นิพนธ์ต้นฉบับ

ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและองค์ประกอบทางเคมีของข้าวเหนียวก่ำพันธุ์พื้นเมืองของไทย

เฉลิม จันทร์สม*, สกุล มูลคำ**, วนิดา จันทร์สม*, เอกสิทธิ์ สกุลคู***
กรณ์กาญจน์ ภมรประวัติธนะ****

บทคัดย่อ

ความหลากหลายทางพันธุกรรมและสภาพแวดล้อมที่ใช้เพาะปลูก มีผลทำให้ข้าวเหนียวก่ำ (*Oryza sativa* L.) มีปริมาณสารสำคัญแตกต่างกัน สีที่เกิดในผนังผลประกอบไปด้วยแอนโทไซยานินอยู่ ๔ ชนิด คือ ไซยานิดิน-ไดเฮกโซไซด์, ไซยานิดิน ๓-กลูโคไซด์, ไซยานิดิน-เฮกโซไซด์ และพีโอนิดิน ๓-กลูโคไซด์ จัดอยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ การศึกษานี้ต้องการที่จะหาพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่พบในท้องถิ่นของประเทศไทย ที่มีปริมาณองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันมากที่สุด โดยเก็บรวบรวมตัวอย่างข้าวเหนียวก่ำพื้นเมืองของไทยจำนวน ๓๖ สายพันธุ์ ทั้งจากภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

ข้าวเหนียวก่ำพันธุ์ K-Entry ๑๒ เหนียวดำ เป็นพันธุ์ที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay ดีที่สุด (IC_{50} = ๒๖.๖๔ ± ๑.๑๔ μg/ml) และฤทธิ์ต้านออกซิเดชันวิธี lipid peroxidation assay ดีที่สุดด้วย (IC_{50} = ๕๐.๒๒ ± ๕.๕๑ μg/ml) นอกจากนี้ตัวอย่างข้าวเหนียวก่ำพันธุ์ K-Entry ๑๒ เหนียวดำ ยังมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและไซยานิดิน ๓-กลูโคไซด์มากที่สุด คือ ๑.๗๓ ± ๐.๐๔ mg GAE/g (grain) และ ๕๓๖.๕๗ ± ๔.๐๕ μg/g (grain) ตามลำดับ ข้าวเหนียวก่ำพันธุ์ที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและปริมาณองค์ประกอบทางเคมีรองลงมา คือ ข้าวเหนียวก่ำพันธุ์ K-Entry ๑๗ เหนียวดำตับหมู โดยมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันวิธี lipid peroxidation assay ดี (IC_{50} = ๗๐.๒๔ ± ๒.๒๐ μg/ml) และมีปริมาณไซยานิดิน ๓-กลูโคไซด์มาก [๔๘๘.๒๒ ± ๓.๔๕ μg/g (grain)]

จากข้อมูลดังกล่าว ควรส่งเสริมให้มีการปลูกข้าวเหนียวก่ำพันธุ์ K-Entry ๑๒ เหนียวดำ และสามารถใช้ข้าวเหนียวก่ำพันธุ์ K-Entry ๑๒ เหนียวดำนี้ เป็นวัตถุดิบในการพัฒนาวิจัยให้ได้ผลิตภัณฑ์ เสริมสุขภาพที่มีคุณภาพต่อไป

คำสำคัญ: ข้าวเหนียวก่ำ, ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน, ผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพ

* งานวิจัย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
** ศูนย์วิจัยข้าวเชียงใหม่ อำเภอสันป่าตอง เชียงใหม่
*** ศูนย์วิจัยข้าวชุมแพ อำเภอชุมแพ ขอนแก่น
**** บัณฑิตศึกษา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

บทนำ

ข้าวเหนียวก่ำหรือข้าวเหนียวดำ (*Oryza sativa* L.) เป็นข้าวเหนียวพันธุ์พื้นเมืองชนิดหนึ่ง ลักษณะเด่น คือ ผนังผล (pericarp) มีสีม่วงดำ มีความหลากหลายทางพันธุกรรม สามารถจำแนกตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะต่างๆ เช่น สีของแผ่นใบ สีของกาบใบ สีของลิ้นใบ รูปร่างของลิ้นใบ สีของหูใบ สีของปล้อง ทรงกอ สีของยอด เกสรเพศเมีย ลักษณะใบธง ลักษณะรวง การแตกระแง้ การแก่ของใบ สีเปลือกเมล็ด สีของข้าวกล้องและรูปร่างข้าวกล้อง เป็นต้น[๑] ความหลากหลายของสีที่เกิดจากปฏิกิริยาของแอนโทไซยานิน (anthocyanin) ในข้าวเหนียวก่ำ โดยเฉพาะส่วนของเมล็ดอันได้แก่ แกลบข้าว (husk) และผนังผลที่มีลักษณะสีม่วงคล้ายกันทั้งหมด แต่อยู่ในระดับสีที่แตกต่างกัน สารสีที่พบในข้าวก่ำ คือ ไซยานิดิน ๓-กลูโคไซด์ (cyanidin 3-glucoside) สูงถึง ๕๔.๔๗ mg/๑๐๐ g (grain) ซึ่งเป็นสารที่ไม่พบในข้าวขาวทั่วไป[๒] ไซยานิดิน ๓-กลูโคไซด์เป็นสารที่มีคุณสมบัติในการต้านออกซิเดชัน (antioxidation) ที่ดีที่สุดในกลุ่มแอนโทไซยานิน และยังมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ[๓] มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลูคีเมีย[๔] ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปอด[๕] และยับยั้งเอนไซม์อัลโดสรีดักเตส (aldose reductase)[๖]

