นิพนธ์ต้นฉบับ

การศึกษาวิธีที่เหมาะสม ในการสกัดสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากข้าวเหนียวดำ

เฉลิม จันทร์สม*, เอกสิทธิ์ สกุลคู**, วนิดา จันทร์สม*,
นุชสิริ เลิศวุฒิโสภณ***, กรณ์กาญจน์ ภมรประวัติ***

บทคัดย่อ

บทนำ: ข้าวเหนียวดำมีปริมาณสารสำคัญและสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดข้าวเหนียวดำให้ได้สารสกัดที่มีปริมาณสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด โดยคำนึงถึงความปลอดภัยของสารสกัดที่ได้ รวมถึงประสิทธิภาพและความคุ้มทุน

วิธีการศึกษา: โดยทำการทดลองศึกษาหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด จากการใช้ตัวทำละลายในการสกัด ๑๒ ชนิด และวิเคราะห์ปริมาณ total phenolic compound, cyanidin 3-glucoside, total monomeric anthocyanin และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay เปรียบเทียบกัน และศึกษาอัตราส่วนระหว่างวัตถุดิบต่อตัวทำละลายแล้วจึงศึกษาหาระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดตามลำดับ

ผลการศึกษา: พบว่าการใช้ ๑%กรดไฮโดรคลอริก (1%HCl) ใน ๙๕%เอทานอล และ 10%HCl ใน ๙๕%เอทานอล จะได้สารสกัดที่มีปริมาณสารสำคัญและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด จึงเลือกใช้ 1%HCl ใน ๙๕% เอทานอล ศึกษาผลของอัตราส่วนระหว่างวัตถุดิบต่อตัวทำละลายในการสกัดข้าวเหนียวดำ โดยปรับอัตราส่วนระหว่างวัตถุดิบต่อตัวทำละลายในการสกัดต่างๆ พบว่าการใช้อัตราส่วนระหว่างข้าวเหนียวดำ ๑ ส่วนต่อตัวทำละลายตั้งแต่ ๕ ส่วนขึ้นไป จะได้ปริมาณสารสำคัญออกมามากที่สุด ดังนั้นจึงเลือกใช้อัตราส่วน ๑:๕ มาทำการทดลองต่อโดยแปรเวลาในการสกัด เพื่อศึกษาผลของเวลาต่อปริมาณสารสำคัญที่ได้ พบว่าเวลาที่เหมาะสมโดยใช้ 1%HCl ใน ๙๕%เอทานอล อัตราส่วน ๑:๕ ในการสกัดข้าวเหนียวดำคือ ตั้งแต่ ๒๔ ชั่วโมงขึ้นไป

วิจารณ์ และสรุปผลการศึกษา: สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดข้าวเหนียวดำ คือ ใช้ 1%HCl ใน ๙๕%เอทานอล อัตราส่วน ๑:๕ เวลานาน ๒๔ ชั่วโมง ซึ่งผลการศึกษานี้อาจนำมาใช้เป็นแนวทางในการกำหนดสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดข้าวเหนียวดำพื้นเมืองของไทยพันธุ์อื่นๆ เพื่อใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

คำสำคัญ: ข้าวเหนียวดำ, สารประกอบฟีนอลิก, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

วันที่รับบทความ: ๑๘ สิงหาคม ๒๕๕๙ **วันที่อนุญาตให้ตีพิมพ์: ๑๗ ตุลาคม ๒๕๕๙**

* งานบริหารการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
** ศูนย์วิจัยข้าวอุดรธานี อำเภอกุดจับ จังหวัดอุดรธานี
*** สถานวิทยาศาสตร์พรีคลินิก คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

บทนำ

สายพันธุ์ข้าวไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรม เยื่อหุ้มเมล็ด (ผิวข้าวกล้อง) ของข้าวก็มีหลากหลายสี เช่น สีเหลืองนวล สีแดงถึงแดงเข้ม และสีม่วงถึงม่วงเข้มจนเกือบดำ และยังพบว่าข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีเข้มมีปริมาณสารสำคัญและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าข้าวขาว[๑-๕] สารสกัดจากรำข้าวยังมี gamma-oryzanol และสารในกลุ่ม tocopherols สารสีที่พบในข้าวสีม่วง-ดำ ประกอบไปด้วยแอนโทไซยานิน มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระและยังมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ[๕-๗] สารสกัดจากข้าวสีม่วง-ดำสามารถยับยั้งเอนไซม์ aldose reductase[๘] ลดระดับน้ำตาลในเลือด[๙] มีฤทธิ์ป้องกันโรคหัวใจและหลอดเลือด โดยเพิ่มภาวะ antioxidant ในพลาสมาและยับยั้งปัจจัยที่ทำให้เกิดการอักเสบ[๒] มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลูคีเมีย ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปอด[๑๐] ชะลอการเจริญของเนื้องอก[๑๑] ข้าวเหนียวดำหรือข้าวเหนียวก่ำ (*Oryza sativa* L.) เป็นข้าวเหนียวพันธุ์พื้นเมืองชนิดหนึ่ง สารสีที่พบ คือ แอนโทไซยานิน ประกอบด้วยแอนโทไซยานินเดี่ยว ๔ ชนิด[๑๒] คือ cyanidin dihexoside, cyanidin 3-glucoside, cyanidin hexoside และ peonidin 3-glucoside ซึ่งแอนโทไซยานินหลักในข้าวเหนียวดำ คือ cyanidin 3-glucoside (ประมาณร้อยละ ๙๐ ของแอนโทไซยานินทั้งหมด) และ peonidin 3-glucoside เป็นแอนโทไซยานินในข้าวเหนียวดำที่มีปริมาณมากรองลงมา (ประมาณร้อยละ ๖ ของแอนโทไซยานินทั้งหมด) และพบ cyanidin dihexoside ประมาณร้อยละ ๓ และ cyanidin hexoside ประมาณร้อยละ ๑ จากการศึกษาการสกัดแอนโทไซยานิน พบว่าปริมาณของแอนโทไซยานินที่สกัดได้จะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับชนิดของตัวทำละลาย[๑๓-๑๕] อัตราส่วนระหว่างวัตถุดิบต่อตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด[๑๖, ๑๗] ชนิดและปริมาณของกรดที่ใช้[๑๘, ๑๙] และเวลาในการสกัด[๑๓, ๒๐, ๒๑] เป็นต้น

