



การตรวจหาปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside และแอนโทไซยานินรวมและทดสอบฤทธิ์ต้าน  
อนุมูลอิสระของข้าวไรซ์เบอร์รี่ในประเทศไทย

DETERMINATION OF CYANIDIN-3-O-GLUCOSIDE AND TOTAL ANTHOCYANIN  
CONTENTS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF RICEBERRY RICE IN THAILAND

ศุทธิณี ใจก่อง

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2564

การตรวจหาปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside และแอนโทไซยานินรวมและทดสอบฤทธิ์ต้าน  
อนุมูลอิสระของข้าวไรซ์เบอร์รี่ในประเทศไทย



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเกษตรศาสตร์  
คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ  
ปีการศึกษา 2564  
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

DETERMINATION OF CYANIDIN-3-O-GLUCOSIDE AND TOTAL ANTHOCYANIN  
CONTENTS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF RICEBERRY RICE IN THAILAND



SUTINEE JAIKONG

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of MASTER OF SCIENCE  
(Pharmaceutical Product Development)  
Faculty of Pharmacy, Srinakharinwirot University

2021

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การตรวจหาปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside และแอนโทไซยานินรวมและทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูล

อิสระของข้าวไรซ์เบอร์รี่ในประเทศไทย

ของ

ศุทธิณี ใจก่อง

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเกษตรขั้นสูง

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก ..... ประธาน  
(รองศาสตราจารย์ ดร.วีระศักดิ์ สามี) (รองศาสตราจารย์ ดร.ชูดา จิตตสุโข)

..... ที่ปรึกษาร่วม ..... กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.สริน ทัดทอง) (อาจารย์ ดร.วิภาพร เสรีเด่นชัย)

ชื่อเรื่อง	การตรวจหาปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside และแอนโทไซยานินรวม และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของข้าวไรซ์เบอร์รี่ในประเทศไทย
ผู้วิจัย	ศุทธิณี ใจก่อง
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2564
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. วีระศักดิ์ สามี
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. สริน ทัดทอง

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ที่จะพัฒนาวิธีการสกัด cyanidin-3-O-glucoside จากข้าวไรซ์เบอร์รี่ โดยศึกษาผลของความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก และอัตราส่วนของเมทานอล วิเคราะห์ปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง จากการทดลองพบว่าอัตราส่วนของตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดคือตัวทำละลายผสมของระหว่าง 0.1N HCl และ MeOH ที่อัตราส่วน 15:85 โดยปริมาตร ตรวจพบปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside สูงที่สุดเท่ากับ  $0.92210 \pm 0.0158$  กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้ง จากนั้นศึกษาผลของตัวทำละลายที่มีขั้วต่างกัน ได้แก่ เฮกเซน เอทานอล และน้ำ ในการสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่จำนวน 4 ตัวอย่าง พบว่าสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ตัวอย่าง D ในตัวทำละลายเอทานอลมีปริมาณสารฟีนอลิกรวม สารฟลาโวนอยด์รวม และสารแอนโทไซยานินรวมสูงที่สุดเท่ากับ  $89.17 \pm 0.56$  mg GAE/g crude extract,  $47.81 \pm 1.26$  mg QE/g crude extract และ  $0.48 \pm 0.033$  mg C-3-GE/g crude extract ตามลำดับ และสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ A ในตัวทำละลายเอทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ FRAP ได้ดีที่สุดมีค่า FRAP value เท่ากับ  $260.601 \pm 0.25$   $\mu$ g/mL และสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ C ในตัวทำละลายเอทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ Superoxide anion ได้ดีที่สุดมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $970.19 \pm 25.14$   $\mu$ g/mL สารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดด้วยเฮกเซนและน้ำตามลำดับ และสารสกัดเอทานอลที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดคือ A, D, C และ B ตามลำดับ แสดงว่าสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในข้าวไรซ์เบอร์รี่ส่วนมากสามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้ว โดยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารฟีนอลิกรวม สารฟลาโวนอยด์รวม และสารแอนโทไซยานินรวมที่มีในสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ จึงสรุปได้ว่าข้าวไรซ์เบอร์รี่เป็นแหล่งสำคัญแหล่งหนึ่งของสารต้านอนุมูลอิสระที่พบในธรรมชาติ

คำสำคัญ : แอนโทไซยานิน, อนุมูลอิสระ, วิเคราะห์, โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง, ไรซ์เบอร์รี่

Title	DETERMINATION OF CYANIDIN-3-O-GLUCOSIDE AND TOTAL ANTHOCYANIN CONTENTS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF RICEBERRY RICE IN THAILAND
Author	SUTINEE JAIKONG
Degree	MASTER OF SCIENCE
Academic Year	2021
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Weerasak Samee , Ph.D.
Co Advisor	Assoc. Prof. Sarin Tadtong , Ph.D.

The objective of this study is to develop a method for cyanidin-3-O-glucoside extraction from Riceberry rice. The effects of the hydrochloric acid concentration and the MeOH ratio were also studied. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) was used to analyze the amount of cyanidin-3-O-glucoside in the extracts. The suitable ratio for cyanidin-3-O-glucoside extraction was 15:85 by volume of 0.1N HCl and MeOH yielded  $0.92210 \pm 0.0158$  g/kg of dried weight. The effects of solvent polarity on extraction, such as hexane, ethanol, and water were also studied. The total phenolic, total flavonoid, total anthocyanin contents and antioxidant activity from four samples of Riceberry rice were examined. The ethanolic extract of sample D showed the highest total phenolic, total flavonoid, and total anthocyanin contents at a concentration of  $89.17 \pm 0.56$  mg GAE/g,  $47.81 \pm 1.26$  mg QE/g and  $0.48 \pm 0.033$  mg C-3-GE/g crude extracts, respectively. The highest antioxidant activity of FRAP assay was the ethanol extract of sample A showed FRAP value of  $260.601 \pm 0.25$   $\mu$ g/mL. The best antioxidant in superoxide anion assay was sample C which showed  $IC_{50}$  value of  $970.19 \pm 25.14$   $\mu$ g/mL. The ethanolic extracts of all samples showed higher antioxidant activity than the extracted hexane and water. The best antioxidant of ethanolic extract was sample A, D, C and B, respectively. These results indicated that most of antioxidant substances in Riceberry rice dissolved in alcoholic solvent. The antioxidant activity was correlated with the total phenolic, total flavonoid, and total anthocyanin contents. Therefore, it can be concluded that the ethanolic extract of Riceberry rice is a potential source of natural antioxidants.

Keyword : Anthocyanin, Extraction, Free radicals, HPLC, Riceberry

## กิตติกรรมประกาศ

ปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีนั้น เนื่องจากผู้วิจัยได้รับความเมตตา ช่วยเหลือ พร้อมทั้งข้อเสนอแนะเพื่อแก้ไขปัญหา ปรับปรุงให้ปริญญาานิพนธ์มีความสมบูรณ์และถูกต้อง ตลอดจนได้รับการดูแลเอาใจใส่การดำเนินงานวิจัยทุกขั้นตอนอย่างดียิ่งจาก รองศาสตราจารย์ ดร.วิระศักดิ์ สามิ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก และขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สริน ทัดทอง ที่ให้ความกรุณาเป็นที่ปรึกษาร่วม พร้อมทั้งเป็นผู้ให้ความรู้ที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัยนี้อย่างดียิ่ง ให้คำปรึกษาเพื่อนำไปพัฒนางานวิจัยให้มีความสมบูรณ์และทรงคุณค่า สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในสังคมได้ รวมทั้งให้ความอนุเคราะห์ในการใช้ห้องปฏิบัติการและเครื่องมือในการทำงานวิจัยครั้งนี้ด้วย ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงในความกรุณาของอาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาานิพนธ์ทั้งสองท่าน ที่ได้เสียสละเวลาอันมีค่าทุ่มเทให้กับงานด้านการวิจัยและพัฒนาอย่างไม่เหน็ดเหนื่อย ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งและขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ศุภา จิตตสุโก ที่ให้ความกรุณาเป็นประธานการสอบปากเปล่าปริญญาานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.วิภาพร เสรีเด่นชัย ที่ให้ความกรุณาเป็นกรรมการการสอบปากเปล่าปริญญาานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านที่ได้ประสิทธิประสาทวิชาความรู้แก่ผู้วิจัยในการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาการเภสัชภัณฑ์ ซึ่งทำให้ผู้วิจัยมีความรู้อย่างเต็มเปี่ยม สามารถนำความรู้ที่ได้นั้นมาใช้ให้เกิดประโยชน์ตลอดจนทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒที่เอื้ออำนวยสถานที่ในการทำงานวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณมารดา บิดา ที่ให้โอกาส ให้การสนับสนุน ตลอดจนเป็นกำลังใจในการศึกษากับผู้วิจัยเป็นอย่างดีเยี่ยมเสมอมา

ศุภทินี ใจก่อ

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย .....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ .....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูปภาพ .....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง .....	1
ความมุ่งหมายของงานวิจัย.....	3
ความสำคัญของการวิจัย .....	3
ขอบเขตของการวิจัย .....	3
ตัวแปรที่ศึกษา .....	4
นิยามศัพท์เฉพาะ.....	4
กรอบแนวคิดในงานวิจัย .....	4
สมมุติฐานในการวิจัย.....	5
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม.....	6
ข้าวไรซ์เบอร์รี่ (riceberry rice) .....	6
งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับข้าวไรซ์เบอร์รี่ .....	8
Anthocyanins.....	9
โครงสร้างแอนโทไซยานิน.....	9
คุณสมบัติทางเคมีของแอนโทไซยานิน .....	11

ความเสถียรของแอนโทไซยานิน .....	12
การสกัด (Extraction).....	12
การวิเคราะห์ปริมาณสารแอนโทไซยานิน .....	13
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง .....	13
อนุมูลอิสระ (free radicals) และสารต้านอนุมูลอิสระ .....	14
สารต้านอนุมูลอิสระ .....	15
การทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay .....	16
การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Superoxide anion scavenging activity assay .....	16
งานวิจัยที่เกี่ยวข้องการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ .....	17
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	18
เครื่องมือ อุปกรณ์ และ สารเคมี (Instrument, Materials and Reagents).....	18
ตัวอย่าง .....	20
การเตรียมตัวอย่างและการสกัดสารจากตัวอย่างข้าวไรซ์เบอร์รี่ .....	20
การทดสอบความเหมาะสมของระบบ (system suitability) .....	22
การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation).....	24
การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิก (Total phenolic content) .....	27
การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ (Total flavonoid content) .....	28
การวิเคราะห์หาปริมาณแอนโทไซยานิน (Total anthocyanin content) .....	29
การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ.....	30
การศึกษาความสัมพันธ์ของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกับปริมาณสารฟีนอลิก สารฟลาโวนอยด์ และ สารแอนโทไซยานิน .....	35
การวิเคราะห์ข้อมูล.....	35
บทที่ 4 ผลการดำเนินงานวิจัย.....	36

1. การสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่.....	36
2. ผลการศึกษาอัตราส่วนของตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่เพื่อตรวจหาปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside ของข้าวไรซ์เบอร์รี่ในประเทศไทย.....	40
3. ผลการทดสอบความเหมาะสมของระบบ (system suitability) .....	44
4. ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์.....	45
5. ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิกรวม (Total phenolic content) .....	50
6. การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม (Total flavonoid content) .....	54
7. การวิเคราะห์หาปริมาณแอนโทไซยานินรวม (Total anthocyanin content) .....	57
8. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ.....	61
9. การศึกษาความสัมพันธ์ของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกับปริมาณสารฟีนอลิก สารฟลาโวนอยด์ และสารแอนโทไซยานิน โดยการใช้ Pearson's correlation.....	70
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายและข้อเสนอแนะ.....	72
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลการทดลอง.....	72
ข้อเสนอแนะ.....	78
บรรณานุกรม.....	79
ภาคผนวก.....	83
ภาคผนวก ก.....	84
ภาคผนวก ข.....	86
ภาพประกอบแสดงข้อมูลโครมาโทแกรมเพิ่มเติมของงานวิจัย.....	87
ประวัติผู้เขียน.....	92

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 1 สารอาหารสำคัญที่อยู่ในข้าวไรซ์เบอร์รี่.....	8
ตาราง 2 สีและการดูดกลืนแสงของแอนโทไซยานินดิน .....	10
ตาราง 3 แสดงอัตราส่วนที่แตกต่างกันของตัวทำละลายในการสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่.....	20
ตาราง 4 เกณฑ์การยอมรับค่าจากการตรวจสอบความเหมาะสมของพารามิเตอร์ (ลาวัลย์ ศรีพงษ์, 2553).....	23
ตาราง 5 เกณฑ์การยอมรับ %recovery ในการทดสอบ Accuracy.....	26
ตาราง 6 เกณฑ์การยอมรับ %RSD ในการทดสอบ Precision .....	27
ตาราง 7 แสดงการใส่สารลงใน 96 well plate ในการทดสอบวิธี Ferric - reducing antioxidant power assay .....	31
ตาราง 8 แสดงการใส่สารลงใน 96 well plate วิธี Superoxide anion scavenging activity assay.....	34
ตาราง 9 แสดงค่าผลผลิตร้อยละของสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ A - D.....	39
ตาราง 10 แสดงผลการวิเคราะห์หาปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside จากข้าวไรซ์เบอร์รี่ .....	42
ตาราง 11 แสดงการเปรียบเทียบอัตราส่วนของ MeOH ต่อปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside ในสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ .....	43
ตาราง 12 แสดงผลการทดสอบความเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ของ cyanidin-3-O-glucoside .	44
ตาราง 13 แสดงผลของกราฟมาตรฐาน cyanidin-3-O-glucoside (n=3) (µg/mL) .....	47
ตาราง 14 แสดงสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานและค่า R <sup>2</sup> (n=3).....	48
ตาราง 15 แสดงค่า Limit of detection และ Limit of Quantitation .....	48
ตาราง 16 ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์.....	49
ตาราง 17 แสดงค่า Inter day precision ของวิธีวิเคราะห์ cyanidin-3-O-glucoside.....	50
ตาราง 18 แสดงปริมาณ Total phenolic content จากสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่.....	51

ตาราง 19 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณ Total phenolic content ของสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่แต่ ละตัวทำละลายที่ใช้สกัด.....	53
ตาราง 20 แสดงปริมาณ Total flavonoid content จากสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่.....	55
ตาราง 21 แสดงการเปรียบเทียบ Total flavonoid content ในสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่.....	57
ตาราง 22 แสดงปริมาณ Total anthocyanin content จากสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่.....	58
ตาราง 23 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณสารแอนโทไซยานินรวม.....	60
ตาราง 24 แสดงสรุปผลของปริมาณ phenolic, flavonoid, anthocyanin.....	61
ตาราง 25 แสดงค่า FRAP value ของสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ทั้ง 4 ตัวอย่าง.....	63
ตาราง 26 แสดงค่า IC <sub>50</sub> ของสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ทั้ง 4 ตัวอย่าง.....	66
ตาราง 27 แสดงการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay.....	68
ตาราง 28 เปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระวิธี Superoxide anion scavenging activity assay .....	69
ตาราง 29 แสดงสรุปผลของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานและสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่....	69
ตาราง 30 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระวิธี FRAP assay กับปริมาณสารฟีนอลิก สารฟลาโวนอยด์ และสารแอนโทไซยานิน.....	70
ตาราง 31 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระวิธี Superoxide anion กับปริมาณ สารฟีนอลิก สารฟลาโวนอยด์ และสารแอนโทไซยานิน.....	71
ตาราง 32 แสดงค่าความเป็นกรด-ด่างของตัวทำละลาย.....	85

## สารบัญรูปภาพ

	หน้า
ภาพประกอบ 1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของข้าว .....	6
ภาพประกอบ 2 ข้าวไรซ์เบอร์รี่.....	7
ภาพประกอบ 3 structure of anthocyanidin.....	10
ภาพประกอบ 4 ลักษณะของโครงสร้าง anthocyanin.....	11
ภาพประกอบ 5 แสดงตัวอย่างข้าวไรซ์เบอร์รี่ จำนวน 4 ตัวอย่าง ประกอบด้วย A คือข้าวไรซ์เบอร์รี่ ตราเทสโกโลดัส, B คือข้าวกล้องไรซ์เบอร์รี่ตรากรีนนิช, C คือข้าวไรซ์เบอร์รี่จากตลาดไท, D คือ ข้าวไรซ์เบอร์รี่ตราหงษ์ทองไลฟ์ .....	36
ภาพประกอบ 6 ลักษณะของสารสกัด A – D ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย hexane .....	37
ภาพประกอบ 7 ลักษณะของสารสกัด A – D ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย absolute ethanol .....	38
ภาพประกอบ 8 ลักษณะของสารสกัด A – D ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย H <sub>2</sub> O .....	38
ภาพประกอบ 9 แสดงผลของการสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ A – D ด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ( <sup>a+</sup> The different letters in column indicate the significant difference at p<0.05).....	39
ภาพประกอบ 10 แสดงผลของตัวทำละลายต่อประสิทธิภาพในการสกัด cyanidin-3-O-glucoside จากข้าวไรซ์เบอร์รี่ .....	40
ภาพประกอบ 11 แสดงโครมาโตแกรมของ cyanidin-3-O-glucoside (a) สารมาตรฐาน cyanidin-3-O-glucoside (b) สกัดด้วยน้ำ, (c) สกัดด้วย 1.0N HCl, (d) สกัดด้วย 0.5N HCl, (e) สกัดด้วย 0.1N HCl และ (f) สกัดด้วย MeOH .....	43
ภาพประกอบ 12 แสดงโครมาโตแกรมการวิเคราะห์สารมาตรฐาน cyanidin-3-O-glucoside....	46
ภาพประกอบ 13 กราฟแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน cyanidin-3-O-glucoside (n=3) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm .....	47
ภาพประกอบ 14 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของสารมาตรฐาน gallic acid .....	50

ภาพประกอบ 15 กราฟแสดงปริมาณสารฟีนอลิกรวม [ * คือแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05, n.s. คือไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (no statistical significance)].....	52
ภาพประกอบ 16 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของสารมาตรฐาน quercetin.....	54
ภาพประกอบ 17 กราฟแสดงปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม [ * คือแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05, n.s. คือไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (no statistical significance)].....	56
ภาพประกอบ 18 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของสารมาตรฐาน cyanidin-3-O-glucoside ..	58
ภาพประกอบ 19 กราฟแสดงปริมาณสารแอนโทไซยานินรวม ( * คือแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05) .....	59
ภาพประกอบ 20 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของสารมาตรฐาน $FeSO_4$ .....	62
ภาพประกอบ 21 กราฟแสดงค่า FRAP value ( * คือแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05).....	63
ภาพประกอบ 22 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของ Trolox กับ % inhibition .....	65
ภาพประกอบ 23 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของ quercetin กับ % inhibition .....	65
ภาพประกอบ 24 แสดงค่า $IC_{50}$ [ * คือแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05, n.s. คือไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (no statistical significance)] .....	67
ภาพประกอบ 25 แสดงโครมาโทแกรมการสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ตราเทสโกโลดส์ด้วย HCl:MeOH อัตราส่วน 100 : 0 .....	87
ภาพประกอบ 26 แสดงโครมาโทแกรมการสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ตราเทสโกโลดส์ด้วย HCl:MeOH อัตราส่วน 15 : 85 .....	88
ภาพประกอบ 27 แสดงโครมาโทแกรมการสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ตราเทสโกโลดส์ด้วย HCl:MeOH อัตราส่วน 30 : 70 .....	89
ภาพประกอบ 28 แสดงโครมาโทแกรมการสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ตราเทสโกโลดส์ด้วย HCl:MeOH อัตราส่วน 45 : 55 .....	90

ภาพประกอบ 29 แสดงโครมาโทแกรมการสกัดข้าวไรซ์เบอรรีตราเทศโกโลดัสด้วย HCl:MeOH อัตราส่วน 60 : 40 .....	91
ภาพประกอบ 30 แสดงโครมาโทแกรมการสกัดข้าวไรซ์เบอรรีตราเทศโกโลดัสด้วย MeOH .....	91



## บทที่ 1

### บทนำ

#### ภูมิหลัง

ในปัจจุบันพบว่าอนุมูลอิสระ (free radicals) มีความสำคัญในการก่อให้เกิดโรคหรือทำให้โรคมีความรุนแรงมากขึ้น อนุมูลอิสระเป็นโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว (unpaired electron) ที่ไม่เสถียร วัตถุประสงค์ของปฏิกิริยา ซึ่งเกิดจากกระบวนการเผาผลาญในร่างกาย (metabolism) ที่เกิดขึ้นในร่างกายมีการใช้ออกซิเจนตลอดเวลา และก่อให้เกิดปฏิกิริยาทำลายสารชีวโมเลกุลในร่างกาย เช่น กรดไขมัน โปรตีน เป็นต้น นอกจากนี้ยังเกิดจากมลพิษจากสิ่งแวดล้อม สารเคมี สารพิษ แสงแดด ความร้อน อาหารที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัว สาเหตุเหล่านี้ก่อให้เกิดเป็น oxidative stress ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคต่าง ๆ เช่น Alzheimer's disease, Parkinson's disease, diabetes mellitus, cancer และการบาดเจ็บของเซลล์ (Aryal, Baniya, Danekhu, & Kunwar, 2019) อีกทั้งยังมีโรคที่สามารถเป็นได้ เช่น อนุมูลอิสระเข้าไปทำให้ผนังหลอดเลือดแดงถูกทำลาย เมื่อมีไขมันไปติดสะสมอยู่บริเวณที่หลอดเลือดแดงถูกทำลายจะก่อให้เกิดเส้นเลือดในสมองตีบ (ischemic stroke) และโรคหัวใจ ในที่สุด ซึ่งโรคต่าง ๆ ในปัจจุบันเกิดเพิ่มมากขึ้น จึงทำให้มีการศึกษาในการใช้สารต้านอนุมูลอิสระ เพื่อลดผลทางชีวภาพของอนุมูลอิสระดังกล่าวและเพื่อเปลี่ยนแปลงธรรมชาติของโรคต่าง ๆ จึงทำให้มีการโฆษณาถึงประโยชน์ของสารต้านอนุมูลอิสระ และชักชวนผู้ป่วยให้บริโภคสารต้านอนุมูลอิสระมากขึ้น

สารที่สามารถต้านอนุมูลอิสระได้มีทั้งจากธรรมชาติ และจากการสังเคราะห์ สารจากธรรมชาติที่มีสมบัติเป็นตัวต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ กลุ่ม polyphenols เช่น ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ไอโซฟลาโวน (isoflavone) แอนโทไซยานิน (anthocyanins) เนื่องจากมาจากธรรมชาติหลายชนิดมีสารต้านอนุมูลอิสระดังกล่าวเป็นองค์ประกอบ ดังนั้นการบริโภคอาหารจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถใช้ต้านอนุมูลอิสระได้ รวมทั้งการบริโภคข้าวที่ถือเป็นอาหารหลักในการดำรงชีวิตซึ่งข้าวเป็นแหล่งของคุณค่าทางอาหาร ประเทศไทยเป็นประเทศที่ผลิตข้าวได้มากที่สุด ข้าวขาวและข้าวที่มีสี ข้าวขาวเป็นข้าวที่ผ่านการขัดสีเอาสารสำคัญทางโภชนาการออกไปเกือบหมดทำให้สูญเสียสารสำคัญที่จำเป็นต่อร่างกาย จึงส่งผลให้ในปัจจุบันการบริโภคข้าวหลากสีที่ไม่ผ่านการขัดสีได้รับความนิยมมากขึ้น เนื่องจากเป็นข้าวเพื่อสุขภาพ เป็นข้าวที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง และพบว่าข้าวที่มีสีมีแอนโทไซยานิน โปรแอนโทไซยานิน และฟีนอลิก (Niu et al., 2013) ซึ่งสารเหล่านี้มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) มีส่วนในการป้องกันการเกิดโรค

ต่าง ๆ เช่น โรคหลอดเลือดหัวใจ (cardiovascular disease) โรคมะเร็ง โรคเบาหวาน (Chaovanalikit, 2011) ลดคลอเลสเทอรอล และชะลอการเสื่อมของเซลล์ร่างกาย เป็นต้น

ข้าวไรซ์เบอร์รี่ (Riceberry rice) ข้าวสายพันธุ์นี้ได้รับการพัฒนาโดยคนไทย จากการร่วมมือระหว่างศูนย์วิทยาศาสตร์ข้าวกับคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติและมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ได้มาจากการผสมระหว่างข้าวเจ้าหอมนิลกับข้าวขาวดอกมะลิ 105 ทำให้ได้พันธุ์ข้าวที่มีลักษณะผิวมันวาว เมล็ดเรียวยาว สีเหมือนลูกเบอร์รี่ เมื่อหุงสุกแล้วจะกลายเป็นสีม่วงเข้ม จากการศึกษาพบว่าคุณสมบัติที่โดดเด่นของข้าวไรซ์เบอร์รี่คือเป็นแหล่งของอาหารที่ให้สารต้านอนุมูลอิสระสูง สารอาหารที่พบได้แก่ โพลีฟีนอล, โอเมกา-3, ธาตุเหล็ก, วิตามินอี, วิตามินบี 1, เบต้าแคโรทีน และแกมมาโอไรซานอล เป็นต้น เมื่อร่างกายได้รับสารอาหารเหล่านี้เพียงพอนในแต่ละวันจะช่วยลดการเกิดโรคต่าง ๆ ได้ (วสันต์ ชุณหวิจิตรวรา, 2558) ซึ่งจากงานวิจัยที่ทำการศึกษากฎวิธีต้านอนุมูลอิสระในข้าวไรซ์เบอร์รี่จะพบว่าสารสกัดมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ จากการศึกษาวิเคราะห์จากวิธี DPPH assay และ ABTS assay (Settapramote, Laokuldilok, Boonyawan, & Utamaang, 2018)

นอกจากนี้ข้าวไรซ์เบอร์รี่ยังพบสารประกอบแอนโทไซยานินซึ่งอยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ แอนโทไซยานินเป็นสารสีที่พบในพืชโดยเฉพาะดอกไม้ ผลไม้ และพืชหัว โดยสีจากแอนโทไซยานินจะเปลี่ยนแปลงไปตามค่า pH ในสภาพที่เป็นกรดจะเป็นสีแดง ในสภาพที่เป็นด่างจะเป็นสีน้ำเงิน แอนโทไซยานินสามารถมีได้หลายชนิด ทั้งนี้ขึ้นกับตัวน้ำตาลที่มาเกาะบริเวณ B-ring ทำให้เป็นสีและชนิดของแอนโทไซยานินจะแตกต่างกัน ได้แก่ ไชยานิดิน (cyanidin) มีสีม่วงแดง, เดลฟินิดิน (delphinidin) มีสีน้ำเงินอมแดง, เพลาโกนิน (pelargonidin) มีสีส้ม เป็นต้น จากงานวิจัยที่ทำการศึกษารับแอนโทไซยานินชนิด ไชยานิดินและพีโอนินในสารเม็ดสีที่ชั้นผิวของเมล็ดข้าว (Khoo, Azlan, Tang, & Lim, 2017; Settapramote et al., 2018)

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีความมุ่งหมายที่จะตรวจหาปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside และแอนโทไซยานินรวม ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของข้าวไรซ์เบอร์รี่ในประเทศไทย เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาวิธีการสกัดสารสำคัญจากข้าวไรซ์เบอร์รี่และใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนาไปสู่ผลิตภัณฑ์ทางยา อาหาร และอาหารเสริมที่มาจากข้าวไรซ์เบอร์รี่ต่อไป

### ความมุ่งหมายของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาอัตราส่วนของตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ เพื่อตรวจหาปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside และ Total anthocyanin content
2. เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์แอนโทไซยานินจากสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ ด้วยเทคนิค HPLC และทำ method validation
3. เพื่อตรวจหาปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside และ Total anthocyanin content จากสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ในประเทศไทย
4. เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ในประเทศไทย

### ความสำคัญของการวิจัย

1. ทราบอัตราส่วนตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ ให้ปริมาณแอนโทไซยานินสูงสุด
2. ทราบถึงปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside และ Total anthocyanin content จากสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ในประเทศไทย
3. สามารถนำวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณแอนโทไซยานินจากพืชอื่น ๆ ต่อไปได้
4. ทราบถึงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ เพื่อนำข้อมูลไปใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ เช่น เป็นข้อมูลในการพัฒนาไปสู่ผลิตภัณฑ์ทางยา อาหาร และอาหารเสริมที่มาจากข้าวไรซ์เบอร์รี่ต่อไป

### ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยเชิงทดลอง แบ่งการศึกษาออกเป็น 2 ส่วน ได้แก่

1. การศึกษาอัตราส่วนของตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่เพื่อตรวจหาปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside และ Total anthocyanin content โดยทำการสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่โดยใช้ HCl : Methanol ตลอดจนตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นตามเกณฑ์การยอมรับของ AOAC 2012 ด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้ cyanidin-3-O-glucoside เป็นสารมาตรฐาน
2. การทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ จากวิธี FRAP assay และจากวิธี superoxide anion scavenging assay โดยทำการสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่โดยใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ hexane, absolute ethanol และน้ำ

## ตัวแปรที่ศึกษา

1. การศึกษาอัตราส่วนของตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่เพื่อ  
ตรวจหาปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside และ Total anthocyanin content

ตัวแปรอิสระ: อัตราส่วนของตัวทำละลายระหว่างความเข้มข้นของ HCl : Methanol

ตัวแปรตาม: ปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside และ Total anthocyanin content

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ตัวแปรอิสระ: phenolic, flavonoid, anthocyanin

ตัวแปรตาม : FRAP value (FRAP assay) และ % radical scavenging  
(superoxide anion scavenging activity)

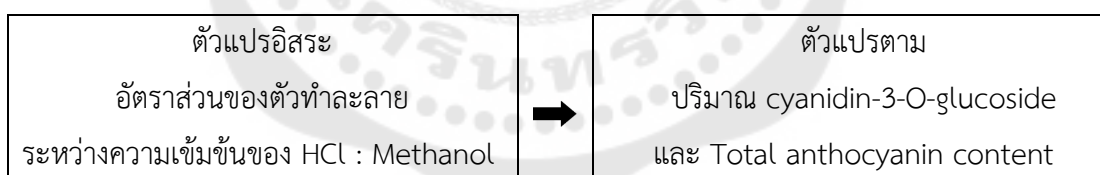
## นิยามศัพท์เฉพาะ

Total anthocyanin contents หมายถึงปริมาณแอนโทไซยานินที่มีในสารสกัดหยาบ

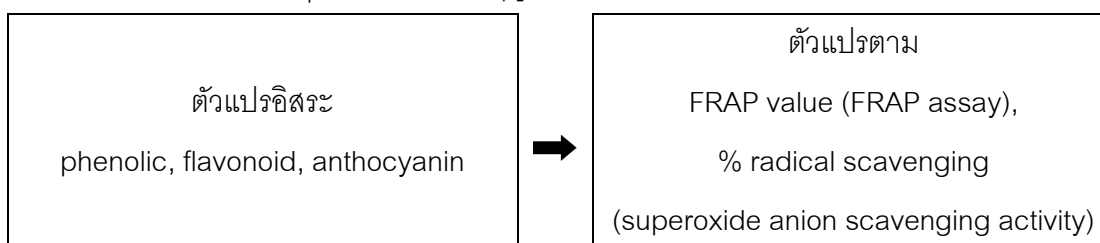
Antioxidant activity หมายถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยทดสอบหาปริมาณของสาร  
ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัด ใช้วิธี FRAP assay และวิธี superoxide anion scavenging assay