ในข้าวเหนียวก่ำ ประกอบด้วยสารแกมมา-โอไรซานอล (γ-oryzanol) ปริมาณสูงถึง ๗๒.๕๕ mg/๑๐๐ g (grain) ซึ่งสูงกว่าข้าวขาวถึง ๒-๓ เท่า[๗] แกมมา-โอไรซานอลเป็นสารที่มีคุณสมบัติในการต้านออกซิเดชัน[๘] ลดการดูดซึมคอเลสเตอรอลจากอาหารสู่ร่างกาย มีผลทำให้ลดการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลในตับ[๙] ลดปริมาณคอเลสเตอรอลในพลาสมา[๑๐] และลดระดับน้ำตาลในเลือด[๑๑] นอกจากนี้ในข้าวเหนียวก่ำยังพบว่ามีสารในกลุ่มโทคอล (tocols) เช่น วิตามินอี, แกมมา-โทโคเฟอรอล แล้วยังพบสารพีโอนิดิน ๓-กลูโคไซด์ (peonidin 3-glucoside), ควอเซติน (quercetin) และกรดเฟอรูลิก (ferulic acid) อีกด้วย[๑๒] จากการทดสอบปลูกพันธุ์ข้าวเหนียวดำจำนวน ๑๖ พันธุ์ และพันธุ์ตรวจสอบอีก ๒ พันธุ์ ใน ๔ สภาพแวดล้อม คือ ฤดูนาปี ๒๕๔๘ ที่ศูนย์วิจัยข้าวสกลนคร ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี และศูนย์วิจัยข้าวชุมแพ และในฤดูนาปี ๒๕๔๙ ที่ศูนย์วิจัยข้าวขอนแก่น ผลจากการศึกษาปริมาณแกมมา-โอไรซานอล พบว่า พันธุ์ที่ให้ค่าเฉลี่ยของปริมาณแกมมา-โอไรซานอลสูง คือ พันธุ์ Niewdam Gs No. ๐๐๖๒๑, KKU-GL-BL-๐๕-๐๐๓, KKU-GL-BL-๐๕-๐๐๒ และ Niewdam Gs No. ๐๕๔๗๕ โดยมีปริมาณแกมมา-โอไรซานอลเท่ากับ ๑๓.๒๒, ๑๑.๐, ๑๐.๕๕ และ ๑๐.๓๔ ppm ตามลำดับ[๑๓]

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยครั้งนี้ คือต้องการที่จะหาพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่พบในท้องถิ่นของประเทศไทย ที่มีปริมาณองค์ประกอบทางเคมีและมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันมากที่สุด

วิธีการทดลอง

๑. กลุ่มตัวอย่างที่นำมาศึกษา

ตัวอย่างข้าวเหนียวก่ำพื้นเมืองของไทยพันธุ์ต่างๆ ซึ่งมีนักวิชาการเกษตรเป็นผู้จำแนกพันธุ์ ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา จากภาคเหนือ (ศูนย์วิจัยข้าวจังหวัดเชียงใหม่) ๔ สายพันธุ์ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (ศูนย์วิจัยข้าวชุมแพ จังหวัดขอนแก่น) ๓๒ สายพันธุ์ รวมทั้งหมด ๓๖ สายพันธุ์ เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -๒๐ องศาเซลเซียส

๒. การศึกษาคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay[๑๔]

เตรียมสารละลายตัวอย่างและสารมาตรฐาน butylate hydroxytoluene (BHT) โดยละลายใน methanol ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ ๑, ๑๐, ๕๐, ๑๐๐ μg/ml แล้วปิเปต (๑๐๐ μl) ใส่ใน ๙๖ well plate เติม ๑๐๐ μl DPPH (๒.๔ mg/๑๐๐ ml ใน methanol) ตั้งทิ้งไว้นาน ๓๐ นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ ๕๑๗ nm แล้ว คำนวณหาค่า % inhibition จากสมการ

$$\% \text{ Inhibition} = [(A_{control} - A_{sample})/A_{control}] \times ๑๐๐$$

คำนวณหาค่าความเข้มข้นที่สามารถต้านออกซิเดชันได้ ๕๐% (IC_{50}) โดยใช้ Graphpad prism program

๓. การศึกษาคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันด้วยวิธี lipid peroxidation of liposome assay[๑๕]

เตรียม liposome จาก bovine brain โดยใช้ ๐.๒ ml ของ liposomes, ๐.๑ ml $FeCl_3$, ๐.๑ ml ascorbic acid (๑ mM), ๐.๕ ml PBS และ ๐.๑ ml ของสารสกัด โดยเตรียมเป็นความเข้มข้นต่างๆ คือ ๐.๐๐๑, ๑, ๐.๐๐๕, ๐.๐๑, ๐.๐๕, ๐.๑, ๐.๕ และ ๕.๐ mg/ml (สำหรับ control ใช้ ethanol แทนสารสกัดและใช้ propylgallate เป็น positive control) ทำ ๔ replicates นำไป incubated ที่ ๓๗ องศาเซลเซียส นาน ๓๐ นาที แล้วทำการทดสอบด้วยวิธี Thiobarbituric acid (TBA) method โดยปิเปต ๒ ml ๒๐% trichloroacetic acid และ ๒ ml ๐.๖๗% 2-thiobarbituric acid และ ๑ ml sample solution ใส่ในหลอดทดลอง นำไปทำให้ร้อนในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ ๘๐ องศาเซลเซียส นาน ๒๐ นาที ทิ้งไว้ให้เย็น แล้ว centrifuge ที่ ๓๐๐๐ rpm นาน ๒๐ นาที แล้วดูดสารละลาย

ใสออก เติม butanol ๒ ml ผสม รอให้แยกชั้นแล้วดูดชั้น butanol มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ ๕๓๒ nm ถ้าเกิดขบวนการ lipid peroxidation จะทำให้ TBA เปลี่ยนสีเป็นสีชมพูของ malonaldehyde แล้วคำนวณหา % inhibition จากสมการ

$$\% \text{ Inhibition} = [(A_{control} - A_{sample})/A_{control}] \times ๑๐๐$$

คำนวณหาค่าความเข้มข้นที่สามารถต้านออกซิเดชันได้ ๕๐% (IC_{50}) โดยใช้ Graphpad prism program