เฉลิม และคณะ[๒๒] ได้ศึกษาหาพันธุ์ข้าวเหนียวดำพื้นเมืองของไทยที่มีปริมาณสารสำคัญและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด โดยเก็บรวบรวมตัวอย่างข้าวเหนียวดำพื้นเมืองจำนวน ๓๖ สายพันธุ์ ทั้งจากภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบว่าข้าวเหนียวดำพันธุ์ K-Entry 12 เหนียวดำ จากขอนแก่น เป็นพันธุ์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้งวิธี DPPH radical scavenging assay และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระวิธี lipid peroxidation assay ดีที่สุด นอกจากนี้ตัวอย่างข้าวเหนียวดำพันธุ์ K-Entry 12 เหนียวดำ ยังมีปริมาณ total phenolic compound และ cyanidin 3-glucoside มากที่สุดด้วย อย่างไรก็ตามยังไม่พบรายงานการศึกษาสภาวะในการสกัดที่เหมาะสม ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดข้าวเหนียวดำพันธุ์ K-Entry 12 เหนียวดำนี้ เพื่อให้ได้สารสกัดที่มีปริมาณสารสำคัญมากที่สุด โดยคำนึงถึงความปลอดภัยของสารสกัด ประสิทธิภาพและความคุ้มทุน เป็นการพัฒนาต่อยอดงานวิจัยเพื่อให้สามารถนำไปใช้ได้จริง โดยช่วยทำให้สามารถกำหนดสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต และการนำไปใช้เป็นแนวทางในระดับอุตสาหกรรมเพื่อใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพต่อไปได้

วิธีการศึกษา

ตัวอย่างข้าวเหนียวดำ

ตัวอย่างข้าวเหนียวดำพันธุ์ K-Entry 12 เหนียวดำ จากศูนย์วิจัยข้าวชุมแพ อำเภอชุมแพ จังหวัดขอนแก่น โดยมีนักวิชาการเกษตรเป็นผู้จำแนกพันธุ์ ลักษณะของต้นข้าวมีความสูงเฉลี่ย ๑๔๑ เซนติเมตร ใบมีสีเขียวและขอบใบมีสีม่วง มีจำนวนรวงข้าวเฉลี่ย ๘ รวงต่อกอ ให้ผลผลิตเฉลี่ย ๓๔๙ กิโลกรัมต่อไร่ เปลือกข้าวมีสีดำและเมล็ดข้าวกล้องมีสีม่วงดำ ความยาวของเมล็ดข้าวกล้องเฉลี่ยประมาณ ๐.๗ มิลลิเมตร (ดังรูปที่ ๑)

รูปที่ ๑ ตัวอย่างข้าวเหนียวดำพันธุ์ K-Entry 12 เหนียวดำจากศูนย์วิจัยข้าวชุมแพ

๑. การทดลองหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด

การสกัดตัวอย่างข้าวเหนียวดำ โดยใช้ตัวทำละลายต่างๆ จำนวน ๑๒ ชนิด คือ ๑) น้ำ ๒) ๕๐%แอลกอฮอล์ ๓) ๙๕%แอลกอฮอล์ ๔) 0.1%HCl ในน้ำ ๕) 1%HCl ในน้ำ ๖) 10% HCl ในน้ำ ๗) 0.1%HCl ใน ๕๐%แอลกอฮอล์ ๘) 1%HCl ใน ๕๐%แอลกอฮอล์ ๙) 10%HCl ใน ๕๐%แอลกอฮอล์ ๑๐) 0.1%HCl ใน ๙๕%แอลกอฮอล์ ๑๑) 1%HCl ใน ๙๕% แอลกอฮอล์ และ ๑๒) 10%HCl ใน ๙๕%แอลกอฮอล์ จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาระเหยตัวทำละลายออกไปโดยเทคนิค evaporator (vacuum dry) และทำให้ได้สารสกัดหยาบด้วยวิธี freeze dry