## กรอบแนวคิดในงานวิจัย

1. การศึกษาอัตราส่วนของตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่เพื่อ  
ตรวจหาปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside และ Total anthocyanin content



2. การทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ



### สมมุติฐานในการวิจัย

1. อัตราส่วนของตัวทำละลายในการสกัดระหว่างความเข้มข้นของ HCl:Methanol มีผลต่อปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside และ Total anthocyanin content
2. สารสกัดที่ได้จากข้าวไรซ์เบอร์รี่ส่วน ethanol พบ Total anthocyanin content สูงสุด
3. ปริมาณสารฟีนอลิก ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ และปริมาณสารแอนโทไซยานินที่ได้จากข้าวไรซ์เบอร์รี่ส่งผลต่อการต้านอนุมูลอิสระ



## บทที่ 2

### บททวนวรรณกรรม

การวิจัยครั้งนี้มีการศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และได้นำเสนอตามหัวข้อดังนี้

1. ข้าวไรซ์เบอร์รี่ (riceberry rice)
2. แอนโทไซยานิน (Anthocyanins)
3. อนุมูลอิสระ และสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)

#### ข้าวไรซ์เบอร์รี่ (riceberry rice)

ข้าว มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Oryza sativa* (L.) อยู่ในวงศ์ Poaceae ข้าวไม่มีรากแก้วมีแต่รากฝอยอยู่ใต้ดิน ลำต้นมีลักษณะเป็นทรงกระบอกเป็นข้อและปล้อง ภายในลำต้นกลวง ข้าวจัดเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ใบข้าวเรียวยาวมีกาบใบหุ้มตาและลำต้น มีลิ้นใบเป็นรูปสามเหลี่ยม และหูใบยื่นออกมาจากด้านนอกของข้อต่อ ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของข้าวที่สามารถแยกจากพืชตระกูลเดียวกัน ดอกมีลักษณะเป็นช่ออยู่ปลายสุดของลำต้น ประกอบด้วยดอกย่อยจำนวนมาก เมื่อดอกมีการผสมเกสรจะพัฒนาเป็นเมล็ดข้าว โดยสามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ 25-30 วัน หลังจากมีการผสมเกสร (Wijitvechkarn, 2018)



ภาพประกอบ 1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของข้าว

ที่มา: Wikipedia (2020)

ข้าวไรซ์เบอร์รี่ (riceberry rice) ข้าวสายพันธุ์นี้ได้รับการพัฒนาโดยคนไทยจาก ศ.ดร. อภิชาติ วรณวิจิตร กับคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติและมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เป็นข้าวที่ได้จากการนำพันธุ์ข้าวมาผสมระหว่าง ข้าวเจ้าหอมนิลกับข้าวขาวดอกมะลิ 105 ทำให้ได้พันธุ์ที่มีลักษณะผิวมันวาว เมล็ดเรียวยาว สีเหมือนลูกเบอร์รี่ เมื่อหุงสุกแล้วจะกลายเป็นสีม่วงเข้ม มีเนื้อสัมผัสเหนียวนุ่ม มีอายุการเก็บเกี่ยว 130 วัน จากการศึกษาพบว่าคุณสมบัติที่โดดเด่นของข้าวไรซ์เบอร์รี่คือเป็นแหล่งของอาหารที่ให้ สารต้านอนุมูลอิสระสูง สารอาหารที่พบดังแสดงในตารางที่ 1 ได้แก่ แทนนิน, โอลิโกแซคคาไรด์, ธาตุเหล็ก, วิตามินอี, วิตามินบี 1, เบต้าแคโรทีน, แกมมา โอไรซานอล โพลีฟีนอล เป็นต้น เมื่อร่างกายได้รับสารอาหารเหล่านี้เพียงพอในแต่ละวันจะช่วยลดการเกิดโรคต่าง ๆ ได้ นอกจากนี้เป็นพันธุ์ข้าวที่มีสีม่วงเข้ม ซึ่งสีม่วงนี้เป็นส่วนประกอบจาก anthocyanin โดย anthocyanin ที่พบในข้าวไรซ์เบอร์รี่ได้มีการศึกษาวิจัยแล้วพบว่ามียุทธในการต้านการอักเสบ ช่วยลดอัตราเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็ง ช่วยป้องกันการเกิดเบาหวาน โรคหลอดเลือด โรคหัวใจ เป็นต้น (Nongyao, Keapradub, Rattanachaisit, & Kongkiattikajorn, 2014)



ภาพประกอบ 2 ข้าวไรซ์เบอร์รี่

ที่มา: Vanavichit (2020)

ตาราง 1 สารอาหารสำคัญที่อยู่ในข้าวไรซ์เบอร์รี่

สารอาหาร	ปริมาณ	ประโยชน์
Omega-3	25.51 mg/100 g	กรดไขมันที่จำเป็น มีส่วนช่วยในการทำงานของสมอง ระบบประสาท
Iron	13-18 mg/kg	เป็นส่วนประกอบสำคัญของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการใช้ออกซิเจนในร่างกายและสมอง
Zinc	31.9 mg/kg	ช่วยสร้างคอลลาเจน ช่วยสังเคราะห์โปรตีน
Vitamin E	678 ug/100 g	ช่วยบำรุงผิวพรรณ ลดอัตราเสี่ยงการเกิดโรคหลอดเลือดสมอง และหัวใจ
Beta-Carotene	63 ug/100 g	บำรุงสายตา ลดอัตราเสี่ยงการเกิดโรคมะเร็ง
Polyphenols	113.5 mg/100 g	ลดอัตราเสี่ยงการเกิดโรคมะเร็ง
Tannin	89.33 mg/100 g	สมานแผล แก้ท้องร่วง แก้บิด
Gamma oryzanol	462 ug/g	ลดอัตราเสี่ยงการเกิดโรคหัวใจ โรคเบาหวาน โรคสมองเสื่อม โรคความดันโลหิตสูง

ที่มา: วสันต์ ชุณหวิจิตร (2558)

### งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับข้าวไรซ์เบอร์รี่

Settapramote et al. (2018) ได้ทำการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับข้าวไรซ์เบอร์รี่ถึงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ รวมถึงปริมาณแอนโทไซยานิน เก็บตัวอย่าง 5 จังหวัด ผลการทดลองฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระจากวิธี DPPH assay ข้าวไรซ์เบอร์รี่จากเพชรบูรณ์สูงที่สุดพบ % scavenging ability of DPPH เท่ากับ 71.54 และวิธี ABTS assay พบว่าข้าวไรซ์เบอร์รี่จากสิงห์บุรีและลำปางสูงที่สุดพบ % scavenging ability of ABTS เท่ากับ 43.41 และ 43.03 ตามลำดับ ปริมาณสารฟีนอลิกที่ลำปางและเพชรบูรณ์สูงที่สุดพบอยู่ระหว่าง 179.16 - 327.61 mg GAE/100 g. และปริมาณแอนโทไซยานินจากลำปางสูงที่สุดพบอยู่ระหว่าง 24.69 - 272.76 mg/100g จากการทดสอบแสดงถึงความสัมพันธ์ในการต้านอนุมูลอิสระมีส่วนอย่างมากจากปริมาณสารฟีนอลิกและสารแอนโทไซยานิน

## Anthocyanins

แอนโทไซยานิน (anthocyanins) มีรากศัพท์มาจากภาษากรีก โดยคำว่า Anthos หมายถึง ดอกไม้ และ Kyanos หมายถึง สีน้ำเงิน ดังนั้นแอนโทไซยานินจึงมีความหมายว่าดอกไม้สีน้ำเงิน (Pervaiz, Songtao, Haider, & Fang, 2017) แอนโทไซยานินเป็นสารสี สามารถละลายน้ำได้ (water-soluble pigments) โดยสีจะเปลี่ยนแปลงไปตามความเป็นกรดและด่าง ในสภาวะที่เป็นกรดเปลี่ยนเป็นสีแดง (pH น้อยกว่า 7) ในสภาวะที่เป็นกลางเปลี่ยนเป็นสีม่วง ในขณะที่เป็นด่างเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน (pH มากกว่า 7) (สำนักหอสมุดและศูนย์สารสนเทศวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 2553) สามารถพบในพืชทั่วไปเช่น ดอกไม้ ผลไม้ และพืชหัวใต้ดิน (Khoo et al., 2017) และพบว่าเป็นสารประกอบชนิดหนึ่งที่สำคัญที่เจอได้ในข้าวดำและข้าวแดง (Jiamyangyuen, Nuengchamnon, & Ngamdee, 2017)

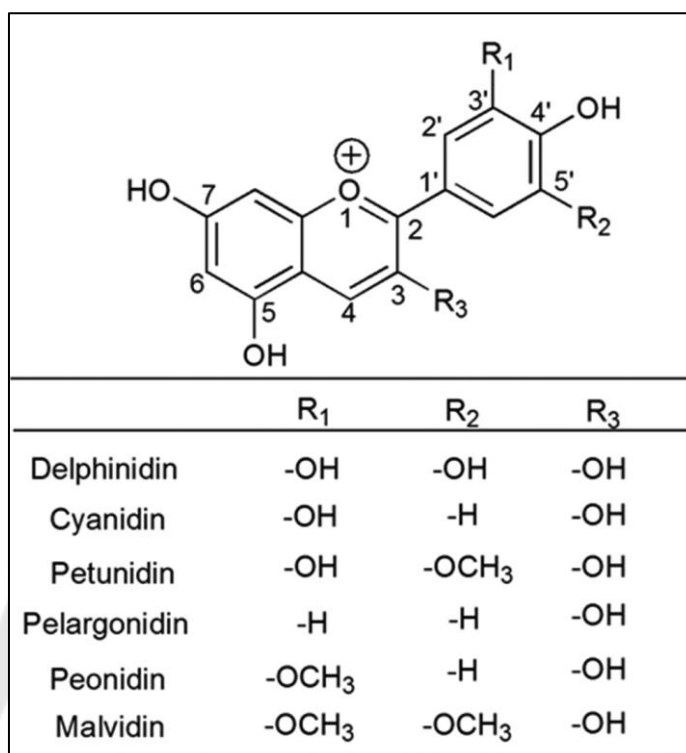
### โครงสร้างแอนโทไซยานิน

โครงสร้างเป็นสารประกอบกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) โครงสร้างประกอบด้วย 3 ส่วน ได้แก่ aglycone, sugar และ acyl group

แอนโทไซยานินถูกค้นพบว่ามี 600 กว่าชนิด โดยโครงสร้างหลักเป็น anthocyanidins หรือเรียกว่า aglycone โดยมีคาร์บอนทั้งหมด 15 อะตอม โครงสร้างพื้นฐานเป็นแบบ  $C_6-C_3-C_6$  คือ glycoside ของ 2-phenyl benzopyrylium หรือ flavylium cation (Pervaiz et al., 2017) เชื่อมต่อกันดังแสดงในภาพประกอบ 3 มีอยู่ประมาณ 6 ชนิด ที่จะเจอบ่อยในพืช ได้แก่ เดลฟินิดิน (delphinidin) ไชยานิดิน (cyanidin) เพทูนิดิน (petunidin) เพลาโกนิดิน (pelargonidin) พีโอนิดิน (peonidin) และมอลวิดิดิน (malvidin)

แอนโทไซยานินที่เกิดขึ้นในธรรมชาติแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันขึ้นกับจำนวนหมู่ไฮดรอกซี (hydroxyl group) ตำแหน่งของในการเกิดไกลโคซิเลชัน (glycosylated) และการแทนที่ของหมู่เมทอกซี (methoxy group) หรือธรรมชาติและจำนวนของอะโรมาติก (aromatic) หรืออะลิฟาติก (aliphatic carboxylates) (Pervaiz et al., 2017)

สีที่เกิดขึ้นของแอนโทไซยานินเป็นผลมาจากการแทนที่ด้วยหมู่เมทอกซี ( $OCH_3$ ) และหมู่ไฮดรอกซี (OH) ของ flavylium ring และส่งผลต่อความเป็นกรด-ด่างของสารละลาย รงค์วัตดูดีแดงเป็นผลมาจากหมู่เมทอกซีมีการเพิ่มจำนวนขึ้น ส่วนรงค์วัตดูดีน้ำเงินเป็นผลมาจากจากหมู่ไฮดรอกซีมีการเพิ่มจำนวนขึ้น (Mazza, 2007) ดังแสดงในตารางที่ 2



ภาพประกอบ 3 structure of anthocyanidin

ที่มา: Yang, Rong-Rong, Ji-Li, and Ke (2019)

ตาราง 2 สีและการดูดกลืนแสงของแอนโทไซยานิดิน

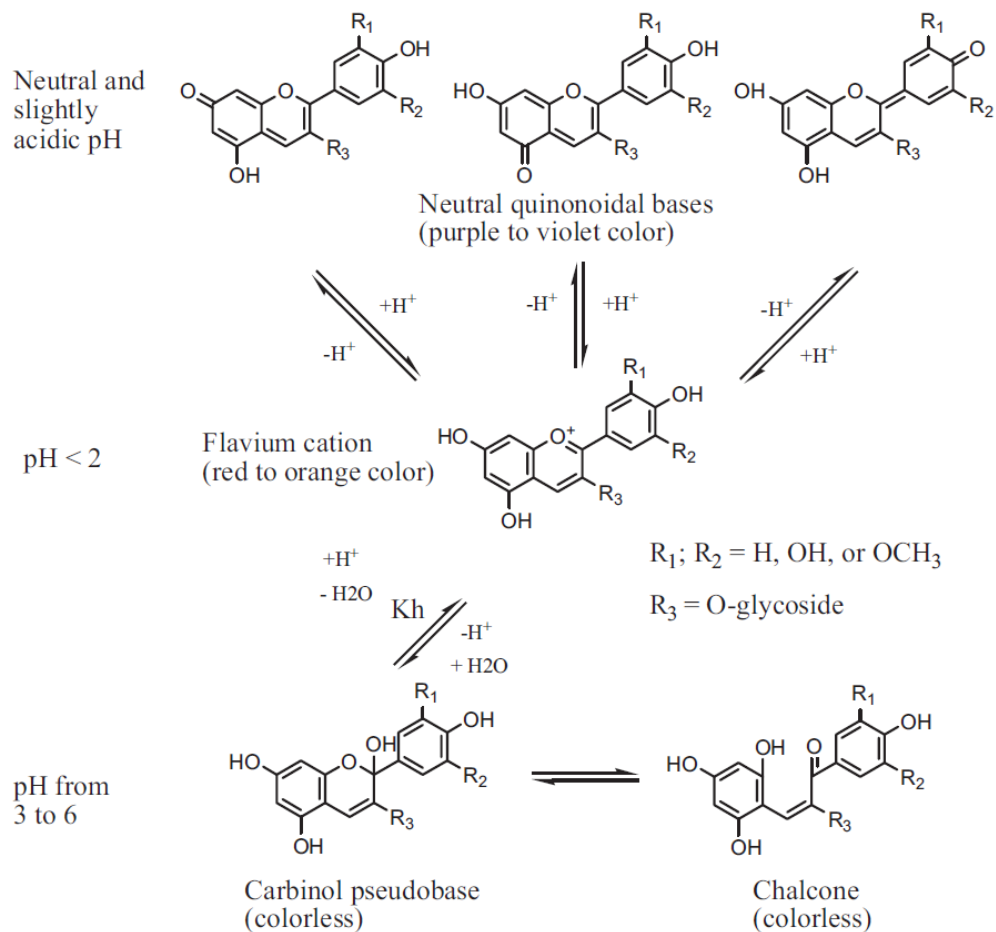
กลุ่มรงควัตถุ	การแทนที่		สี	การดูดกลืนแสง (nm) in HCl acidified MeOH
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>		
delphinidin	OH	OH	ม่วง	546
cyanidin	OH	H	ม่วง-แดง	535
petunidin	OCH <sub>3</sub>	OH	ม่วง	543
pelargonidin	H	H	แดง	520
peonidin	OCH <sub>3</sub>	H	ม่วง-แดง	532
malvidin	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	ม่วง	542

ที่มา: He and Giusti (2010)

### คุณสมบัติทางเคมีของแอนโทไซยานิน

แอนโทไซยานินเป็น pH indicator โดยวัดค่าความเป็นกรดและความเป็นด่าง เมื่อค่า pH ต่ำจะมีสีแดง เมื่อค่า pH เป็นกลางจะให้สีน้ำเงิน และเมื่อค่า pH สูงจะไม่มีสี

แอนโทไซยานินขณะที่อยู่ในสภาวะสมดุลจะมี 4 โครงสร้างคือ ในสภาวะที่เป็นกรด pH ต่ำกว่า 2 โครงสร้างจะเป็นแบบ flavylum cation (red-orange) เมื่อ pH เพิ่มขึ้นจะเกิดการสูญเสียโปรตอนโครงสร้างจะเป็นแบบ quinonoidal base (purple-violet) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่เกิดขึ้นได้ปกติ แต่เมื่อเกิดปฏิกิริยาไฮเดรชัน (hydration) โครงสร้างจะเป็นแบบ carbinol pseudobase (colorless) ซึ่งไม่มีสี และเมื่อ pH สูงขึ้นโครงสร้างจะเป็นแบบ chalcone (colorless) ซึ่งไม่มีสีจะปรากฏให้เห็นดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพประกอบ 4 ลักษณะของโครงสร้าง anthocyanin

ที่มา: He and Giusti (2010)

### ความเสถียรของแอนโทไซยานิน

ความเสถียรของแอนโทไซยานินมีหลายปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อ โดยปัจจัยที่ส่งผลมากที่สุดคือปัจจัยทางเคมีและฟิสิกส์ ได้แก่ อุณหภูมิ แสง ความเป็นกรด-ด่าง น้ำตาล และออกซิเจน รวมไปถึงความเข้มข้น โครงสร้างเคมีและองค์ประกอบของแอนโทไซยานิน

1. Structure เมื่อมีการเพิ่มจำนวนหมู่ไฮดรอกซี จะส่งผลให้ความยาวคลื่นในการดูดกลืนแสงเพิ่มมากขึ้นและทำให้เกิดการเปลี่ยนสีจากส้มไปเป็นม่วง แต่เมื่อหมู่แทนที่เป็นหมู่เมทอกซีที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ความยาวคลื่นในการดูดกลืนแสงลดลง (สำนักหอสมุดและศูนย์สารสนเทศ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 2553)

2. Temperature เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นส่งผลต่อความเสถียร จะทำให้ความเสถียรต่ำลง มีการศึกษาความเสถียรด้านความร้อนของแอนโทไซยานินที่ผ่านการทำให้สุกหรือโดนความร้อน พบว่าการผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 100 °C ทำให้ปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (Hiemori, Koh, & Mitchell, 2009)

3. ความเป็นกรด-ด่าง เมื่อสารอยู่ในสภาวะสมดุลที่มีค่า pH น้อยกว่า 0.5 จะอยู่ในโครงสร้างแบบ flavylum cation เพียงชนิดเดียวปรากฏเป็นสารละลายสีแดง เมื่อค่า pH เพิ่มขึ้นจนอยู่ในสภาพที่มีความเป็นกรดอ่อนทำให้ปริมาณ flavylum cation ลดลงและเปลี่ยนไปเป็น carbinol pseudobase ซึ่งไม่มีสี เมื่อแอนโทไซยานินอยู่ในสารละลายที่มีความเป็นด่างจะมีเฉพาะโครงสร้าง carbinol pseudobase และโครงสร้าง chalcone ซึ่งไม่มีสี

4. Ascorbic acids (Palakajornsak, 2004) สามารถเกิดการควบแน่น (condensation) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 4 เกิดเป็นสารที่มีความไม่คงตัว อีกทั้งเป็นสารประกอบที่ไม่มีสี นอกจากนี้กรดแอสคอร์บิกสามารถเกิดการ oxidized ได้ ส่งผลให้สีที่เห็นมีความจางลง

### การสกัด (Extraction)

แอนโทไซยานินสามารถสกัดได้โดยใช้ตัวทำละลายหลายชนิด ได้แก่ methanol, ethanol, acetone และน้ำ เป็นต้น เมื่อสกัดสารที่ได้จะได้สิ่งสกัดที่ประกอบด้วยแอนโทไซยานินและสารอื่น ๆ ได้แก่ กรดอินทรีย์ และน้ำตาล เนื่องจากตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดไม่จำเพาะสำหรับแอนโทไซยานิน อย่างเดียวจึงต้องมีการทำให้สารสกัดมีความบริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคต่าง ๆ ในการทำให้แอนโทไซยานินแยกจากสารตัวอื่น ๆ

การสกัดเพื่อให้ได้แอนโทไซยานินที่มีความคล้ายกับธรรมชาติสามารถใช้ตัวทำละลายได้หลายตัว ซึ่งมีการใช้ methanol เป็นตัวทำละลายสกัดมากที่สุด มีการทดลองเปรียบเทียบประสิทธิภาพของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดพบว่า methanol มีประสิทธิภาพในการ

สกัดและการ recovery มากกว่า ethanol และน้ำ แต่หากนำมาใช้กับอาหารควรใช้ ethanol กับน้ำมากกว่า เนื่องจากมีความเป็นพิษน้อยกว่า methanol

การสกัดแอนโทไซยานินโดยใช้สารละลายกรด ส่งผลให้สารแอนโทไซยานินมีความคงตัวมากขึ้น เช่น formic acid, acetic acid และ hydrochloric

### การวิเคราะห์ปริมาณสารแอนโทไซยานิน

สามารถแบ่งได้ 2 แบบ คือ การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณ และการวิเคราะห์หา Total anthocyanin content

1. การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของแอนโทไซยานิน โดยใช้วิธี HPLC จะอาศัยความมีขั้วของสารแอนโทไซยานินในการแยก ใช้วิธี reverse-phase HPLC จะแยกตามความเป็นขั้ว ได้แก่ delphinidin < cyanidin < petunidin < pelargonidin < peonidin < malvidin สารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์แบบ HPLC จะอยู่ในสภาวะที่เป็นกรด pH < 2 แอนโทไซยานินจะมีโครงสร้างแบบ flavylium cation (สำนักหอสมุดและศูนย์สารสนเทศวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 2553)

2. การวิเคราะห์หา Total anthocyanin content (Chaovanalikit, 2011) สามารถทดสอบได้หลายวิธี เช่น การวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยนำสารสกัดที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงช่วงความยาวคลื่นสูงสุด แอนโทไซยานินมีความยาวคลื่นสูงสุดอยู่ในช่วง 490-550 นาโนเมตร และอีกวิธีหนึ่งคือ pH differential method เป็นการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างตามค่า pH ที่มีการเปลี่ยนแปลงไปทำให้การดูดกลืนแสงเปลี่ยนไปด้วย

### งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

รายงานวิจัยที่ทำการสกัดแอนโทไซยานิน มีดังนี้

Hiemori et al. (2009) ทำการศึกษาวิจัยถึงองค์ประกอบและความคงตัวด้วยความร้อนของแอนโทไซยานินในข้าวสีดำ วิเคราะห์โดยใช้เครื่อง LC-(ESI) MS/MS และ HPLC-PDA สารแอนโทไซยานินที่พบได้สูงที่สุดคือ cyanidin-3-glucoside (572.47 µg/g เท่ากับ 91.13% ของ TAC) และ peonidin-3-glucoside (29.78 µg/g เท่ากับ 4.74 % ของ TAC) นอกจากนี้ความคงตัวด้วยความร้อนของสารที่วัดได้จากการถูกความร้อนและการใช้แรงดัน พบว่าวิธีทั้งหมดในการหุงข้าวสีดำ ส่งผลให้ปริมาณของสารแอนโทไซยานินลดต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญ และแรงดันที่ใช้ในการหุงข้าวเป็นสาเหตุหลัก ส่งผลให้ปริมาณ cyanidin-3-glucoside ลดต่ำลง และถัดมาเป็นการใช้หม้อที่หุงข้าวและปริมาณก๊าซที่ใช้ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการหุงข้าวเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดการสลายตัวด้วยความร้อนของ cyanidin-3-glucoside

Jiamyangyuen et al. (2017) ทำการศึกษาข้าวไรซ์เบอร์รี่และข้าวหอมมะลิแดง โดยใช้ข้าวหอมมะลิขาวเป็นตัวควบคุม ทำการเพาะปลูกข้าวในเดือนกรกฎาคม เก็บเกี่ยวในเดือนพฤศจิกายน โดยเก็บเกี่ยวระยะเวลาต่างกันทั้งหมด 5 ครั้ง นำมาสกัดด้วย hexane ก่อน จากนั้นสกัดต่อด้วย methanol : 1N HCl in water (85:15) ทำการวิเคราะห์หาสารanthocyanin และ pro-anthocyanin ในข้าวทั้งสามชนิด ผลการทดลองพบ anthocyanin เฉพาะในข้าวไรซ์เบอร์รี่เท่านั้น ส่วนในข้าวหอมมะลิแดงพบเฉพาะ pro-anthocyanin เท่านั้น ส่วนข้าวหอมมะลิขาวไม่เจอทั้ง anthocyanin และ pro-anthocyanin

### อนุมูลอิสระ (free radicals) และสารต้านอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระเป็นอะตอมที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยว (unpaired-electron) ที่มีความไม่เสถียรเนื่องจากขาดอิเล็กตรอน และไวต่อการเกิดปฏิกิริยา ซึ่งเกิดจากในกระบวนการเมแทบอลิซึมมีการใช้อะตอมออกซิเจนในร่างกายตลอดเวลา โดยในปกติร่างกายของมนุษย์จะมีโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนอยู่เป็นคู่ ซึ่งหากอิเล็กตรอนถูกอนุมูลอิสระแย่งจับไปในร่างกาย ทำให้โมเลกุลของเซลล์เกิดความไม่คงตัวขึ้น เป็นเหตุให้อวัยวะนั้นทำงานผิดปกติไป รวมทั้งอนุมูลอิสระจากภายนอก ร่างกาย เช่น มลพิษในสิ่งแวดล้อม สารเคมี สารพิษ แสงแดด ความร้อน อาหารที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัว และอนุมูลอิสระจากร่างกายในร่างกายนอก อนุมูลอิสระออกซิเจน

สาเหตุเหล่านี้ส่งผลให้ร่างกายมีสารที่ใช้ต้านอนุมูลอิสระไม่มากพอที่จะไปต่อต้านการจับอนุมูลอิสระข้างในเซลล์ของร่างกาย ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคต่าง ๆ เช่น การบาดเจ็บของเซลล์โรคมะเร็ง (Aryal et al., 2019) และโรคต่าง ๆ ที่สามารถเกิดขึ้นได้ เช่น เส้นเลือดในสมองตีบ ร่างกายมีวิธีการป้องกันอันตรายจากอนุมูลอิสระได้ 2 วิธี คือ (Wirasorn, Klarod, Hongsprabhas, & Boonsiri, 2014)

1. กลุ่มที่ไม่ใช่เอนไซม์ (nonenzymatic antioxidants) ร่างกายจะได้รับสารที่สามารถต้านอนุมูลอิสระโดยการรับประทานอาหาร ได้แก่ carotenoid, beta-carotene, lycopene, vitamin E, vitamin C และ glutathione นอกจากนี้ยังรวมถึง Coenzyme Q<sub>10</sub> สารเหล่านี้จะทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ที่จำเป็นในการเริ่มปฏิกิริยาทางเคมีเพื่อสร้างพลังงานในร่างกายมีความสำคัญต่อกล้ามเนื้อส่วนต่าง ๆ

2. กลุ่มที่เป็นเอนไซม์ (enzymatic antioxidants) เป็นเอนไซม์ที่ร่างกายผลิตขึ้น ให้เกาะกับตัวอนุมูลอิสระซึ่งมีเอนไซม์ catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase ขณะที่ร่างกายเราส่วนมากจะผลิตไม่มากพอตามความต้องการ ส่งผลให้เซลล์ในร่างกายเกิดการ

บาดเจ็บ เมื่อคนเรามีอายุสูงขึ้นกระบวนการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระจึงลดลง ในขณะที่อัตราการเกิดอนุมูลอิสระเท่าเดิม จึงทำให้โอกาสในการเกิดโรคต่าง ๆ เพิ่มขึ้น

### สารต้านอนุมูลอิสระ

สารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ถือเป็นตัววีรดิษฐ์ในปฏิกิริยา โดยสารต้านออกซิเดชัน มีการแบ่งตามกลไกออกเป็น 3 ชนิด คือ

1. Scavenging antioxidant
2. Preventive antioxidant
3. Chain breaking antioxidant

ปกติในร่างกายจะมีการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระได้เองตามธรรมชาติ โดยการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระจะเพียงพอกับการสร้างอนุมูลอิสระ แต่สารต้านอนุมูลอิสระก็สามารถได้รับเพิ่มจากการบริโภคผัก ผลไม้ ได้เช่นกัน โดยงานวิจัยนี้จะกล่าวถึงเพียงสารในกลุ่มโพลีฟีนอลิก ซึ่งในปัจจุบันพบว่ามีส่วนช่วยในการต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากมีฤทธิ์ในการต้านไวรัส ต้านแบคทีเรีย ต้านการเกิดการอักเสบ และมีฤทธิ์สลายลิ่มเลือด ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สัมพันธ์กับการเป็นสารยับยั้งอนุมูลอิสระ โดยสารกลุ่มโพลีฟีนอลิกแบ่งได้ 3 กลุ่ม ได้แก่

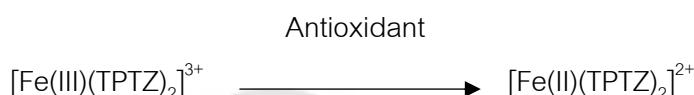
1. Simple phenols/phenolic acid และอนุพันธ์ เช่น salicylic acid, gallic acid, vanillin, tannic acid, catechol เป็นต้น
2. Phenylpropanoids เช่น hydroxycinnamic acids, coumarins และ lignans เป็นต้น
3. กลุ่ม Flavonoids จำแนกออกได้หลายกลุ่ม เช่น catechins, proanthocyanins, anthocyanidins, flavones, flavonols, flavanones และ isoflavones เป็นต้น

มีรายงานการศึกษายืนยันว่าฤทธิ์เภสัชวิทยาที่มีความสัมพันธ์กับคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารฟลาโวนอยด์ โดยมีกลไกการออกฤทธิ์ 3 กลไก คือ

1. Chelating agent ทำหน้าที่เป็นสารคีเลต สามารถจับกับโลหะหนัก เพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระได้
2. Chain breaking oxidation ทำหน้าที่เป็นตัวให้ไฮโดรเจนเพื่อยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ
3. Regenerate vitamin E โดยวีรดิษฐ์  $\alpha$ -tocopheroxyl กลับเป็น  $\alpha$ -tocopherol เหมือนเดิม เพื่อให้ทำหน้าที่ได้ต่อไป

### การทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay

FRAP assay เป็นหลักการเดียวกันกับสารต้านอนุมูลอิสระ โดยการถ่ายเทของอิเล็กตรอนไปให้สารประกอบเชิงซ้อน  $[\text{Fe(III)(TPTZ)}_2]^{3+}$  เพื่อให้เปลี่ยนรูปจากเดิมไปสู่  $[\text{Fe(II)(TPTZ)}_2]^{2+}$  โดย  $[\text{Fe(II)(TPTZ)}_2]^{2+}$  สามารถดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 595 nm ปริมาณของ  $[\text{Fe(II)(TPTZ)}_2]^{2+}$  ที่ได้สามารถนำมาประมาณค่าความสามารถการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ โดยแสดงเป็นค่า FRAP value โดยใช้เทียบกับกราฟมาตรฐานของ Trolox