๔. การวิเคราะห์ปริมาณ total phenolics compound[๑๖]

วิเคราะห์ปริมาณ total phenolic compounds ในตัวอย่างด้วย Folin-Ciocalteu's reagent โดยเตรียมสารละลายสารตัวอย่าง ความเข้มข้น ๐.๑ mg/ml ปิเปตสารละลายตัวอย่าง ๒๐ µl ลงใน ๙๖-well plate เติม Folin-Ciocalteu's reagent ๑๐๐ µl แล้วเติม sodium carbonate (๗.๕%) ๘๐ µl ตั้งทิ้งไว้ ๓๐ นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น ๗๖๕ nm ในแต่ละความเข้มข้นทำการทดสอบซ้ำ ๓ ครั้ง แล้วคำนวณหาปริมาณ total phenolic compounds เทียบจากกราฟมาตรฐานของ gallic acid (Gallic acid equivalent, GAE)

๕. การวิเคราะห์ปริมาณ cyanidin ๓-glucoside และ peonidin ๓-glucoside ด้วย High performance liquid chromatography (HPLC)[๑๗]

Pump: ConstaMetric ๔๑๐๐ (Thermo Separation Products-TSP, Riviera Beach, CA, USA)

Data acquisition and processing: PC ๑๐๐๐ (TSP) software

Detector: SpectroMonitor ๔๑๐๐ (TSP) Visible (λ = ๕๑๐ nm)

Column: C๑๘, ๔.๖ × ๒๕๐ mm (๕ µm), Phenomenex (USA)

Mobile phase: (Solvent A) Formic acid ๑๐%, (Solvent B) Acetonitrile

Linear gradient ๕ - ๓๐% A ๓๐ min.

Isocratic ๕% A ๑๐ min.

Flow rate: ๐.๘ ml/min

Injection: ๑๐๐ µl fixed loop (Auto-sampler, AS ๓๕๐๐), Cyanidin ๓-glucoside standard inject ๑๐ µl (n=๓) Sample inject ๑๐ µl (n=๓)

๖. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One way analysis of variance) เมื่อพบความแตกต่างจะทดสอบความแตกต่างเป็นรายคู่ (Mulltiple comparisons) ด้วยวิธี Duncan's new multiple range test ($p < ๐.๐๕$)

ผลการทดลอง

จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay พบว่าตัวอย่างข้าวเหนียวก่ำพันธุ์ที่มีฤทธิ์ดีที่สุด คือ K-Entry ๑๒ เหนียวดำ (IC_{50} = ๒๖.๖๔ ± ๑.๑๔ µg/ml) และตัวอย่างข้าวเหนียวก่ำพันธุ์ที่มีฤทธิ์รองลงมา คือ K-Entry ๑๐ เหนียวดำจาก มข. (IC_{50} = ๓๕.๘๐ ± ๐.๒๕ µg/ml) และ K-entry ๑๔ เหนียวดำ (IC_{50} = ๓๘.๒๕ ± ๑.๒๑ µg/ml) ดังตารางที่ ๑

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี lipid peroxidation assay พบว่าตัวอย่างข้าวเหนียวก่ำพันธุ์ที่มีฤทธิ์ดีที่สุด คือ K-Entry ๑๒ เหนียวดำ (IC_{50} = ๕๐.๒๒ ± ๕.๕๑ µg/ml) และตัวอย่างข้าวเหนียวก่ำพันธุ์ที่มีฤทธิ์รองลงมา คือ K-Entry ๑๗ เหนียวดำตับหมู (IC_{50} = ๗๐.๒๔ ± ๒.๒๐ µg/ml) และ K-entry ๑๐ เหนียวดำจาก มข. (IC_{50} = ๘๕.๒๕ ± ๒.๐๒ µg/ml)

ผลการวิเคราะห์ปริมาณ total phenolics compound พบว่าตัวอย่างข้าวเหนียวก่ำพันธุ์ที่มีปริมาณ total phenolics compound มากที่สุด คือ K-Entry ๑๒ เหนียวดำ [๑.๗๓ ± ๐.๐๔ mg GAE/g (grain)] และตัวอย่างข้าวเหนียวก่ำพันธุ์ C-๔ ก่ำเชียงใหม่ [๑.๗๑ ± ๐.๐๑ mg GAE/g (grain)] ส่วนตัวอย่างข้าวเหนียวก่ำพันธุ์ที่มีปริมาณ total phenolics compound รองลงมา คือ K-Entry ๑๔ เหนียวดำ [๑.๕๔ ± ๐.๐๒ mg GAE/g (grain)]

