

การสกัดทางเลือกและการทำให้บริสุทธิ์ของแกมมาออริซานอลจากรำข้าวและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ Alternative Extraction and Purification Methods of γ -Oryzanol from Rice Bran and Its Antioxidant Scavenging Activity

ดวงกมล เรือนงาม^{1*}, จิตติ ทาไ้¹, สุจิตรา สุกนธมัต², ร่มจิตรา นกเขา³
Duangkamol Ruen-ngam^{1*}, Chitti Tawai¹, Sujitra Sukonthamut², Raumjit Nokkoul³

Received: September 22, 2017

Accepted: November 30, 2017

บทคัดย่อ

ออริซานอลเป็นสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งในปัจจุบันนิยมใช้เป็นอาหารเสริม พบมากในน้ำมันรำข้าวแต่น้ำมันรำข้าวดิบที่ได้จากการสกัดมีสิ่งปนเปื้อนปะปน ได้แก่ ขี้ผึ้ง และยางเหนียว ซึ่งจำเป็นต้องกำจัดออกก่อนการให้น้ำมันรำข้าวดิบให้บริสุทธิ์ด้วยกรรมวิธีหลายขั้นตอน ในขั้นแรกเป็นการสกัดน้ำมันจากรำข้าวหอมมะลิด้วยวิธีการสกัดเย็นและวิธีการแช่ในตัวทำละลายเอทานอลและเฮกเซน หลังจากนั้นกำจัดสิ่งปนเปื้อนออกด้วยกระบวนการตกผลึกด้วยอะซิโตนในสารละลายผสม 2 ระบบ ที่ศึกษาเปรียบเทียบกันได้แก่ เมทานอล:อะซิโตนและเอทานอล:อะซิโตน กระบวนการตกผลึกมีสองขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณแกมมาออริซานอลในส่วนที่เป็นของแข็งและของเหลวทำโดยใช้เครื่อง RP-HPLC ส่วนการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระใช้วิธี DPPH ผลการทดลองพบว่าแกมมาออริซานอลที่ได้ในทุกสภาวะมีลักษณะเป็นผงสีขาวนวลจนไปถึงสีเหลืองซีด สภาวะการผลิตที่ดีที่สุดคือการสกัดเย็นและตกผลึกด้วยสารละลายผสมเอทานอลผสมกับอะซิโตน ผลได้เป็นร้อยละ 12.31 ซึ่งมีความบริสุทธิ์ร้อยละ 94.71 ผลึกแกมมาออริซานอลที่ได้นี้นำไปวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ประสิทธิภาพการต้านร้อยละ 50 (IC_{50}) ที่ความเข้มข้น 0.171 mg/ml ซึ่งอยู่ในช่วงเดียวกันกับสารมาตรฐาน BHT แต่มีค่าต่ำกว่าสารมาตรฐานแกมมาออริซานอลที่ใช้ในเชิงการค้า

คำสำคัญ: การต้านอนุมูลอิสระ การสกัด กระบวนการทำให้บริสุทธิ์ น้ำมันรำข้าว แกมมาออริซานอล

ABSTRACT

Oryzanols are well-known antioxidant and now used as food supplements. Crude rice bran oil (CRBO) composes of many impurities such as wax and gum sludge which are required to be removed prior to purifying CRBO with many serial steps. Firstly, CRBO was extracted from jasmine rice bran by cold press extraction and maceration with ethanol and hexane extraction then impurities; such as waxes and gums, were removed from the CRBO by 2 different systems, i.e., methanol:acetone and ethanol:acetone crystallisation systems which were then compared. The crystallisation involved two steps and yielded a solid and a liquid phase under cold conditions. The γ -oryzanol content in all phases was analysed by RP-HPLC and the antioxidant scavenging activity was analyzed by DPPH assay. The γ -oryzanol obtained from all conditions was a fine white to pale yellow crystal. The best extraction conditions were cold pressed extraction with crystallisation in ethanol: acetone, which yielded 12.31% γ -oryzanol crystals with 94.71 % purity. The γ -oryzanol crystals were evaluated for their antioxidant scavenging activity and had an IC_{50} of 0.171 mg/ml, with almost the same range as the

* Corresponding author e-mail: duangkamol.ru@kmitl.ac.th, modeliebe@gmail.com

¹ Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL) Bangkok Thailand

² Department of Statistics, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL) Bangkok Thailand

³ Department of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang Prince of Chumphon Campus (KMITL PCC) Chumphon Thailand

BHT standard. However, it was lower than that obtained with a commercial γ -oryzanol standard.