๒. การทดลองหาอัตราส่วนระหว่างวัตถุดิบต่อตัวทำละลายในการสกัด

ทำการสกัดข้าวเหนียวดำ โดยใช้ตัวทำละลายที่ดีที่สุดจากการวิเคราะห์ผลในข้อ ๑ แล้วปรับอัตราส่วนระหว่างวัตถุดิบต่อตัวทำละลายในการสกัดต่างๆ คือ ๑:๒, ๑:๕, ๑:๑๐, ๑:๒๕, ๑:๕๐ และ ๑:๑๐๐ ตามลำดับ ในแต่ละอัตราส่วนทำการสกัดจำนวน ๓ ครั้ง สกัดเป็นเวลา ๑ ชั่วโมง

๓. การหาระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด

ทำการสกัดข้าวเหนียวดำ ซึ่งเลือกตัวทำละลายและอัตราส่วนที่ดีที่สุดจากผลการทดลองที่ได้ข้างต้น มาทำการทดลองโดยแปรเวลาในการสกัด ๕ ระดับ คือ ๑๐ นาที, ๑ ชั่วโมง, ๕ ชั่วโมง, ๒๔ ชั่วโมง และ ๗๒ ชั่วโมงตามลำดับ

๔. การวิเคราะห์ปริมาณ total monomeric anthocyanin ด้วยวิธี pH-different method[๒๓]

เตรียมสารละลายตัวอย่าง ใน 0.025 M. potassium chloride buffer, pH 1.0 นำไป scan หา $\lambda_{vis\text{-}max}$ ด้วยเครื่อง spectrophotometer (absorbance < 1.2) หากสารละลายตัวอย่างมีความเข้มข้นมาก ให้เจือจางด้วย 0.025 M. potassium chloride buffer, pH 1.0 และเตรียมสารละลายตัวอย่างใน 0.4 M. sodium acetate buffer, pH 4.5 โดยเตรียมให้มีความเข้มข้นของสารตัวอย่างเท่ากัน ตั้งทิ้งไว้ ๑๕ นาที นำสารละลายตัวอย่างทั้งสองไปวัดค่า absorbance ที่ $\lambda_{vis\text{-}max}$ และที่ ๗๐๐ นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank คำนวณหาปริมาณ monomeric anthocyanin จากสูตร

Monomeric anthocyanin (mg/liter) = (A x MW x DF x 1000) / (ε x 1)

เมื่อ A = absorbance of diluted sample คำนวณจากสูตร

$$A = (A\lambda_{vis\text{-}max} - A_{700})_{pH\ 1.0} - (A\lambda_{vis\text{-}max} - A_{700})_{pH\ 4.5}$$

MW = molecular weight

DF = dilution factor (๐.๒ มิลลิเมตร เจือจางเป็น ๓ มิลลิลิตร ค่า DF = 15)

ε = molar absorptivity

(ในกรณีของข้าวเหนียวดำนั้นใช้ค่าของ cyanidin 3-glucoside คือ MW = 449.2 และ ε = 26,900)

๕. การวิเคราะห์ปริมาณ total phenolic compound[๒๔]

วิเคราะห์ปริมาณ total phenolic compound ในตัวอย่างด้วย Folin-Ciocalteu's reagent โดยเตรียมสารละลายสารตัวอย่างความเข้มข้น ๑๐๐ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปตสารละลายตัวอย่าง ๒๐ ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate เติม Folin-Ciocalteu's reagent ๑๐๐ ไมโครลิตร แล้วเติม sodium carbonate (๔๐ กรัมต่อลิตร) ๘๐ ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ ๓๐ นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น ๗๖๕ นาโนเมตร แล้วคำนวณหาปริมาณ total phenolic compounds เทียบจากกราฟมาตรฐานของ gallic acid (gallic acid equivalent, GAE)

๖. การวิเคราะห์ปริมาณ cyanidin 3-glucoside ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (HPLC)[๒๕] โดยมีสภาวะต่างๆ ดังนี้

การวิเคราะห์ใช้เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูงของบริษัท Thermo Separation Products (TSP) รุ่น ConstaMetric 4100 สภาวะการแยกใช้คอลัมน์ชนิด C18 (4.6 x 250 mm. (5 µm.) with guard column) ของบริษัท Phenomenex วัฏภาคเคลื่อนที่ คือ ๑๐% กรดฟอร์มิก (A) และอะซิโตไนไตรล์ (B) โดยปรับอัตราส่วนการไหลของสารละลาย A จากร้อยละ ๕ ไปที่ร้อยละ ๓๐ โดยปริมาตร ในเวลา ๓๐ นาที ที่อัตราการไหล ๐.๘ มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรของสารที่ฉีดเท่ากับ ๑๐ ไมโครลิตร และตรวจวัดสัญญาณค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น ๕๑๐ นาโนเมตร

๗. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระวิธี DPPH assay[๒๖]