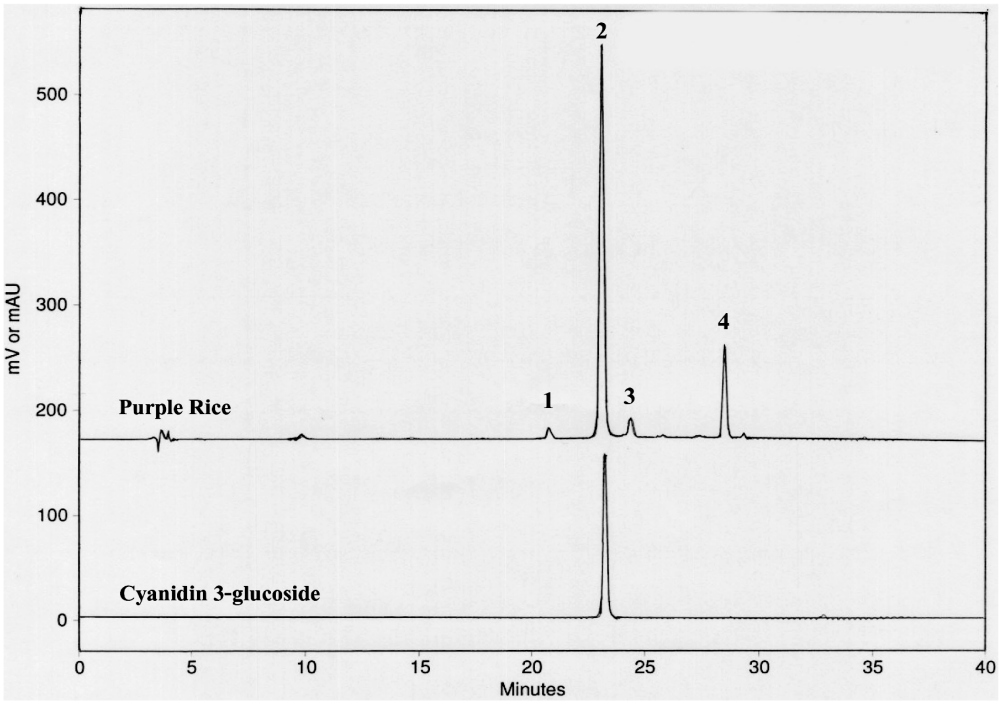
จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่าข้าวเหนียวก่ำประกอบไปด้วยแอนโทไซยานินอยู่ ๔ ชนิด คือ cyanidin dihexoside, cyanidin ๓-glucoside, cyanidin hexoside และ peonidin ๓-glucoside ดังรูปที่ ๑ โดยแอนโทไซยานินหลักในข้าวเหนียวก่ำ คือ cyanidin ๓-glucoside ซึ่งผลการวิเคราะห์ปริมาณ cyanidin ๓-glucoside พบว่าตัวอย่างข้าวเหนียวก่ำพันธุ์ที่มีปริมาณ cyanidin ๓-glucoside มากที่สุด คือ K-Entry ๑๒ เหนียวดำ [๕๓๖.๕๗ ± ๔.๐๕ µg/g (grain)] และตัวอย่างข้าวเหนียวก่ำพันธุ์ที่มีปริมาณ cyanidin ๓-glucoside รองลงมา คือ K-Entry ๑๗ เหนียวดำตับหมู [๔๘๘.๒๒ ± ๓.๔๕ µg/g (grain)] และ K-Entry ๑๔ เหนียวดำ [๔๗๕.๒๙ ± ๑.๗๒ µg/g (grain)]

ตารางที่ ๑ ผลการศึกษาคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันและปริมาณองค์ประกอบทางเคมีในข้าวเหนียวก่ำ

