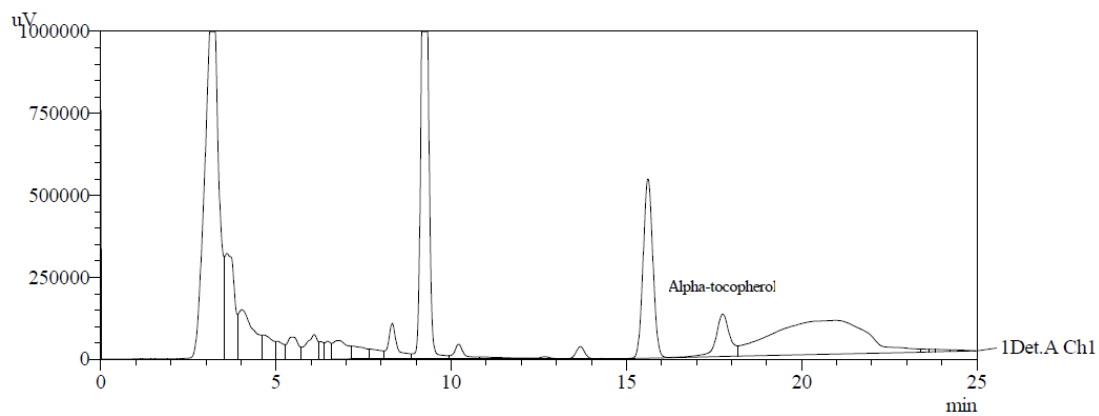
ns คือ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ และ * คือ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)



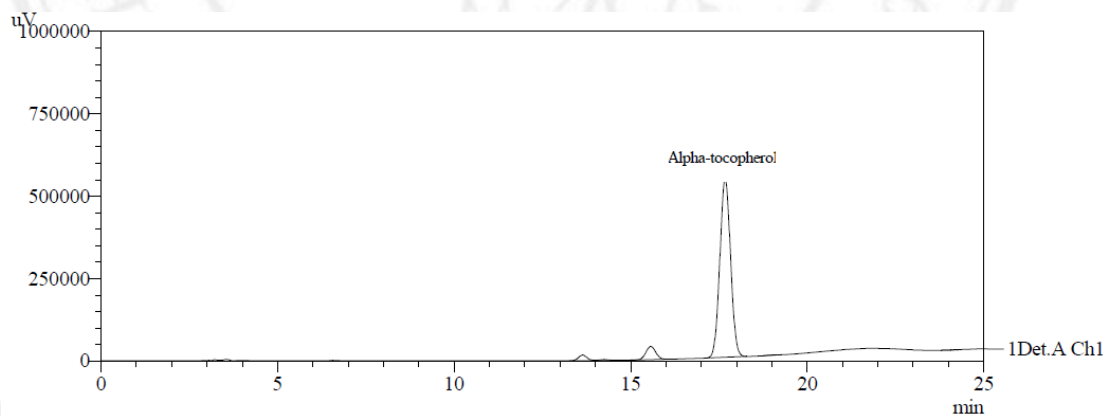
รูป ข-1 โครมาโทแกรมของสารแอลฟา-โทโคฟีรอลที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตต



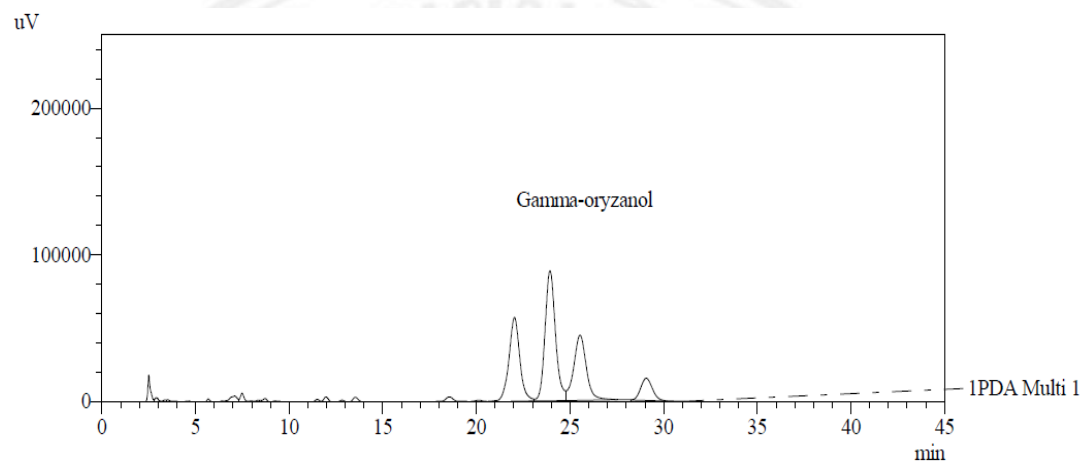
รูป ข-2 โครมาโทแกรมของสารแอลฟา-โทโคฟีรอลที่สกัดด้วยเอทานอล