เตรียมสารละลายตัวอย่างและสารมาตรฐานโดยละลายใน methanol ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ ๑, ๑๐, ๕๐, ๑๐๐ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้ว ปิเปต สารตัวอย่างนี้ (๑๐๐ ไมโครลิตร) ใส่ใน well plate เติม ๑๐๐ ไมโครลิตร DPPH (๒.๔ มิลลิกรัมต่อ ๑๐๐ มิลลิลิตร ใน methanol) ตั้งทิ้งไว้ที่ ๓๗ องศาเซลเซียส นาน ๓๐ นาที นำไปวัดค่า absorbance ที่ ๕๑๗ นาโนเมตร คำนวณหาค่า % Radical scavenging = $(1-A_{sample}/A_{blank})/100$ แล้วคำนวณหาค่า IC_{50} ด้วยโปรแกรม Excel

๘. การวิเคราะห์ทางสถิติ

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One way analysis of variance) เมื่อพบความแตกต่างจะทดสอบความแตกต่างเป็นรายคู่ (Multiple comparisons) ด้วยวิธี Duncan's new multiple range test ($p < 0.05$, DMRT)

ผลการศึกษา

จากผลการทดลองหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดข้าวเหนียวดำพันธุ์ K-Entry 12 เหนียวดำ โดยทดลองใช้ตัวทำละลายในการสกัด ๑๒ ชนิด ซึ่งจากการวิเคราะห์ปริมาณ total phenolic compound, cyanidin 3-glucoside, total monomeric anthocyanin และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay พบว่าเมื่อใช้ 1%HCl ใน ๙๕%เอทานอล และ 10%HCl ใน ๙๕%เอทานอล เป็นตัวทำละลายที่ดีที่สุดในการสกัด โดยพบปริมาณ total monomeric anthocyanin ๕๐๖.๐๙ ± ๔.๔๕ และ ๕๑๑.๑๑ ± ๕.๗๘ ไมโครกรัมต่อกรัม (เมล็ดข้าว) ตามลำดับ, total phenolic compound ๑.๕๒ ± ๐.๐๓ และ ๑.๕๒ ± ๐.๐๑ มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิค/กรัม (เมล็ดข้าว) ตามลำดับ, cyanidin 3-glucoside ๔๔๘.๖๑ ± ๒.๐๖ และ ๔๔๒.๓๒ ± ๕.๑๕ ไมโครกรัมต่อกรัม (เมล็ดข้าว) ตามลำดับ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay ค่า IC_{50} เท่ากับ ๓๔.๒๖ ± ๒.๓๗ และ ๓๕.๔๕ ± ๐.๘๓ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าปริมาณ total phenolic compound, cyanidin 3-glucoside, total monomeric anthocyanin และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay พบว่าสารสกัดทั้ง ๒ ชนิด ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ดังตารางที่ ๑

ตารางที่ ๑ ผลการทดลองหาชนิดของตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดข้าวเหนียวดำ

การสกัด	Total monomeric anthocyanin [µg/g (grain)]	Total phenolic compound [mg GAE/g (grain)]	Cyanidin 3-glucoside [µg/g (grain)]	DPPH assay (IC_{50}, µg/ml)
น้ำ	๓๑๐.๕๘ ± ๑.๐๕^{g}	๐.๕๖ ± ๐.๐๔^{e}	๒๒๗.๘๗ ± ๑.๑๓^{i}	> ๑๐๐
๕๐%แอลกอฮอล์	๔๒๖.๔๒ ± ๘.๒๓^{d}	๑.๔๒ ± ๐.๑๑^{bc}	๓๘๐.๔๗ ± ๑.๐๔^{e}	๔๖.๔๓ ± ๑.๔๖^{c}
๙๕%แอลกอฮอล์	๔๕๒.๒๐ ± ๑.๐๗^{c}	๑.๔๖ ± ๐.๐๑^{b}	๓๙๙.๑๕ ± ๒.๖๐^{d}	๔๒.๓๐ ± ๒.๑๘^{b}
0.1%HCl ในน้ำ	๓๒๘.๒๘ ± ๕.๑๐^{f}	๐.๕๒ ± ๐.๐๓^{e}	๒๕๖.๗๖ ± ๓.๘๑^{h}	> ๑๐๐
1%HCl ในน้ำ	๓๓๑.๙๖ ± ๑.๐๘^{f}	๐.๗๗ ± ๐.๐๐^{d}	๒๙๐.๓๒ ± ๐.๐๒^{f}	๘๘.๗๐ ± ๗.๕๔^{d}
10%HCl ในน้ำ	๓๕๓.๒๔ ± ๐.๔๖^{e}	๐.๘๐ ± ๐.๐๓^{d}	๒๗๕.๐๓ ± ๕.๕๒^{g}	๙๐.๘๐ ± ๔.๖๐^{d}
0.1%HCl ใน ๕๐%แอลกอฮอล์	๔๕๕.๑๙ ± ๔.๒๒^{c}	๑.๔๔ ± ๐.๐๒^{b}	๔๑๒.๓๒ ± ๖.๐^{c}	๔๓.๖๗ ± ๓.๔๑^{bc}
1%HCl ใน ๕๐%แอลกอฮอล์	๔๘๗.๐๘ ± ๖.๙๕^{b}	๑.๔๑ ± ๐.๐๒^{c}	๔๒๐.๙๐ ± ๗.๑๗^{c}	๔๐.๙๔ ± ๔.๖๖^{b}
10%HCl ใน ๕๐%แอลกอฮอล์	๔๙๔.๑๓ ± ๓.๐๕^{b}	๑.๔๒ ± ๐.๐๔^{bc}	๔๑๘.๕๘ ± ๖.๓๓^{c}	๓๘.๒๙ ± ๒.๕๓^{b}
0.1%HCl ใน ๙๕%แอลกอฮอล์	๔๙๐.๐๗ ± ๒.๓๒^{b}	๑.๕๐ ± ๐.๐๑^{a}	๔๓๐.๔ ± ๐.๕๕^{b}	๔๐.๕๑ ± ๑.๓๘^{b}
1%HCl ใน ๙๕%แอลกอฮอล์	๕๐๖.๐๔ ± ๔.๔๕^{a}	๑.๕๒ ± ๐.๐๓^{a}	๔๔๘.๖๑ ± ๒.๐๖^{a}	๓๔.๒๖ ± ๒.๓๗^{a}
10%HCl ใน ๙๕%แอลกอฮอล์	๕๑๑.๑๑ ± ๕.๗๘^{a}	๑.๕๒ ± ๐.๐๑^{a}	๔๔๒.๓๒ ± ๕.๑๕^{a}	๓๕.๔๕ ± ๐.๘๓^{a}