ตัวอย่าง	DPPH assay (IC_{50}, μg/ml)	Lipid peroxidation (IC_{50}, μg/ml)	Total phenolics compound [mg GAE/g (grain)]	Cyanidin 3-glucoside [μg/g (grain)]	Peonidin 3-glucoside [μg/g (grain)]
K-Entry ๑ เหนียวดำ GS.No.๒๑๖๒๕	๕๓.๒๖ ± ๐.๘๕	๑๓๓.๑๒ ± ๑๐.๐๘	๑.๒๗ ± ๐.๑๑	๑๖๒.๑๓ ± ๓.๐๓	๑๒.๑๓ ± ๑.๐๔
K-Entry ๒ ข้าวก่ำ GS.No.๘๘๐๘๔	๔๗.๐๒ ± ๔.๓๒	๕๒.๖๔ ± ๕.๕๖	๑.๔๕ ± ๐.๐๗	๒๗๑.๐๑ ± ๒.๐๗	๓๐.๒๕ ± ๐.๘๐
K-Entry ๓ IR๗๕๒๔๗-๑-๒-B-๑-B-B	๕๘.๗๐ ± ๒.๕๕	๒๒๗.๘๓ ± ๗.๒๗	๑.๐๐ ± ๐.๐๕	๕๖.๐๖ ± ๐.๗๕	๑๐.๐๘ ± ๒.๒๓
K-Entry ๔ KKU-GL-BL-๐๕-๐๐๖	>๑๐๐	>๕๐๐	๐.๔๔ ± ๐.๐๕	๕๒.๒๔ ± ๑.๑๘	๓.๕๖ ± ๐.๕๑
K-Entry ๕ KKU-GL-BL-๐๕-๐๐๕	>๑๐๐	>๕๐๐	๐.๕๖ ± ๐.๐๒	๘๕.๔๕ ± ๐.๐๕	๑๒.๑๕ ± ๓.๓๐
K-Entry ๖ KKU-GL-BL-๐๕-๐๑๑	>๑๐๐	>๕๐๐	๐.๕๐ ± ๐.๐๑	๕๐.๓๕ ± ๑.๐๘	๑๐.๐๖ ± ๐.๐๖
K-Entry ๗เหนียวดำจาก มข.	>๑๐๐	>๕๐๐	๐.๕๔ ± ๐.๐๔	๑๐๐.๐๒ ± ๐.๓๒	๑๓.๒๗ ± ๐.๗๔
K-Entry ๘ เหนียวดำจาก มข.	>๑๐๐	>๕๐๐	๐.๕๑ ± ๐.๑๐	๕๕.๖๕ ± ๐.๕๖	๑๐.๑๕ ± ๑.๕๐
K-Entry ๙ เหนียวดำจาก มข.	๕๕.๒๖ ± ๐.๗๕	๑๓๗.๑๔ ± ๐.๖๓	๑.๒๔ ± ๐.๐๓	๓๓๓.๕๑ ± ๑.๐๐	๒๘.๗๖ ± ๐.๖๖
K-Entry ๑๐ เหนียวดำจาก มข.	๓๕.๘๐ ± ๐.๒๕	๘๕.๒๕ ± ๒.๐๒	๑.๔๓ ± ๐.๑๐	๓๐๖.๓๔ ± ๒.๒๘	๒๕.๖๒ ± ๒.๐๐
K-Entry ๑๑ เหนียวดำจาก มข.	>๑๐๐	>๕๐๐	๐.๕๔ ± ๐.๐๗	๑๐๖.๒๕ ± ๑.๒๓	๕.๕๘ ± ๐.๕๒
K-Entry ๑๒ เหนียวดำ	๒๔.๖๔ ± ๑.๑๔	๕๐.๒๒ ± ๕.๕๑	๑.๗๓ ± ๐.๐๔	๕๓๖.๕๗ ± ๔.๐๕	๓๗.๓๖ ± ๑.๒๔
K-Entry ๑๓ เหนียวดำ	>๑๐๐	>๕๐๐	๐.๖๗ ± ๐.๐๕	๑๖๔.๐๘ ± ๐.๗๐	๑๔.๒๕ ± ๑.๕๗
K-Entry ๑๔ เหนียวดำ	๓๘.๒๕ ± ๑.๒๑	๘๖.๓๔ ± ๓.๘๒	๑.๕๔ ± ๐.๐๒	๔๗๕.๒๕ ± ๑.๗๒	๓๐.๑๘ ± ๑.๑๔
K-Entry ๑๕ เหนียวดำ	๘๔.๕๔ ± ๔.๒๗	>๕๐๐	๐.๗๕ ± ๐.๐๘	๑๐๐.๕๓ ± ๐.๑๘	๑๑.๔๕ ± ๐.๖๑
K-Entry ๑๖ เหนียวดำน้อย	๗๕.๘๐ ± ๖.๓๒	>๕๐๐	๐.๕๘ ± ๐.๑๒	๑๒๓.๑๕ ± ๐.๕๕	๘.๕๘ ± ๐.๒๕
K-Entry ๑๗ เหนียวดำตับหมู	๕๑.๘๔ ± ๑.๕๘	๗๐.๒๔ ± ๒.๒๐	๑.๕๒ ± ๐.๐๓	๔๘๘.๒๒ ± ๓.๔๕	๒๘.๕๘ ± ๐.๐๘
K-Entry ๑๘ เหนียวดำ	>๑๐๐	>๕๐๐	๐.๗๑ ± ๐.๐๗	๗๗.๗๕ ± ๓.๐๖	๖.๐๗ ± ๐.๕๓
K-Entry ๑๙ เหนียวดำ	>๑๐๐	>๕๐๐	๐.๗๕ ± ๐.๐๑	๕๐.๐๕ ± ๐.๐๑	๗.๒๐ ± ๐.๒๒
K-Entry ๒๐ เหนียวดำ	๗๕.๖๔ ± ๒.๔๖	>๕๐๐	๑.๐๐ ± ๐.๐๒	๑๕๔.๓๒ ± ๐.๕๐	๑๓.๓๓ ± ๑.๐๖
K-Entry ๒๑ เหนียวแดง	>๑๐๐	๔๐๔.๒๕ ± ๕.๑๕	๑.๐๖ ± ๐.๐๖	ND	ND
K-Entry ๒๒ เหนียวดำ	๔๗.๕๕ ± ๓.๓๕	๑๔๔.๔๒ ± ๕.๕๑	๑.๓๘ ± ๐.๐๕	๒๕๘.๘๐ ± ๐.๗๓	๑๕.๒๔ ± ๒.๐๕
K-Entry ๒๓ เหนียวดำ	>๑๐๐	>๕๐๐	๐.๗๘ ± ๐.๐๓	๖๖.๖๗ ± ๒.๑๐	๑๒.๒๖ ± ๐.๓๘
K-Entry ๒๔ ข้าวกล่ำ	>๑๐๐	>๕๐๐	๐.๖๑ ± ๐.๑๐	๕๖.๖๓ ± ๑.๔๔	๔.๘๗ ± ๐.๘๖
K-Entry ๒๕ ข้าวกล่ำ	๘๓.๔๖ ± ๑.๐๒	๒๕๗.๗๕ ± ๔.๐๒	๐.๕๘ ± ๐.๑๒	๑๑๕.๕๐ ± ๒.๐๓	๗.๖๕ ± ๑.๗๗
K-Entry ๒๖ เหนียวดำ	๘๖.๕๓ ± ๘.๒๔	>๕๐๐	๑.๐๖ ± ๐.๐๒	๑๒๐.๕๐ ± ๐.๓๖	๒๓.๓๑ ± ๐.๖๐
K-Entry ๒๗ ข้าวกล่ำ	๕๖.๒๘ ± ๒.๐๐	>๕๐๐	๐.๗๐ ± ๐.๐๔	๖๗.๕๘ ± ๐.๕๐	๘.๘๓ ± ๑.๒๐
K-Entry ๒๘ ข้าวกล่ำ	>๑๐๐	>๕๐๐	๐.๕๕ ± ๐.๐๖	๕๑.๐๕ ± ๐.๒๗	๓.๒๖ ± ๑.๓๕
K-Entry ๒๙ ข้าวกล่ำ	>๑๐๐	>๕๐๐	๐.๖๖ ± ๐.๐๐	๘๐.๐๕ ± ๑.๑๑	๕.๖๔ ± ๐.๒๓
K-Entry ๓๐ ข้าวกล่ำ	>๑๐๐	>๕๐๐	๐.๕๕ ± ๐.๐๑	๗๕.๓๖ ± ๑.๖๖	๑๐.๓๕ ± ๐.๗๘
K-Entry ๓๑ ข้าวกล่ำ	๖๕.๑๓ ± ๕.๕๐	๒๔๕.๕๕ ± ๒๐.๒๔	๐.๘๕ ± ๐.๐๓	๗๖.๕๒ ± ๒.๐๒	๑๓.๓๔ ± ๒.๑๔
K-Entry ๓๒ ข้าวกล่ำ	๕๐.๓๖ ± ๓.๒๖	>๕๐๐	๐.๘๓ ± ๐.๐๕	๖๕.๘๕ ± ๐.๕๔	๕.๕๒ ± ๐.๒๐
C-๑ ก่ำเมืองน่าน	๖๒.๘๓ ± ๑๐.๒๔	๑๕๘.๘๓ ± ๕.๘๑	๑.๒๘ ± ๐.๐๗	๒๓๘.๒๔ ± ๑.๗๖	๒๖.๖๖ ± ๐.๕๒
C-๒ แดงเมืองลอง	๔๕.๔๕ ± ๖.๑๖	>๕๐๐	๑.๐๐ ± ๐.๐๘	ND	ND
C-๓ ก่ำนายพร้อม	๔๕.๒๖ ± ๓.๑๒	๑๓๐.๐๑ ± ๕.๐๑	๑.๓๔ ± ๐.๐๑	๓๔๖.๓๒ ± ๒.๐๕	๓๐.๓๐ ± ๐.๓๗
C-๔ ก่ำเชียงใหม่	๗๔.๒๐ ± ๑.๔๗	๕๗.๗๕ ± ๖.๘๕	๑.๗๑ ± ๐.๐๑	๒๗๐.๑๕ ± ๐.๕๕	๒๗๘.๓๘ ± ๒.๐๖