Keywords: antioxidant activity, extraction, purification, rice bran oil, γ -oryzanol

บทนำ

ประเทศไทยเป็นหนึ่งในสิบของผู้ผลิตและผู้ส่งออกข้าวในระยะเวลา 7 ปีที่ผ่านมา สถานการณ์สินค้าเกษตรประเภทธัญพืชและจากรายงานแนวโน้มในเดือนพฤศจิกายนปี 2014 จัดอันดับให้ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตข้าวรายใหญ่อันดับที่หกและเป็นอันดับที่สามในฐานะผู้ส่งออกในโลกทั้งนี้มีการผลิตข้าวมากถึง 20.5 ล้านตันต่อปี [1] การสีข้าวทำให้เกิดรำข้าวที่เป็นผลพลอยได้ขึ้นประมาณร้อยละ 10.5 ของน้ำหนักข้าวเดิม รำข้าวเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ โทโคไตรอีนอล ออริซานอล ฟีนอลิก แอนโทไซยานิน ไฟเตท และโพลีฟีนอล เป็นต้น [2-9]

ออริซานอล เป็นสารประกอบเอสเทอร์ของกรดเพอรูลิกที่มีอยู่ประมาณร้อยละ 2 ในรำข้าว ออริซานอลสามารถยับยั้งการดูดซึมคอเลสเตอรอล เพิ่มการขับคอเลสเตอรอล และเพิ่มการหลั่งน้ำดี ช่วยลดการตกตะกอนของแคลตเลต และช่วยควบคุมการทำงานของสมอง ออริซานอลเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่นิยมใช้เป็นอาหารเสริมในปัจจุบันอีกด้วย [10-11] มีนักวิจัยได้พัฒนาวิธีสกัดและทำออริซานอลให้บริสุทธิ์จากแหล่งธรรมชาติ เช่น น้ำมันรำข้าวดิบ (crude rice bran oil, CRBO) [4, 11-17] CRBO ถูกสกัดจากรำข้าวโดยผ่านหลายขั้นตอน ตัวอย่างวิธีการสกัด ได้แก่ การใช้ชุดข้อหักเลท การแช่ การใช้ไอน้ำภายใต้สภาวะกึ่งวิกฤติ (subcritical water extraction, SWE) และการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ภายใต้ภาวะวิกฤติยิ่งยวด (supercritical carbon dioxide extraction, SC-CO₂) [3-4, 11, 17-19] อย่างไรก็ตามวิธีการสกัดข้างต้นค่อนข้างแพงดังนั้นการสกัดเย็นและการใช้ตัวทำละลายจึงเป็นวิธีที่ยั่งยืนและสามารถประยุกต์ได้ดีในระบบขยายขนาด

ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของวัสดุ โดยทั่วไปแล้วเฮกเซนถูกใช้ในการสกัดสารที่ไม่มีขั้ว เช่น น้ำมัน ในขณะที่เอทานอลถูกใช้สำหรับสารประกอบที่มีขั้วเช่น แกมมาออริซานอล ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงใช้ตัวทำละลายทั้งสองในการสกัด [11, 14, 20] อย่างไรก็ตามการสกัดอย่างเดียวไม่เพียงพอในการทำสารแกมมาออริซานอลให้บริสุทธิ์ จากการศึกษาทางวิจัยในอดีตพบว่ามีหลายวิธี ได้แก่ การใช้ซิลิกาไล (ต่าง) การกลั่นทางกายภาพ การกลั่นทางเคมี การใช้วิธีทางโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง และการเหนี่ยวนำให้ตกตะกอนโดยแคลเซียมโอออน แต่กระบวนการเหล่านี้ให้ค่าผลได้ของแกมมาออริซานอลต่ำและแกมมาออริซานอลที่ได้มีคุณภาพต่ำกว่าสารที่ผลิตในเชิงการค้า [12-13, 21] บางงานวิจัยทำการทดลองเบื้องต้นโดยใช้การตกตะกอนสองขั้นตอนซึ่งมีคุณภาพสูง สกัดน้ำมันรำข้าวดิบด้วยชุดข้อหักเลท โดยใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลาย [13] อย่างไรก็ตาม กระบวนการสกัดน้ำมันรำข้าวดิบด้วยวิธีการแช่ด้วยตัวทำละลายเฮกเซนและเอทานอล อีกทั้งชนิดตัวทำละลายที่เลือกใช้ปลอดภัยและแตกต่างกันในขั้นตอนการตกผลึก (การทำให้บริสุทธิ์) เป็นปัจจัยที่สำคัญและมีผลกระทบต่อผลผลิตที่ได้ของแกมมาออริซานอลและคุณภาพของผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้ แต่ส่วนนี้ยังไม่มีรายงานอย่างแน่ชัด ดังนั้นงานวิจัยฉบับนี้ทำขึ้นมาเพื่อเติมเต็มในส่วนดังกล่าว