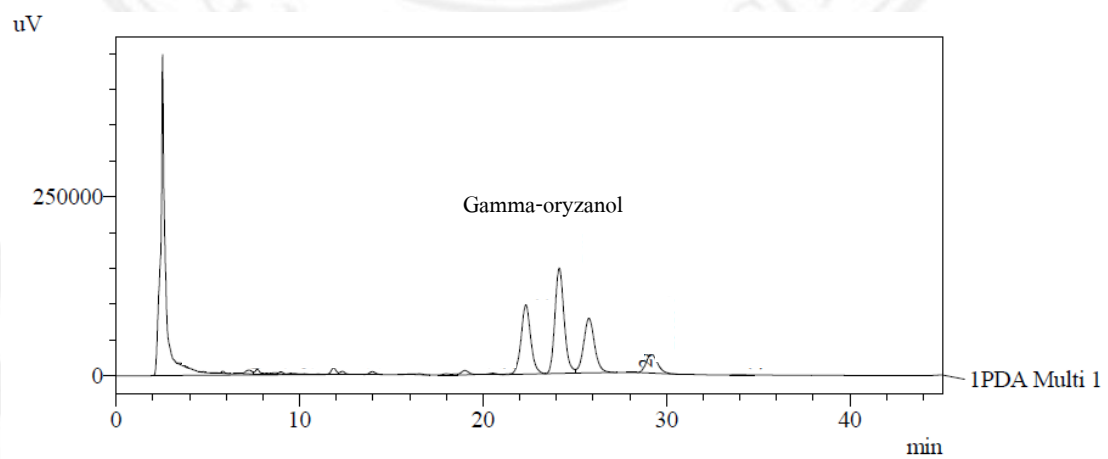
รูป ข-3 โครมาโทแกรมของสารแอลฟา-โทโคฟีรอลที่สกัดด้วยเมทานอล



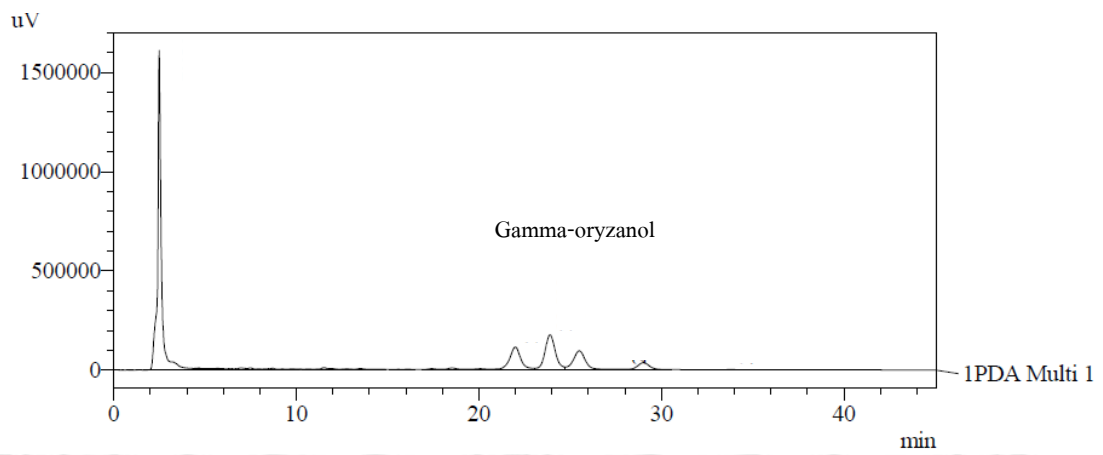
รูป ข-4 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานแอลฟา-โทโคฟีรอล