หมายเหตุ Positive control จากการทดสอบ DPPH assay คือ BHT มีค่า IC_{50} = ๑๔.๒ ± ๒.๓๗ μg/ml

ND = not detected



รูปที่ ๑ HPLC chromatogram ของข้าวเหนียวก่ำและ cyanidin 3-glucoside

Peak 1 = cyanidin dihexoside
Peak 2 = cyanidin 3-glucoside
Peak 3 = cyanidin hexoside
Peak 4 = peonidin 3-glucoside

peonidin 3-glucoside เป็นแอนโทไซยานินในข้าวเหนียวก่ำ ที่มีปริมาณมากรองลงมาจาก cyanidin 3-glucoside ยกเว้น ข้าวเหนียวก่ำพันธุ์ C-๔ ก่ำเชียงใหม่ ซึ่งเป็นพันธุ์เดียวที่มีปริมาณ peonidin 3-glucoside มากกว่า cyanidin 3-glucoside

ไม่พบแอนโทไซยานินในข้าวพันธุ์ K-Entry ๒๑ เหนียวแดงและพันธุ์ C-๒ แดงเมืองลอง

สรุปและอภิปรายผล

จากผลการศึกษาคุณสมบัติในการต้านออกซิเดชันและผลการวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ของข้าวเหนียวก่ำพันธุ์ต่างๆ พบว่า คุณสมบัติในการต้านออกซิเดชันและปริมาณ total phenolics compound, cyanidin 3-glucoside และ peonidin 3-glucoside นั้นแตกต่างกัน โดยข้าวเหนียวก่ำพันธุ์ K-Entry ๑๒ เหนียวดำ เป็นพันธุ์ที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay (IC_{50} = ๒๖.๖๔ ± ๑.๑๔ μg/ml) และวิธี lipid peroxidation assay ดีที่สุด (IC_{50} = ๕๐.๒๒ ± ๕.๕๑ μg/ml) นอกจากนี้ตัวอย่างข้าวเหนียวก่ำพันธุ์ K-Entry ๑๒ เหนียวดำ ยังมีปริมาณ total phenolics compound และ cyanidin 3-glucoside มากที่สุด คือ ๑.๗๓ ± ๐.๐๔ mg GAE/g (grain) และ ๕๓๖.๕๗ ± ๔.๐๕ μg/g (grain) ตามลำดับ (ตารางที่ ๒)

ตารางที่ ๒ สรุปพันธุ์ข้าว ๓ อันดับแรกที่มีคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันและปริมาณองค์ประกอบทางเคมีมากที่สุด

Test	อันดับ ๑	๒	๓
DPPH assay (IC_{50}, μg/ml)	K-Entry ๑๒ เหนียวดำ (๒๖.๖๔ ± ๑.๑๔)[a]	K-Entry ๑๒ เหนียวดำจาก มข. (๓๕.๘๐ ± ๐.๒๕)[b]	K-Entry ๑๔ เหนียวดำ (๓๘.๒๕ ± ๑.๒๑)[b]
Lipid peroxidation assay (IC_{50}, μg/ml)	K-Entry ๑๒ เหนียวดำ (๕๐.๒๒ ± ๕.๕๑)[a]	K-Entry ๑๗ เหนียวดำตับหมู (๗๐.๒๔ ± ๒.๒๐)[b]	K-Entry ๑๐ เหนียวดำจาก มข. (๘๕.๒๕ ± ๒.๐๒)[c]
Total phenolics compound [mg GAE/g (grain)]	K-Entry ๑๒ เหนียวดำ (๑.๗๓ ± ๐.๐๔)[a]	C-๔ ก่ำเชียงใหม่ (๑.๗๑ ± ๐.๐๑)[a]	K-Entry ๑๔ เหนียวดำ (๑.๕๔ ± ๐.๐๒)[b]
Cyanidin 3-glucoside [μg/g (grain)]	K-Entry ๑๒ เหนียวดำ (๕๓๖.๕๗ ± ๔.๐๕)[a]	K-Entry ๑๗ เหนียวดำตับหมู (๔๘๘.๒๒ ± ๓.๔๕)[b]	K-Entry ๑๔ เหนียวดำ (๔๗๕.๒๕ ± ๑.๗๒)[c]
Peonidin 3-glucoside [μg/g (grain)]	C-๔ ก่ำเชียงใหม่ (๒๗๘.๓๘ ± ๒.๐๖)[a]	K-Entry ๑๒ เหนียวดำ (๓๗.๓๖ ± ๑.๒๔)[b]	C-๓ ก่ำนายพร้อม (๓๐.๓๐ ± ๐.๓๗)[c]

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันในแนวนอน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < ๐.๐๕$, DMRT)