งานวิจัยนี้แสดงถึงการเปรียบเทียบการตกผลึกสารแกมมาออริซานอลจากน้ำมันรำข้าวดิบสายพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิที่ปลูกกันมากในภาคกลางของประเทศไทย ในขั้นตอนศึกษาวิธีการสกัดที่แตกต่างกันสามสภาวะ ได้แก่ การสกัดเย็น การแช่โดยใช้สารเฮกเซนและเอทานอล และศึกษาขั้นตอนการตกผลึกซึ่งดำเนินการต่อเนื่องสองขั้นตอนซึ่งขั้นตอนการตกผลึกจะแทนเมทานอลด้วยเอทานอลซึ่งไม่เป็นพิษ จากนั้นจะนำเอาผลิตภัณฑ์ที่ได้มาวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

* Corresponding author e-mail: duangkamol.ru@kmitl.ac.th, modeliebe@gmail.com

¹ ภาควิชาชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ 10520 ประเทศไทย

² ภาควิชาสถิติ, คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ 10520 ประเทศไทย

³ สำนักเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพร, จังหวัดชุมพร 86160 ประเทศไทย

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. วัตถุดิบ

ใช้รำข้าวขาวดอกมะลิที่เป็นผลผลิตพลอยได้ของ กระบวนการสีจากจังหวัดสุพรรณบุรี ประเทศไทย นำรำข้าว เก็บรักษาในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -25 องศาเซลเซียส เพื่อ ป้องกันการเสื่อมคุณภาพของสารออริซานอล เมทานอล ไอโซโพรพานอล เอทิลอะซิเตต และเฮกเซน (เกรด HPLC) จาก Burdick และ Jackson ประเทศสหรัฐอเมริกา เมทานอล ร้อยละ 95 เอทานอล และอะซิโตน จาก RCI Labscan ประเทศไทย สารมาตรฐานแกมมาออริซานอล สังเคราะห์ที่มีความบริสุทธิ์ร้อยละ 98.7 จากบริษัท Tsuno Rice Fine Chemicals ประเทศญี่ปุ่น สาร 2,2-Diphenyl -1- pic-rylhydrazyl (DPPH) และ สาร 2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT) จาก Sigma-Aldrich, ประเทศเยอรมนี

2. วิธีการ

กระบวนการสกัดที่ใช้มี 2 วิธี ได้แก่ การสกัดเย็น และการแช่ในตัวทำละลายที่แตกต่างกันสองตัว คือ เฮกเซน และเอทานอล ขั้นตอนต่อไป เป็นการเอาไขมันและกัมออก ผัง กระบวนการทดลองแสดงดัง Figure 1 น้ำมันรำข้าวดิบ แสดงได้ดัง Figure 2 และการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ของรำข้าว ตามวิธี AOAC และ ASEANFOODS [20-21] ดังที่แสดงใน Table 1

3. กระบวนการสกัดเย็น

กระบวนการการสกัดเย็นหรือบีบอัด ใช้เครื่องจักร จากบริษัท Lopburi Vegetable Oil จังหวัดลพบุรี ประเทศไทย โดยนำน้ำมันรำข้าวดิบ (CRBO) ที่ได้จากการ สกัดถูกลมกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 เพื่อ กำจัดตะกอนออก จากนั้นนำมาเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาทดลอง

4. กระบวนการสกัดด้วยการแช่

นำรำข้าวผสมกับเฮกเซนด้วยอัตราส่วน 1:6 (W/V) หลังจากนั้น เขย่าที่ความเร็ว 200 rpm ที่อุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง [ดัดแปลงมา จาก 13, 22] นำมากรองผ่านกระดาษ whatman เบอร์ 1 และระเหยเฮกเซนออกด้วยเครื่องระเหยภายใต้ความดัน 175 mmHg ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ทำการ ทดลองเช่นเดิมแต่ใช้ ร้อยละ 95 เอทานอล แทนและใช้ สภาวะการระเหยภายใต้ความดัน 90 mmHg ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

5. การเอาไขมันและกัมออก

นำน้ำมันรำข้าวดิบที่เตรียมได้ 50 กรัม มา ละลายในอะซิโตนที่อัตราส่วน 1 ต่อ 6 (W/V) จากนั้น นำมาอุ่นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นและเก็บที่อุณหภูมิ -25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้ไขมันและกัม นำมาแยกออกโดย กรองผ่านกระดาษ whatman เบอร์ 1 ระเหยอะซิโตนที่ อยู่ในของเหลวด้วยเครื่องระเหยที่ความดัน 200 mmHg ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นำสารละลายที่เหลือมาใช้ ในขั้นตอนการตกผลึก [13]

6. การตกผลึก

นำน้ำมันรำข้าว 10 กรัม ละลายในตัวทำละลาย ผสมเมทานอลและอะซิโตนที่อัตราส่วน 7:3 (V/V) ปริมาตร 400 มิลลิลิตร แล้วจึงนำสารละลายผสมที่ได้นี้แช่แข็งที่ อุณหภูมิ -65 ± 3 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง แยกส่วนของแข็งออกจากส่วนของเหลวโดยกรองผ่าน กระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 กำจัดตัวทำละลาย ออกด้วยเครื่องระเหยที่ 45 องศาเซลเซียส ความดัน 150 mmHg ได้ของเหลวที่ 1 (LP1) ส่วนของแข็งที่เรียกเป็น SP1 เก็บของเหลว LP1 ในภาชนะดูดความชื้นที่ อุณหภูมิห้อง (30 ± 1 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมเฮกเซน 20 มิลลิลิตร นำมาเก็บที่อุณหภูมิ

* Corresponding author e-mail: duangkamol.ru@kmitl.ac.th, modeliebe@gmail.com

¹ Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL) Bangkok Thailand

² Department of Statistics, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL) Bangkok Thailand

³ Department of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang Prince of Chumphon Campus (KMITL PCC) Chumphon Thailand

5±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลาหนึ่งสัปดาห์ นำมากรองเพื่อแยกผลึกของสารแกมมาออริซานอล (SP2) ออกส่วนของเหลวที่เหลือเรียกว่า LP2 ล้าง SP2 ด้วยเฮกเซน 30 มิลลิลิตร [13, 19] และนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟี

(Reverse phase, RP-HPLC) [24] ทำการทดลองเช่นเดิมแต่เปลี่ยนตัวทำละลายเป็นเอทานอลและอะซีโตนนี้และทำการระเหยที่สภาวะ 175 mmHg ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