ข้อดีคือเป็นวิธีที่สามารถทำได้ง่าย ใช้เวลาในการทดลองน้อย ราคาไม่แพงและสามารถทำซ้ำแล้วให้ผลเหมือนเดิม

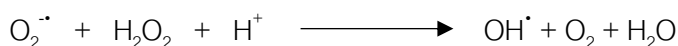
ข้อเสียคือปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นนี้เป็นปฏิกิริยาเคมีที่ไม่เกี่ยวข้องกับสภาวะที่เกิดขึ้นในร่างกายและตัวทำละลายต้องใช้น้ำปราศจากไอออน

### การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Superoxide anion scavenging activity assay

ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต Superoxide anion radical ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) เป็นอนุมูลเริ่มแรกที่เกิดขึ้นและเป็นตัวเริ่มต้นที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระตัวอื่น ๆ จากการเกิดปฏิกิริยาถูกใช้ทำให้มีอนุมูลอิสระปริมาณเพิ่มมากขึ้นส่งผลให้ความแรงของอนุมูลอิสระเป็นอันตรายสูงขึ้นด้วย ซึ่งการเกิด  $\text{O}_2^{\cdot-}$  เป็นดังสมการ



เมื่อ  $\text{O}_2^{\cdot-}$  ทำปฏิกิริยากับ  $\text{H}_2\text{O}_2$  เกิดเป็น  $\text{OH}^{\cdot}$  เรียกขั้นตอนนี้ว่า Haber-Weiss reaction



วิธี Superoxide anion scavenging activity assay เป็นวิธีการที่ใช้ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยา คือ superoxide anion ซึ่งเป็นการจำลองอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต โดยปฏิกิริยาเกิดจากการที่ riboflavin ถูกกระตุ้นด้วยแสง ทำให้อยู่ในรูป free radical แล้วทำให้ออกซิเจนถูกรีดิวซ์ได้ superoxide anion และ superoxide anion ที่เกิดขึ้นจะไปทำปฏิกิริยากับ Nitro- blue tetrazolium chloride (NBT) ซึ่งมีสีเหลืองทำให้ NBT ถูกเปลี่ยนเป็น blue formazan ซึ่งมีสีฟ้า หากสารที่นำมาทดสอบมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จะ

สามารถยับยั้งปฏิกิริยาดังกล่าวได้ ซึ่งจะไม่เกิด blue formazan ขึ้น สามารถตรวจสอบได้จากการนำไปวัดความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

#### งานวิจัยที่เกี่ยวข้องการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

Thitipramote et al. (2016) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จากวิธี DPPH, FRAP และ ABTS จากข้าวกล้องหอมมะลิแดง ข้าวกล้องลิ้มผิว และข้าวกล้องญี่ปุ่น สกัดด้วยเอทานอล 70% เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดจากข้าวหอมมะลิแดงมี total phenolic contents (1.018 mg GAE/mg extract) มากกว่าข้าวกล้องลิ้มผิวและข้าวกล้องญี่ปุ่น (0.755 และ 0.069 mg GAE/mg extract ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) สารประกอบ pro-anthocyanidins พบเฉพาะสารสกัดข้าวกล้องหอมมะลิแดง ในขณะที่สาร anthocyanidin เกิดขึ้นเฉพาะในข้าวกล้องลิ้มผิว นอกจากนี้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากการทดสอบจาก 3 วิธี ในข้าวหอมมะลิแดงมีฤทธิ์มากกว่าข้าวกล้องลิ้มผิว และข้าวกล้องญี่ปุ่นอย่างมีนัยสำคัญ ผลการทดลองเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าข้าวสีพื้นเมืองของไทยโดยเฉพาะข้าวหอมมะลิแดงมีสารประกอบที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพมากและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง

Niu et al. (2013) ได้ทำการศึกษา total phenolic contents, phenolic acid และ cyanidin-3-O-glucoside และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างข้าวแดงจำนวน 22 ตัวอย่าง โดยการสกัดด้วย methanol : water ในอัตราส่วน 7:3 (v/v) จากการทดสอบพบว่าในตัวอย่างข้าวแดงมีปริมาณ total phenolic contents เท่ากับ 433 - 2213  $\mu\text{g}$  และความเข้มข้นของ cyanidin-3-O-glucoside เท่ากับ 11.6 - 16.5  $\mu\text{g/g}$  และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงของข้าวแดงมีความสัมพันธ์เชิงบวกอย่างมากกับปริมาณ total phenolic contents ที่พบอย่างมีนัยสำคัญ

### บทที่ 3

#### วิธีดำเนินการวิจัย

#### เครื่องมือ อุปกรณ์ และ สารเคมี (Instrument, Materials and Reagents)

##### สารเคมี

- 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4H-chromen-4-one (Sigma, India)
- 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) (Fluka, USA)
- 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (trolox) (Sigma, Russia)
- Acetic acid (QReC, New Zealand)
- Acetonitrile (HPLC grade) (Merck, Germany)
- Aluminium chloride ( $\text{AlCl}_3$ ) (Kemaus, Australia)
- Cyanidin-3-O-glucoside
- Dipotassium hydrogen phosphate ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) (Univar, Australia)
- Ethanol (HPLC grade) (Merck, Germany)
- Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Univar, Australia)
- Ferric chloride hexahydrate ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) (Panreac, Spain)
- Ferrous sulphate heptahydrate ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) (Unilab, Australia)
- Folin-ciocalteu reagent (VWR, England)
- Gallic acid (Sigma, USA)
- Hydrochloric acid (HCl) (QReC, New Zealand)
- Methanol (HPLC grade) (Merck, Germany)
- Nitro tetrazolium blue chloride (NBT) (Sigma, USA)
- Phosphoric acid (HPLC grade) (Merck, Germany)
- Potassium chloride (KCl) (Univar, Australia)
- Potassium dihydrogen phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) (Univar, Australia)
- Riboflavin (Sigma, China)
- Sodium acetate trihydrate (Univar, Australia)
- Sodium carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )
- น้ำปราศจากไอออน (A.N.B. Laboratories Co., Ltd, ประเทศไทย)

### อุปกรณ์ และเครื่องมือ

- 96-well microplate (Sterilin, UK)
- Beaker ขนาด 25, 50, 100, 250 และ 1000 ml (Pyrex<sup>®</sup>, USA)
- Centrifuge tube ขนาด 15 และ 50 ml
- Cylinder ขนาด 5, 10 และ 500 ml
- Erlenmeyer flask (Pyrex<sup>®</sup>, USA)
- High Performance Liquid Chromatography (YL9100, Young Lin, Korea)
  - pump: YL9111 binary pump (Fortune Scientific, Thailand)
  - column compartment: YL9131 (Fortune Scientific, Thailand)
  - column: ACE<sup>®</sup> C18-AR (250 mm x 4.6 mm id, 5  $\mu$ m particle size)

(Advanced Chromatography Technologies, Scotland)

- detector: YL9120 UV-visible detector (Fortune Scientific, Thailand)
- HPLC vial & cap
- Incubator (MEMMERT, Germany)
- Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml
- Micropipette ขนาด 20 – 200  $\mu$ l และขนาด 100 – 1000  $\mu$ l (GILSON, France)
- Microplate reader (SpectraMax M3) (Molecular Devices, USA)
- Multichannel micropipette ขนาด 20 - 200  $\mu$ l (CORNING, Poland)
- Nylon membrane filter (ขนาด 0.45  $\mu$ m) (ANPEL, Shanghai)
- Parafilm (BERMIS, Germany)
- pH meter (METTLER TOLEDO, USA)
- Rotary evaporator (buchi rotavapor R-114, Switzerland)
- Ultrasonic sonicator bath (POWERSONIC 410, Korea)
- Vacuum pump (SPARMAX, Taiwan)
- Volumetric flask ขนาด 10, 25, 50 และ 100 ml (Witeg Diffigo, Germany)
- Volumetric pipette ขนาด 1, 2, 3, 4 และ 5 ml
- Vortex mixer (Scientific industries, inc.)
- กระดาษกรอง (Whatman<sup>TM</sup>, China)
- เครื่องชั่งดิจิตอล ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler Toled, USA)

- เครื่องหมุนเหวี่ยง
- ชุดกรอง Buchner funnel filtration
- โคมไพฟลูออเรสเซนส์

### ตัวอย่าง

- ข้าวไรซ์เบอร์รี่ A ชื่อการค้าคือ ข้าวไรซ์เบอร์รี่ตราเทสโกโลดัส เก็บตัวอย่าง พ.ศ. 2563
- ข้าวไรซ์เบอร์รี่ B ชื่อการค้าคือ ข้าวกล้องไรซ์เบอร์รี่ตรากรีนนิช เก็บตัวอย่าง พ.ศ. 2563
- ข้าวไรซ์เบอร์รี่ C ชื่อการค้าคือ ข้าวไรซ์เบอร์รี่จากตลาดไท เก็บตัวอย่าง พ.ศ. 2563
- ข้าวไรซ์เบอร์รี่ D ชื่อการค้าคือ ข้าวไรซ์เบอร์รี่ตราหงส์ทองไลฟ์ เก็บตัวอย่าง พ.ศ. 2563

### การเตรียมตัวอย่างและการสกัดสารจากตัวอย่างข้าวไรซ์เบอร์รี่

การเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาอัตราส่วนของตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่เพื่อตรวจหาปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside ของข้าวไรซ์เบอร์รี่ในประเทศไทย

- วิธีการเตรียมตัวอย่างดัดแปลงมาจากวิธีของ Hiemori et al. (2009) โดยนำข้าวไรซ์เบอร์รี่ A มาบดให้ละเอียดด้วยเครื่อง blender จนได้ผงละเอียด จากนั้นทำการแห้งโดยใช้แรงเบอร์ 40 ซั่งผงข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่เตรียมไว้ 1 g ผสมกับตัวทำละลายตามอัตราส่วนดังตารางที่ 3 ปริมาตร 10 mL ทำการสกัดด้วยวิธี sonication เป็นระยะเวลา 30 นาที จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไป centrifuge ที่ 3,000 rpm เป็นระยะเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลานำไปกรองแยกกากด้วยกระดาษกรอง (Whatman No.1) ได้สารละลายสีแดง ทำซ้ำการทดลองละ 3 ครั้ง นำสารสกัดที่ได้กรองด้วย Nylon membrane filter ใส่ HPLC vial 2 mL ไปตรวจหาปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside ด้วยเครื่อง HPLC

ตาราง 3 แสดงอัตราส่วนที่แตกต่างกันของตัวทำละลายในการสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่

solvent	อัตราส่วนของตัวทำละลาย (mL)					
	1	2	3	4	5	6
0.1N HCl: MeOH	0 : 100	15 : 85	30 : 70	45 : 55	60 : 40	100 : 0
0.5N HCl: MeOH	0 : 100	15 : 85	30 : 70	45 : 55	60 : 40	100 : 0
1N HCl: MeOH	0 : 100	15 : 85	30 : 70	45 : 55	60 : 40	100 : 0
Water: MeOH	0 : 100	15 : 85	30 : 70	45 : 55	60 : 40	100 : 0

### การเตรียมสารละลายเพื่อใช้ในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation)

- การเตรียมสารละลายมาตรฐานของ cyanidin-3-O-glucoside

เตรียม Stock solution ของ cyanidin-3-O-glucoside ที่ความเข้มข้น 20 µg/mL ปริมาตร 50 mL โดยชั่ง cyanidin-3-O-glucoside น้ำหนัก 0.00112 กรัม ละลายและปรับปริมาตรจนครบ 50 mL ด้วย mobile phase ในขวดปรับปริมาตร จากนั้นเตรียมสารมาตรฐานของ cyanidin-3-O-glucoside ที่ความเข้มข้น 1.4, 1.2, 1.0, 0.8, 0.6 และ 0.4 µg/mL เพื่อนำไปใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานและเตรียมสารมาตรฐานของ cyanidin-3-O-glucoside ที่ความเข้มข้น 1.3, 0.9 และ 0.5 µg/mL ใช้ทำชุดตัวอย่างควบคุมคุณภาพ โดยทำ Serial dilution ดังนี้

- เตรียมความเข้มข้น 1.4 µg/mL โดยปิเปต Stock solution ของ cyanidin-3-O-glucoside ที่ความเข้มข้น 20 µg/mL มา 350 µL ปรับปริมาตรจนครบ 5 mL ด้วย mobile phase

- เตรียมความเข้มข้น 1.2 µg/mL โดยปิเปต Stock solution ของ cyanidin-3-O-glucoside ที่ความเข้มข้น 20 µg/mL มา 300 µL ปรับปริมาตรจนครบ 5 mL ด้วย mobile phase

- เตรียมความเข้มข้น 1.0 µg/mL โดยปิเปต Stock solution ของ cyanidin-3-O-glucoside ที่ความเข้มข้น 20 µg/mL มา 250 µL ปรับปริมาตรจนครบ 5 mL ด้วย mobile phase

- เตรียมความเข้มข้น 0.8 µg/mL โดยปิเปต Stock solution ของ cyanidin-3-O-glucoside ที่ความเข้มข้น 20 µg/mL มา 200 µL ปรับปริมาตรจนครบ 5 mL ด้วย mobile phase

- เตรียมความเข้มข้น 0.6 µg/mL โดยปิเปต Stock solution ของ cyanidin-3-O-glucoside ที่ความเข้มข้น 20 µg/mL มา 150 µL ปรับปริมาตรจนครบ 5 mL ด้วย mobile phase

- ความเข้มข้น 0.4 µg/mL โดยปิเปต Stock solution ของ cyanidin-3-O-glucoside ที่ความเข้มข้น 20 µg/mL มา 100 µL ปรับปริมาตรจนครบ 5 mL ด้วย mobile phase

- เตรียมความเข้มข้น 1.3 µg/mL โดยปิเปต Stock solution ของ cyanidin-3-O-glucoside ที่ความเข้มข้น 20 µg/mL มา 325 µL ปรับปริมาตรจนครบ 5 mL ด้วย mobile phase

- เตรียมความเข้มข้น 0.9 µg/mL โดยปิเปต Stock solution ของ cyanidin-3-O-glucoside ที่ความเข้มข้น 20 µg/mL มา 225 µL ปรับปริมาตรจนครบ 5 mL ด้วย mobile phase

- เตรียมความเข้มข้น 0.5 µg/mL โดยปิเปต Stock solution ของ cyanidin-3-O-glucoside ที่ความเข้มข้น 20 µg/mL มา 125 µL ปรับปริมาตรจนครบ 5 mL ด้วย mobile phase

## การเตรียมตัวอย่างเพื่อตรวจหาปริมาณแอนโทไซยานินรวม ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูล

### อิสระ

- เตรียมข้าวไรซ์เบอร์รี่จาก 4 ตัวอย่าง บดให้ละเอียดด้วยเครื่อง blender จนได้ผงละเอียด จากนั้นทำการร่งโดยใช้แรงเบอร์ 40 ซั่งผงข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่เตรียมไว้ตัวอย่างละ 1 กรัม ผสมกับตัวทำละลาย hexane ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำการสกัดด้วยวิธี sonication เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไป centrifuge ที่ 3,000 rpm เป็นระยะเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำไปกรองแยกกากด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 1 นำกากที่เหลือไปทำการสกัดซ้ำ ทำซ้ำการทดลองละ 3 ครั้ง เก็บสารละลายในส่วน hexane แยกเก็บไว้ จากนั้นนำกากข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่ผ่านการสกัดจาก hexane มาสกัดต่อด้วยการเติมตัวทำละลาย absolute ethanol ปริมาตร 10 มิลลิลิตร สกัดด้วยวิธีเดิม ทำซ้ำการทดลองละ 3 ครั้ง เก็บสารละลายในส่วน absolute ethanol แยกเก็บไว้ จากนั้นนำกากข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่สกัดจาก hexane และ absolute ethanol มาสกัดต่อด้วยการเติมน้ำปริมาตร 10 มิลลิลิตร สกัดด้วยวิธีเดิม ทำซ้ำการทดลองละ 3 ครั้ง เก็บสารละลายในส่วนน้ำแยกเก็บไว้

- นำสารละลายสีที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลาย hexane, absolute ethanol และน้ำ มาระเหยแห้งโดยใช้ rotary evaporator จนได้สารสกัดหยาบของข้าวไรซ์เบอร์รี่ทั้ง 4 ตัวอย่าง จากนั้นทำการหำร้อยละของผลได้ของสารสกัด แล้วนำใส่ขวดสีชาเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปตรวจหา Total anthocyanin content และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่อไป

### การทดสอบความเหมาะสมของระบบ (system suitability)

เป็นการตรวจสอบว่าระบบโครมาโทกราฟีที่ทดสอบสามารถแยก และการวิเคราะห์ให้ผลเหมือนเดิมทุกครั้ง (reproducibility) เพียงพอ สำหรับใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่าง โดยการทดสอบนี้อยู่บนหลักการของเครื่องมือ ระบบอิเล็กทรอนิกส์ การปฏิบัติงานวิเคราะห์ ซึ่งทั้งหมดทำการประเมินแบบองค์รวม สามารถทำการทดสอบได้ดังนี้

- เตรียมความเข้มข้น 0.4 µg/mL โดยปิเปต Stock solution ของสารมาตรฐาน cyanidin-3-O-glucoside ที่ความเข้มข้น 20 µg/mL มา 100 µL และปรับปริมาตรจนครบ 5 mL โดยใช้ mobile phase จากนั้นกรองสารละลายด้วย Nylon membrane filter และบรรจุใน HPLC vial นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยวิเคราะห์ 1 ความเข้มข้น ทำการวิเคราะห์ซ้ำทั้งหมด 6 ครั้ง โดยใช้สภาวะ (condition) ดังนี้

- Column: C18 250 mm x 4.6 mm

- Mobile phase : acetonitrile และ 0.85% phosphoric acid (15:85)

- Solvent: isocratic elution
- Flow rate: 1 mL/min
- Temperature: 25 °C
- Wavelength: 520 nm
- Run time: 10 min
- Injection volume: 20 µL
- ทำการวิเคราะห์ตามหัวข้อต่าง ๆ ดังนี้
  - Resolution (Rs) คือ การใช้สภาวะที่เหมาะสมแยกสารสองชนิดในสารละลายผสม
  - Tailing factor (T) เป็นการวัดความสมมาตรของพีค
  - Number of theoretical plate (N) เป็นตัวบ่งชี้ถึงประสิทธิภาพของ column
  - Relative standard deviation (%RSD) คือ ค่าร้อยละเบี่ยงเบนมาตรฐาน

สัมพัทธ์ เป็นการวัดความแม่นยำของระบบโดยนำ peak area, peak height และ retention time ที่วัดได้ มาคำนวณตามสมการ ดังนี้

$$\% RSD = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100$$

เกณฑ์การยอมรับค่าพารามิเตอร์พื้นฐานเพื่อแสดงประสิทธิภาพการแยกของระบบตามมาตรฐาน guideline ดังแสดงในตารางที่ 4

ตาราง 4 เกณฑ์การยอมรับค่าจากการตรวจสอบความเหมาะสมของพารามิเตอร์ (ลาวัลย์ ศรีพงษ์, 2553)

Parameters	guideline
$R_s$	> 2.0 general
T	≤ 2
N	> 2000
%RSD	≤ 1.0%

## การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation)

นำวิธีที่พัฒนาขึ้นมาตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ตามข้อกำหนดและเกณฑ์การยอมรับดังนี้

### specificity

ความจำเพาะของวิธีทดสอบ

- วิเคราะห์ว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นนั้นสามารถตรวจวิเคราะห์ได้เจาะจงกับสารที่เราต้องการศึกษา โดยผลการวิเคราะห์ต้องไม่พบพีคที่เวลาเดียวกับพีคที่เราต้องการวิเคราะห์

- วิธีการทดลอง นำสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่มาทำการ spike โดยการเติมสารมาตรฐานที่รู้ปริมาณและความเข้มข้นลงไปบรรจุใน HPLC vial จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC เปรียบเทียบพีคของสารมาตรฐาน และพีคของสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ตรงกันหรือไม่

### linearity and Range

ความสัมพันธ์อย่างเป็นเส้นตรงและช่วงความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ

- Linearity คือ ความสามารถของวิธีที่ใช้ในการทดสอบที่ให้ผลทดสอบเป็นสัดส่วนโดยตรงต่อความเข้มข้นจริงของสารที่มีอยู่ภายในช่วงความเข้มข้นที่กำหนด

- Range เป็นช่วงความเข้มข้นของค่าสูงและค่าต่ำของสารในการทดสอบ มีลักษณะเป็นเส้นตรงและสามารถวิเคราะห์ปริมาณสารในช่วงความเข้มข้นนั้นได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ

- วิธีการทดลองนำ stock solution ของ สารมาตรฐาน cyanidin-3-O-glucoside เตรียมให้ได้ความเข้มข้น 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 และ 1.4  $\mu\text{g/mL}$  โดยเปิด stock solution มา 100, 150, 200, 250, 300 และ 350  $\mu\text{L}$  ตามลำดับ และปรับปริมาตรด้วย mobile phase จนครบ 5 mL และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

- สร้าง calibration curve จาก peak area ที่ได้จากการวิเคราะห์ และคำนวณหาสมการเส้นตรง ( $y = mx + c$ ) กับ correlation coefficient (r)

เกณฑ์ที่ยอมรับประเมินจากค่าของ correlation coefficient ต้องมากกว่า 0.995

### Limit of detection (LOD) และ Limit of quantitation (LOQ)

- Limit of detection คือ ปริมาณต่ำสุดของสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่ตรวจพบได้เป็นความเข้มข้นที่ไม่สามารถบอกเป็นปริมาณหรือความเข้มข้นที่แน่นอนได้

- Limit of quantitation คือ ปริมาณต่ำสุดของสารสามารถตรวจหาค่าได้ในเชิงปริมาณ และอ่านค่าได้แม่นยำและถูกต้อง

สามารถหาได้จากสมการดังนี้

$$\text{LOD} = \frac{3\text{SD of } y - \text{intercept}}{\text{slope}}$$

$$\text{LOQ} = \frac{10\text{SD of } y - \text{intercept}}{\text{slope}}$$

- วิธีการทดลองนำ stock solution ของ สารมาตรฐาน cyanidin-3-O-glucoside มาเจือจางด้วย methanol และ mobile phase ให้ได้ความเข้มข้น ตามที่คำนวณได้จากสมการของ LOD และ LOQ บรรจุใน HPLC vial และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

- แทนค่าพื้นที่ใต้กราฟในสมการเส้นตรงของ calibration curve เพื่อตรวจสอบดูว่า สามารถตรวจพบ peak ที่ความเข้มข้นของ LOD หรือไม่ และสามารถวิเคราะห์ปริมาณสารที่ความเข้มข้นของ LOQ ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำหรือไม่ โดยดูจาก %recovery และ %RSD

#### Accuracy

ความถูกต้องของวิธีทดสอบคือความสามารถของวิธีทดสอบว่าแสดงผลการวิเคราะห์ ที่ได้มีค่าใกล้เคียงกับค่าจริงมากน้อยเพียงใด เกณฑ์การยอมรับแสดงดังตารางที่ 5 สามารถทดสอบได้ ดังนี้

- นำ stock solution ของสารมาตรฐาน cyanidin-3-O-glucoside มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.4, 0.6 และ 0.8 µg/mL โดยปีเปิด stock solution มา 2, 3 และ 4 mL ตามลำดับ และปรับปริมาตรด้วย mobile phase 10 mL บรรจุใน HPLC vial และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยวิเคราะห์ทั้งหมด ความเข้มข้นละ 2 ครั้ง ทำซ้ำ 3 ครั้ง

- แทนค่า peak area ลงในสมการเส้นตรงของ calibration curve เพื่อหาปริมาณที่วิเคราะห์ได้ และนำไปคำนวณหา %recovery โดยคำนวณจากสมการ ดังนี้

$$\% \text{ recovery} = \frac{\text{ปริมาณที่วิเคราะห์ได้}}{\text{ปริมาณที่มีอยู่จริง}} \times 100\%$$

ตาราง 5 เกณฑ์การยอมรับ %recovery ในการทดสอบ Accuracy

Concentration	Recovery limits
100 ( % )	98 - 101 ( % )
10 ( % )	95 - 102 ( % )
1 ( % )	92 - 105 ( % )
0.1 ( % )	90 - 108 ( % )
0.01 ( % )	85 - 110 ( % )
10 µg/g (part per million)	80 - 110 ( % )
1 µg/g	75 - 120 ( % )
10 µg/kg (parts per billion)	70 - 125 ( % )

ที่มา: AOAC (2012)

#### Precision

ความแม่นยำของวิธีทดสอบคือ ผลจากการทดสอบมีความใกล้เคียงกันโดยทดสอบซ้ำกันหลายครั้ง เกณฑ์การยอมรับแสดงดังตารางที่ 6 มีวิธีการทดสอบดังนี้

- นำ stock solution ของ สารมาตรฐาน cyanidin-3-O-glucoside มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.4, 0.6 และ 0.8 µg/mL โดยเปิด stock solution มา 2, 3 และ 4 mL ตามลำดับ และปรับปริมาตรด้วย mobile phase 10 mL บรรจุใน HPLC vial และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยวิเคราะห์ทั้งหมด 3 ความเข้มข้น vial ละ 2 ครั้ง ทำซ้ำการทดลองละ 3 ครั้ง ในวันเดียวกัน (Inter-day precision) และ ทำซ้ำการทดลองละ 3 ครั้ง ในวันที่แตกต่างกันเป็นเวลา 3 วัน (intra-day precision)

ตาราง 6 เกณฑ์การยอมรับ %RSD ในการทดสอบ Precision

Concentration	Repeatability (RSDr)	Reproducibility (RSDR)
100 %	1 %	2 %
10 %	1.5 %	3 %
1 %	2 %	4 %
0.1 %	3 %	6 %
0.01 %	4 %	8 %
10 µg/g (part per million)	6 %	11 %
1 µg/g	8 %	16 %
10 µg/kg (parts per billion)	15 %	32 %

ที่มา: AOAC (2012)

- แทนค่า peak area ที่ได้ไปแทนค่าลงในสมการเส้นตรงของ calibration curve เพื่อหาปริมาณที่วิเคราะห์ได้ และนำไปคำนวณหา %RSD

#### การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิก (Total phenolic content)

วิเคราะห์หา Total phenolic content จากวิธี Folin - Ciocalteu Colorimetric ดัดแปลงมาจากวิธีของ Ainsworth and Gillespie (2007)

##### เตรียมสารละลายที่ใช้ทดสอบ

- เตรียมสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent ที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร (10% v/v Folin-Ciocalteu reagent) โดยปิเปตสารละลาย Folin-Ciocalteu 5 mL ปรับปริมาตรจนครบ 50 mL ด้วยน้ำปราศจากไอออน

- เตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (ความเข้มข้น 100 g/L) โดยชั่ง  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  10 g ละลายในน้ำปราศจากไอออน จากนั้นปรับปริมาตรจนครบ 100 mL ด้วยน้ำปราศจากไอออน

- เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 200  $\mu\text{g/mL}$  โดยชั่งกรดแกลลิก 20 mg ละลายในเอทานอลและปรับปริมาตรโดยใช้เอทานอลจนครบ 100 mL นำ stock solution ของสารมาตรฐานกรดแกลลิกมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100  $\mu\text{g/mL}$

#### ขั้นตอนการทดสอบ

ใส่สารละลายตัวอย่างข้าวไรซ์เบอร์รี่ 4 ตัวอย่างที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดหรือสารละลายมาตรฐานที่เจือจางแล้ว ปริมาตร 50  $\mu\text{L}$  จากนั้นเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent ลงหลุมละ 100  $\mu\text{L}$  เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 1 นาที และทิ้งไว้ 4 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตลงหลุมละ 50  $\mu\text{L}$  โดยทำการทดสอบแต่ละตัวอย่าง 3 ครั้ง แล้วนำ 96-well plate ไปป่ม (incubate) ในที่มืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 765 nm จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงไปหาความเข้มข้นของสารฟีนอลิกจากสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐาน gallic acid แล้วเทียบเป็น gallic acid equivalence ต่อน้ำหนักตัวอย่างแห้งหนัก 1 กรัม (GAE/g crude extract)

#### การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ (Total flavonoid content)

วิเคราะห์หา Total flavonoid content จากวิธี aluminium chloride method ดัดแปลงมาจากวิธีของ Bong et al. (2021)

#### เตรียมสารละลายที่ใช้ทดสอบ

- เตรียมสารละลาย 10% aluminium chloride ( $\text{AlCl}_3$ ) จาก  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  โดยชั่ง  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  18.10 g ละลายในน้ำปราศจากไอออน และปรับปริมาตรจนครบ 100 mL

- เตรียมสารละลายโซเดียมอะซิเตต (sodium acetate trihydrate) โดยชั่ง 13.61 g ละลายในน้ำปราศจากไอออน และปรับปริมาตรจนครบ 100 mL

- เตรียมสารละลายมาตรฐาน quercetin ความเข้มข้น 200  $\mu\text{g/mL}$  โดยชั่ง 20 mg ละลายในเอทานอลและปรับปริมาตรจนครบ 100 mL นำ stock solution ของสารมาตรฐาน quercetin มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100  $\mu\text{g/mL}$

#### ขั้นตอนการทดสอบ

ใส่สารละลายตัวอย่างข้าวไรซ์เบอร์รี่ 4 ตัวอย่างที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดหรือสารละลายมาตรฐานที่เจือจางแล้ว ปริมาตร 50  $\mu\text{L}$  เติมเอทานอล 140  $\mu\text{L}$  หลังจากนั้นเติมสารละลาย 10% aluminium chloride 10  $\mu\text{L}$  และเติมสารละลาย sodium acetate trihydrate 10  $\mu\text{L}$  โดยทำการทดสอบแต่ละตัวอย่าง 3 ครั้ง แล้วนำ 96-well plate ไปป่ม (incubate) ในที่มืดเป็น

เวลา 40 นาที จากนั้นนำไปวัดความสามารถการดูดกลืนแสงด้วย microplate reader ที่ wavelength 415 nm จากนั้นนำค่าที่ได้ไปหาปริมาณของสารฟลาโวนอยด์จากสมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐาน quercetin แล้วเทียบเป็น quercetin equivalence ต่อน้ำหนักตัวอย่างแห้งหนัก 1 กรัม (QE/g crude extract)

### การวิเคราะห์หาปริมาณแอนโทไซยานิน (Total anthocyanin content)

วิเคราะห์หา Total anthocyanin content จากวิธี pH-differential ดัดแปลงมาจากวิธีของ Lee, Durst, and Wrolstad (2005)

#### เตรียมสารละลายที่ใช้ทดสอบ

- เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ pH เท่ากับ 1.0 หรือ Potassium chloride (0.025M) โดยชั่งโพแทสเซียมคลอไรด์ 0.186 g ใส่ลงในบีกเกอร์เติมน้ำ 95 mL นำไปวัด pH แล้วปรับให้ได้ pH 1.0 ( $\pm 0.05$ ) ด้วย hydrochloric acid นำสารละลายบัฟเฟอร์ที่ปรับ pH แล้วปรับปริมาตรสารละลายโดยใช้น้ำ DI จนครบ 100 mL

- เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ pH 4.5 หรือโซเดียมอะซิเตท (Sodium acetate, 0.4M) โดยชั่งโซเดียมอะซิเตท 5.443 g ใส่ลงในบีกเกอร์เติมน้ำ 95 mL นำไปวัด pH แล้วปรับให้ได้ pH 4.5 ( $\pm 0.05$ ) ด้วย hydrochloric acid นำสารละลายบัฟเฟอร์ที่ปรับ pH แล้วปรับปริมาตรสารละลายโดยใช้น้ำ DI จนครบ 100 mL

#### ขั้นตอนการทดสอบ

ใส่สารละลายตัวอย่างข้าวไรซ์เบอร์รี่ 4 ตัวอย่าง หรือสารละลายมาตรฐาน ปริมาตร 40  $\mu$ L และเติมสารละลายบัฟเฟอร์ 160  $\mu$ L ทำเช่นเดียวกันทั้ง pH 1.0 และ pH 4.5 โดยทำการทดสอบแต่ละตัวอย่าง 3 ครั้ง แล้วนำไปบ่มในที่มืด 30 นาที จากนั้นนำไปวัดความสามารถดูดกลืนแสงด้วย microplate reader ความยาวคลื่น 510, 700 nm แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงไปคำนวณ โดยที่  $A = (A_{510nm} - A_{700nm})_{pH1.0} - (A_{510nm} - A_{700nm})_{pH4.5}$  เมื่อได้ค่า A นำไปแทนค่าหาปริมาณของแอนโทไซยานินจากสมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐานของ cyanidin-3-O-glucoside ตามสมการ  $y = 0.561x - 0.0151$

## การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

### การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ วิธี Ferric - reducing antioxidant power assay

#### การเตรียมสาร

- เตรียม FRAP reagent ประกอบด้วยสารละลาย 300 mM acetate buffer (pH = 3.6) สารละลาย 20 mM  $\text{FeCl}_3$  และสารละลาย 10 mM TPTZ เตรียมโดย

- ชั่งสาร sodium acetate trihydrate ปริมาณ 1.5 g ละลายด้วย acetic acid ปริมาตร 8 mL จากนั้นปรับปริมาตรสารละลายด้วยน้ำปราศจากไอออนจนครบ 500 mL จะได้ 300 mM acetate buffer (pH 3.6)

- ชั่งสาร  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ปริมาณ 54 mg ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออนแล้วปรับปริมาตรจนครบ 10 mL จะได้สารละลาย 20 mM  $\text{FeCl}_3$

- ชั่งสาร TPTZ ปริมาณ 31.2 mg ละลายด้วย 40 mM HCl แล้วปรับปริมาตรจนครบ 10 mL จะได้สารละลาย 10 mM TPTZ

- ผสมสารละลาย 3 ในอัตราส่วน 10:1:1 ตามลำดับ

- เตรียมสารละลาย 5 mM  $\text{FeSO}_4$  เพื่อใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานในช่วง 50-500  $\mu\text{M}$  โดยชั่ง  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ปริมาณ 69.5 mg ละลายด้วย 40 mM HCl แล้วปรับปริมาตรจนครบ 50 mL จากนั้นผสมสารละลาย acetate buffer,  $\text{FeSO}_4$  และ TPTZ ในอัตราส่วน 10:1:1 ตามลำดับ แล้วเจือจางด้วย acetate buffer เพื่อเตรียมความเข้มข้นให้แตกต่างกัน 5 ความเข้มข้น

- เตรียมสารละลาย Trolox (ความเข้มข้น 10 mg/mL) โดยชั่งสาร Trolox ปริมาณ 20 mg ละลายด้วย absolute ethanol ปริมาตร 2 mL

- เตรียมสารละลาย quercetin (ความเข้มข้น 10 mg/mL) โดยชั่งสาร quercetin ปริมาณ 20 mg ละลายด้วย absolute ethanol ปริมาตร 2 mL

- เตรียมสารละลายสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ 4 ตัวอย่าง (ความเข้มข้น 10 mg/mL) โดยชั่งสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ปริมาณ 20 mg ละลายด้วย absolute ethanol ปริมาตร 2 mL

#### การสร้างกราฟมาตรฐานของ $\text{FeSO}_4$

- เตรียมสารละลาย  $\text{FeSO}_4$  6 ความเข้มข้น ได้แก่ 26.0419, 52.0838, 104.1675, 150.0012, 208.335, 300  $\mu\text{g/mL}$

- ใส่สารละลาย  $\text{FeSO}_4$  ความเข้มข้นละ 200  $\mu\text{L}$  ลงใน 96-well plate

- วัดความสามารถการดูดกลืนแสงด้วย microplate reader ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงแต่ละตัวอย่างเป็นอิสระต่อกัน 3 ครั้ง แต่ละครั้งทดสอบ 3 ซ้ำ

- สร้างกราฟมาตรฐาน  $\text{FeSO}_4$  เพื่อใช้ในการหาปริมาณ  $\text{Fe}^{2+}$  ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจากข้าวไรซ์เบอร์รี่แต่ละตัวอย่าง
- เตรียมสารสกัดจากข้าวไรซ์เบอร์รี่ความเข้มข้น 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$
- ทำการทดสอบแต่ละตัวอย่างเป็นอิสระต่อกัน 3 ครั้ง แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ โดยชนิดของสารและปริมาณสารที่ใส่ในแต่ละหลุมแสดงในตารางที่ 7
- Incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 30 นาที
- วัดความสามารถการดูดกลืนแสงด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 595 nm นำค่าที่ได้ไปหา FRAP value จากกราฟมาตรฐาน และเปรียบเทียบค่า FRAP value กับสารมาตรฐาน quercetin ที่ความเข้มข้น 10  $\text{mg}/\text{mL}$

ตาราง 7 แสดงการใส่สารลงใน 96 well plate ในการทดสอบวิธี Ferric - reducing antioxidant power assay

การทดลอง \ สาร	FRAP reagent ( $\mu\text{L}$ )	นำปราชจากไฮออน ( $\mu\text{L}$ )	Absolute ethanol ( $\mu\text{L}$ )	Quercetin/ Trolox ( $\mu\text{L}$ )	Sample ( $\mu\text{L}$ )
Negative control	180	20	-	-	-
Solvent control	180	-	20	-	-
Sample	180	-	-	-	20
Blank sample	-	180	-	-	20
Positive control	180	-	-	20	-
Blank positive control	-	180	-	20	-

\*Positive control ใช้ quercetin

การหาค่า FRAP value ของสารตัวอย่าง

นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้แทนค่าในสมการเส้นตรงที่ได้จากสารมาตรฐาน  $\text{FeSO}_4$  จะได้ค่า FRAP value ของสารตัวอย่าง

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระกับ Trolox

หาค่า TEAC จากสมการ

$$\text{TEAC} = \frac{\text{FRAP value ของสารที่ต้องการเปรียบเทียบ}}{\text{FRAP value ของ trolox}}$$

### การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Superoxide anion scavenging activity assay

การเตรียมสาร

- เตรียมสารละลาย 50 mM Potassium phosphate buffer (pH 8.0) ที่ประกอบด้วยสารละลาย  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  และสารละลาย  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  โดยชั่ง  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ปริมาณ 4.0932 g และชั่ง  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ปริมาณ 0.2041 g ละลายแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 500 mL ด้วยน้ำปราศจากไอออน
  - เตรียมสารละลาย 50% ethanol ใน Potassium phosphate buffer โดยผสม absolute ethanol ปริมาตร 12 mL กับ potassium phosphate buffer ปริมาตร 28 mL
  - เตรียมสารละลาย 750  $\mu\text{M}$  NBT โดยชั่ง NBT ปริมาณ 9.1985 mg ละลายด้วย potassium phosphate buffer ปริมาตร 15 mL
  - เตรียมสารละลาย 1 mM EDTA โดยชั่ง EDTA ปริมาณ 4.38 mg ละลายด้วย potassium phosphate buffer ปริมาตร 15 mL
  - เตรียมสารละลาย 266  $\mu\text{M}$  Riboflavin โดยชั่ง riboflavin ปริมาณ 5 mg ละลายด้วย potassium phosphate buffer ปริมาตร 50 mL
  - เตรียมสารละลาย Trolox ความเข้มข้น 2 mg/mL โดยชั่ง Trolox ปริมาณ 4 mg ละลายด้วย 50% ethanol ใน potassium phosphate buffer ปริมาตร 2 mL
  - เตรียมสารละลาย quercetin ความเข้มข้น 1 mg/mL โดยชั่ง quercetin ปริมาณ 2 mg ละลายด้วย 50% ethanol ใน potassium phosphate buffer ปริมาตร 2 mL
  - เตรียมสารละลายสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ 4 ตัวอย่าง ความเข้มข้น 20 mg/mL โดยชั่งสารสกัด 40 mg ละลายด้วย 50% ethanol ใน potassium phosphate buffer ปริมาตร 2 mL
  - Incubate plate ภายใต้แสงสว่างของคอมไฟฟลูออเรสเซนส์ (ระยะห่างจากหลอดไฟในแนวราบ 3 cm และในแนวตั้ง 16 cm โดยหลอดไฟ 15 watt) ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที และทำ reference control โดย incubate plate ในที่มืดอุณหภูมิห้อง 10 นาที
  - วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร
- การสร้างกราฟมาตรฐานของ Trolox และ quercetin

- เตรียมสารละลาย Trolox ให้มีความเข้มข้นแตกต่างกัน 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 100, 120, 140, 160 และ 180  $\mu\text{g/mL}$

- เตรียมสารละลาย quercetin ให้มีความเข้มข้นแตกต่างกัน 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 20, 30, 40, 50 และ 60  $\mu\text{g/mL}$

- หา % inhibition ในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระของทั้งสารละลาย Trolox และสารละลาย quercetin โดยทำการทดสอบแต่ละตัวอย่างเป็นอิสระต่อกัน 3 ครั้ง แต่แต่ละครั้งทดสอบ 3 ซ้ำ

- นำค่า % inhibition ไปสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ของค่าความเข้มข้นของสาร Trolox และ quercetin กับค่าเฉลี่ยของ % inhibition ที่คำนวณได้และหาค่า  $IC_{50}$  จากสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟ

#### ทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

- เตรียมสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันตัวอย่างละ 5 ความเข้มข้น ดังนี้

สารสกัด A ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย Hexane ความเข้มข้น 13,333, 8,888, 5,926, 3,950 และ 2,633  $\mu\text{g/mL}$

สารสกัด B ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย Hexane ความเข้มข้น 20,000, 13,333, 8,888, 5,926, 3,950  $\mu\text{g/mL}$

สารสกัด C ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย Hexane ความเข้มข้น 20,000, 15,000, 11,250, 8,437 และ 6,328  $\mu\text{g/mL}$

สารสกัด D ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย Hexane ความเข้มข้น 15,000, 11,250, 8,437, 6,328 และ 4,218  $\mu\text{g/mL}$

สารสกัด A ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย absolute ethanol ความเข้มข้น 5,000, 2,500, 1,250, 625 และ 312  $\mu\text{g/mL}$

สารสกัด B ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย absolute ethanol ความเข้มข้น 10,000, 5,000, 2,500, 1,250 และ 625  $\mu\text{g/mL}$

สารสกัด C ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย absolute ethanol ความเข้มข้น 2,500, 1,250, 625, 312 และ 156  $\mu\text{g/mL}$

สารสกัด D ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย absolute ethanol ความเข้มข้น 10,000, 5,000, 2,500, 1,250 และ 625  $\mu\text{g/mL}$

สารสกัด A ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย H<sub>2</sub>O EtOH ความเข้มข้น 10,000, 5,000, 2,500, 1,250 และ 625 µg/mL

สารสกัด B ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย H<sub>2</sub>O ความเข้มข้น 5,000, 2,500, 1,250, 625 และ 312 µg/mL

สารสกัด C ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย H<sub>2</sub>O ความเข้มข้น 5,000, 2,500, 1,250, 625 และ 312 µg/mL

สารสกัด D ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย H<sub>2</sub>O ความเข้มข้น 5,000, 2,500, 1,250, 625 และ 312 µg/mL

- ทำการทดสอบแต่ละตัวอย่างเป็นอิสระต่อกัน 3 ครั้ง แต่จะครั้งทดสอบ 3 ซ้ำ และ ปริมาณสารที่ใส่แสดงในตารางที่ 8

ตาราง 8 แสดงการใส่สารลงใน 96 well plate วิธี Superoxide anion scavenging activity assay

การทดลอง	สาร Potassium phosphate buffer (µL)	EDTA (µL)	Riboflavin (µL)	NBT (µL)	Quercetin/Trolox (µL)	Sample (µL)
Negative control	60	20	100	20	-	-
Sample	20	20	100	20	-	40
Blank sample	120	20	-	20	-	40
Positive control	20	20	100	20	40	-
Blank positive control	120	20	-	20	40	-

\*การสร้างกราฟมาตรฐานใช้ sample คือ quercetin

การหา % inhibition ของสารตัวอย่าง

- หาจากสมการ

$$\% \text{ inhibition} = \frac{\text{Abs(negative)} - [\text{Abs(sample)} - \text{Abs(blank)}]}{\text{Abs(control)}} \times 100$$

เมื่อ Abs (negative) คือ ค่าการดูดกลืนแสงจากปฏิกิริยาควบคุมผลลบ (blue formazan)

Abs (sample) คือ ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาทดสอบ

Abs (blank) คือ ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาทดสอบเทียบ โดยต้องลบกับค่าการดูดกลืนแสงของ plate ที่เป็น reference ก่อน

หาค่า  $IC_{50}$  ของสารตัวอย่าง

- นำค่า % inhibition ไปสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ของค่าความเข้มข้นของสารสกัดและค่าเฉลี่ย % inhibition ที่ได้และหาค่า  $IC_{50}$  จากสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟ

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระกับ Trolox จากสมการ

$$TEAC = \frac{IC_{50} \text{ ของ Trolox}}{IC_{50} \text{ ของสารที่ต้องการเปรียบเทียบ}}$$

### การศึกษาความสัมพันธ์ของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกับปริมาณสารฟีนอลิก สารฟลาโวนอยด์ และสารแอนโทไซยานิน

นำค่า % inhibition จากการทดสอบในแบบจำลอง Ferric-reducing antioxidant power assay มาเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกับปริมาณสารฟีนอลิก สารฟลาโวนอยด์ และสารแอนโทไซยานิน โดยใช้สถิติ Pearson correlation ซึ่งพิจารณาจากค่า correlation เข้าใกล้ 1 และ significant level น้อยกว่า 0.05 อธิบายว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ

นำค่า % inhibition ในแบบจำลอง Superoxide anion scavenging activity assay มาเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่อปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และสารแอนโทไซยานิน โดยใช้สถิติ Pearson correlation ซึ่งพิจารณาจากค่า correlation เข้าใกล้ 1 และ significant level น้อยกว่า 0.05

### การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่ได้แสดงในรูปค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน และทำการทดลองละ 3 ครั้ง คำนวณหา  $IC_{50}$  ของการยับยั้งโดยการวิเคราะห์แบบถดถอย ข้อมูลการทดลองที่ได้นำมาวิเคราะห์โดยคำนวณจากค่าเฉลี่ยที่ได้จากข้อมูลของแต่ละการทดลอง โดยเปรียบเทียบแบบ One-Way Analysis of Variance (ANOVA) (SPSS ver.23)

## บทที่ 4 ผลการดำเนินงานวิจัย

### 1. การสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่

ลักษณะข้าวไรซ์เบอร์รี่จากตลาดที่ประชาชนทั่วไปหาซื้อกันได้จำนวน 4 ตัวอย่าง เก็บตัวอย่าง พ.ศ.2563 เมล็ดข้าวไรซ์เบอร์รี่มีลักษณะผิวมันวาว เมล็ดเรียวยาว มีสีม่วงเข้ม แสดงผลภาพประกอบ 5



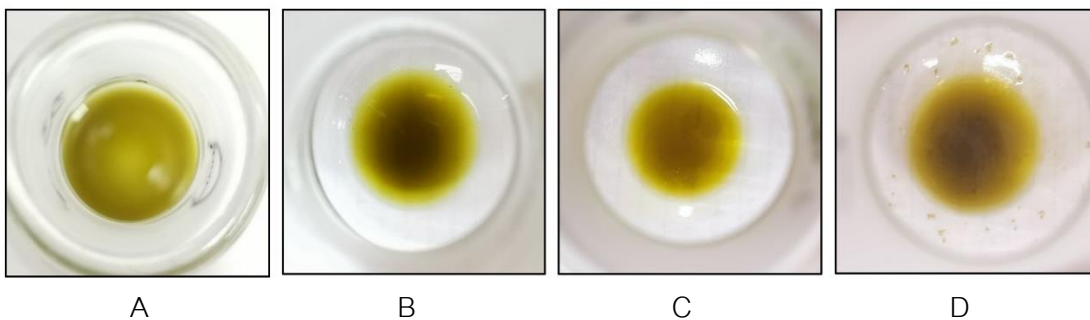
ภาพประกอบ 5 แสดงตัวอย่างข้าวไรซ์เบอร์รี่ จำนวน 4 ตัวอย่าง ประกอบด้วย A คือข้าวไรซ์เบอร์รี่ตราเทสโกโลดส์, B คือข้าวกล้องไรซ์เบอร์รี่ตรากรีนนิช, C คือข้าวไรซ์เบอร์รี่จากตลาดไท, D คือข้าวไรซ์เบอร์รี่ตราหงษ์ทองไลฟ์

เมื่อทำการสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่จนได้สารสกัดหยาบ (crude extract) จากนั้นซึ่งดูน้ำหนักสารสกัดหยาบและนำไปคำนวณหาผลผลิตร้อยละ (% yield) ของสารสกัด A, B, C และ D แสดงผลดังตารางที่ 9 และภาพประกอบ 9

เมื่อสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย hexane สารที่สกัดได้มีลักษณะเป็นของเหลวคล้ายน้ำมัน สารละลายขุ่นมีสีเหลืองเขียว ผลผลิตร้อยละของสารสกัด A, B, C และ D ที่ได้อยู่ในช่วง 3.79 - 8.24 โดยตัวอย่างสารสกัด B ให้ผลผลิตร้อยละปริมาณสูงที่สุดเท่ากับ 8.24 รองลงมาคือตัวอย่างสารสกัด D ให้ผลผลิตร้อยละเท่ากับ 6.94 รองลงมาคือตัวอย่างสารสกัด A ให้ผลผลิตร้อยละเท่ากับ 5.49 และตัวอย่างสารสกัด C ให้ผลผลิตร้อยละปริมาณน้อยที่สุดเท่ากับ 3.79 แสดงผลดังภาพประกอบ 6

เมื่อสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย absolute ethanol สารที่สกัดได้มีลักษณะเป็นของเหลวขุ่นและเหนียว มีสีแดงถึงม่วงเข้ม ผลผลิตร้อยละของสารสกัด A, B, C และ D ที่ได้อยู่ในช่วง 1.89 - 4.79 โดยตัวอย่างสารสกัด B ให้ผลผลิตร้อยละปริมาณสูงที่สุดเท่ากับ 4.79 รองลงมาคือตัวอย่างสารสกัด A ให้ผลผลิตร้อยละเท่ากับ 3.89 รองลงมาคือตัวอย่างสารสกัด D ให้ผลผลิตร้อยละเท่ากับ 3.29 และตัวอย่างสารสกัด C ให้ผลผลิตร้อยละปริมาณน้อยที่สุดเท่ากับ 1.89 แสดงผลดังภาพประกอบ 7

เมื่อสกัดโดยใช้ตัวทำละลายน้ำสารที่สกัดได้มีลักษณะเป็นผงแห้ง มีสีม่วงถึงดำ ผลผลิตร้อยละของสารสกัด A, B, C และ D ที่ได้อยู่ในช่วง 3.24 - 10.39 โดยสารสกัด A ให้ผลผลิตร้อยละปริมาณสูงที่สุดเท่ากับ 10.39 รองลงมาคือตัวอย่างสารสกัด B ให้ผลผลิตร้อยละเท่ากับ 5.59 รองลงมาคือตัวอย่างสารสกัด D ให้ผลผลิตร้อยละเท่ากับ 4.74 และสารสกัด C ให้ผลผลิตร้อยละปริมาณน้อยที่สุดเท่ากับ 3.24 แสดงผลดังภาพประกอบ 8



ภาพประกอบ 6 ลักษณะของสารสกัด A – D ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย hexane



A

B

C

D

ภาพประกอบ 7 ลักษณะของสารสกัด A – D ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย absolute ethanol



A

B

C

D

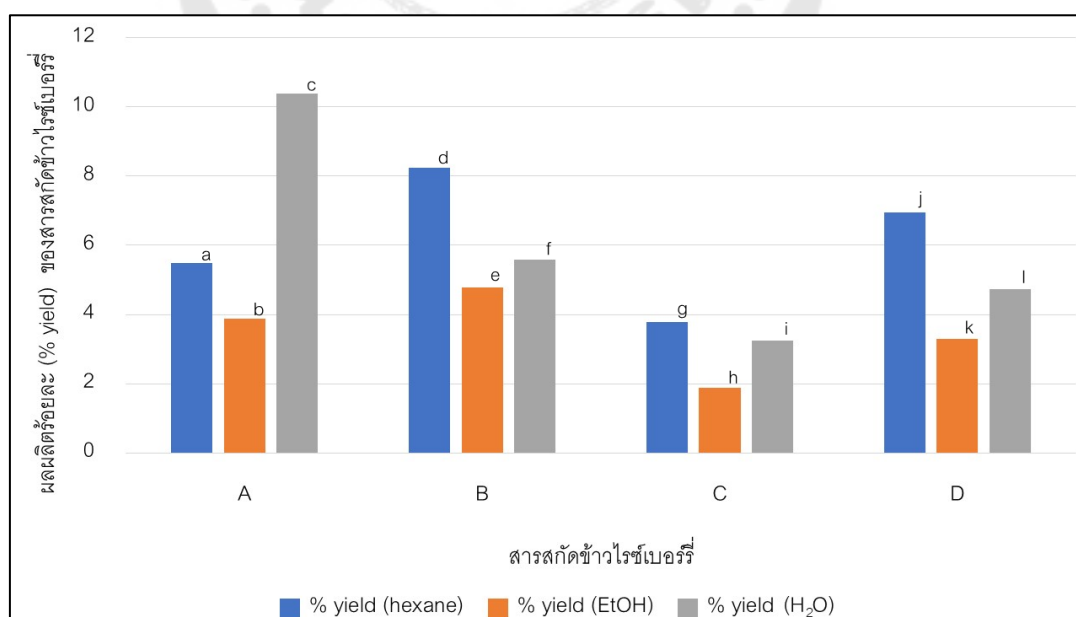
ภาพประกอบ 8 ลักษณะของสารสกัด A – D ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย H<sub>2</sub>O

เมื่อเปรียบเทียบผลผลิตร้อยละของสารสกัด A, B, C และ D พบว่าตัวทำละลายที่ใช้สกัดสารในแต่ละตัวอย่างให้ผลผลิตร้อยละที่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 และเมื่อเปรียบเทียบผลผลิตร้อยละของสารสกัด A, B, C และ D พบว่าตัวอย่างแต่ละชนิดให้ผลผลิตร้อยละที่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ตาราง 9 แสดงค่าผลผลิตร้อยละของสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ A - D

ตัวอย่าง	น้ำหนักที่ใช้สกัด	ตัวทำละลาย	ลักษณะของสารสกัด	crude extract	% yield
A	20.0173 g	Hexane	ของเหลวสีเหลืองเขียว	1.1 g	5.49 <sup>a</sup>
		EtOH	ของเหลวสีแดงม่วงเข้ม	0.78	3.89 <sup>b</sup>
		H <sub>2</sub> O	ของแข็งสีม่วงดำเข้ม	2.08	10.39 <sup>c</sup>
B	20.0104 g	Hexane	ของเหลวสีเหลืองเขียวเข้ม	1.65	8.24 <sup>d</sup>
		EtOH	ของเหลวสีแดงม่วงเข้ม	0.96	4.79 <sup>e</sup>
		H <sub>2</sub> O	ของแข็งสีม่วงดำ	1.12	5.59 <sup>f</sup>
C	20.0200 g	Hexane	ของเหลวสีเหลืองเขียว	0.76	3.79 <sup>g</sup>
		EtOH	ของเหลวสีแดงม่วง	0.38	1.89 <sup>h</sup>
		H <sub>2</sub> O	ของแข็งสีม่วงดำ	0.65	3.24 <sup>i</sup>
D	20.0199 g	Hexane	ของเหลวสีเหลืองเขียว	1.39	6.94 <sup>j</sup>
		EtOH	ของเหลวสีแดงม่วง	0.66	3.29 <sup>k</sup>
		H <sub>2</sub> O	ของแข็งสีม่วงดำ	0.95	4.74 <sup>l</sup>

<sup>a-l</sup> The different letters in column indicate the significant difference at  $p < 0.05$

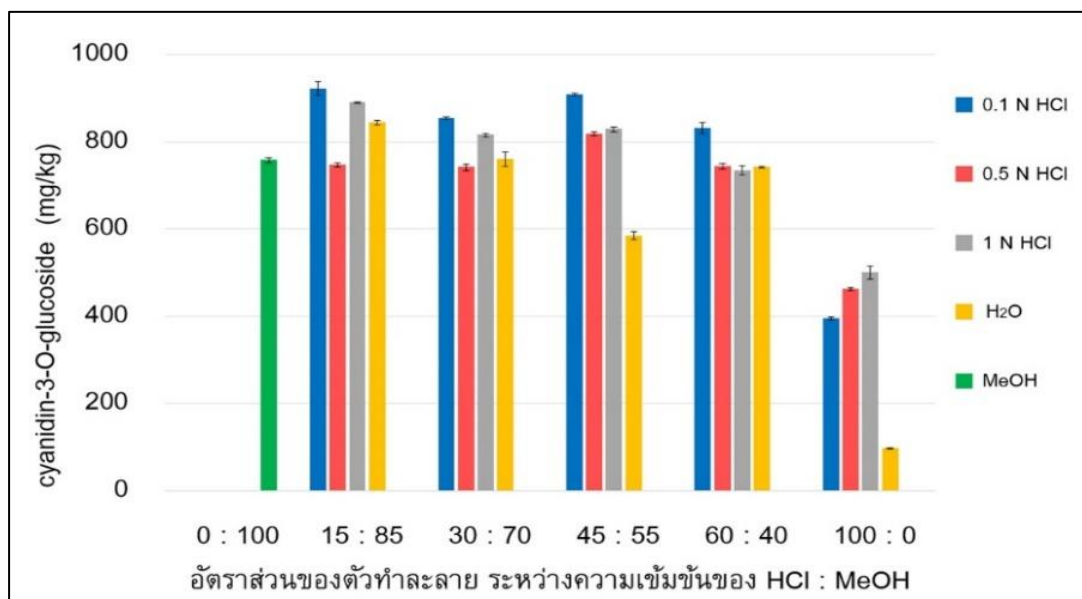


ภาพประกอบ 9 แสดงผลของการสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ A - D ด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด

(<sup>a-l</sup> The different letters in column indicate the significant difference at  $p < 0.05$ )

## 2. ผลการศึกษาอัตราส่วนของตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่เพื่อตรวจหาปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside ของข้าวไรซ์เบอร์รี่ในประเทศไทย

### 2.1 ศึกษาความเข้มข้นของ HCl ที่ใช้ในการสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่เพื่อตรวจหาปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside



ภาพประกอบ 10 แสดงผลของตัวทำละลายต่อประสิทธิภาพในการสกัด cyanidin-3-O-glucoside จากข้าวไรซ์เบอร์รี่

ในการศึกษาปัจจัยของตัวทำละลาย ได้แก่ HCl ความเข้มข้นต่าง ๆ MeOH และน้ำ ต่อปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside จากสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่ทำการสกัดด้วยวิธี sonication ผลการทดลองแสดงในตาราง 10 เป็นค่าที่ได้จากการคำนวณหาปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside จากการนำค่าพื้นที่ใต้กราฟที่ได้แทนค่าในสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน  $y = 69.408x + 1.4179$  พบว่าการสกัดด้วย HCl ความเข้มข้นต่าง ๆ ให้ปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 เมื่อใช้ HCl เป็นตัวทำละลายเพียงชนิดเดียว พบปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside อยู่ในช่วง 0.39442 - 0.49978 กรัมต่อกิโลกรัม โดยความเข้มข้นของ HCl ที่ให้ปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside มากที่สุดอยู่ที่ 1N HCl รองลงมาคือ 0.5N HCl และ 0.1N HCl ให้ปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside น้อยที่สุด ในขณะที่การศึกษปัจจัยการสกัดจากตัวทำละลายผสมระหว่าง HCl กับ MeOH พบว่าในสารละลายผสมความเข้มข้น 0.1N HCl : MeOH พบปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside อยู่ในช่วง 0.83127 - 0.92210 กรัมต่อกิโลกรัม ขณะที่

ความเข้มข้น 0.5N HCl : MeOH พบปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside อยู่ในช่วง 0.74105 - 0.81823 กรัมต่อกิโลกรัม และที่ความเข้มข้น 1.0N HCl : MeOH พบปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside อยู่ในช่วง 0.73391 - 0.89040 กรัมต่อกิโลกรัม และเมื่อไม่ใช้ HCl ในการสกัดโดยใช้ H<sub>2</sub>O : MeOH พบปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside อยู่ในช่วง 0.58453 - 0.84379 กรัมต่อกิโลกรัม และเมื่อใช้ MeOH ในการสกัดเพียงชนิดเดียวพบปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside เท่ากับ 0.75769 กรัมต่อกิโลกรัม และการใช้น้ำสกัดเพียงชนิดเดียวพบปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside เท่ากับ 0.09657 กรัมต่อกิโลกรัม ผลของการสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่เมื่อนำเสนอเป็นกราฟ ดังแสดงในภาพประกอบ 10 พบว่าเมื่อใช้ตัวทำละลาย H<sub>2</sub>O เพียงชนิดเดียวก็ช่วยสกัดสารออกมาได้ แต่ยังได้ปริมาณน้อย และเมื่อใช้ตัวทำละลาย HCl หรือ MeOH เพียงชนิดเดียวก็พบว่าสามารถสกัด cyanidin-3-O-glucoside ออกมาได้ปริมาณมากกว่าการใช้ H<sub>2</sub>O สกัดเพียงชนิดเดียว แต่เมื่อใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง HCl กับ MeOH พบว่าสามารถสกัด cyanidin-3-O-glucoside ออกมาได้ปริมาณมากกว่าการใช้ตัวทำละลายเพียงชนิดเดียว อีกทั้งการใช้เทคนิคอัลตราโซนิกในการสกัดช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัด cyanidin-3-O-glucoside จากข้าวไรซ์เบอร์รี่ออกมาได้ปริมาณสูงขึ้น

จากการวิเคราะห์นำปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside มาเปรียบเทียบกับในสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ โดยเปรียบเทียบอัตราส่วนของ MeOH ต่อปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside พบว่าสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย HCl (0%MeOH) เพียงชนิดเดียวให้ปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside ที่แตกต่างจากการสกัดด้วยตัวทำละลาย 40, 55, 70, 85 และ 100 %MeOH อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 เมื่อสกัดโดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง HCl กับ MeOH มีปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside ที่ไม่แตกต่างกัน แสดงผลดังตารางที่ 11