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$, DMRT)

จากผลการทดลองหาอัตราส่วนระหว่างวัตถุดิบต่อตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด โดยทดลองใช้ตัวทำละลาย 1%HCl ใน ๙๕%เอทานอล อัตราส่วนต่างๆ ในการสกัด ดังตารางที่ ๒ พบว่าการใช้อัตราส่วน ๑:๕ และ ๑:๑๐๐ จะได้ปริมาณ total monomeric anthocyanin, total phenolic compound, cyanidin 3-glucoside และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ดีที่สุด จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าปริมาณสารสำคัญและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดทั้ง ๒ ชนิด ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ ๒ แสดงผลของการใช้อัตราส่วนระหว่างวัตถุดิบต่อตัวทำละลายในการสกัด

อัตราส่วนของวัตถุดิบต่อตัวทำละลาย	Total monomeric anthocyanin [µg/g (grain)]	Total phenolic compound [mg GAE/g (grain)]	DPPH assay (IC_{50}, µg/ml)	Cyanidin 3-glucoside [µg/g (grain)]
๑ : ๒	๕๓๕.๑๓ ± ๓.๒๘^{b}	๑.๕๒ ± ๐.๐๐^{b}	๓๖.๔๐ ± ๒.๐๙^{c}	๔๒๖.๑๕ ± ๕.๐๘^{c}
๑ : ๕	๕๔๐.๔๐ ± ๑.๗๕^{a}	๑.๕๘ ± ๐.๐๑^{a}	๓๐.๑๕ ± ๐.๐๕^{a}	๔๔๒.๐๗ ± ๒.๒๒^{a}
๑ : ๑๐	๕๔๔.๑๓ ± ๓.๐๕^{a}	๑.๕๖ ± ๐.๐๓^{a}	๒๙.๑๒ ± ๑.๐๒^{a}	๔๓๖.๑๕ ± ๑.๓๙^{b}
๑ : ๒๕	๕๔๓.๒๕ ± ๕.๐๐^{a}	๑.๕๖ ± ๐.๐๑^{a}	๓๒.๓๗ ± ๒.๒๔^{bc}	๔๓๕.๘๐ ± ๕.๖๑^{bc}
๑ : ๕๐	๕๓๖.๗๗ ± ๐.๘๕^{b}	๑.๕๘ ± ๐.๐๑^{a}	๒๘.๕๖ ± ๐.๗๘^{a}	๔๓๔.๓๖ ± ๔.๔๒^{bc}
๑ : ๑๐๐	๕๔๑.๐๑ ± ๒.๔๓^{a}	๑.๕๗ ± ๐.๐๑^{a}	๓๐.๓๐ ± ๐.๔๓^{a}	๔๓๗.๙๘ ± ๐.๘๘^{abc}

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$, DMRT)

ผลการทดลองหาเวลาที่เหมาะสมในการสกัดข้าวเหนียวดำพันธุ์ K-Entry 12 เหนียวดำ โดยทดลองใช้ตัวทำละลาย 1%HCl ใน ๙๕%เอทานอล อัตราส่วน ๑:๕ โดยแปรเวลาในการสกัด ดังตารางที่ ๓ พบว่าเมื่อเวลาในการสกัดเพิ่มขึ้นปริมาณแอนโทไซยานินที่สกัดได้จะเพิ่มขึ้น แต่เมื่อใช้เวลาที่ ๒๔ ชั่วโมง และ ๗๒ ชั่วโมง จะได้ปริมาณ total monomeric anthocyanin, total phenolic compound, cyanidin 3-glucoside และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ไม่ต่างกัน จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าปริมาณสารสำคัญและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดทั้ง ๒ ชนิด ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ ๓ แสดงผลของเวลาต่อปริมาณสารสำคัญที่สกัดได้