ข้าวเหนียวก่ำพันธุ์ที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและปริมาณองค์ประกอบทางเคมีรองลงมา คือ ข้าวเหนียวก่ำพันธุ์ K-Entry ๑๗ เหนียวดำตับหมู โดยมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันวิธี lipid peroxidation assay ดี (IC_{50} = ๗๐.๒๔ ± ๒.๒๐ μg/ml) และมีปริมาณ cyanidin 3-glucoside มาก [๔๘๘.๒๒ ± ๓.๔๕ μg/g (grain)] และข้าวเหนียวก่ำพันธุ์ K-Entry ๑๐ เหนียวดำจาก มข. โดยมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันวิธี DPPH assay ดี (IC_{50} = ๓๕.๘๐ ± ๐.๒๕ μg/ml) และมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันวิธี lipid peroxidation assay ค่อนข้างดี (IC_{50} = ๘๕.๒๕ ± ๒.๐๒ μg/ml)

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินด้วยวิธี HPLC พบว่าสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Hiemori และคณะ[๑๘] โดยข้าวเหนียวก่ำประกอบไปด้วยแอนโทไซยานินอยู่ ๔ ชนิด คือ cyanidin dihexoside, cyanidin 3-glucoside, cyanidin hexoside และ peonidin 3-glucoside ซึ่งแอนโทไซยานินหลักในข้าวเหนียวก่ำ คือ cyanidin 3-glucoside (ประมาณ ๙๐% ของแอนโทไซยานินทั้งหมด) และ peonidin 3-glucoside เป็นแอนโทไซยานินในข้าวเหนียวก่ำที่มีปริมาณมากรองลงมา (ประมาณ ๖% ของแอนโทไซยานินทั้งหมด) และพบ cyanidin dihexoside ประมาณ ๓% และ cyanidin hexoside ประมาณ ๑% ยกเว้น ข้าวเหนียวก่ำพันธุ์ C-๔ ก่ำเชียงใหม่ ซึ่งเป็นพันธุ์เดียวที่มี peonidin 3-glucoside ปริมาณมาก (ประมาณ ๕๐% ของแอนโทไซยานินทั้งหมด)

จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay และวิธี lipid peroxidation assay พบว่าฤทธิ์ต้านออกซิเดชันมีความสัมพันธ์โดยแปรผันตรงกับปริมาณ total phenolics compound ในข้าวเหนียวก่ำ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Siddhuraju และ Becker[๑๖] ในขณะที่ข้าวเหนียวก่ำพันธุ์ K-Entry ๑๒ เหนียวดำ และ C-๔ ก่ำเชียงใหม่มีปริมาณ total phenolics compound เท่ากับ ๑.๗๓ ± ๐.๐๔ และ ๑.๗๑ ± ๐.๐๑ mg/g (grain) ตามลำดับ ซึ่งจากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่ข้าวเหนียวก่ำพันธุ์ K-Entry ๑๒ เหนียวดำนั้นมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดีกว่าข้าวเหนียวก่ำพันธุ์ C-๔ ก่ำเชียงใหม่ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะปริมาณของ cyanidin 3-glucoside ที่มีมากในข้าวเหนียวก่ำพันธุ์ K-Entry ๑๒ เหนียวดำ ซึ่งเป็นสารต้านออกซิเดชันที่ดีที่สุดในกลุ่มแอนโทไซยานิน ส่วน peonidin 3-glucoside ซึ่งมีมากในข้าวเหนียวก่ำพันธุ์ C-๔ ก่ำเชียงใหม่ แต่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันน้อยกว่า cyanidin 3-glucoside จึงทำให้ข้าวเหนียวก่ำพันธุ์ C-๔ ก่ำเชียงใหม่ มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันน้อยกว่าข้าวเหนียวก่ำพันธุ์ K-Entry ๑๒ เหนียวดำ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Hu และคณะ[๓]

ไม่พบแอนโทไซยานินในข้าวพันธุ์ K-Entry ๒๑ เหนียวแดงและพันธุ์ C-๒ แดงเมืองลองทำให้ทั้งสองพันธุ์นี้มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันทั้งวิธี DPPH radical scavenging assay และวิธี lipid peroxidation assay ต่ำ

จากข้อมูลดังกล่าว ควรส่งเสริมให้มีการปลูกข้าวเหนียวก่ำพันธุ์ K-Entry ๑๒ เหนียวดำ และสามารถใช้ข้าวเหนียวก่ำพันธุ์ K-Entry ๑๒ เหนียวดำนี้ เป็นวัตถุดิบในการพัฒนาวิจัยให้ได้ผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพที่มีคุณภาพต่อไป

เอกสารอ้างอิง

๑. อัญชลี ชาวนา, ปรเมศ บรรเทิง, ประสิทธิ์ ใจศิล, บุญรัตน์ จงดี. การจำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวเหนียวดำพันธุ์พื้นเมืองโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา. สัมมนาวิชาการเกษตร ประจำปี ๒๕๔๕. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ๒๓-๒๔ มกราคม ๒๕๔๕: หน้า ๒๕-๓๐.

๒. มนตรี ปัญญาทอง, พันทิพา พงษ์เพียจันทร์, เพทาย พงษ์เพียจันทร์, ดำเนิน กาละดี, สำรี มั่นเขตกรณ์. การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดโปรแอนโทไซยานิดินจากข้าวเหนียวดำและสารไซยานิดิน ๓-กลูโคไซน์ที่มีต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดจากหนูหรือไมอิโลมาเซลล์ชนิด X๖๓. สัมมนาวิชาการบัณฑิตศึกษาเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ ๕. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่. ๓-๔ ธันวาคม ๒๕๕๐.

๓. Hu C, Zawistowski J, Ling W, Kitts DD. Black rice (*Oryza sativa* L. indica) pigmented fraction suppresses both reactive oxygen species and nitric oxide in chemical and biological model systems. J Agric Food Chem 2003;51:5271-7.