ตาราง 10 แสดงผลการวิเคราะห์หาปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside จากข้าวไรซ์เบอร์รี่

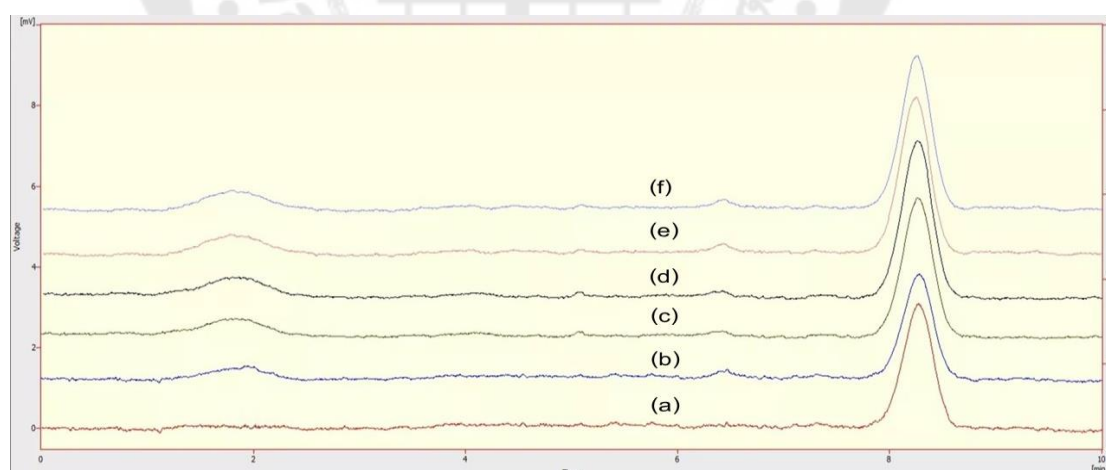
ลำดับการ ทดลอง	ปัจจัยที่ศึกษา		ปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside (g/kg) (mean $\pm$ SD)
	ความเข้มข้น	อัตราส่วน	
	ของ HCl	ของ MeOH	
1	0.1N HCl	-	0.39442 $\pm$ 0.0387
2	0.5N HCl	-	0.46200 $\pm$ 0.0027
3	1N HCl	-	0.49978 $\pm$ 0.0146
4	0.1N HCl	40	0.83127 $\pm$ 0.0119
5	0.1N HCl	55	0.90878 $\pm$ 0.0019
6	0.1N HCl	70	0.85446 $\pm$ 0.0020
7	0.1N HCl	85	0.92210 $\pm$ 0.0158
8	0.5N HCl	40	0.74360 $\pm$ 0.0066e
9	0.5N HCl	55	0.81823 $\pm$ 0.0046
10	0.5N HCl	70	0.74105 $\pm$ 0.0080
11	0.5N HCl	85	0.74669 $\pm$ 0.0051
12	1N HCl	40	0.73391 $\pm$ 0.0107
13	1N HCl	55	0.82860 $\pm$ 0.0060
14	1N HCl	70	0.81523 $\pm$ 0.0042
15	1N HCl	85	0.89040 $\pm$ 0.0019
16	0.00 (H <sub>2</sub> O)	-	0.09657 $\pm$ 0.0016
17	0.00 (H <sub>2</sub> O)	40	0.74208 $\pm$ 0.0016
18	0.00 (H <sub>2</sub> O)	55	0.58453 $\pm$ 0.0097
19	0.00 (H <sub>2</sub> O)	70	0.75994 $\pm$ 0.0163
20	0.00 (H <sub>2</sub> O)	85	0.84379 $\pm$ 0.0053
21 - 24	0 - 1N HCl	100	0.75769 $\pm$ 0.0063

ตาราง 11 แสดงการเปรียบเทียบเทียบอัตราส่วนของ MeOH ต่อปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside ในสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่

คู่เปรียบเทียบ อัตราส่วนของ MeOH	Mean Difference	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
100%HCl•40%MeOH	- 0.3995*	0.0728	0.000	- 0.553	- 0.247
100%HCl•55%MeOH	- 0.4218*	0.0728	0.000	- 0.575	- 0.269
100%HCl•70%MeOH	- 0.4295*	0.0728	0.000	- 0.582	- 0.276
100%HCl•85%MeOH	- 0.4876*	0.0728	0.000	- 0.641	- 0.335
100%HCl•100%MeOH	- 0.3945*	0.0728	0.000	- 0.547	- 0.241

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

## 2.2 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside ในสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ด้วยเทคนิค HPLC



ภาพประกอบ 11 แสดงโครมาโตแกรมของ cyanidin-3-O-glucoside (a) สารมาตรฐาน cyanidin-3-O-glucoside (b) สกัดด้วยน้ำ, (c) สกัดด้วย 1.0N HCl, (d) สกัดด้วย 0.5N HCl, (e) สกัดด้วย 0.1N HCl และ (f) สกัดด้วย MeOH

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside ในสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่โดยใช้เทคนิค HPLC พบว่าลักษณะ chromatogram ของสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ขึ้นที่เวลาเดียวกันกับสารมาตรฐาน cyanidin-3-O-glucoside ที่เวลา 8.28 นาที ดังแสดงในภาพที่ 11 (b-f) แสดงได้ว่ามีปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside เป็นองค์ประกอบ

### 2.3 การศึกษาความสัมพันธ์ของความเข้มข้น HCl และอัตราส่วนของ MeOH

ความเข้มข้นของ HCl และอัตราส่วนของ MeOH พบว่าเมื่อใช้ HCl ในการสกัดเพียงชนิดเดียวพบว่าไม่มีอิทธิพลต่อปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside ในขณะที่ใช้ MeOH ในการสกัดเพียงชนิดเดียวพบว่าไม่มีอิทธิพลต่อปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside แต่เมื่อสกัดด้วยสารละลายผสมระหว่าง HCl และ MeOH พบว่ามีอิทธิพลต่อปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside ที่อัตราส่วน 15 : 85 ของ 0.1N HCl : MeOH แต่อย่างไรก็ตามการเพิ่มความเข้มข้นของ HCl ร่วมกับการลดอัตราส่วนของ MeOH ในการสกัดมากกว่านี้ไม่ได้ช่วยเพิ่มปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside

### 3. ผลการทดสอบความเหมาะสมของระบบ (system suitability)

ความเหมาะสมของระบบที่ใช้ในการแยกสารดัดแปลงมาจากวิธีของ Hiemori et al. (2009) ในการวิเคราะห์ปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside จำเป็นต้องเลือกใช้ชนิดของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ เนื่องจากเฟสเคลื่อนที่เป็นปัจจัยหนึ่งที่สามารถพาสารที่ต้องการวิเคราะห์ออกจากคอลัมน์เพื่อทำให้เกิดการแยกได้ โดยพิจารณาจากค่าพารามิเตอร์ตามเกณฑ์มาตรฐานการยอมรับของ US FDA guideline ได้แก่ Tailing factor (T)  $\leq 2$ , Number of theoretical plate (N)  $> 2000$ , Resolution (Rs)  $> 2$  (Research & Administration, 1994) และเวลาในการวิเคราะห์ที่น้อย เพื่อศึกษาความเหมาะสมของระบบโดยวิเคราะห์จากผลการฉีดสารละลายมาตรฐานทำซ้ำ 6 ครั้ง ผลแสดงในตาราง 12

ตาราง 12 แสดงผลการทดสอบความเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ของ cyanidin-3-O-glucoside

Parameter	cyanidin-3-O-glucoside (mean $\pm$ %RSD)
theoretical plate	2041.6667 $\pm$ 3.09
Tailing factor	0.8885 $\pm$ 2.01
Resolution	-
Peak area	24.2463 $\pm$ 1.48

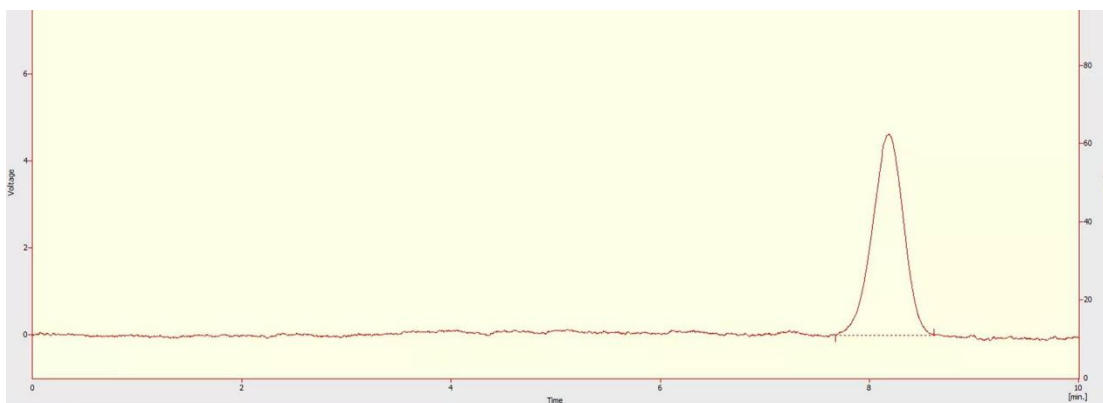
ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC เวลาที่สารมาตรฐาน cyanidin-3-O-glucoside ถูกแยกออกมาที่เวลา 8.28 นาที มีค่า Tailing factor ของพีค cyanidin-3-O-glucoside มีค่าเท่ากับ  $0.8885 \pm 2.01$  เป็นค่าที่ยอมรับได้โดย Tailing factor  $\leq 2$  อีกทั้งการแยกของคอลัมน์มีค่าเท่ากับ  $2041.6667 \pm 3.09$  ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับได้คือ theoretical plate มากกว่า 2000 และค่าความแม่นยำของการวิเคราะห์ซ้ำ (Peak area) มีค่า %RSD ซึ่งไม่เกิน 2 จากผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าระบบเครื่องมือมีความเหมาะสมในการวิเคราะห์สาร cyanidin-3-O-glucoside

#### 4. ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

เมื่อการพัฒนาวิธีวิเคราะห์แล้วเสร็จ ก่อนนำวิธีที่พัฒนาขึ้นมาใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างจริง ต้องผ่านการตรวจสอบความถูกต้อง แม่นยำ คงทน เพื่อให้เกิดความมั่นใจว่าวิธีวิเคราะห์ให้ผลที่ถูกต้อง มีความเหมาะสมสามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างจริงได้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษา Method validation ซึ่งเป็นกระบวนการยืนยันความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้นโดยมี Guideline ในการทำ Method validation ที่ได้รับการยอมรับจากทั่วโลกได้แก่ AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals ฉบับปี 2012 จากผลการศึกษาพารามิเตอร์ที่สำคัญในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สามารถแสดงผลได้ดังการทดลองต่อไปนี้

##### 4.1 ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ (Specificity)

ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์เป็นความเฉพาะเจาะจงของการวัดเฉพาะสารที่ต้องการวิเคราะห์ โดยการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์สารมาตรฐาน cyanidin-3-O-glucoside เทียบกับสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ โดยพิจารณาจากค่า Retention time ของสารมาตรฐาน cyanidin-3-O-glucoside พบว่าค่า Retention time ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ถูกแยกออกมาที่เวลา 8.28 นาที โดยพีคไม่ถูกรบกวนการวิเคราะห์ด้วยสารอื่น ๆ แสดงในภาพประกอบ 12



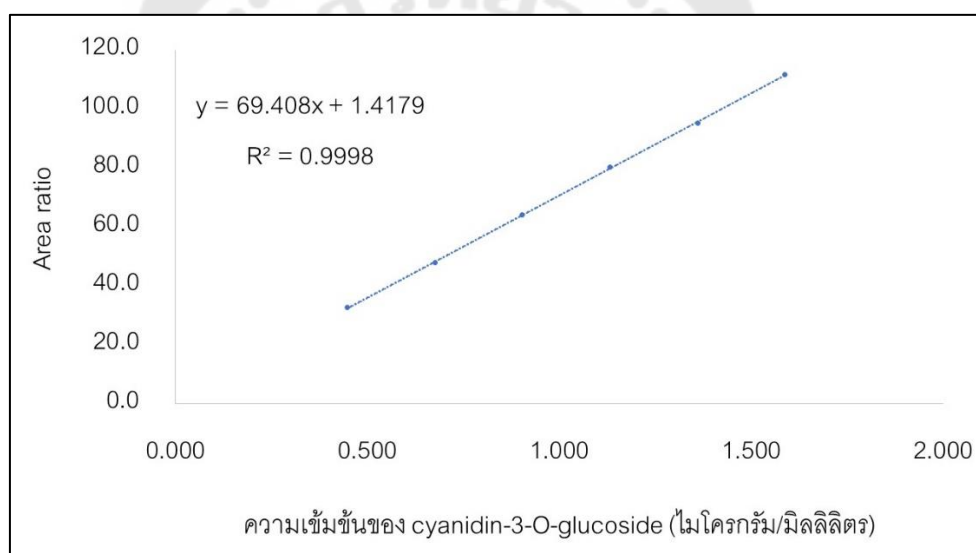
ภาพประกอบ 12 แสดงโครมาโตแกรมการวิเคราะห์สารมาตรฐาน cyanidin-3-O-glucoside

#### 4.2 การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity and Range)

ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารโดยทั่วไปนิยมใช้วิธีวิเคราะห์แบบ Internal standard โดยความเป็นเส้นตรงแสดงเป็นกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่าง Peak area ratio กับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน cyanidin-3-O-glucoside ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ขึ้นอยู่กับความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน เป็นค่าการถดถอยเชิงเส้น ( $R^2$ ) สามารถหาความเข้มข้นของตัวอย่างจากสมการที่ได้จากกราฟมาตรฐาน ผลของกราฟมาตรฐาน cyanidin-3-O-glucoside แสดงในตาราง 13, 14 และภาพประกอบ 13 ผลของช่วงความเข้มข้นความเป็นเส้นตรงกราฟมาตรฐาน อยู่ในช่วง 0.4 -1.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของสารมาตรฐาน cyanidin-3-O-glucoside พบว่า ความเข้มข้นดังกล่าวมีสมการเชิงเส้นเฉลี่ยคือ  $y = 69.408x + 1.418$  และมีค่าถดถอยเชิงเส้น (coefficient of determination) เท่ากับ 0.9998 ซึ่งเมื่อคำนวณ % recovery มีค่าอยู่ในช่วง 99.11 - 100.89 % ผ่านตามเกณฑ์การยอมรับของ AOAC (เกณฑ์คือควรมากกว่า 0.995 ของ correlation coefficient ของ regression line และความเข้มข้นแต่ละจุดของกราฟมาตรฐานต้องให้ค่า % recovery อยู่ในช่วง 92 – 105)

ตาราง 13 แสดงผลของกราฟมาตรฐาน cyanidin-3-O-glucoside (n=3) ( $\mu\text{g/mL}$ )

ความเข้มข้น	ความเข้มข้นที่วิเคราะห์	% Recovery	Area ratio (Mean $\pm$ SD)
0.448	0.452	100.89	32.784 $\pm$ 2.01
0.676	0.670	99.11	47.925 $\pm$ 1.75
0.904	0.904	100.09	64.224 $\pm$ 1.51
1.132	1.136	100.36	80.273 $\pm$ 1.38
1.36	1.353	99.51	95.349 $\pm$ 2.11
1.588	1.592	100.24	111.894 $\pm$ 2.43



ภาพประกอบ 13 กราฟแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน cyanidin-3-O-glucoside (n=3) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm

ตาราง 14 แสดงสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานและค่า  $R^2$  (n=3)

Linearity	Equation of standard curve	Coefficient of Determination ( $R^2$ )
Linearity 1	$y = 68.026x + 3.9077$	0.9997
Linearity 2	$y = 70.395x + 1.1875$	0.9999
Linearity 3	$y = 69.802x - 0.8413$	0.9997
Mean	$y = 69.408x + 1.4179$	0.9998

#### 4.3 การหาความเข้มข้นที่ต่ำสุดที่สามารถตรวจพบและความเข้มข้นที่ต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ในเชิงปริมาณ (Limit of detection, LOD and Limit of quantitation, LOQ)

ผลการศึกษาหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบและความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ในเชิงปริมาณแสดงในตาราง 15

การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (Limit of detection, LOD) ของ cyanidin-3-O-glucoside ที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณสามารถศึกษาได้จากสูตรการประมาณค่า  $LOD = 3.3\sigma / S$  โดย  $\sigma$  แทนค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของสัญญาณ และ S แทน slope ของกราฟมาตรฐาน วิเคราะห์แล้วพบว่า LOD มีค่าเท่ากับ 0.1030  $\mu\text{g/mL}$

การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ) ของ cyanidin-3-O-glucoside ที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณสามารถศึกษาได้จากสูตรการประมาณค่า  $LOQ = 10\sigma / S$  โดย  $\sigma$  แทนค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของสัญญาณ และ S แทน slope ของกราฟมาตรฐาน วิเคราะห์แล้วพบว่า LOQ มีค่าเท่ากับ 0.3433  $\mu\text{g/mL}$

ตาราง 15 แสดงค่า Limit of detection และ Limit of Quantitation

Standard	S	$\sigma$	LOD ( $\mu\text{g/mL}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/mL}$ )
cyanidin-3-O-glucoside	69.4076	2.3828	0.1030	0.3433

#### 4.4 การทดสอบความถูกต้อง (Accuracy) และความแม่นยำ (Intra day precision)

ความถูกต้องในการวิเคราะห์ cyanidin-3-O-glucoside แสดงด้วยค่าร้อยละการกักเก็บคืน (%Recovery) โดยการเตรียมสารละลายมาตรฐาน cyanidin-3-O-glucoside จำนวน 3 ความเข้มข้น โดยวิเคราะห์ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ โดยเตรียมความเข้มข้น 0.562, 1.018 และ 1.474  $\mu\text{g/mL}$  ค่าเฉลี่ย % recovery มีค่าในช่วง 99.58 - 101.03 ซึ่งผ่านตามเกณฑ์การยอมรับ (เกณฑ์กำหนดว่าค่า % recovery ต้องอยู่ในช่วง 90-108%) และ %RSD ของ cyanidin-3-O-glucoside อยู่ในช่วง 1.11 – 1.66 ซึ่งมีค่า %RSD น้อยกว่า 3% ผ่านเกณฑ์ยอมรับของ AOAC ถือว่าการวิเคราะห์มีความแม่นยำ ดังแสดงตาราง 16

ตาราง 16 ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

ความเข้มข้น ( $\mu\text{g/mL}$ )	ร้อยละการกักเก็บคืน (%Recovery)				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	Mean $\pm$ SD	%RSD
0.562	98.70	98.99	101.04	99.58 $\pm$ 1.27	1.28
1.018	101.08	100.22	97.88	99.73 $\pm$ 1.66	1.66
1.474	102.20	100.91	99.96	101.03 $\pm$ 1.13	1.11

#### 4.5 การทดสอบความแม่นยำ (Inter day precision)

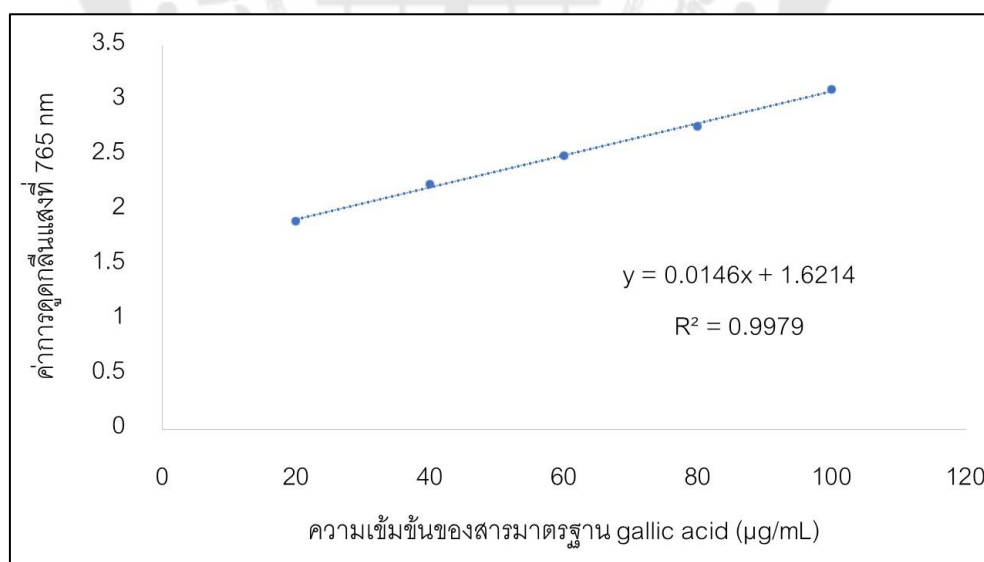
ความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ cyanidin-3-O-glucoside สำหรับการวิเคราะห์เป็นเวลา 3 วัน ที่ความเข้มข้นของ cyanidin-3-O-glucoside เท่ากับ 0.562, 0.018 และ 1.474  $\mu\text{g/mL}$  ผลการวิเคราะห์มีค่า % recovery อยู่ในช่วง 98.62 – 100.63 และ %RSD ของ cyanidin-3-O-glucoside อยู่ในช่วง 0.35 – 2.98 ซึ่งมีค่า %RSD < 6% ผ่านเกณฑ์ยอมรับของ AOAC ถือว่าความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์มีความแม่นยำ ดังแสดงในตาราง 17

ตาราง 17 แสดงค่า Inter day precision ของวิธีวิเคราะห์ cyanidin-3-O-glucoside

ความเข้มข้น ( $\mu\text{g/mL}$ )	ร้อยละการคืนกลับ (%Recovery)				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย ( $\pm\text{SD}$ )	%RSD
0.562	95.32	99.58	100.97	$98.62 \pm 2.95$	2.98
1.018	99.05	99.73	99.24	$99.34 \pm 0.35$	0.35
1.474	100.34	101.03	100.51	$100.63 \pm 0.36$	0.36

### 5. ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิกรวม (Total phenolic content)

การวิเคราะห์ใช้วิธี Folin-Ciocalteu Colorimetric โดยทำการทดสอบสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ A – D ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ที่แตกต่างกันทั้งหมดจำนวน 12 สารสกัดเทียบกับสารมาตรฐาน gallic acid ซึ่งเป็นสารกลุ่มฟีนอลิก โดย Folin-ciocalteu reagent จะเกิดปฏิกิริยากับสารทดสอบและสารมาตรฐานได้ในสภาวะเบส หลังจากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้ความยาวคลื่น 765 nm ทำซ้ำการทดลองละ 3 ครั้ง จากนั้นคำนวณหาปริมาณสารฟีนอลิก ดังแสดงในภาพประกอบ 14

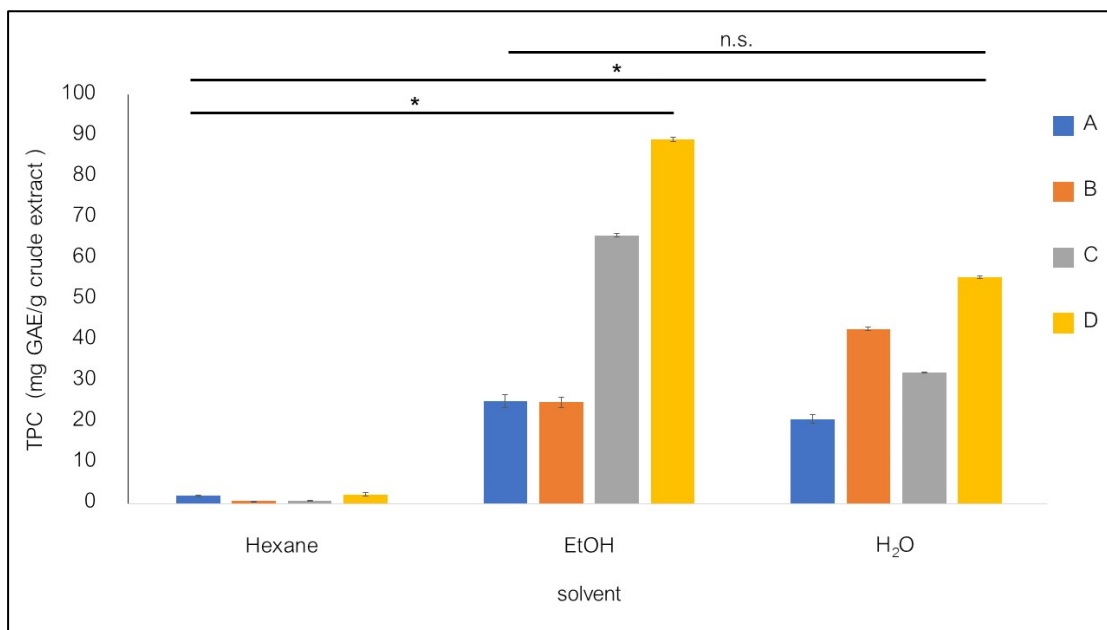


ภาพประกอบ 14 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของสารมาตรฐาน gallic acid

ตาราง 18 แสดงปริมาณ Total phenolic content จากสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่

ตัวอย่าง	ตัวทำละลาย	มิลลิกรัมสมมูลของ gallic acid ต่อกรัมของสารสกัด (mean $\pm$ SD) (mg GAE/g crude extract)
A	Hexane	1.83 $\pm$ 0.15
	EtOH	25.07 $\pm$ 1.62
	H <sub>2</sub> O	20.66 $\pm$ 1.03
B	Hexane	0.60 $\pm$ 0.02
	EtOH	24.74 $\pm$ 1.20
	H <sub>2</sub> O	42.72 $\pm$ 0.38
C	Hexane	0.65 $\pm$ 0.05
	EtOH	65.66 $\pm$ 0.38
	H <sub>2</sub> O	32.15 $\pm$ 0.10
D	Hexane	2.19 $\pm$ 0.39
	EtOH	89.17 $\pm$ 0.56
	H <sub>2</sub> O	55.39 $\pm$ 0.40

จากกราฟมาตรฐาน gallic acid สมการคือ  $y = 0.0146x + 1.6214$ ,  $R^2 = 0.9979$   
 คำนวณหา Total phenolic content จากสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ A - D พบว่ามีปริมาณอยู่ในช่วง  
 0.60 - 89.17 mg GAE/g crude extract แสดงผลดังตาราง 18 และภาพประกอบ 15



ภาพประกอบ 15 กราฟแสดงปริมาณสารฟีนอลิกรวม [ \* คือแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05, n.s. คือไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (no statistical significance)]

ผลการหา Total phenolic content ในสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ เมื่อใช้สารสกัด A - D ที่สกัดด้วย hexane พบปริมาณสารฟีนอลิกรวมอยู่ในช่วง 0.60 - 2.19 mg GAE/g crude extract โดยสารสกัด D ให้ปริมาณสารฟีนอลิกรวมสูงที่สุด  $2.19 \pm 0.39$  mg GAE/g crude extract และสารสกัด B ให้ปริมาณสารฟีนอลิกรวมน้อยที่สุด เท่ากับ  $0.60 \pm 0.02$  mg GAE/g crude extract

เมื่อใช้สารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่สกัดด้วย absolute ethanol พบปริมาณสารฟีนอลิกรวมอยู่ในช่วง 24.74 - 89.17 mg GAE/g crude extract โดยสารสกัด D ให้ปริมาณสารฟีนอลิกรวมสูงที่สุด  $89.17 \pm 0.56$  mg GAE/g crude extract และสารสกัด B ให้ปริมาณสารฟีนอลิกรวมน้อยที่สุด เท่ากับ  $24.74 \pm 1.20$  mg GAE/g crude extract

เมื่อใช้สารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่สกัดด้วย H<sub>2</sub>O พบปริมาณสารฟีนอลิกรวมอยู่ในช่วง 20.66 - 55.39 mg GAE/g crude extract โดยสารสกัด D ให้ปริมาณสารฟีนอลิกรวมสูงที่สุด  $55.39 \pm 0.40$  mg GAE/g crude extract และสารสกัด A ให้ปริมาณสารฟีนอลิกรวมน้อยที่สุด เท่ากับ  $20.66 \pm 1.03$  mg GAE/g crude extract

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกรวมจากสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ทั้ง 4 ตัวอย่าง พบว่าตัวอย่างสารสกัด D ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย absolute ethanol มีปริมาณสารฟีนอลิกรวมสูงที่สุด มีปริมาณเท่ากับ  $89.17 \pm 0.56$  mg GAE/g crude extract และตัวอย่าง B ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย hexane มีปริมาณสารฟีนอลิกรวมน้อยที่สุด มีปริมาณเท่ากับ  $0.60 \pm 0.02$  mg GAE/g crude extract

จากการวิเคราะห์นำปริมาณสารฟีนอลิกรวมมาเปรียบเทียบกันในสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ทั้ง 4 ตัวอย่าง พบว่าสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ 4 ตัวอย่างที่สกัดด้วย absolute ethanol ให้ปริมาณสารฟีนอลิกรวมที่แตกต่างจากสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ทั้ง 4 ตัวอย่างที่สกัดด้วยตัวทำละลาย hexane แต่ไม่แตกต่างจากการสกัดด้วยตัวทำละลาย  $H_2O$  อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 และสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ทั้ง 4 ตัวอย่างที่สกัดโดยใช้ตัวทำละลาย  $H_2O$  พบปริมาณสารฟลาโวนอยด์ที่แตกต่างจากข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย hexane อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 แสดงผลดังตารางที่ 19 และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารฟีนอลิกในสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่แต่ละตัวอย่าง A - D พบว่าแต่ละตัวอย่างให้ปริมาณสารฟีนอลิกรวมที่ไม่แตกต่างกัน

ตาราง 19 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณ Total phenolic content ของสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่แต่ละตัวทำละลายที่ใช้สกัด

คู่เปรียบเทียบตัว ทำละลาย	Mean Difference	Std. Error	Sig	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
hexane • EtOH	-49.84250*	15.90518	0.020	-88.7610	-10.9239
hexane • $H_2O$	-36.41250*	7.42339	0.016	-59.9572	-12.8677
EtOH • $H_2O$	13.43000	17.54283	0.484	-34.1873	61.0473

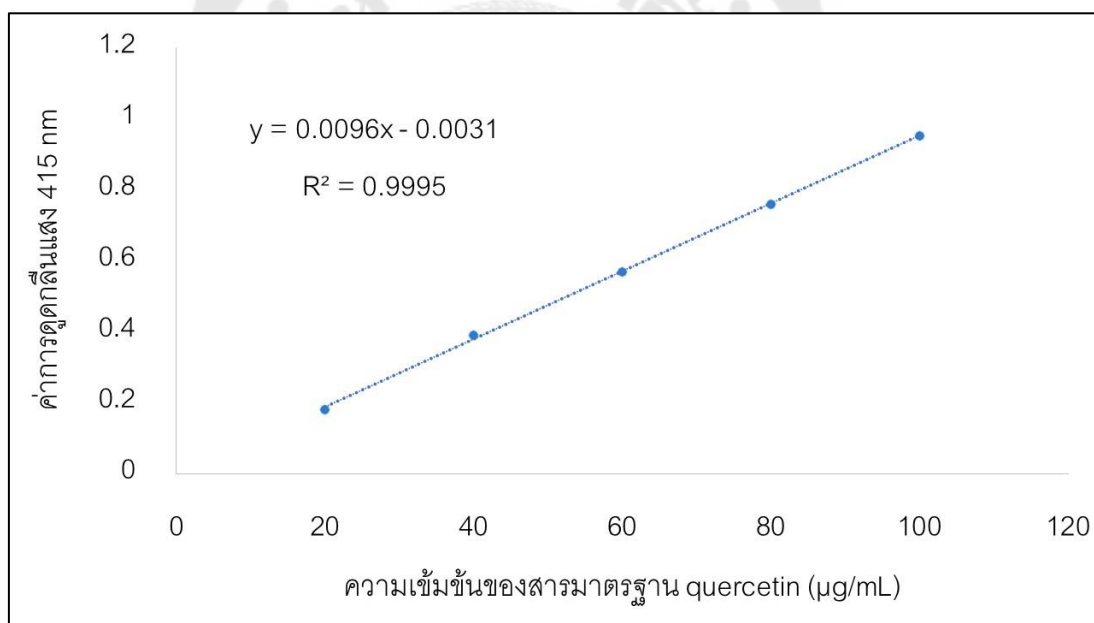
\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Independent Samples Test