เวลาที่ใช้สกัด	Total monomeric anthocyanin [μg/g (grain)]	Total phenolic compound [mg GAE/g (grain)]	DPPH assay (IC_{50}, μg/ml)	Cyanidin 3-glucoside [μg/g (grain)]
๑๐ นาที	๓๒๙.๙๔ ± ๑๐.๓๖^{d}	๑.๑๐ ± ๐.๐๔^{d}	๔๑.๐๙ ± ๔.๑๘^{d}	๒๗๒.๓๐ ± ๑๐.๘๗^{e}
๑ ชั่วโมง	๔๑๓.๕๔ ± ๗.๐๔^{c}	๑.๑๘ ± ๐.๐๑^{c}	๓๕.๖๐ ± ๒.๕๔^{c}	๓๖๗.๒๔ ± ๓.๑๐^{d}
๕ ชั่วโมง	๔๔๔.๘๓ ± ๐.๐๘^{b}	๑.๓๓ ± ๐.๐๒^{b}	๓๑.๕๕ ± ๐.๘๒^{b}	๔๐๐.๙๔ ± ๗.๗๖^{c}
๒๔ ชั่วโมง	๕๕๗.๖๖ ± ๓.๒๑^{a}	๑.๕๕ ± ๐.๐๐^{a}	๒๖.๑๑ ± ๒.๓๕^{a}	๔๔๘.๐๕ ± ๑.๕๓^{a}
๗๒ ชั่วโมง	๕๔๓.๓๙ ± ๑.๒๖^{b}	๑.๕๕ ± ๐.๐๒^{a}	๒๗.๐๔ ± ๒.๒๘^{a}	๔๓๘.๗๕ ± ๐.๕๒^{b}

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$, DMRT)

วิจารณ์ และสรุปผลการศึกษา

จากผลการทดลองพบว่าการใช้เอทานอลจะมีประสิทธิภาพการสกัดแอนโทไซยานินสูงกว่าการใช้น้ำ และเมื่อใช้ร่วมกับสารละลายกรด HCl ในเอทานอลแล้วจะทำให้ประสิทธิภาพการสกัดสูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Perez-Jimenez และ Saura-Calixto[๑๓]; Chiriboga และ Francis[๑๔] แต่จากการศึกษาของสุภาพรรณ และอรไท[๑๕] ได้เปรียบเทียบกันระหว่างแอลกอฮอล์ ๓ ชนิด พบว่า 1%HCl ใน เมทานอล จะมีประสิทธิภาพในการสกัดดีที่สุด รองลงมาได้แก่ 1%HCl ใน เอทานอล และ 1%HCl ใน บิวทานอล ตามลำดับ แต่ถ้าต้องการนำใช้ไปในอาหาร เอทานอลจะได้รับความนิยมมากกว่า เมทานอล เนื่องจากจะมีปริมาณสารที่ตกค้างในผลิตภัณฑ์สุดท้ายน้อยกว่า อีกทั้ง เมทานอล มีความเป็นพิษสูงกว่าแม้จะตกค้างอยู่ในปริมาณเพียงเล็กน้อยก็ตาม ดังนั้นจึงเลือกใช้ 1%HCl ใน ๙๕%เอทานอล (ซึ่งมีความปลอดภัยและราคาถูกกว่า) มาเป็นตัวทำละลายในการศึกษา

จากผลการทดลองหาอัตราส่วนระหว่างวัตถุดิบต่อตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด โดยทดลองใช้ตัวทำละลาย 1%HCl ใน ๙๕%เอทานอลอัตราส่วนต่างๆ ในการสกัด พบว่าการใช้อัตราส่วน ๑:๕ และ ๑:๑๐๐ จะได้ปริมาณสารสำคัญและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ดีที่สุด จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าสารสกัดทั้ง ๒ ชนิด ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ การพิจารณาเลือกอัตราส่วนที่เหมาะสม คือ ปริมาณสารสำคัญและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่สกัดได้ จำนวนครั้งในการสกัดและปริมาตรรวมของตัวทำละลายที่ใช้ ดังนั้นจึงเลือกใช้ 1%HCl ใน ๙๕%เอทานอลอัตราส่วน ๑:๕ (มีปริมาตรรวมน้อยกว่าการใช้อัตราส่วน ๑:๑๐๐) ซึ่งใช้พลังงานในการระเหยเอาตัวทำละลายออกน้อยกว่า

ผลการทดลองหาเวลาที่เหมาะสมในการสกัดข้าวเหนียวดำพันธุ์ K-Entry 12 เหนียวดำ โดยทดลองใช้ตัวทำละลาย 1%HCl ใน ๙๕%เอทานอล อัตราส่วน ๑:๕

โดยแปรเวลาในการสกัด พบว่าเมื่อใช้เวลาในการสกัดเพิ่มขึ้น ปริมาณแอนโทไซยานินที่สกัดได้จะเพิ่มขึ้น สอดคล้องกับรายงานของ Chiriboga และ Francis[๑๕] แต่เมื่อใช้เวลาที่ ๒๔ ชั่วโมง และ ๗๒ ชั่วโมง พบว่าปริมาณสารสำคัญและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดทั้ง ๒ ชนิด ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นจึงเลือกใช้ 1%HCl ใน ๙๕%เอทานอลอัตราส่วน ๑:๕ และสกัดเป็นเวลา ๒๔ ชั่วโมง ซึ่งจะใช้เวลารวมทั้งหมดในการสกัดน้อยกว่า