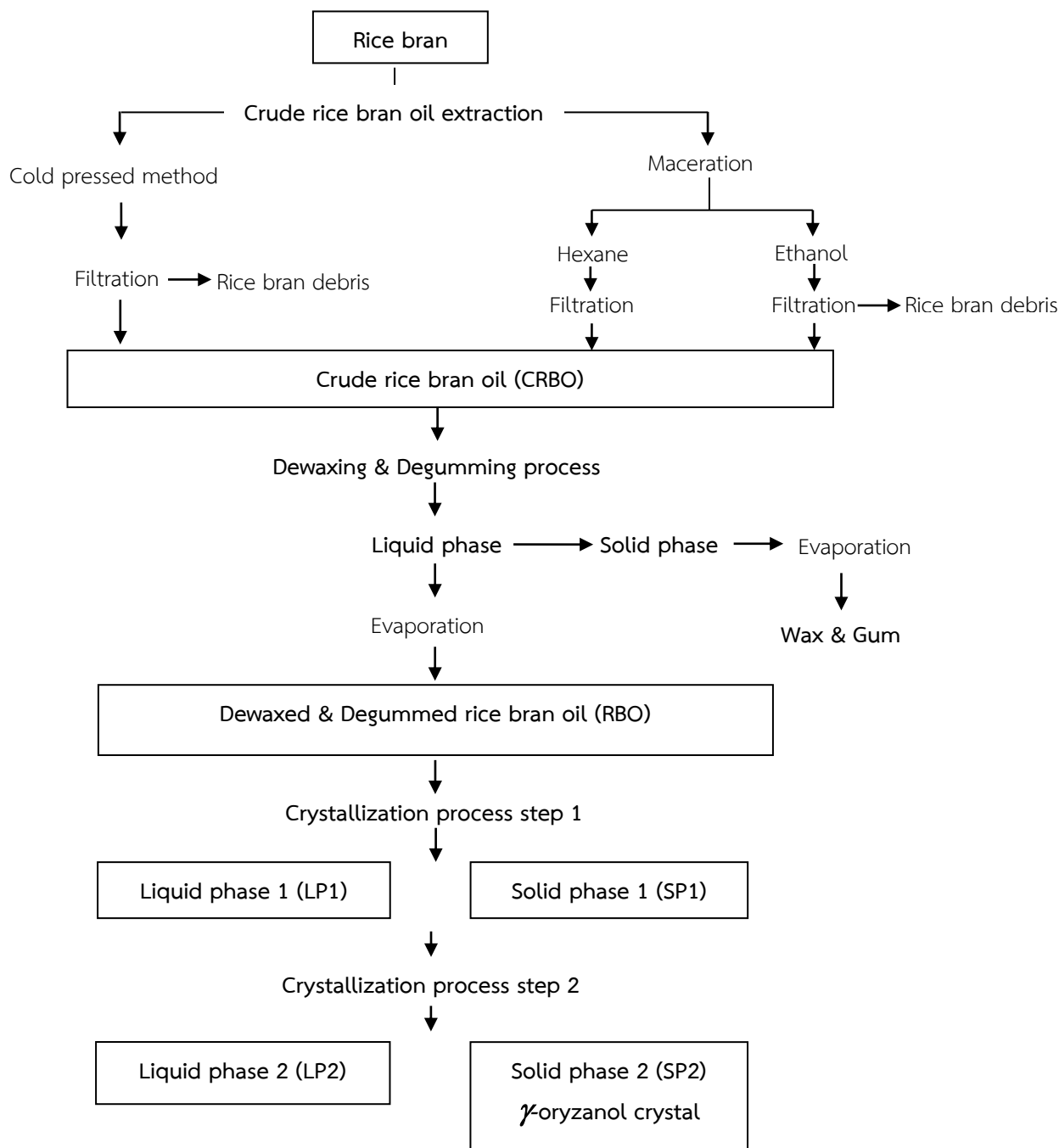


Figure 1. Flow diagram

* Corresponding author e-mail: duangkamol.ru@kmitl.ac.th, modeliebe@gmail.com

¹ภาควิชาชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ 10520 ประเทศไทย

²ภาควิชาสถิติ, คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ 10520 ประเทศไทย

³สำนักเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพร, จังหวัดชุมพร 86160 ประเทศไทย

7. การวิเคราะห์ปริมาณแกมมาออริซานอล

วิเคราะห์โดยโครมาโตกราฟีแบบย้อนกลับ [24] ด้วยคอลัมน์ที่ C-18 (ACE[®] Scotland) ยาว 25 cm ใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น เมทานอล : ไอโซโพรพานอล : เอทิลอะซีเตต ที่อัตราส่วน 47.5:40:12.5 (V/V) และอัตราการไหลเท่ากับ 1 mL/min ในการวิเคราะห์แต่ละครั้งจะใช้ตัวอย่างน้ำมันรำข้าวที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้น 30 µg/mL ปริมาณ 20 µL รายงานผลโดยใช้โปรแกรม Shimadzu LC Solution เตรียมกราฟมาตรฐานของแกมมาออริซานอล ในช่วงความเข้มข้น 0.05-50 µg/mL การวิเคราะห์ปริมาณ ทำโดยพิจารณาจากโครมาโตแกรมที่เกิดขึ้นที่เวลาเดียวกับเวลาของสารมาตรฐาน

8. การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของผลึกของออริซานอล

ความบริสุทธิ์ของผลึกของออริซานอลแสดงในรูป ร้อยละความบริสุทธิ์ของแกมมาออริซานอล (%γ-oryzanol purity) และร้อยละประสิทธิภาพของการทำให้บริสุทธิ์ (%Purification efficiency) ซึ่งหาได้จากสมการดังต่อไปนี้