## 6. การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม (Total flavonoid content)

การวิเคราะห์ทำโดยวิธี aluminium chloride method โดยทำการทดสอบซ้ำวไรซ์เบอร์รี่ที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกันทั้งหมด 12 สารสกัดเทียบกับสารมาตรฐาน quercetin ที่เป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ โดย aluminium chloride จะเกิดปฏิกิริยากับสารทดสอบและสารมาตรฐาน หลังจากนั้นนำมาวัดความสามารถดูดกลืนแสง ความยาวคลื่น 415 nm ทำซ้ำการทดลองละ 3 ครั้ง จากนั้นนำค่าที่ได้มาหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ ดังแสดงในภาพประกอบ 16

จากกราฟมาตรฐานของ quercetin ( $y = 0.0096x - 0.0031$ ,  $R^2 = 0.9995$ ) สามารถนำไปคำนวณหา Total flavonoid content ของสารสกัดหยาบซ้ำวไรซ์เบอร์รี่ทั้ง 4 ตัวอย่าง พบว่ามี Total flavonoid content ในช่วง 7.17 - 47.81 mg QE/g crude extract แสดงผลดังตาราง 20 และภาพประกอบ 17



ภาพประกอบ 16 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของสารมาตรฐาน quercetin

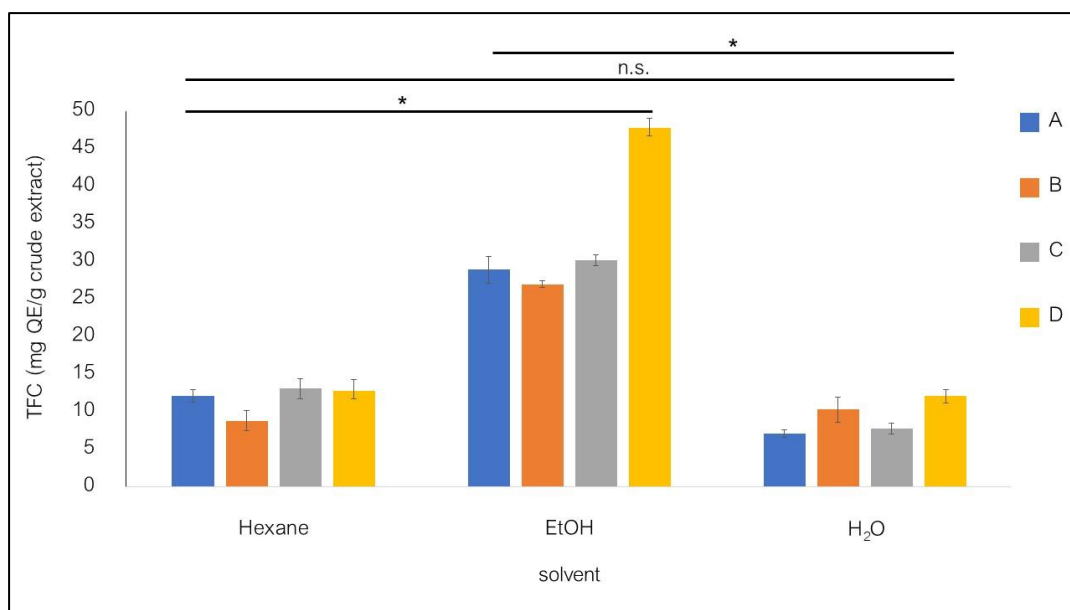
ตาราง 20 แสดงปริมาณ Total flavonoid content จากสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่

ตัวอย่าง	ตัวทำละลาย	มิลลิกรัมสมมูลของ quercetin ต่อกรัมของสารสกัด (mean $\pm$ SD) (mg QE/g crude extract)
A	Hexane	12.11 $\pm$ 0.82
	EtOH	28.97 $\pm$ 1.79
	H <sub>2</sub> O	7.17 $\pm$ 0.51
B	Hexane	8.85 $\pm$ 1.34
	EtOH	27.03 $\pm$ 0.49
	H <sub>2</sub> O	10.34 $\pm$ 1.70
C	Hexane	13.10 $\pm$ 1.37
	EtOH	30.21 $\pm$ 0.73
	H <sub>2</sub> O	7.78 $\pm$ 0.71
D	Hexane	12.80 $\pm$ 1.56
	EtOH	47.81 $\pm$ 1.26
	H <sub>2</sub> O	12.19 $\pm$ 0.78

ผลการหา Total flavonoid content ในสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ทั้ง 4 ตัวอย่าง เมื่อใช้สารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย hexane พบ Total flavonoid content อยู่ในช่วง 8.85 - 13.10 mg QE/g crude extract โดยสารสกัด C ให้ Total flavonoid content สูงที่สุด เท่ากับ 13.10  $\pm$  1.37 mg QE/g crude extract และสารสกัด B ให้ Total flavonoid content น้อยที่สุด เท่ากับ 8.85  $\pm$  1.34 mg QE/g crude extract

เมื่อใช้สารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย absolute ethanol พบปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมอยู่ในช่วง 27.03 - 47.81 mg QE/g crude extract โดยสารสกัด D ให้ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมสูงสุดเท่ากับ 47.81  $\pm$  1.26 mg QE/g crude extract และสารสกัด B ให้ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมน้อยที่สุด 27.03  $\pm$  0.49 mg QE/g crude extract

เมื่อใช้สารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย H<sub>2</sub>O พบปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมอยู่ในช่วง 7.17 - 12.19 mg QE/g crude extract โดยสารสกัด D ให้ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุด 12.19 ± 0.78 mg QE/g crude extract สารสกัด A ให้ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมน้อยที่สุด 7.17 ± 0.51 mg QE/g crude extract



ภาพประกอบ 17 กราฟแสดงปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม [ \* คือแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05, n.s. คือไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (no statistical significance)]

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมจากสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ทั้ง 4 ตัวอย่าง พบว่าตัวอย่างสารสกัด D ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย absolute ethanol พบปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุดมีปริมาณเท่ากับ 47.81 ± 1.26 mg QE/g crude extract และตัวอย่างสารสกัด A ที่สกัดด้วย H<sub>2</sub>O มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมน้อยที่สุดมีปริมาณเท่ากับ 7.17 ± 0.51 mg QE/g crude extract

การเปรียบเทียบปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมจากสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ทั้ง 4 ตัวอย่าง พบว่าสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ทั้ง 4 ตัวอย่างที่สกัดด้วย absolute ethanol มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์แตกต่างจากสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ทั้ง 4 ตัวอย่างที่สกัดด้วยตัวทำละลาย hexane และ H<sub>2</sub>O อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 แต่สารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ทั้ง 4 ตัวอย่าง

ที่สกัดด้วย H<sub>2</sub>O พบปริมาณสารฟลาโวนอยด์ไม่แตกต่างจากสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย hexane แสดงผลดังตารางที่ 21 และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่แต่ละตัวอย่าง พบว่าแต่ละตัวอย่าง A - D ให้ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมไม่แตกต่างกัน

ตาราง 21 แสดงการเปรียบเทียบ Total flavonoid content ในสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่

คู่เปรียบเทียบตัว ทำละลาย	Mean Difference	Std. Error	Sig	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
hexane • EtOH	-21.78775*	4.91034	0.018	-36.7643	-6.8111
hexane • H <sub>2</sub> O	2.34800	1.51907	0.175	-1.3964	6.0924
EtOH • H <sub>2</sub> O	24.13575*	4.95105	0.013	9.2702	39.0012

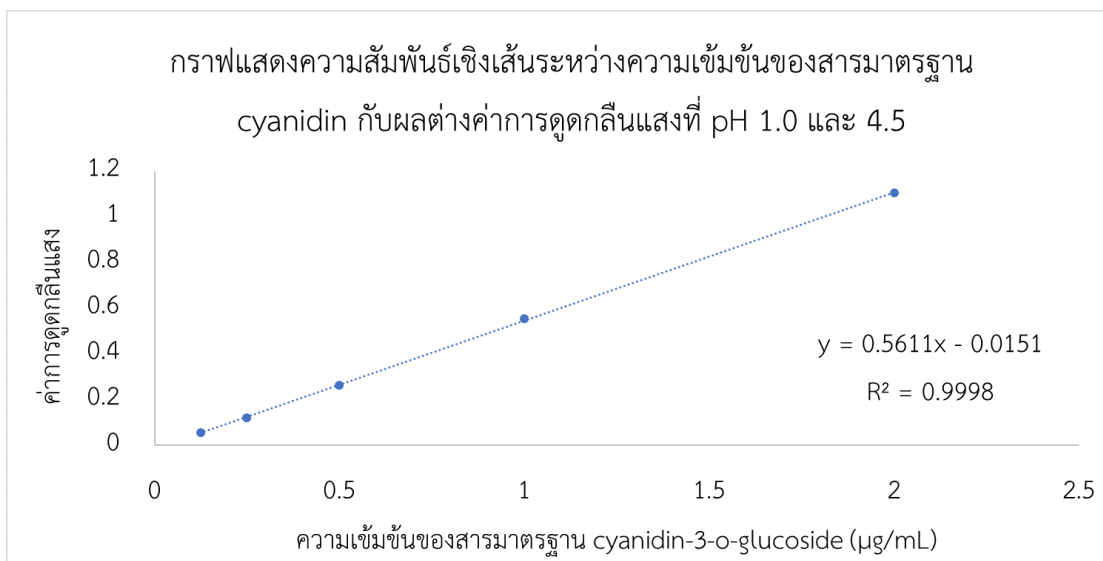
\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Independent Samples Test

## 7. การวิเคราะห์หาปริมาณแอนโทไซยานินรวม (Total anthocyanin content)

การวิเคราะห์ทำโดยวิธี pH-differential โดยทำการทดสอบสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกันทั้งหมด 12 สารสกัดเทียบกับสารมาตรฐาน cyanidin-3-O-glucoside หลังจากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 และ 700 nm ทำซ้ำการทดลองละ 3 ครั้ง จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาปริมาณแอนโทไซยานิน ดังแสดงในภาพประกอบ 18

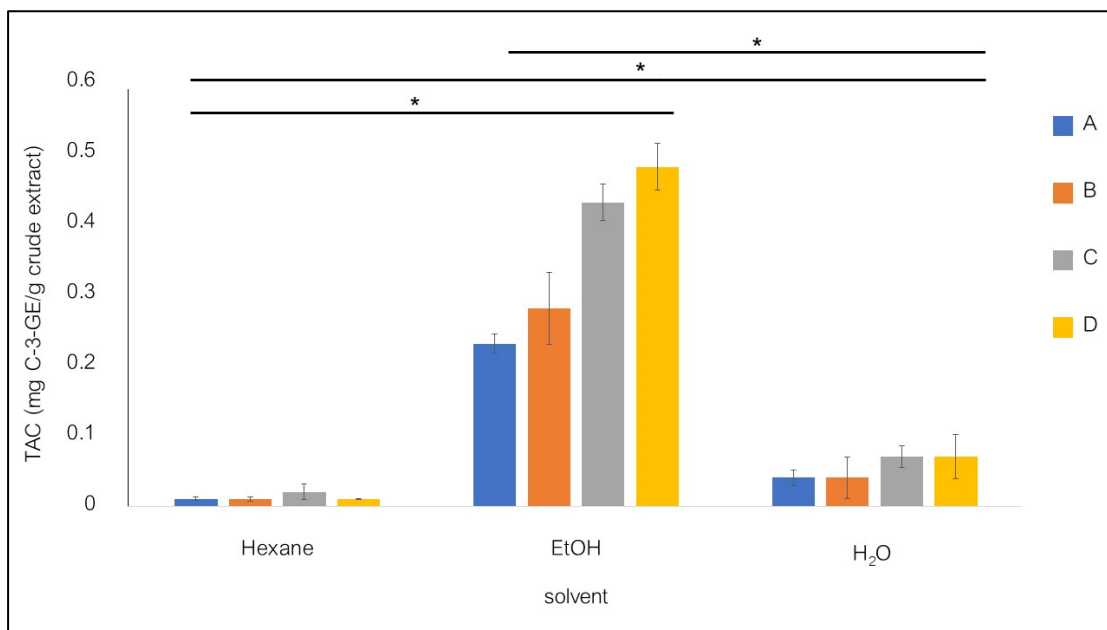
จากกราฟมาตรฐานของ cyanidin-3-O-glucoside ( $y = 0.5611x - 0.0151$ ,  $R^2 = 0.9998$ ) สามารถนำไปหาปริมาณสารแอนโทไซยานินรวมของสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ทั้ง 4 ตัวอย่าง พบว่ามี Total anthocyanin content ในช่วง 0.01 - 0.48 mg C-3-GE/g crude extract แสดงผลดังตารางที่ 22 และภาพที่ 19



ภาพประกอบ 18 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของสารมาตรฐาน cyanidin-3-O-glucoside

ตาราง 22 แสดงปริมาณ Total anthocyanin content จากสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่

ตัวอย่าง	ตัวทำละลาย	มิลลิกรัมสมมูลของ cyanidin-3-O-glucoside ต่อกรัมของสารสกัด (mean $\pm$ SD) (mg C-3-GE/g crude extract)
A	Hexane	0.01 $\pm$ 0.002
	EtOH	0.23 $\pm$ 0.014
	H <sub>2</sub> O	0.04 $\pm$ 0.011
B	Hexane	0.01 $\pm$ 0.003
	EtOH	0.28 $\pm$ 0.051
	H <sub>2</sub> O	0.04 $\pm$ 0.030
C	Hexane	0.02 $\pm$ 0.011
	EtOH	0.43 $\pm$ 0.026
	H <sub>2</sub> O	0.07 $\pm$ 0.015
D	Hexane	0.01 $\pm$ 0.001
	EtOH	0.48 $\pm$ 0.033
	H <sub>2</sub> O	0.07 $\pm$ 0.031



ภาพประกอบ 19 กราฟแสดงปริมาณสารแอนโทไซยานินรวม (\* คือแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05)

ผลการหาปริมาณสารแอนโทไซยานินรวมจากสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ทั้ง 4 ตัวอย่าง เมื่อใช้สารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่สกัดด้วย hexane พบปริมาณสารแอนโทไซยานินรวมอยู่ในช่วง 0.01 - 0.02 mg C-3-GE/g crude extract โดยสารสกัด C ให้ปริมาณสารแอนโทไซยานินรวมสูงสุดเท่ากับ  $0.02 \pm 0.011$  mg C-3-GE/g crude extract และสารสกัด D พบปริมาณสารแอนโทไซยานินรวมน้อยที่สุด  $0.01 \pm 0.001$  mg C-3-GE/g crude extract

เมื่อใช้สารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่สกัดด้วย absolute ethanol พบปริมาณสารแอนโทไซยานินรวมอยู่ในช่วง 0.23 - 0.48 mg C-3-GE/g crude extract โดยสารสกัด D ให้ปริมาณสารแอนโทไซยานินรวมสูงสุดเท่ากับ  $0.48 \pm 0.033$  mg C-3-GE/g crude extract และสารสกัด A พบปริมาณสารแอนโทไซยานินรวมน้อยที่สุด  $0.23 \pm 0.014$  mg C-3-GE/g crude extract

เมื่อใช้สารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่สกัดด้วย H<sub>2</sub>O พบปริมาณสารแอนโทไซยานินรวมอยู่ในช่วง 0.04 - 0.07 mg C-3-GE/g crude extract โดยสารสกัด C ให้ปริมาณสารแอนโทไซยานินรวมสูงสุดเท่ากับ  $0.07 \pm 0.015$  mg C-3-GE/g crude extract และสารสกัด A พบปริมาณสารแอนโทไซยานินรวมน้อยที่สุดเท่ากับ  $0.04 \pm 0.011$  mg C-3-GE/g crude extract

จากการวิเคราะห์หา Total anthocyanin content ในสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ทั้ง 4 ตัวอย่าง พบว่าตัวอย่างสารสกัด D ที่สกัดด้วย absolute ethanol มีปริมาณสารแอนโทไซยานินรวมสูงที่สุดมีปริมาณเท่ากับ  $0.48 \pm 0.033$  mg C-3-GE/g crude extract และตัวอย่างสารสกัด D สกัดด้วย hexane มีปริมาณสารแอนโทไซยานินรวมน้อยที่สุดมีปริมาณเท่ากับ  $0.01 \pm 0.001$  mg C-3-GE/g crude extract

การเปรียบเทียบ Total anthocyanin content ในสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ทั้ง 12 สารสกัด พบว่าสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ทั้ง 4 ตัวอย่างที่สกัดด้วยตัวทำละลาย absolute ethanol, hexane และ H<sub>2</sub>O พบปริมาณสารแอนโทไซยานินที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 แสดงผลดังตารางที่ 23 และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารแอนโทไซยานินรวมในสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่แต่ละตัวอย่าง พบว่าแต่ละตัวอย่าง A – D ให้ปริมาณสารแอนโทไซยานินรวมที่ไม่แตกต่างกัน

ตาราง 23 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณสารแอนโทไซยานินรวม

คู่เปรียบเทียบตัว ทำละลาย	Mean Difference	Std. Error	Sig	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
hexane • EtOH	-0.34330*	0.05909	0.001	-.4879056	-.1986944
hexane • H <sub>2</sub> O	-0.04295*	0.00888	0.003	-.0646862	-.0212138
EtOH • H <sub>2</sub> O	0.30035*	0.05958	0.002	.1545467	.4461533

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Independent Samples Test

จากผลการหาปริมาณสารฟีนอลิก สารฟลาโวนอยด์ และสารแอนโทไซยานิน จากสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ทั้ง 4 ตัวอย่าง สามารถสรุปรวมได้ดังตารางที่ 24

ตาราง 24 แสดงสรุปผลของปริมาณ phenolic, flavonoid, anthocyanin

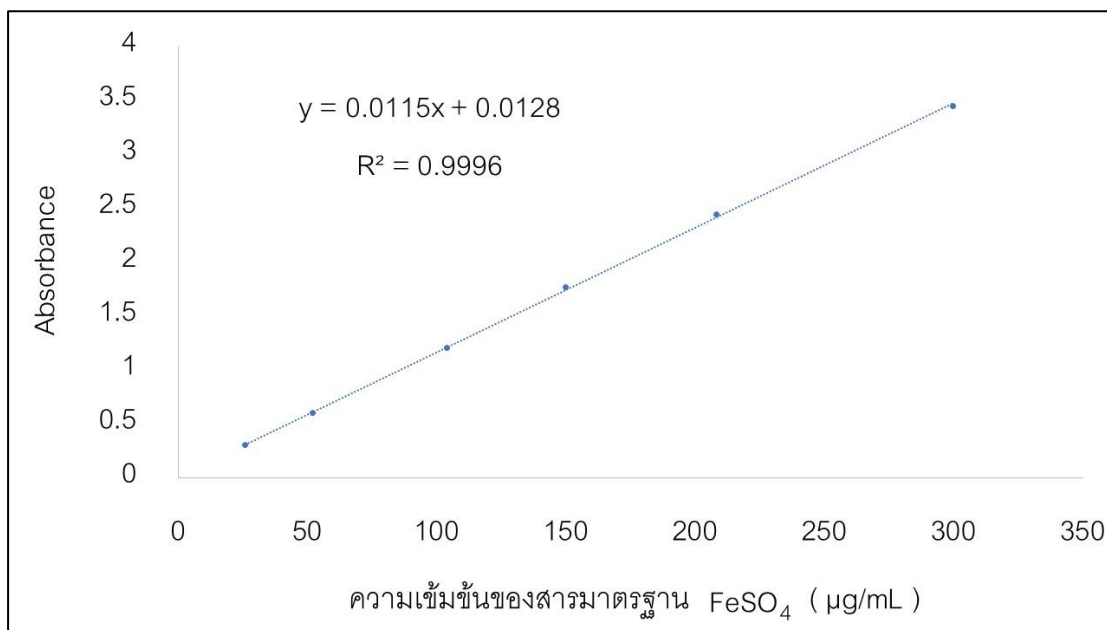
ตัวอย่าง	ตัวทำละลาย	ปริมาณสาร (mg/g)		
		phenolic	flavonoid	anthocyanin
A	hexane	1.83 ± 0.15	12.11 ± 0.82	0.01 ± 0.002
B	hexane	0.60 ± 0.02	8.85 ± 1.34	0.01 ± 0.003
C	hexane	0.65 ± 0.05	13.10 ± 1.37	0.02 ± 0.011
D	hexane	2.19 ± 0.39	12.80 ± 1.56	0.01 ± 0.001
A	EtOH	25.07 ± 1.62	28.97 ± 1.79	0.23 ± 0.014
B	EtOH	24.74 ± 1.20	27.03 ± 0.49	0.28 ± 0.051
C	EtOH	65.66 ± 0.38	30.21 ± 0.73	0.43 ± 0.026
D	EtOH	89.17 ± 0.56	47.81 ± 1.26	0.48 ± 0.033
A	H <sub>2</sub> O	20.66 ± 1.03	7.17 ± 0.51	0.04 ± 0.011
B	H <sub>2</sub> O	42.72 ± 0.38	10.34 ± 1.70	0.04 ± 0.030
C	H <sub>2</sub> O	32.15 ± 0.10	7.78 ± 0.71	0.07 ± 0.015
D	H <sub>2</sub> O	55.39 ± 0.40	12.19 ± 0.82	0.07 ± 0.031

## 8. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

### 8.1 วิธี Feric-reducing antioxidant power assay

วิธี FRAP assay ทำการทดสอบสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่เทียบกับสารมาตรฐาน FeSO<sub>4</sub> โดยหากสารที่นำมาทดสอบมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จะให้อิเล็กตรอนแก่สารประกอบเชิงซ้อน Fe<sup>3+</sup> - TPTZ และเปลี่ยนเป็นสารประกอบเชิงซ้อน Fe<sup>2+</sup> - TPTZ หลังจากนั้นนำมาวัดการดูดกลืนแสงที่ 595 nm

ในการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน FeSO<sub>4</sub> นั้น จะวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานทั้ง 6 ความเข้มข้น และหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกับค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสง ดังภาพประกอบที่ 20



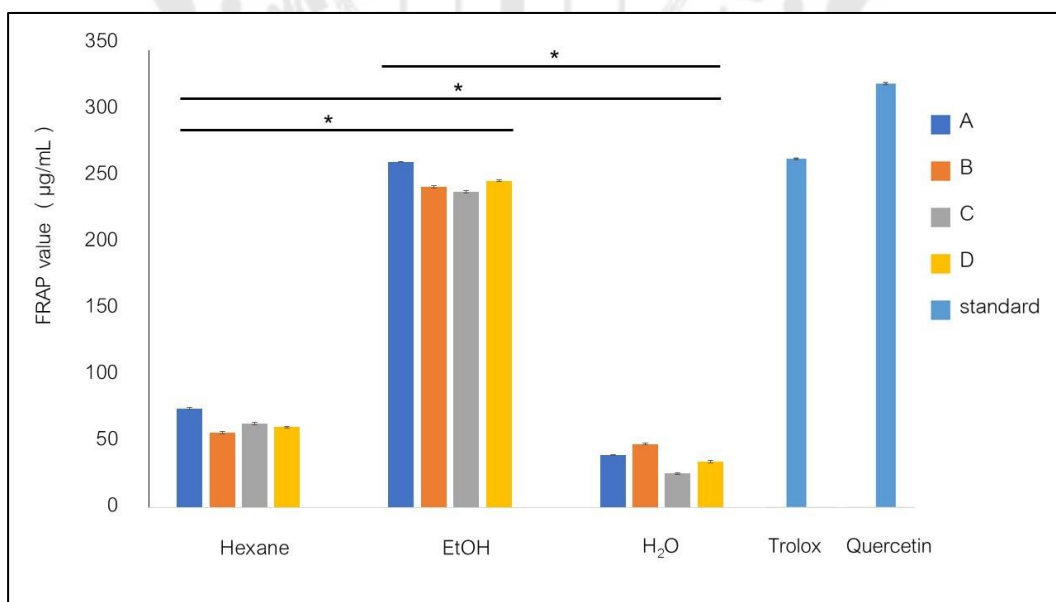
ภาพประกอบ 20 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของสารมาตรฐาน FeSO<sub>4</sub>

เมื่อวัดการดูดกลืนแสงของสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ทั้ง 4 ตัวอย่าง หลังจากทำปฏิกิริยากับ FRAP reagent แล้วนำค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงมาแทนค่าในสมการเส้นตรง  $y = 0.0115x + 0.012$  เพื่อคำนวณหาค่า FRAP value แสดงผลดังตารางที่ 25 และภาพประกอบที่ 21

จากการคำนวณหาค่า FRAP value พบว่าสารมาตรฐาน Trolox และ quercetin มีค่า FRAP value เท่ากับ  $262.898 \pm 0.071$  และ  $319.571 \pm 0.00$  µg/mL ในส่วนของสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ทั้ง 4 ตัวอย่าง เมื่อใช้สารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย hexane ที่ความเข้มข้น 10 µg/mL มีค่า FRAP value อยู่ในช่วง 56.670 - 74.740 µg/mL โดยสารสกัด C มีค่า FRAP value สูงที่สุดเท่ากับ  $74.740 \pm 0.87$  µg/mL และสารสกัด B มีค่า FRAP value น้อยที่สุดเท่ากับ  $56.670 \pm 0.93$  µg/mL

ตาราง 25 แสดงค่า FRAP value ของสารสกัดข้าวไรซ์เบอรี่ทั้ง 4 ตัวอย่าง

ตัวอย่าง	ตัวทำละลาย	FRAP value ( $\mu\text{g/mL}$ ) (mean $\pm$ SD)
A	Hexane	74.740 $\pm$ 0.87
	EtOH	260.601 $\pm$ 0.25
	H <sub>2</sub> O	39.615 $\pm$ 0.22
B	Hexane	56.670 $\pm$ 0.93
	EtOH	242.131 $\pm$ 0.92
	H <sub>2</sub> O	48.122 $\pm$ 0.45
C	Hexane	63.379 $\pm$ 0.81
	EtOH	238.096 $\pm$ 0.95
	H <sub>2</sub> O	25.701 $\pm$ 0.70
D	Hexane	60.628 $\pm$ 0.68
	EtOH	246.534 $\pm$ 0.93
	H <sub>2</sub> O	35.006 $\pm$ 0.95



ภาพประกอบ 21 กราฟแสดงค่า FRAP value (\* คือแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05)

เมื่อใช้สารสกัดข้าวไรซ์เบอรรี่ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย absolute ethanol ที่ความเข้มข้น 10 µg/mL มีค่า FRAP value อยู่ในช่วง 238.096 - 260.601 µg/mL โดยสารสกัด A มีค่า FRAP value สูงที่สุดเท่ากับ 260.601 ± 0.25 µg/mL และสารสกัด C มีค่า FRAP value น้อยที่สุดเท่ากับ 238.096 ± 0.95 µg/mL

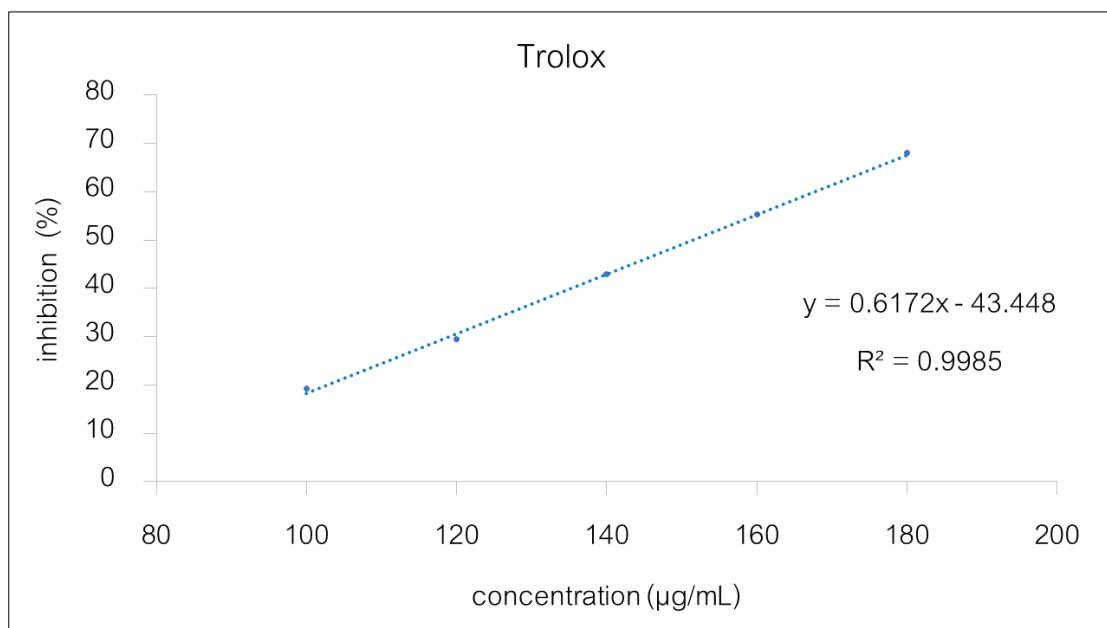
เมื่อใช้สารสกัดข้าวไรซ์เบอรรี่ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย H<sub>2</sub>O ที่ความเข้มข้น 10 µg/mL มีค่า FRAP value อยู่ในช่วง 25.701 - 48.122 µg/mL โดยสารสกัด B มีค่า FRAP value สูงที่สุดเท่ากับ 48.122 ± 0.45 µg/mL และสารสกัด C มีค่า FRAP value น้อยที่สุดเท่ากับ 25.701 ± 0.70 µg/mL

จากการวิเคราะห์ค่า FRAP value ในสารสกัดข้าวไรซ์เบอรรี่ทั้ง 4 ตัวอย่าง พบว่า ตัวอย่างสารสกัด A ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย absolute ethanol มีค่า FRAP value สูงที่สุดมีค่าเท่ากับ 260.601 ± 0.25 µg/mL และตัวอย่างสารสกัด C ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย H<sub>2</sub>O มีค่า FRAP value น้อยที่สุดมีค่าเท่ากับ 25.701 ± 0.70 µg/mL