อย่างไรก็ตามหากคำนึงถึงความปลอดภัยของสารสกัด การใช้กรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้นสูงๆ ในการสกัดจะทำให้มีปริมาณกรดที่หลงเหลืออยู่มากในสารสกัดที่ได้หลังจากที่ระเหยเอาสารละลายออกไปแล้ว ซึ่งการระเหยเอากรดออกทำได้ค่อนข้างยาก หากนำสารสกัดนี้ไปผสมกับผลิตภัณฑ์ต่างๆ โดยตรงอาจทำให้เกิดพิษจากกรดได้ ดังนั้นจึงควรทำให้เป็นกลาง (neutralize) หรือปรับลดความเข้มข้นของกรดลงมาโดยใช้สารละลายด่างที่เหมาะสมก่อนที่จะนำไปใช้ และหากนำวิธีการนี้ไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมจริง เมื่อมีกรดมากก็ต้องใช้สารละลายด่างจำนวนมากเช่นกัน และผลที่ได้ก็คือจะเกิดเกลือของกรดและด่างนั้นจำนวนมากไปด้วย ดังนั้นการใช้ 0.1%HCl ใน ๙๕%เอทานอล สกัดข้าวเหนียวดำแทน 1%HCl ใน ๙๕%เอทานอล เพื่อลดปริมาณกรดไฮโดรคลอริกลงก็เป็นทางเลือกหนึ่งซึ่งจากรายงานการวิจัยของ Liu และคณะ[๒๗], Rattanachaisit และ Kongkiattikajorn[๒๘], นวลพรรณและคณะ[๒๙], Oancea และคณะ[๓๐] และ Vanini และคณะ[๓๑] ที่มีการใช้ 0.1%HCl ในแอลกอฮอล์สกัดแอนโทไซยานินและสารสำคัญต่างๆ เช่นกัน ทั้งนี้จากผลการทดลองในตารางที่ ๑ จะเห็นว่า สารสกัดที่ได้จากการใช้ 0.1%HCl ใน ๙๕%เอทานอลนั้นได้ปริมาณสารสำคัญต่างๆ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าการใช้ 1%HCl ใน ๙๕%เอทานอลเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

เอกสารอ้างอิง

๑. Kukamoo A, Noenplab A, Immark S, Chankasem L. Evaluation of nutritional values in colored rice. Agricultural Sci J 2009;40(Suppl):345-8.

๒. Wang Q, Han P, Zhang M, Xia M, Zhu H, Ma J, et al. Supplementation of black rice pigment fraction improves antioxidant and anti-inflammatory status in patients with coronary heart disease. Asia Pac J Clin Nutr 2007;16(Suppl 1):295-301.

๓. Suttajit M, Immark S, Teerajan S, Suttajit S, Chiyasut C. Antioxidative activity and polyphenol content in different varieties of Thai rice grains. Asia Pac J Clin Nutr 2006;15(Suppl):S78-85.

๔. Laokuldilok T, Shoemaker CF, Jongkaewwattana S, Tulyathan V. Antioxidants and antioxidant activity of several pigmented rice brans. J Agric Food Chem 2011; 59:193-9.

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

๖. Pereira CG, Watanabe S, Crozier A, Fujimura T, Yokota T, Ashihara H. Phytochemical profile of a Japanese black–purple rice. Food Chem 2013;141:2821-7.

๗. Min B, McClung AM, Chen MH. Phytochemicals and Antioxidant capacities in rice brans of different color. J Food Sci 2011;76:C117-26.

๘. Robert Y, Shinji T, Naofumi M. Identification of phenolic compounds isolated from pigmented rice and their aldose reductase inhibitory activities. Food Chem 2007;101:1616-25.

๙. Leonora NP, Lilian UT. Blood glucose lowering effects of brown rice in normal and diabetic subjects. Int J Food Sci Nutr 2006;57:151-8.

๑๐. Pei NC, Shu CC, Hui LC, Chui LC, Shun FY, Yih SH. Cyanidin 3-glucoside and peonidin 3-glucoside inhibit tumor cell growth and induce apoptosis in vitro and suppress tumor growth in vivo. Nutrition and Cancer 2006;53:232-43.

๑๑. Chen YT, Zheng RL, Jia ZJ, Ju Y. Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. Free Radic Biol Med 1990;9:19-21.

๑๒. 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.

๑๓. Perez-Jimenez J, Saura-Calixto F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. Food Res Int 2006;39:791-800.

๑๔. Chiriboga C, Francis FJ. An anthocyanin recovery system from cranberry pomace. J Amer Soc Hort Sci 1970;95:233-6.

๑๕. สุภาพรรณ ดุลยพิรุฬหศิลป์, อรไท สุขเจริญ. การสกัดแอนโธไซยานินส์จากเปลือกมังคุด. กรุงเทพมหานคร: สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; ๒๕๒๙.

๑๖. Bronnum-Hansen K, Flink JM. Anthocyanin colorants from elderberry (*Sambucus nigra* L.) IV. Further studies on production of the liquid extract, concentrates and freeze dried powder. J Food Technol 1986;21:605-14.