๔. Hyun JW and Chung HS. Cyanidin and malvidin from *Oryza sativa* CV. Heugjinjubyeo mediate cytotoxicity against human monocytic leukemia cells by arrest of G(2)/M phase and induction of apoptosis. J Agric Food Chem 2004;52:2213-7.

๕. Chen PN, Chu SC, Chiou HL, Ching CL, Yang SF, Hsieh YS. Cyanidin 3-glucoside and peonidin 3-glucoside inhibit tumor cell growth and induce apoptosis in vitro and suppress tumor growth *in vivo*. Nutr Cancer 2005;53:232–43.

๖. Yawadio R, Tanimori S, Morita N. Identification of phenolic compounds isolated from pigmented rices and their aldose reductase inhibitory activities. Food Chem 2007;101:1616-25.

๗. ปณิตา บุญสิทธิ์, ดำเนิน กาละดี, พันทิพา พงษ์เพียจันทร์. ปริมาณแกมม่าโอไรซานอลในข้าวเหนียวก่ำพื้นเมืองของไทย. Agricultural Sci J 2006;37:191-4.

๘. Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Deermer EK. Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated beta-cyclodextrin as the solubility enhancer. J Agric Food Chem 2002;50:1815-21.

๙. Nakamura H. Effect of γ-oryzanol on Hepatic Cholesterol Biosynthesis and Fecal Excretion Metabolites. Radioisotopes 1996;25:371-4.

๑๐. Lichtenstein AH, Ausman LM, Carrasco W, Gualtieri LJ, Ordovas JM, et al. Rice bran oil consumption and plasma lipid levels in moderately hypercholesterolemic humans. Arterioscler Thromb 1994;14:549-56.

๑๑. Qureshi AA, Sami SA, Salser WA, Khan FA. Synergistic effect of tocotrienol-rich fraction (TRF(25)) of rice bran and lovastatin on lipid parameters in hypercholesterolemic humans. J Nutr Biochem 2001;12:318-29.

๑๒. ผดุงขวัญ จิตโรภาส, อรุณศรี ปรีเปรม, บุญมี ศิริ, ชิดชนก คำเลิศ, บังอร ศรีพานิชกุลชัย. ปัจจัยที่มีผลต่อการต้านออกซิเดชันและแกมมาโอไรซานอลในเม็ดรำข้าวหอมดอกมะลิ ๑๐๕ ที่พัฒนาขึ้น. วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น ๒๕๔๗;๙:๕๙–๖๗.

๑๓. นารีรัตน์ แสนเมืองชิน, ปรเมศ บรรเทิง , อัญชลี ชาวนา. การประเมินข้าวเหนียวดำพันธุ์พื้นเมือง. KKU Agri cultural Sciences Seminar 2008.

๑๔. Farrukh A, Iqbal A, Zafar M. Antioxidant and free radical scavenging properties of twelve traditionally used indian medicinal plants. Turk J Biol 2006;30:177-83.

๑๕. Uchiyama M, Mihara M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. Anal Biochem 1978;86:271–8.

๑๖. Kahkonen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja K, Kujala TS, et al. Anti-oxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. J Agric Food Chem 1999;47:3954-62.

๑๗. Cantos E, Espin JC, Thomas-Barbreran FA. Varietal differences among the polyphenol profiles of seven table grape cultivars studied by LC-DAD-MS-MS. J Agric Food Chem 2002;50:5691-96.

๑๘. Hiemori M, Koh E, Mitchell AE. Influence of cooking on anthocyanins in black rice (*Oryza sativa* L. *japonica* var. SBR). J Agric Food Chem 2009;57:1908-14.

๑๙. Siddhuraju P, Becker K. Antioxidant Properties of Various Solvent Extracts of Total Phenolic Constituents from Three Different Agroclimatic Origins of Drumstick Tree (*Moringa oleifera* Lam.) Leaves. J Agric Food Chem 2003;51: 2144-55.

Abstract

Antioxidant activity and chemical constituents in purple glutinous rice Thailand local genotypes

Chalerm Jansom*, Sakul Moolkam**, Vanida Jansom*, Ekasith Skulkhu***, Kornkarn Bhamarapravatana****

* Research office, Faculty of Medicine, Thammasat University

** Chiang Mai rice research center, Sanpatong District, Chiang Mai

*** Chum Phae rice research center, Chum Phae District, Khonkaen

**** Graduate studies, Faculty of Medicine, Thammasat University

Genetic diversity and growing environment cause differentiation of chemical constituents in purple glutinous rice (*Oryza Sativa* L.) The colors of pericarp layers are characterized by anthocyanins profile. The anthocyanins are cyanidin dihexoside, cyanidin 3-glucoside, cyanidin hexoside and peonidin 3-glucoside. They belong to parent class of flavonoids, which have antioxidant activity. In this study was to investigate for antioxidant activity and chemical constituents in purple glutinous rice Thailand local genotypes. The 36 local genotypes of purple glutinous rice were collected from the north and northeast of Thailand.

K-Entry 12 Niewdam gave the highest antioxidant activity both DPPH radical scavenging assay (IC_{50} = 26.64 ± 1.14 μg/ml) and lipid peroxidation assay (IC_{50} = 50.22 ± 5.51 μg/ml). Furthermore, the highest content of total phenolics compound and cyanidin 3-glucoside were 1.73 ± 0.04 mg GAE/g (grain) and 536.57 ± 4.05 μg/g (grain), respectively. K-Entry 17 Niewdamtubmhoo gave high antioxidant activity by lipid peroxidation assay (IC_{50} = 70.24 ± 2.20 μg/ml) and high cyaniding 3-glucoside content [488.22 ± 3.45 μg/g (grain)].

This data demonstrated to cultivated K-Entry 12 Niewdam promotion. This genotype could be useful raw material for nutraceutical product.

Key words: Purple glutinous rice, Antioxidant, Nutraceutical