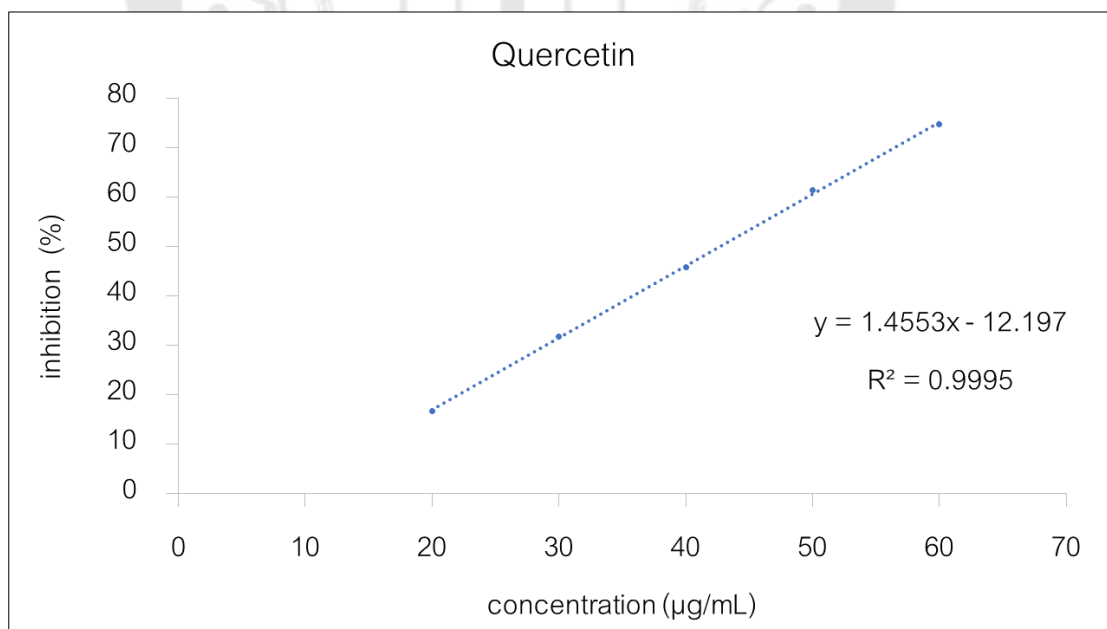
## 8.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Superoxide anion scavenging activity assay

เป็นการทดสอบฤทธิ์ในสารสกัดข้าวไรซ์เบอรรี่ทั้ง 12 สารสกัดด้วยวิธี Superoxide anion scavenging activity assay ทำการทดสอบสารสกัดข้าวไรซ์เบอรรี่เทียบกับสารมาตรฐาน ได้แก่ Trolox และ quercetin โดยหากสารที่นำมาทดสอบมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะสามารถยับยั้งปฏิกิริยาระหว่าง superoxide anion กับ NBT ทำให้ไม่เกิด blue formazan หลังจากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 nm

ในการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox และ quercetin นั้น จะวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานทั้ง 5 ความเข้มข้น เพื่อคำนวณหา % inhibition และหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกับ % inhibition ดังรูปภาพประกอบ 22 และ 23 ตามลำดับ



ภาพประกอบ 22 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของ Trolox กับ % inhibition

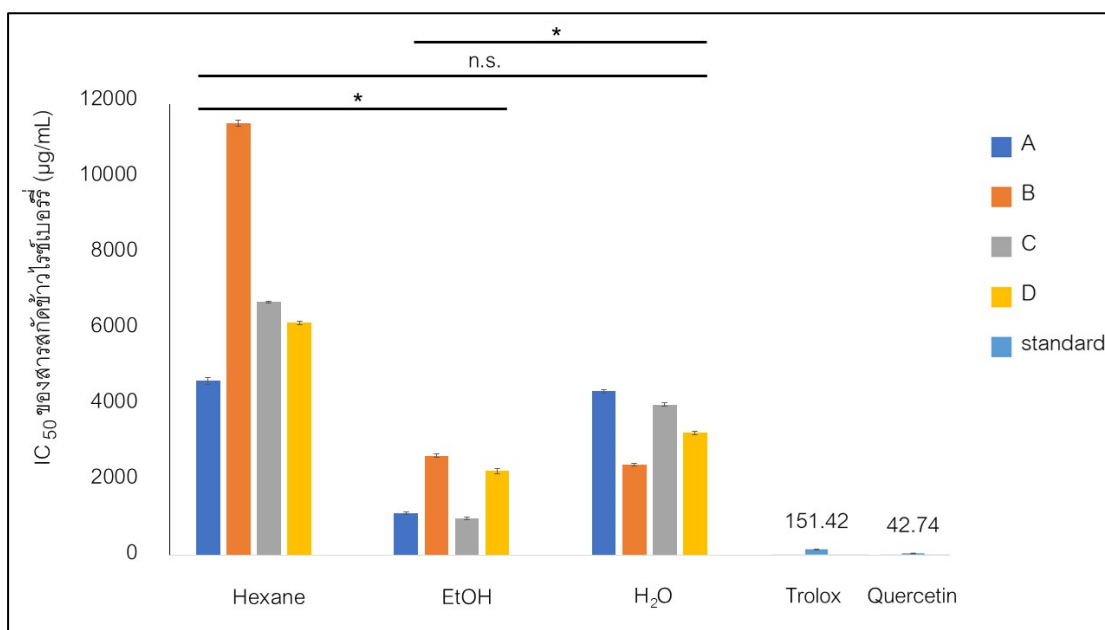


ภาพประกอบ 23 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของ quercetin กับ % inhibition

เมื่อวัดการดูดกลืนแสงของสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ทั้ง 4 ตัวอย่าง จำนวน 12 ตัวอย่าง หลังจากทำปฏิกิริยากับ superoxide anion กับ NBT แล้วมาคำนวณหา % inhibition แสดงผลดังตารางที่ 26 และภาพประกอบ 24

ตาราง 26 แสดงค่า  $IC_{50}$  ของสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ทั้ง 4 ตัวอย่าง

ตัวอย่าง	ตัวทำละลาย	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
A	Hexane	4610.77 $\pm$ 89.81
	EtOH	1106.43 $\pm$ 37.51
	H <sub>2</sub> O	4337.00 $\pm$ 45.03
B	Hexane	11420.00 $\pm$ 79.91
	EtOH	2630.91 $\pm$ 51.19
	H <sub>2</sub> O	2392.25 $\pm$ 25.74
C	Hexane	6688.12 $\pm$ 21.48
	EtOH	970.19 $\pm$ 25.14
	H <sub>2</sub> O	3979.63 $\pm$ 47.86
D	Hexane	6142.26 $\pm$ 46.35
	EtOH	2229.09 $\pm$ 67.93
	H <sub>2</sub> O	3228.20 $\pm$ 49.39



ภาพประกอบ 24 แสดงค่า  $IC_{50}$  [\* คือแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05, n.s. คือไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (no statistical significance)]

จากการคำนวณหาค่า  $IC_{50}$  พบว่าสารมาตรฐาน Trolox มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $151.42 \pm 0.46 \mu\text{g/mL}$  และ quercetin มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $42.74 \pm 0.48 \mu\text{g/mL}$  เมื่อใช้สารสกัดข้าวไรซ์เบอรรี่ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย hexane ค่า  $IC_{50}$  อยู่ในช่วง  $4610.77 - 11420.00 \mu\text{g/mL}$  โดยสารสกัด A ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $4610.77 \pm 89.81 \mu\text{g/mL}$  และสารสกัด B ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยที่สุด ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $11420.00 \pm 79.91 \mu\text{g/mL}$

เมื่อใช้สารสกัดข้าวไรซ์เบอรรี่ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย absolute ethanol ค่า  $IC_{50}$  อยู่ในช่วง  $970.19 - 2630.91 \mu\text{g/mL}$  โดยสารสกัด C แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $970.19 \pm 25.14 \mu\text{g/mL}$  และสารสกัด B ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยที่สุด ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $2630.91 \pm 51.19 \mu\text{g/mL}$

เมื่อใช้สารสกัดข้าวไรซ์เบอรรี่ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย H<sub>2</sub>O ค่า  $IC_{50}$  อยู่ในช่วง  $2392.25 \pm 25.74 - 4337.00 \pm 45.03 \mu\text{g/mL}$  โดยสารสกัด B แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $2392.25 \pm 25.74 \mu\text{g/mL}$  และสารสกัด A ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยที่สุด ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $4337.00 \pm 45.03 \mu\text{g/mL}$

จากการวิเคราะห์ค่า  $IC_{50}$  ในสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ทั้ง 4 ตัวอย่าง พบว่าตัวอย่างสารสกัด C ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย absolute ethanol ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $970.19 \pm 25.14 \mu\text{g/mL}$  ลำดับถัดมาคือตัวอย่างสารสกัด A สกัดด้วย absolute ethanol มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $1106.43 \pm 37.51 \mu\text{g/mL}$

### 8.3 การเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ ANOVA

#### วิธี Ferric-reducing antioxidant power assay

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ใช้วิธี Ferric-reducing antioxidant power assay พบว่าสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ทั้ง 4 ตัวอย่างที่สกัดด้วย hexane, absolute ethanol และ  $H_2O$  มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 แสดงผลดังตารางที่ 27

ตาราง 27 แสดงการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay

คู่เปรียบเทียบตัว ทำละลาย	Mean Difference	Std. Error	Sig	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
hexane • EtOH	-182.98600*	6.24991	0.000	-198.4752	-167.4967
hexane • $H_2O$	26.74250*	6.07489	0.005	11.7552	41.7297
EtOH • $H_2O$	209.72850*	6.77077	0.000	193.1521	226.3048

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Independent Samples Test

#### Superoxide anion scavenging activity assay

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ใช้วิธี Superoxide anion scavenging activity assay พบว่าสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ทั้ง 4 ยี่ห้อที่สกัดด้วย absolute ethanol มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแตกต่างจากสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่สกัดด้วย hexane และ  $H_2O$  อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 แต่สารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ทั้ง 4 ยี่ห้อที่สกัดด้วย  $H_2O$  ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ไม่แตกต่างจากสารที่สกัดด้วยตัวทำละลาย hexane แสดงผลดังตารางที่ 28

ตาราง 28 เปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระวิธี Superoxide anion scavenging activity assay

คู่เปรียบเทียบตัว ทำละลาย	Mean Difference	Std. Error	Sig	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
hexane • EtOH	5481.1550*	1525.3176	0.029	976.5299	9985.780
hexane • H <sub>2</sub> O	3731.0400	1530.8746	0.080	-762.0709	8224.1509
EtOH • H <sub>2</sub> O	-1750.1150*	595.6383	0.026	-3208.3995	-291.8304

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Independent Samples Test

จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สามารถสรุปรวมได้ดังตารางที่ 29

ตาราง 29 แสดงสรุปผลของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานและสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่

ตัวอย่าง	ตัวทำละลาย	FRAP assay (µg/mL)		Superoxide anion (µg/mL)	
		FRAP value	TEAC	IC <sub>50</sub>	TEAC
A	hexane	74.740 ± 0.87	0.28	4610.77 ± 89.81	0.03
	EtOH	260.601 ± 0.25	0.99	1106.43 ± 37.51	0.14
	H <sub>2</sub> O	39.615 ± 0.22	0.15	4337.00 ± 45.03	0.03
B	hexane	56.670 ± 0.93	0.22	11420.00 ± 79.91	0.01
	EtOH	242.131 ± 0.92	0.92	2630.91 ± 51.19	0.06
	H <sub>2</sub> O	48.122 ± 0.45	0.18	2392.25 ± 25.74	0.06
C	hexane	63.379 ± 0.81	0.24	6688.12 ± 21.48	0.02
	EtOH	238.096 ± 0.95	0.91	970.19 ± 25.14	0.16
	H <sub>2</sub> O	25.701 ± 0.70	0.10	3979.63 ± 47.86	0.04
D	hexane	60.628 ± 0.68	0.23	6142.26 ± 46.35	0.02
	EtOH	246.534 ± 0.93	0.55	2229.09 ± 67.93	0.07
	H <sub>2</sub> O	35.006 ± 0.95	0.13	3228.20 ± 49.39	0.05
Trolox		262.898 ± 0.71	1.00	151.42 ± 0.46	1.00
Quercetin		319.571 ± 0.00	1.22	42.74 ± 0.48	3.54

## 9. การศึกษาความสัมพันธ์ของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกับปริมาณสารฟีนอลิก สารฟลาโวนอยด์ และสารแอนโทไซยานิน โดยการใช้ Pearson's correlation

### 9.1 วิธี Ferric - reducing antioxidant power assay

ตาราง 30 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระวิธี FRAP assay กับปริมาณสารฟีนอลิก สารฟลาโวนอยด์ และสารแอนโทไซยานิน

		Correlations			
		FRAP	phenolic	flavonoid	anthocyanin
FRAP	Pearson Correlation	1	0.465	0.906*	0.890*
	Sig.	-	0.128	0.000	0.000
phenolic	Pearson Correlation	0.465	1	0.674*	0.773*
	Sig.	0.128	-	0.016	0.003
flavonoid	Pearson Correlation	0.906*	0.674*	1	0.937*
	Sig.	0.000	0.016	-	0.000
anthocyanin	Pearson Correlation	0.890*	0.773*	0.937*	1
	Sig.	0.000	0.003	0.000	-

\*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

จากตาราง 30 พบว่าปริมาณสารฟลาโวนอยด์ และสารแอนโทไซยานินมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทดสอบด้วยวิธี Ferric - reducing antioxidant power assay อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 เนื่องจากค่า Sig น้อยกว่า 0.05 และมี correlation เข้าใกล้ 1 ในขณะที่ปริมาณสารฟีนอลิกไม่สัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทดสอบด้วยวิธี Ferric - reducing antioxidant power assay เนื่องจากค่า Sig > 0.05 และ correlation ไม่เข้าใกล้ 1

## 9.2 วิธี Superoxide anion scavenging activity assay

ตาราง 31 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระวิธี Superoxide anion กับปริมาณสารฟีนอลิก สารฟลาโวนอยด์ และสารแอนโทไซยานิน

		Correlations			
		IC <sub>50</sub>	phenolic	flavonoid	anthocyanin
IC <sub>50</sub>	Pearson Correlation	1	-0.665*	-0.542	-0.619*
	Sig.	-	0.018	0.069	0.032
phenolic	Pearson Correlation	-0.665*	1	0.674*	0.773*
	Sig.	0.018	-	0.016	0.003
flavonoid	Pearson Correlation	-0.542	0.674*	1	0.937*
	Sig.	0.069	0.016	-	0.000
anthocyanin	Pearson Correlation	-0.619*	0.773*	0.937*	1
	Sig.	0.032	0.003	0.000	-

\*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

จากตาราง 31 พบว่าปริมาณสารฟีนอลิก และสารแอนโทไซยานิน สัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทดสอบด้วยวิธี Superoxide anion scavenging activity assay อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 เนื่องจากค่า Sig น้อยกว่า 0.05 และมี correlation เข้าใกล้ 1 ในขณะที่ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ ไม่สัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทดสอบด้วยวิธี Superoxide anion scavenging activity assay เนื่องจากค่า Sig > 0.05 และ correlation ไม่เข้าใกล้ 1

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย อภิปรายและข้อเสนอแนะ

#### สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลการทดลอง

การศึกษานี้ศึกษาอัตราส่วนของตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อการสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ เพื่อตรวจหาปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside และเพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside จากสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ด้วยเทคนิค HPLC จากนั้นทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของข้าวไรซ์เบอร์รี่ทั้ง 4 ตัวอย่าง

จากการเก็บตัวอย่างข้าวไรซ์เบอร์รี่ นำมาสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดได้แก่ hexane, absolute ethanol และน้ำ พบว่าการสกัดด้วยตัวทำละลาย hexane ผลผลิตร้อยละที่ได้อยู่ในช่วง 3.79 - 8.24 เมื่อสกัดด้วยตัวทำละลาย absolute ethanol ผลผลิตร้อยละที่ได้อยู่ในช่วง 1.89 - 4.79 เมื่อสกัดด้วยตัวทำละลายน้ำผลผลิตร้อยละที่ได้อยู่ในช่วง 3.24 - 10.39

จากการวิเคราะห์ข้อมูลการสกัดเพื่อศึกษาความเข้มข้นของ hydrochloric acid และอัตราส่วนของเมทานอลที่ใช้ในการสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่เพื่อตรวจหาปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside โดยใช้สารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ A ในการวิเคราะห์ พบว่าความเข้มข้นของ hydrochloric acid เป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเพิ่มการสกัด cyanidin-3-O-glucoside อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ทั้งนี้เนื่องจากโครงสร้างของ cyanidin-3-O-glucoside เป็นสารกลุ่มแอนโทไซยานินที่แตกตัวเป็นประจุบวกในสภาวะกรด โดยพบว่าการสกัดด้วย HCl ความเข้มข้นต่าง ๆ ให้ปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อใช้ HCl เป็นตัวทำละลายเพียงชนิดเดียว พบปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside อยู่ในช่วง 0.39442 - 0.49978 กรัมต่อกิโลกรัม โดยความเข้มข้นของ HCl ที่ให้ปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside สูงที่สุดอยู่ที่ 1.0N HCl แต่เมื่อใช้ตัวทำละลายระหว่าง HCl : MeOH พบว่าในสารละลายผสมของ 0.1N HCl : MeOH พบปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside อยู่ในช่วง 0.83127 - 0.92210 กรัมต่อกิโลกรัม ขณะที่ 0.5N HCl : MeOH พบปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside อยู่ในช่วง 0.74105 - 0.81823 กรัมต่อกิโลกรัม และที่ 1.0N HCl : MeOH พบปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside อยู่ในช่วง 0.73391 - 0.89040 กรัมต่อกิโลกรัม แต่เมื่อใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง H<sub>2</sub>O : MeOH พบปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside อยู่ในช่วง 0.58453 - 0.84379 กรัมต่อกิโลกรัม และเมื่อใช้ MeOH ในการสกัดเพียงชนิดเดียวพบปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside เท่ากับ 0.75769 กรัมต่อกิโลกรัม และการใช้น้ำสกัดเพียงชนิดเดียวพบปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside เท่ากับ 0.09657 กรัมต่อกิโลกรัม จากข้อมูลที่ได้จากการทดลองวิเคราะห์แล้วพบว่าการใช้น้ำสกัดเพียงชนิดเดียวก็ตรวจพบปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside

แต่ปริมาณที่ได้น้อยมากเมื่อเทียบกับการสกัดด้วยสารละลาย HCl ซึ่งเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ HCl จะตรวจพบปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside เพิ่มมากขึ้น แต่โครงสร้างทางเคมีส่วนใหญ่ของ cyanidin-3-O-glucoside ประกอบด้วยส่วนที่เป็น polyphenol ซึ่งละลายได้ดีในเมทานอล การสกัดด้วยเมทานอลเพียงชนิดเดียวจึงตรวจพบปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside มากกว่าการสกัดด้วย HCl เพียงชนิดเดียว การใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง HCl และ MeOH จึงช่วยให้สามารถสกัด cyanidin-3-O-glucoside จากข้าวไรซ์เบอร์รี่ออกมาได้มากยิ่งขึ้น ในอัตราส่วน 15 : 85 โดยปริมาตร ของ 0.1N HCl และ MeOH สามารถสกัด cyanidin-3-O-glucoside ได้สูงที่สุดเท่ากับ 0.92210 กรัมต่อกิโลกรัม แต่อย่างไรก็ตามการเพิ่มความเข้มข้นของ HCl ร่วมกับการลดอัตราส่วนของเมทานอลในการสกัดมากกว่านี้ไม่ได้ช่วยเพิ่มปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside ที่สกัดได้จากข้าวไรซ์เบอร์รี่ เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Jiamyangyuen et al. (2017) ที่ใช้ตัวทำละลาย 1N HCl : MeOH ในอัตราส่วน 15 : 85 ทำการสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ผ่านวิธีการหมัก 1 ชั่วโมง พบปริมาณแอนโทไซยานิน 0.37 g/kg ซึ่งพบว่าต่ำกว่าการศึกษานี้เนื่องจากความเข้มข้นของ HCl สูงกว่าอีกทั้งค่า pH สูงจึงส่งผลให้ปริมาณ flavylum cation ลดลงเนื่องจากแอนโทไซยานินจะคงตัวในสภาพสมดุล โดยที่สารละลาย pH ต่ำ และจากผลการทดลองสรุปได้ว่าไม่จำเป็นต้องใช้กรดที่มีความเข้มข้นสูงก็สามารถสกัด cyanidin-3-O-glucoside ออกมาได้ อีกทั้ง 0.1N HCl ก็สามารถสกัด cyanidin-3-O-glucoside ออกมาได้ปริมาณมากกว่า 1N HCl และงานวิจัยของ Palakajornsak (2004) ได้ทำการศึกษาสาเหตุที่ส่งผลกระทบต่อความเสถียรของแอนโทไซยานินที่สกัดจากเปลือกมังคุด พบว่าที่ pH ต่ำ (pH 1.0) แอนโทไซยานินจะคงตัวมากเมื่อ pH สูง (pH 4.0) จากงานวิจัยของ Pajareon (2019) ศึกษาเสถียรภาพของแอนโทไซยานินจากสารสกัดรำข้าวไรซ์เบอร์รี่พบว่าค่า pH ส่งผลต่อความคงตัวของแอนโทไซยานินโดย pH ที่แอนโทไซยานินมีความคงตัวคือ pH เท่ากับ 1 อีกทั้งการใช้เทคนิคอัลตราโซนิกในการสกัดช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดสารแอนโทไซยานินจากข้าวไรซ์เบอร์รี่สูงกว่าวิธีการสกัดที่ไม่ใช้เทคนิคอัลตราโซนิกร่วมในการสกัด

การทดสอบความเหมาะสมของระบบในการวิเคราะห์ปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside ด้วยเทคนิค HPLC ผลที่ได้จากการวิเคราะห์พบว่าเวลาที่สาร cyanidin-3-O-glucoside ถูกแยกออกมาที่เวลา 8.28 นาที มีค่า Tailing factor ของพีค cyanidin-3-O-glucoside มีค่าเท่ากับ  $0.8885 \pm 2.01$  ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับได้คือ Tailing factor  $\leq 2$  อีกทั้ง Theoretical plate มีค่าเท่ากับ  $2041.6667 \pm 3.09$  ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับได้คือ theoretical plate  $> 2000$  และค่าความแม่นยำของการวิเคราะห์ซ้ำมีค่า %RSD ซึ่งไม่เกิน 2 แสดงให้เห็นว่าระบบเครื่องมือนี้มีความเหมาะสมในการวิเคราะห์สาร cyanidin-3-O-glucoside

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นตามเกณฑ์การยอมรับของ AOAC ฉบับปี 2012 พบว่าผ่านเกณฑ์การยอมรับทุกหัวข้อ ได้แก่การศึกษาความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ พบว่าค่า Retention time ของ cyanidin-3-O-glucoside ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ถูกแยกออกมาที่เวลา 8.28 นาที โดยพีคไม่ถูกรบกวนการวิเคราะห์ด้วยสารอื่นๆ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะเจาะจงต่อสารที่ต้องการตรวจวัด และการศึกษาความเป็นเส้นตรงของ cyanidin-3-O-glucoside พบว่ามีสมการเชิงเส้นคือ  $y = 69.408x + 1.418$  และมีค่า  $R^2 = 0.9998$  และเมื่อนำผลที่ได้มาหาค่าร้อยละการกลับคืนพบว่าอยู่ในช่วงร้อยละ 99.11 - 100.89 ซึ่งค่าที่ได้อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ และการศึกษาหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณได้ (LOQ) มีค่าเท่ากับ  $0.3433 \mu\text{g/mL}$  เป็นความเข้มข้นที่สามารถนำไปวิเคราะห์ปริมาณได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์และความแม่นยำพบว่าผลการวิเคราะห์ซ้ำกันหลายๆ ครั้ง แสดงค่าความแตกต่างของข้อมูลอยู่ในช่วง 1.11 - 1.66 และแสดงค่าความถูกต้องของการวิเคราะห์อยู่ในช่วง 99.58 - 101.03 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมีความถูกต้องและแม่นยำสูง อยู่ในเกณฑ์การยอมรับตามมาตรฐาน และความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ พบว่าแสดงค่าความแตกต่างของข้อมูลอยู่ในช่วง 0.35 - 2.98 และแสดงค่า %Recovery อยู่ในช่วง 98.62 - 100.63 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมีความเที่ยงตรงสูงและอยู่ในเกณฑ์การยอมรับตามมาตรฐาน

การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิกรวมเทียบกับกรดแกลลิก พบว่าสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ D และสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ C ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย absolute ethanol มีปริมาณสารฟีนอลิกรวมสูงที่สุดมีปริมาณเท่ากับ  $89.17 \pm 0.56$  และ  $65.66 \pm 0.38 \text{ mg GAE/g crude extract}$  ตามลำดับ และตัวอย่างสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ A - D ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย hexane มีปริมาณสารฟีนอลิกรวมน้อยที่สุด มีปริมาณอยู่ในช่วง 0.60 - 2.19 mg GAE/g crude extract และพบว่าสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ A - D ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย absolute ethanol มีปริมาณสารฟีนอลิกที่แตกต่างจากสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ A - D ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย hexane และแต่ไม่แตกต่างจากการสกัดด้วยตัวทำละลายน้ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 นอกจากนี้เมื่อเทียบกับงานวิจัยของ Settapramote et al. (2018) ทำการสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ด้วย 85% methanol โดยใช้ magnetic stirrer ช่วยสกัด พบว่าให้ปริมาณสารฟีนอลิกรวมอยู่ในช่วง 179.16 - 327.61 mg GAE/100 g ซึ่งพบว่าต่ำกว่าการศึกษานี้ อาจเนื่องจากการศึกษานี้ใช้วิธีการสกัดด้วยวิธี sonication จึงช่วยให้สกัดปริมาณสารฟีนอลิกรวมออกมาได้มากขึ้น และ Shen, Jin, Xiao, Lu, and Bao (2009) รายงานว่าปริมาณสารฟีนอลิกรวมในข้าวที่มีสีอยู่ในช่วง 165.8 - 1244.9 mg

GAE/100 g ซึ่งพบว่าต่ำกว่าการศึกษาที่ ประการแรกอาจเนื่องจากพวกเขาใช้ปริมาณตัวทำละลายที่มากกว่าการศึกษาที่ ประการที่สองพวกเขาสกัดด้วยวิธีการหมักทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งพื้นที่ผิวในการสัมผัสตัวทำละลายอาจน้อยเกินไป ซึ่งการสกัดในการศึกษานี้ใช้วิธี sonication จะปล่อยคลื่นความถี่สูงออกมาในตัวทำละลายจะช่วยดึงสารที่อยู่ในข้าวไรซ์เบอร์รี่ออกมาละลายในตัวทำละลายได้มากขึ้น

การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม พบว่าตัวอย่างข้าวไรซ์เบอร์รี่ D, C, A และ B ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย absolute ethanol มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุดมีปริมาณ  $47.81 \pm 1.26$ ,  $30.21 \pm 0.73$ ,  $28.97 \pm 1.79$  และ  $27.03 \pm 0.49$  mg QE/g crude extract ตามลำดับ และตัวอย่างข้าวไรซ์เบอร์รี่ A - D ที่สกัดด้วยน้ำมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมน้อยที่สุดมีปริมาณอยู่ในช่วง 7.17 - 12.19 mg QE/g crude extract และพบว่าสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ A - D ที่สกัดด้วย absolute ethanol มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์แตกต่างจากสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ A - D ที่สกัดด้วย hexane และน้ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 การตรวจพบฟลาโวนอยด์ชั้น ethanol ให้ปริมาณสูงสุดบ่งชี้ว่าสารฟลาโวนอยด์ในข้าวไรซ์เบอร์รี่มีสภาพขั้วสูงใกล้เคียงกับตัวทำละลายชั้น ethanol ตามกฎ like dissolve like rule ฟลาโวนอยด์เป็นสารประกอบในกลุ่มฟีนอลิกกลุ่มใหญ่ประเภท polyphenol พบมากในรูปของ glycoside มีบทบาทหลักในการกำจัดอนุมูลอิสระโดยการให้อิเล็กตรอนหรือให้ H atom แก่อนุมูลอิสระ กำจัดโลหะหนักจำพวก  $Fe^{2+}$  และ  $Cu^+$  ยับยั้งเอนไซม์ที่กระตุ้นการเกิดอนุมูลอิสระ จากงานวิจัยของ Fu et al. (2016) ทำการสกัดมันหวานด้วยน้ำให้ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมน้อยที่สุด ขณะที่ใช้ตัวทำละลาย ethanol แสดงปริมาณสารฟลาโวนอยด์สูงที่สุด

การวิเคราะห์หาปริมาณแอนโทไซยานินรวม พบว่าข้าวไรซ์เบอร์รี่ D และข้าวไรซ์เบอร์รี่ C ที่สกัดด้วย absolute ethanol มีปริมาณสารแอนโทไซยานินรวมสูงที่สุดมีปริมาณเท่ากับ  $0.48 \pm 0.03$ ,  $0.43 \pm 0.03$  mg C-3-GE/g crude extract ตามลำดับ ตัวอย่างสารสกัด D ที่สกัดด้วย hexane มีปริมาณสารแอนโทไซยานินรวมน้อยที่สุดมีปริมาณเท่ากับ  $0.01 \pm 0.00$  mg C-3-GE/g crude extract และการเปรียบเทียบปริมาณสารแอนโทไซยานินรวมในสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่พบว่าสารสกัดข้าว A - D ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย absolute ethanol, hexane และ  $H_2O$  มีปริมาณสารแอนโทไซยานินที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 โดยตัวทำละลาย absolute ethanol สามารถสกัดสารแอนโทไซยานินได้มากกว่า hexane และน้ำ จากค่า dielectric constant ซึ่งเป็นค่าที่ใช้วัดความมีขั้วของตัวทำละลาย โดยค่าคงที่ dielectric constant ของ hexane, ethanol และน้ำ เท่ากับ 1.9, 24 และ 80 ตามลำดับ จากค่าดังกล่าว

พบว่า ethanol มีขั้วสูงกว่า hexane และต่ำกว่าน้ำ จึงทำให้สามารถทำลายผนังเซลล์ของข้าวไรซ์เบอร์รี่ได้ ซึ่งโครงสร้างส่วนใหญ่ไม่มีขั้ว เมื่อผนังเซลล์ถูกทำลายทำให้สารจำพวกแอนโทไซยานิน รวมถึงฟีนอลิกภายในสามารถออกมาจากเซลล์ของข้าวไรซ์เบอร์รี่ได้มากขึ้น ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Fu et al. (2016) ทำการสกัดมันหวานด้วย ethanol ให้ปริมาณสารแอนโทไซยานินรวมสูงสุด นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับวิธีการสกัดของงานวิจัยของ Rongsuphan and Kajorncheappunngam (2019) ทำการสกัดโดยใช้วิธีอัลตราโซนิกร่วมในการสกัดพบว่าให้ปริมาณแอนโทไซยานินรวมสูงกว่าวิธีสกัดทั่วไป ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า ข้าวไรซ์เบอร์รี่สามารถเป็นแหล่งของสารแอนโทไซยานินได้ และ ethanol เป็นตัวทำละลายที่ดีที่สุดในการสกัดแอนโทไซยานิน อีกทั้งการใช้วิธี sonication ในการสกัดช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดสารได้สูงกว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายและวิธีอื่น