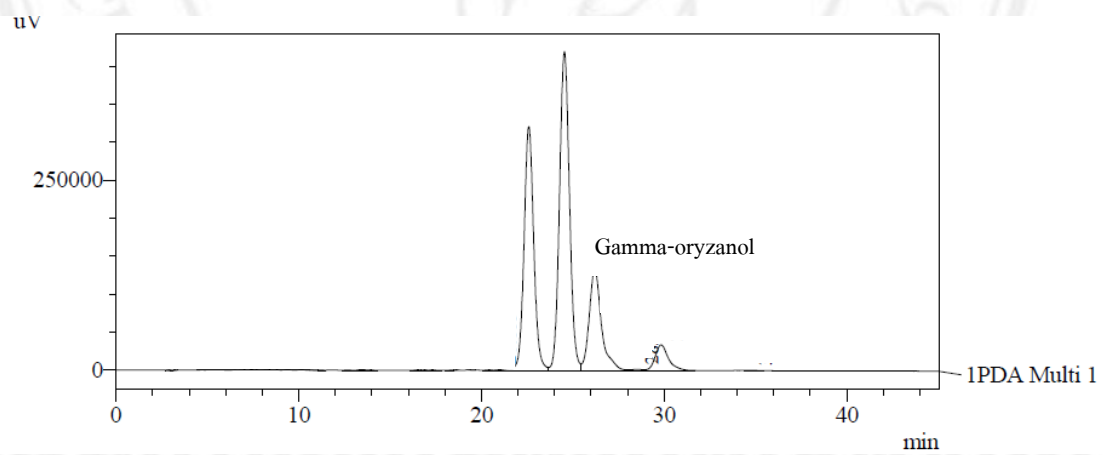
รูป ข-5 โครมาโทแกรมของสารแกมมา-ออริซานอลที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท



รูป ข-6 โครมาโทแกรมของสารแกมมา-ออริซานอลที่สกัดด้วยเอทานอล



รูป ข-7 โครมาโทแกรมของสารแกมมา-ออริซานอลที่สกัดด้วยเมทานอล



รูป ข-8 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานแกมมา-ออริซานอล



ภาคผนวก ค

ผลิตภัณฑ์ชุมชนเชียงใหม่ในระหว่างการรักษา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved

ผลิตภัณฑ์กุ้งเชียงหมูในระหว่างการเก็บรักษา



รูป ค-1 ผลิตภัณฑ์กุ้งเชียงหมูที่เก็บรักษา ที่ 0 วัน



รูป ค-2 ผลิตภัณฑ์กุ้งเชียงหมูที่เก็บรักษา ที่ 5 วัน



รูป ค-3 ผลิตรักกันขุนเชียงหมูที่เก็บรักษา ที่ 10 วัน



รูป ค-4 ผลัดกัณฑ์กนเจียงหมที่เก็บรักษา ที่ 15 วัน



ภาคผนวก ง

เครื่องมือ วัสดุที่ใช้ในการทดลอง ส่วนผสม
และกรรมวิธีการผลิตกุนเชียง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เครื่องมือ วัสดุที่ใช้ในการทดลอง ส่วนผสม และกรรมวิธีการผลิตกุนเชียง

1. เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง



รูป ง-1 เครื่องกะเทาะเปลือกข้าว



รูป ง-2 เครื่องขัดสี

2. วัตถุดิบที่ใช้ในการทดลอง



รูป ง-3 ตัวอย่างเมล็ดข้าวพันธุ์หอมนิล



รูป ง-4 ตัวอย่างรำข้าวพันธุ์หอมนิล



รูป ง-5 ตัวอย่างสารสกัดจากรำข้าวพันธุ์หอมนิล

3. ส่วนผสม และกรรมวิธีการผลิตกุนเชียงหมู (ดัดแปลงจาก พรทวิ, 2548)