๑๗. รัตนา รุจิรวนิช, ระมน เสรีวรวิทย์กุล. การสกัดแอนโธไซยานินส์จากดอกกระเจี๊ยบแดงแห้ง. กรุงเทพมหานคร: สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; ๒๕๓๒.

๑๘. Fuleki T, Francis FJ. Quantitative methods for anthocyanins. Extraction and determination of total anthocyanin in cranberry. J Food Sci 1968;33:72-7.

๑๙. Metivier RP, Francis FJ, Clydesdale FM. Solvent extraction of anthocyanins from wine pomace. J Food Sci 1980;45:1099-100.

๒๐. Awika JM. Rooney LW, Waniska RD. Anthocyanins from black sorghum and their antioxidant properties. Food Chem 2004;90:293-301

๒๑. Sun T, Ho C. Antioxidant activities of buckwheat extracts. Food Chem 2005;90:743-9.

๒๒. เฉลิม จันทร์สม, สกุล มูลคำ, วนิดา จันทร์สม, เอกสิทธิ์ สกุลคู, กรณ์กาญจน์ ภมรประวัติธนะ. ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและองค์ประกอบทางเคมีของข้าวเหนียวก่ำพันธุ์พื้นเมืองของไทย. ธรรมศาสตร์เวชสาร ๒๕๕๓; ๑๐:๑๓๖-๔๓.

๒๓. Ronald EW. Current Protocols in Food Analytical Chemistry; Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy.internet 2014 [cited 2014 July 16] Available from: http://www.wiley.com/legacy/cp/ cpfac/facsample.htm, October 2008.

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

๒๕. 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;50:5691-6.

๒๖. 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.

๒๗. Liu GL, Guo HH, Sun YM. Optimization of the extraction of anthocyanins from the fruit skin of Rhodomyrtus tomentosa (Ait.) Hassk and identification of anthocyanins in the extract using high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry (HPLC-ESI-MS). Int J Mol Sci 2012; 13:6292-302.

๒๘. Rattanachaisit P, Kongkiattikajorn J. Antioxidative activities of bran extracts from pigmented rice cultivars. The International Conference on Herbal and Traditional Medicine (HTM 2015) 28-30 January, 2015; Pullman Khon Kaen Raja Orchid Hotel, Khon Kaen; 2015.

๒๙. นวลพรรณ นงค์เยาว์, นันท์นภัส แก้วประดับ, พรรณี รัตนชัยสิทธ์, จิรศักดิ์ คงเกียรติขจร. การวิเคราะห์องค์ประกอบแอนโทไซยานินในรำข้าวสี. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี; เอกสารประกอบการประชุมวิชาการมหาสารคามวิจัย ครั้งที่ ๑๐. ๑๑ - ๑๒ กันยายน ๒๕๕๗; มหาวิทยาลัยมหาสารคาม. มหาสารคาม; ๒๕๕๗.

๓๐. Oancea S, Grosu C, Ketney O, Stoia M. Conventional and ultrasound-assisted extraction of anthocyanins from blackberry and sweet cherry cultivars. Acta Chim Slov 2013;60:383-9.

๓๑. Vanini LS, Hirata TA, Edmar AK. Clemente Extraction and stability of anthocyanins from the Benitaka grape cultivar (*Vitis vinifera* L.). Braz J Food Technol 2009; 12:213-9.

Abstract

Study on appropriate methods for extraction of antioxidant compounds from black glutinous rice

Chalerm Jansom*, Ekasith Skulkhu**, Vanida Jansom*, Nusiri Lerdvuthisopon***, Kornkarn Bhamarapravati***

* Research Administrative Office, Faculty of Medicine, Thammasat University

** Udon Thani Rice Research Center, Amphur Kut chap, Udon Thani

*** Department of Preclinical Science, Faculty of Medicine, Thammasat University

Introduction: Black glutinous rice has high chemical constituents and antioxidant compounds. This research aimed to determine appropriate extraction method of black glutinous rice for highest antioxidant compounds of the crude extract. The method was considered on low cost, safety and efficiency condition.

Method: Black glutinous rice was extracted with 12 solvents. Total phenolic compound, total monomeric anthocyanin, cyanidin 3-glucoside and antioxidant activities determined by DPPH radical scavenging assay of the crude extracts were measured.

Result: The extraction with 1%hydrochloric acid (1%HCl) in 95%ethanol and 10%HCl in 95%ethanol were significantly highest chemical constituents and antioxidant activities. This solvent (1%HCl in 95%ethanol) was selected to study for black glutinous rice and solvent ratio. The result found that black glutinous rice and its solvent ratio was 1:5 or more solvent gave the high chemical constituents and antioxidant activity. The extraction time was also studied with 1%HCl in 95%ethanol as a solvent and ratio as 1:5. The appropriate time was 24 hours or more for extraction of this condition.

Discussion and Conclusion: The appropriate extraction method of black glutinous rice was 1%HCl in 95% ethanol as a solvent and ratio as 1:5 for 24 hours. This data was an alternative condition for black glutinous rice Thailand local genotypes extraction for using as ingredients in nutraceuticals in manufacture industry.

Key words: Black glutinous rice, Phenolic compound, Antioxidant