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ด้วยวิธี FRAP assay เป็นวิธีทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านออกซิเดชัน พบว่าตัวอย่างสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ A - D ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย absolute ethanol มีค่า FRAP value สูงที่สุดมีค่าอยู่ในช่วง 238.096 - 260.601  $\mu\text{g/mL}$  โดยสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ A ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย absolute ethanol มีค่า FRAP value สูงที่สุดมีค่าเท่ากับ  $260.601 \pm 0.25 \mu\text{g/mL}$  และตัวอย่างสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ C ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย  $\text{H}_2\text{O}$  มีค่า FRAP value น้อยที่สุดมีค่าเท่ากับ  $25.701 \pm 0.70 \mu\text{g/mL}$  และจากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay พบว่าสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ A - D ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย absolute ethanol, hexane และ  $\text{H}_2\text{O}$  มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ผลที่ได้เกิดจากสารฟีนอลิก สารฟลาโวนอยด์และสารแอนโทไซยานินทั้งหมดที่พบเป็นสารสำคัญในตัวอย่างข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่สามารถละลายได้ดีในตัวทำละลาย ethanol และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นแปรผันตามปริมาณสารที่พบในตัวอย่างข้าวไรซ์เบอร์รี่ จากการศึกษาของ Daiponmak, Theerakulpisut, Thanonkao, Vanavichit, and Prathepha (2010) พบว่าสารฟีนอลิกจากข้าวไรซ์เบอร์รี่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ด้วยวิธี Superoxide anion scavenging activity assay พบว่าตัวอย่างสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ A - D ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย absolute ethanol ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด โดยสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ C ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย absolute ethanol มีค่า  $\text{IC}_{50}$  เท่ากับ  $970.19 \pm 25.14 \mu\text{g/mL}$  และสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ B ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย hexane ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยสุด ค่า  $\text{IC}_{50}$  เท่ากับ  $11420 \pm 79.91$

$\mu\text{g/mL}$  และจากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Superoxide anion พบว่าสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย absolute ethanol มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแตกต่างจากสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย hexane และ  $\text{H}_2\text{O}$  อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

การศึกษาความสัมพันธ์ของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกับปริมาณสารฟีนอลิก สารฟลาโวนอยด์ และสารแอนโทไซยานิน โดยการใช้ Pearson's correlation เมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP assay พบว่าปริมาณสารฟลาโวนอยด์ และสารแอนโทไซยานินสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ในขณะที่ปริมาณสารฟีนอลิกไม่สัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทดสอบด้วยวิธี Ferric - reducing antioxidant power assay และเมื่อทดสอบด้วยวิธี Superoxide anion scavenging activity assay พบว่าปริมาณสารฟีนอลิก และสารแอนโทไซยานิน สัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ในขณะที่ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ ไม่สัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทดสอบด้วยวิธี Superoxide anion scavenging activity assay จากการศึกษาความสัมพันธ์ของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นนี้เกี่ยวข้องกับโครงสร้างทางเคมีของสารฟีนอลิก สารฟลาโวนอยด์ และสารแอนโทไซยานินที่มีโครงสร้างหลักประกอบด้วย aromatic ring แทนที่ด้วยหมู่ไฮดรอกซิลที่สามารถใช้ดักจับอนุมูลอิสระได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Settapramote et al. (2018) พบว่าสารแอนโทไซยานินสามารถจับอนุมูลอิสระได้โดยการให้ phenolic hydrogen atoms ส่งผลให้มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูง และพบว่าสารฟีนอลิกจากข้าวที่มีสีมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ภายใต้ตัวทำละลายต่างชนิดกันเปรียบเสมือนการเปรียบเทียบความสามารถของสารสกัดภายใต้สารอินทรีย์ที่เป็นตัวกลางต่างชั่วคราว นอกจากนี้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดขึ้นกับองค์ประกอบทางพฤกษเคมีที่แตกต่างกันในแต่ละสารสกัด แสดงให้เห็นว่าตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดเป็นตัวแปรสำคัญเพราะตัวทำละลายสามารถเป็นตัวกำหนดปริมาณของสารฟีนอลิก สารฟลาโวนอยด์ และสารแอนโทไซยานินที่สกัดได้

### ข้อเสนอแนะ

1. การศึกษาการสกัด cyanidin-3-O-glucoside โดยใช้วิธี sonication ด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างตัวทำละลายอินทรีย์และสารละลายกรดถึงแม้จะให้ปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside ออกมาด้วยวิธีการสกัดดังกล่าว แต่สารสกัด cyanidin-3-O-glucoside อาจไม่บริสุทธิ์ จึงควรมีการศึกษาวิธีการที่จะทำให้สารสกัด cyanidin-3-O-glucoside บริสุทธิ์ต่อไป
2. สามารถนำวิธีที่พัฒนาขึ้นไปประยุกต์ใช้กับการวิเคราะห์ cyanidin-3-O-glucoside ในตัวอย่างอื่น ๆ ได้ ที่มีสารแอนโทไซยานินเป็นองค์ประกอบ
3. นำวิธีวิเคราะห์สารฟีนอลิก สารฟลาโวนอยด์ และสารแอนโทไซยานิน ในการศึกษาครั้งนี้ไปประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์ข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่มีอยู่ในท้องตลาดได้



## บรรณานุกรม

- Ainsworth, E. A., & Gillespie, K. M. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nature protocols*, 2(4), 875-877.
- AOAC. (2012). AOAC Guidelines for Single-Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. Retrieved from [https://members.aoac.org/AOAC\\_Docs/StandardsDevelopment/SLV\\_Guidelines\\_Dietary\\_Supplements.pdf](https://members.aoac.org/AOAC_Docs/StandardsDevelopment/SLV_Guidelines_Dietary_Supplements.pdf)
- Aryal, S., Baniya, M. K., Danekhu, K., & Kunwar, P. (2019). Total Phenolic Content, Flavonoid Content and Antioxidant Potential of Wild Vegetables from Western Nepal. *Plants*, 8(4).
- Bong, F. J., Chear, N. J. Y., Ramanathan, S., Mohana-Kumaran, N., Subramaniam, S., & Chew, B. L. (2021). The development of callus and cell suspension cultures of Sabah Snake Grass (*Clinacanthus nutans*) for the production of flavonoids and phenolics. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 33, 1-13.
- Chaovanalikit, A. (2011, July-December). Extraction and analysis of anthocyanin. *Srinakharinwirot University (Journal of Science and Technology)*, 3(6), 26-36.
- Daiponmak, W., Theerakulpisut, P., Thanonkao, P., Vanavichit, A., & Prathepha, P. (2010). Changes of anthocyanin cyanidin-3-glucoside content and antioxidant activity in Thai rice varieties under salinity stress. *Science Asia*, 36, 286-291.
- Fu, Z.-f., Tu, Z.-c., Zhang, L., Wang, H., Wen, Q.-h., & Huang, T. (2016). Antioxidant activities and polyphenols of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) leaves extracted with solvents of various polarities. *Food Bioscience*, 15, 11-18.
- He, J., & Giusti, M. M. (2010). Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties. *Annual Review of Food Science and Technology*, 1, 163-187.
- Hiemori, M., Koh, E., & Mitchell, A. E. (2009). Influence of Cooking on Anthocyanins in Black Rice (*Oryza sativa* L. japonica var. SBR). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(5), 1908-1914.

- Jiamyangyuen, S., Nuengchamnong, N., & Ngamdee, P. (2017). Bioactivity and chemical components of Thai rice in five stages of grain development. *Journal of Cereal Science*, 74, 136-144.
- Khoo, H. E., Azlan, A., Tang, S. T., & Lim, S. M. (2017). Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food & Nutrition Research*, 61, 1-21.
- Lee, J., Durst, R. W., & Wrolstad, R. E. (2005). Determination of Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines by the pH Differential Method: Collaborative Study. *Journal of AOAC International*, 88(5), 1269–1278.
- Mazza, G. J. (2007). Anthocyanins and heart health. *Ann Ist Super Sanita*, 43(4), 369-374.
- Niu, Y., Gao, B., Slavin, M., Zhang, X., Yang, F., Bao, J., . . . Yu, L. L. (2013). Phytochemical compositions, and antioxidant and anti-inflammatory properties of twenty-two red rice samples grown in Zhejiang. *Food Science and Technology*, 54, 521-527.
- Nongyao, N., Keapradub, N., Rattanachaisit, P., & Kongkiattikajorn, J. (2014). Analysis of Anthocyanin Composition in Pigmented Rice Brans. *Journal of Science and Technology Mahasarakham*, 10, 649-660.
- Pajareon, S. (2019). Stability of anthocyanin extract from riceberry rice bran encapsulated with rice bran protein concentrate under different pH and heating conditions. *Rmutsb Academic Journal*, 7(2), 205-215.
- Palakajornsak, Y. (2004). *Extraction and stability of anthocyanins from mangosteen peel*. (Master's thesis). Silpakorn University, Bangkok.
- Pervaiz, T., Songtao, J., Haider, M. S., & Fang, J. (2017). Naturally Occurring Anthocyanin, Structure, Functions and Biosynthetic Pathway in Fruit Plants. *Journal of Plant Biochemistry & Physiology*, 5(2), 1-9.
- Research, C. f. D. E. a., & Administration, U. S. F. a. D. (1994, november). Reviewer Guidance, Validation of Chromatographic Methods. *FDA, Rockville, MD*, 21-28.
- Rongsuphan, T., & Kajorncheappunngam, S. (2019). Anthocyanin content, antibacterial

- activity and antioxidant capacity of purple corn cob extract via ultrasonic extraction. *Phranakhon Rajabhat Research Journal (Science and Technology)*, 14, 47-61.
- Settapramote, N., Laokuldilok, T., Boonyawan, D., & Utamaang, N. (2018). Physiochemical, Antioxidant Activities and Anthocyanin of Riceberry Rice from Different Locations in Thailand. *Food and Applied Bioscience Journal*, 6, 84-94.
- Shen, Y., Jin, L., Xiao, P., Lu, Y., & Bao, J. (2009). Total phenolics, flavonoids, antioxidant capacity in rice grain and their relations to grain color, size and weight. *Journal of Cereal Science*, 49, 106-111.
- Thitipramote, N., Pradmeeteekul, P., Pintathong, P., Nimkamnerd, J., Thitilerdecha, N., & Chaiwut, P. (2016). Bioactive compounds and antioxidant activities of red (Brown Red Jasmine) and black (Kam Leum Pua) native pigmented rice. *International Food Research Journal*, 23(1), 410-414.
- Vanavichit, A. (2020). Riceberry: the Key to Innovative Nutraceutical Rice-based Products. Retrieved from <https://dna.kps.ku.ac.th/index.php/news-articles-rice-rsc-rgdu-knowledge/267-2020-02-04-07-33-25>
- Wijitvechkarn, J. (2018). *Study Homocysteine level in Blood in the Group That Eat Rice berry and White Rice*. (master's thesis). Dhurakij Pundit University, Bangkok.
- Wikipedia. (2020). Rice. Retrieved from <https://en.wikipedia.org/wiki/Rice>
- Wirasorn, K., Klarod, K., Hongsprabhas, P., & Boonsiri, P. (2014). Oxidative Stress, Antioxidant and Cancer. *Srinagarind Med Journal*, 29(2).
- Yang, L., Rong-Rong, C., Ji-Li, F., & Ke, Y. (2019). Total Anthocyanins and Cyanidin-3-O-Glucoside Contents and Antioxidant Activities of Purified Extracts from Eight Different Pigmented Plants. *Pharmacognosy Magazine*, 15(60), 124-129.
- ลาววัลย์ ศรีพงษ์. (2553). การทดสอบความเหมาะสมของระบบในวิธีทางโครมาโทกราฟี System Suitability Test in Chromatographic Methods. *Thai Journal of Pharmacy (CPE)*, 5, 9.
- วสันต์ ชุณหวิจิตร. (2558, ตุลาคม 2557 – มกราคม 2558). ข้าวไรซ์เบอร์รี่. *ข่าวสารเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์*, 60(2), 25-35.

สำนักหอสมุดและศูนย์สารสนเทศวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. (2553, มิถุนายน). แอนโทไซยานิน (Anthocyanin). ประมวลสารสนเทศพร้อมใช้.







ตาราง 32 แสดงค่าความเป็นกรด-ด่างของตัวทำละลาย

	อัตราส่วน HCl : MeOH					
	0:100	15:85	30:70	45:55	60:40	100:0
0.1N HCl	4.39	1.52	1.49	1.40	1.27	1.11
0.5N HCl	4.39	0.94	0.88	0.79	0.72	0.81
1N HCl	4.39	0.66	0.57	0.50	0.33	0.28
H <sub>2</sub> O	4.39	5.06	5.23	5.60	5.79	5.14



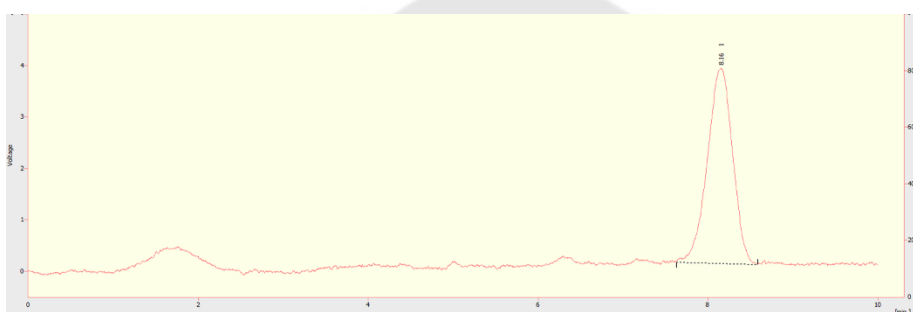


ภาคผนวก ข

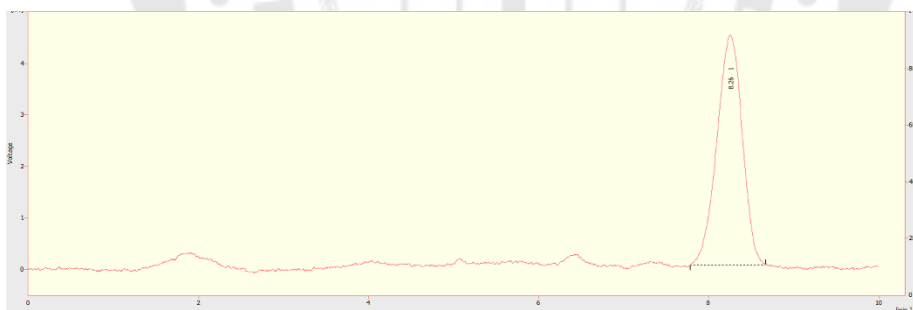
ภาพประกอบแสดงข้อมูลโครมาโทแกรมเพิ่มเติมของงานวิจัย



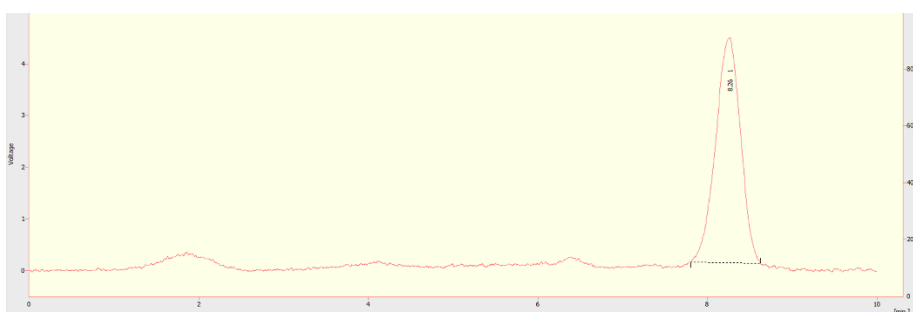
0.1N HCl



0.5N HCl

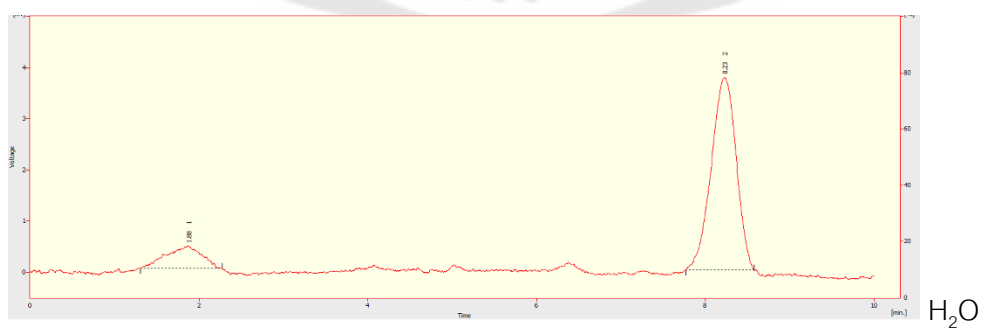
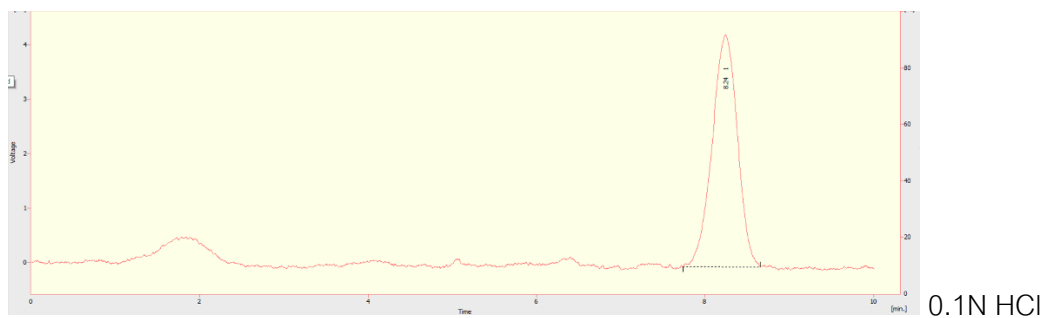


1N HCl

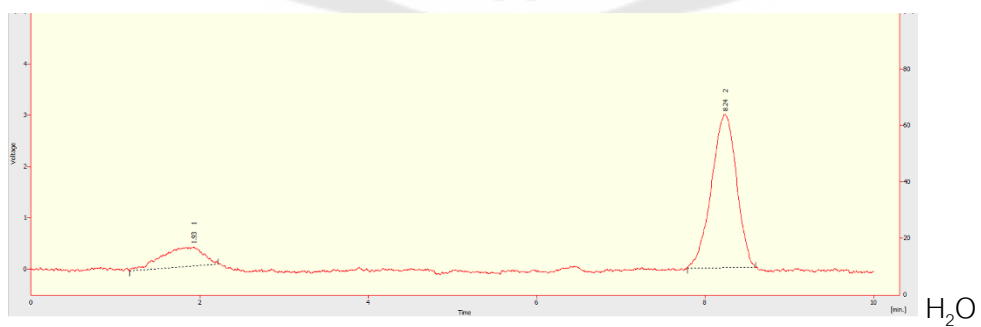
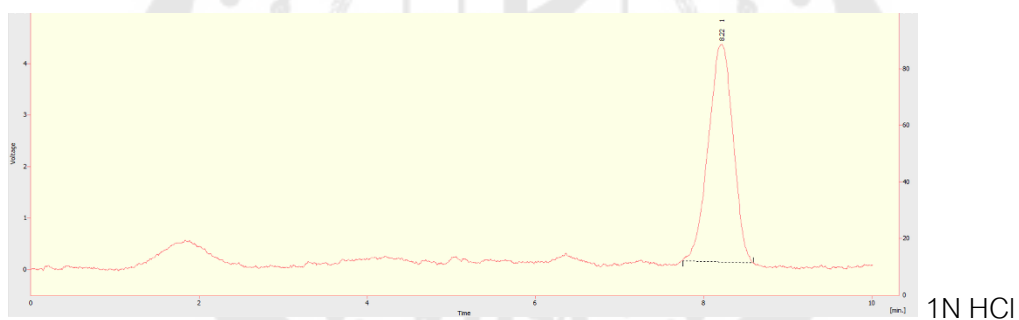
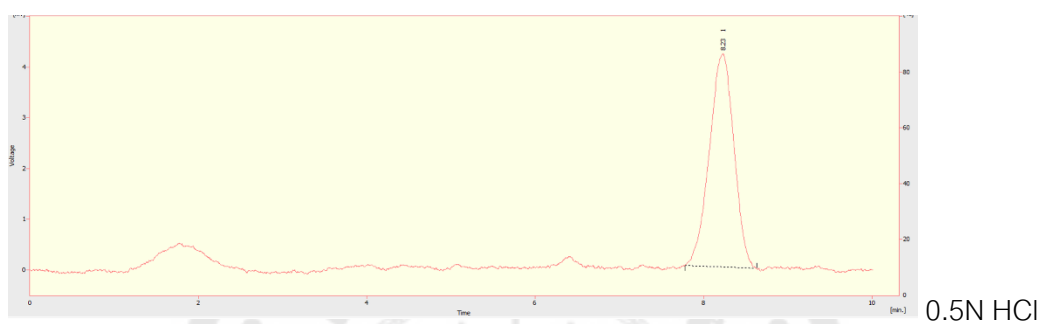
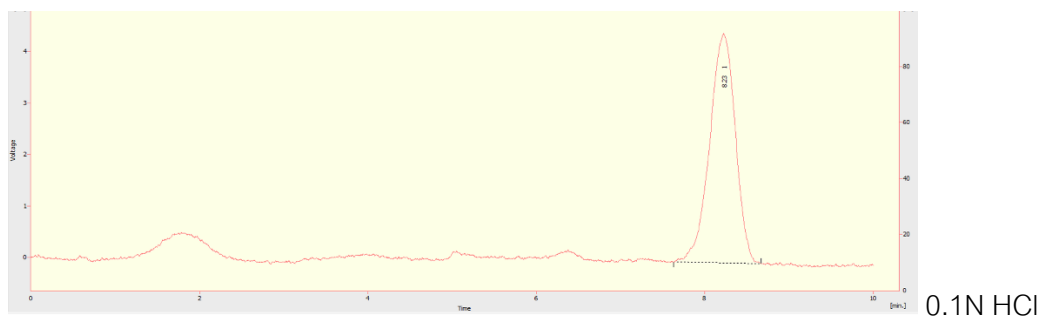
H<sub>2</sub>O

ภาพประกอบ 25 แสดงโครมาโทแกรมการสกัดข้าวไรซ์เบอรรีตราเทศโกโลตัสด้วย HCl:MeOH

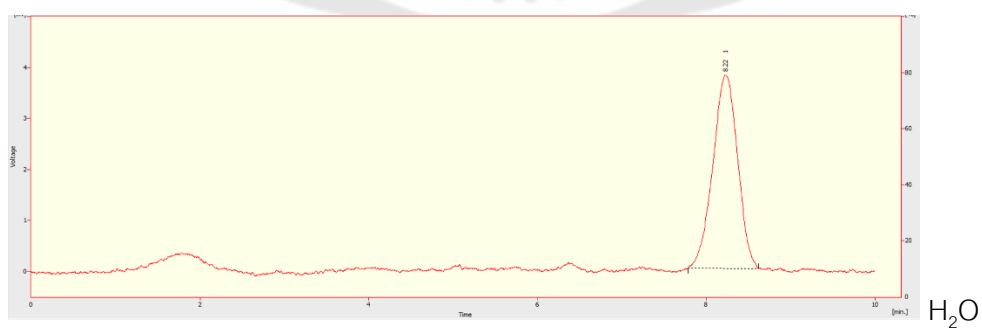
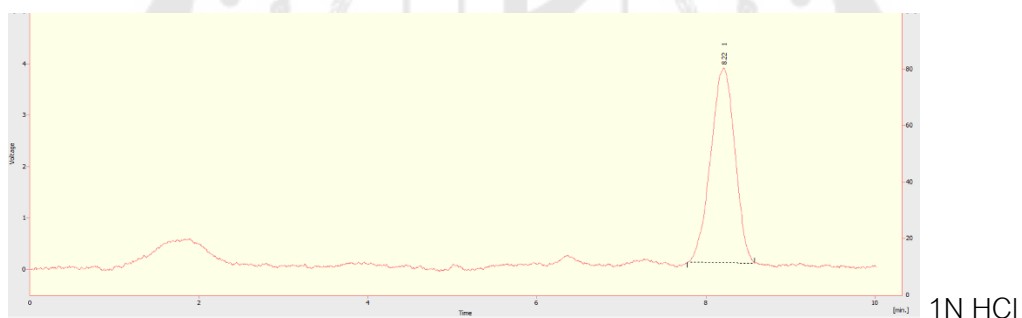
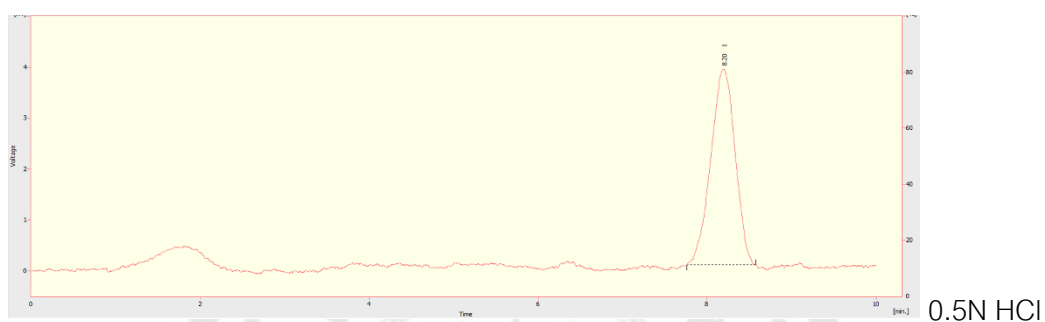
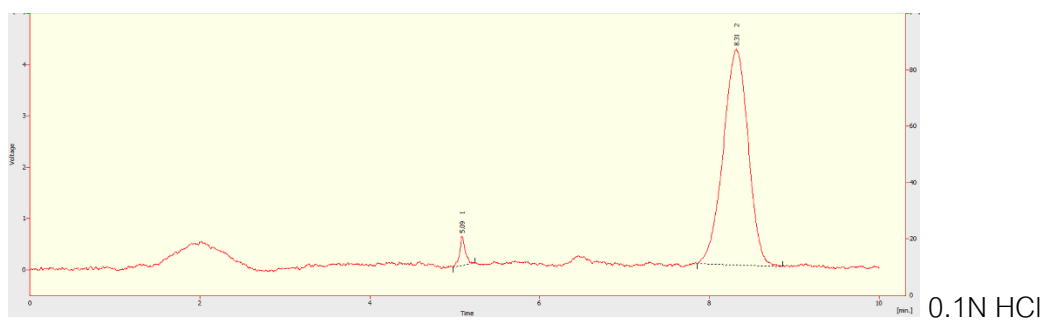
อัตราส่วน 100 : 0



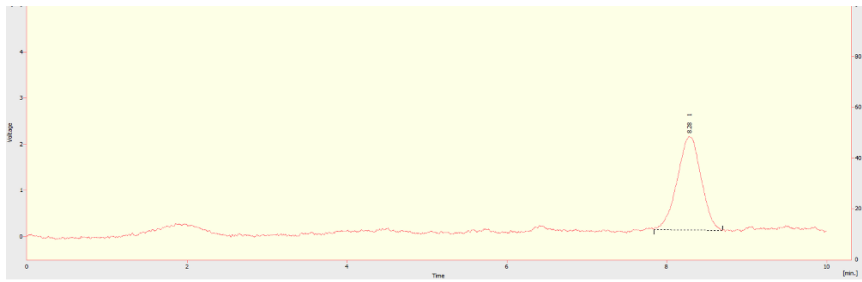
ภาพประกอบ 26 แสดงโครมาโทแกรมการสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ตราเทสโกโลดส์ด้วย HCl:MeOH  
อัตราส่วน 15 : 85



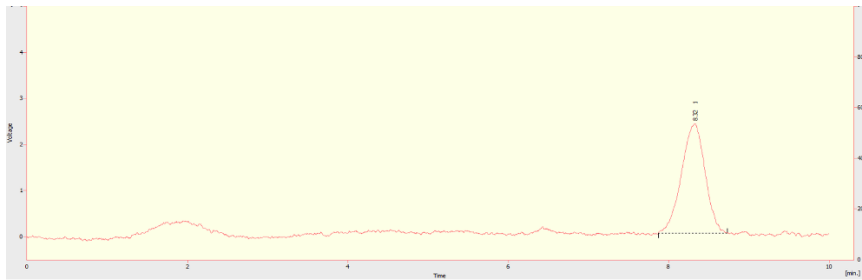
ภาพประกอบ 27 แสดงโครมาโทแกรมการสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ตราเทสโกโลดส์ด้วย HCl:MeOH  
อัตราส่วน 30 : 70



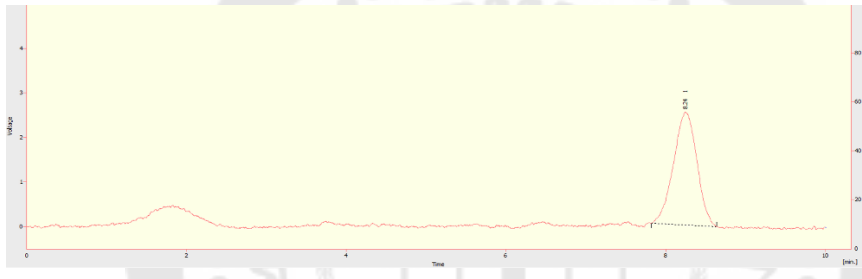
ภาพประกอบ 28 แสดงโครมาโทแกรมการสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ตราเทสโกโลดส์ด้วย HCl:MeOH  
อัตราส่วน 45 : 55



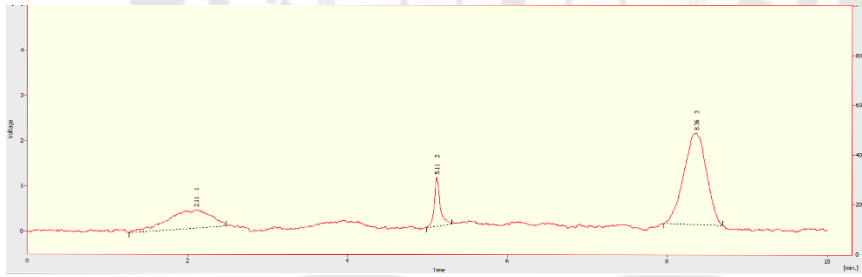
0.1N HCl



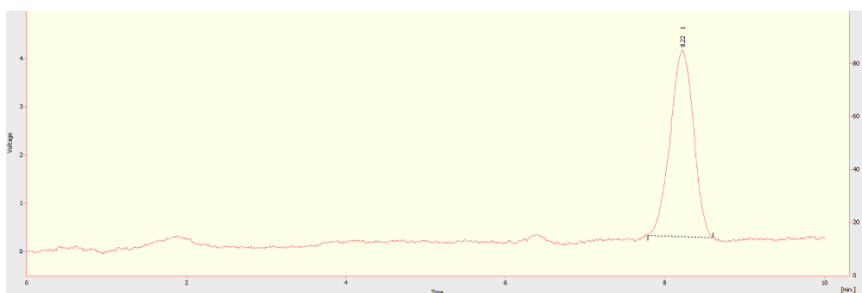
0.5N HCl



1N HCl

H<sub>2</sub>O

ภาพประกอบ 29 แสดงโครมาโทแกรมการสกัดข้าวไรซ์เบอรรีตราเทศโกโลดัสด้วย HCl:MeOH  
อัตราส่วน 60 : 40



ภาพประกอบ 30 แสดงโครมาโทแกรมการสกัดข้าวไรซ์เบอรรีตราเทศโกโลดัสด้วย MeOH

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ศุภินี ใจก่อง
วัน เดือน ปี เกิด	22 ตุลาคม 2536
สถานที่เกิด	เชียงใหม่
วุฒิการศึกษา	พ.ศ.2559 การแพทย์แผนไทยประยุกต์บัณฑิต มหาวิทยาลัยเทคโนโลยี ราชมงคลธัญบุรี