3.1 ส่วนผสม

3.1.1 หมูบดหยาบ	700	กรัม
3.1.2 มันหมูแข็งหั่น (ลูกเต๋า)	280	กรัม
3.1.3 น้ำตาลทราย	175	กรัม
3.1.4 แป้งมันสำปะหลัง	32	กรัม
3.1.5 เกลือ	20	กรัม
3.1.6 ผงเพรค	1.4	กรัม
(มีไนไตรท์ เท่ากับ 0.056 กรัม)		
3.1.7 อิริทอร์เบต	0.35	กรัม

3.2 ขั้นตอนการผลิต

- 3.2.1 นำหมูบดหยาบ 200 กรัม ผสมกับเกลือ และผงเพรค ประมาณ 2 นาที
- 3.2.2 เติมน้ำมันหั่นลูกเต๋า 280 กรัม ผสมต่อประมาณ 1 นาที

3.2.3 เติมน้ำตาลทราย 175 กรัม อิริทอร์เบต 0.35 กรัม และแป้งมันสำปะหลัง 32 กรัม ผสม
ต่อประมาณ 3 นาที

3.2.4 บรรจุส่วนผสมในข้อ 3.2.3 ลงในไส้เทียม และมัดเป็นท่อนประมาณ 5-6 นิ้ว

3.2.5 อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ประมาณ 12-15 ชั่วโมง

3.2.6 บรรจุถุง และปิดผนึก



รูป ง-6 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์กุนเชียงหมูหลังการอบ

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นายสุวัฒน์ พงษ์ไทย
วัน เดือน ปีเกิด	30 พฤศจิกายน 2527
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เกียรตินิยม) สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ ปีการศึกษา 2549 สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนปายวิทยาคาร อ.ปาย จ.แม่ฮ่องสอน ปีการศึกษา 2545
ประวัติการทำงาน	ตำแหน่ง นักวิชาการตรวจรับรองระบบ (GMP&HACCP) สถาบันอาหาร (ประเทศไทย) กระทรวงอุตสาหกรรม กรุงเทพฯ ตำแหน่ง เจ้าหน้าที่ฝ่ายประกันคุณภาพ (Quality Assurance Supervisor) บริษัท ไทยยูเนี่ยน โฟรเซ่น โปรดักส์ จำกัด (มหาชน) จ.สมุทรสาคร
ทุนสนับสนุนงานวิจัย	ได้รับทุนสนับสนุนจาก บริษัทเตตราแพค (ประเทศไทย) จำกัด และ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ทุนที่ได้รับขณะศึกษา	1.) ทุนนักศึกษาแลกเปลี่ยน โครงการ “2012 International Exchange & Educational Program for Food Safety and Manufacturing of Traditional foods” ณ Kagawa University ประเทศญี่ปุ่น ปีการศึกษา 2555 2.) ทุนผู้ช่วยสอน (TA) รายวิชา ปฏิบัติการเคมีผลิตภัณฑ์ทางทะเล ภาคเรียนที่ 2 ปีการศึกษา 2554

ผลงานวิจัยที่เผยแพร่

- 1.) Phongthai, S. and Laokuldilok, T. 2013. Optimization of Extraction Condition of Antioxidants from Pigmented Rice Bran (*cv. Hom Nin*) using Response Surface Methodology. In proceeding of The 3rd 2013 International and National Conference of Khon Kaen University on “Local Community: The Foundation of Development in the ASEAN Economic Community (AEC)”. 9 - 10 May, 2013.
At Centara Hotel & Convention Centre Khon Kaen, Thailand
(ได้รับรางวัล “Honorable Mention Award of International Oral Presentation”)
- 2.) Phongthai, S. and Laokuldilok, T. 2013. Acidified Ethanol Extraction of Antioxidants in Black Rice Bran (*cv. Hom Nin*) and Antioxidant Activities of the Extracts. . Publication in a Special Issue of Journal of Interdisciplinary Network (JIN). International Conference on Interdisciplinary Research and Development in ASEAN Universities. 8-10 August, 2013. At Imperial Mae Ping Hotel, Chiang Mai, Thailand