%γ-Oryzanol purity =

$$\left(\frac{\text{Area of } \gamma\text{-oryzanol peak}}{\text{Total area under all peaks}} \right) \times 100$$

$$\% \text{Purification efficiency} = \left(\frac{P_C - P_{\text{CRBO}}}{P_{\text{CRBO}}} \right) \times 100$$

เมื่อ P_C คือ ร้อยละความบริสุทธิ์ของแกมมาออริซานอล ในผลึกผลิตภัณฑ์

P_{CRBO} คือ ร้อยละความบริสุทธิ์ของแกมมาออริซานอล ในน้ำมันรำข้าวดิบ (CRBO)

9. การทดสอบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

การทดสอบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ ใช้สาร DPPH ความเข้มข้น 0.5 mM ละลายผลึกของสารแกมมาออริซานอลในเอทานอลที่ช่วงความเข้มข้น 0.03–1.5 mg/mL ใช้ตัวอย่าง 100 µL ทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH 100 µL นำมาเก็บในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm ด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลท (EMS Reader MF, LabSystems, Finland) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน BHT ที่เตรียมในช่วงความเข้มข้น 0.02–2.00 mg/mL การลดลงของ DPPH คำนวณจากสมการ;

$$\text{DPPH reduction (\%)} = \left(\frac{A_o - A_s}{A_s} \right) \times 100$$

เมื่อ A_o = ค่าการดูดซับแสงของสารละลายควบคุม (absorbance)

A_s = ค่าการดูดซับแสงของสารละลายตัวอย่าง (absorbance)

ความเข้มข้นของสารแกมมาออริซานอลที่สามารถยับยั้งด้วยสารอนุมูลอิสระ DPPH ลงร้อยละ 50 (แสดงในรูป IC_{50}) และประเมินค่าโดยใช้ GraphPad Prism เวอร์ชัน 5.0 IC_{50} ที่มีค่าที่ต่ำกว่า แสดงว่ามีกิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระมากกว่า

10. การวิเคราะห์ทางสถิติ

การทดลองทุกปัจจัยทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วดำเนินการหาค่าเฉลี่ย จากนั้นเปรียบเทียบความแตกต่างแต่ละปัจจัยด้วย ANOVA ภายใต้วิธีการของ Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) ด้วยโปรแกรมทางสถิติ SPSS 22.0

* Corresponding author e-mail: duangkamol.ru@kmitl.ac.th, modeliebe@gmail.com

¹ Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL) Bangkok Thailand

² Department of Statistics, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL) Bangkok Thailand

³ Department of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang Prince of Chumphon Campus (KMITL PCC) Chumphon Thailand

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การสกัดน้ำมันรำข้าวดิบ

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยประมาณของรำข้าวตามกระบวนการ AOAC (2012) และ ASEANFOODS (2011) ได้ผลดัง Table 1 น้ำมันรำข้าวดิบที่ได้จากการสกัดด้วยสามกระบวนการที่แตกต่างกัน ได้แก่ กระบวนการสกัดเย็น และกระบวนการแช่ด้วยตัวทำละลาย 2 กระบวนการการสกัดเย็นมีอุณหภูมิอยู่ที่ประมาณ 49.5 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นสภาวะที่สารแกมมาออร์ซานอลไม่เสื่อมสลาย ผลการสกัดด้วย 3 สภาวะแสดงดัง Table 2 ซึ่งพบว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายให้ผลผลิตสูงกว่าการสกัดเย็น คือ มีค่าอยู่ในช่วง ร้อยละ 10.24-13.80 และได้สารแกมมาออร์ซานอลในช่วง 2.81-2.96 mg/g ของรำข้าว ในขณะที่การสกัดด้วยการบีบเย็นได้ค่าผลได้ของน้ำมันและสารแกมมาออร์ซานอลอยู่ที่ ร้อยละ 5.06 และ 0.93 mg/g ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากยังมีสาร

แกมมาออร์ซานอลถูกกักอยู่ในรำข้าว ในขณะที่ตัวทำละลายสามารถแทรกซึมเข้าไปในรำข้าวได้ดีกว่า

การสกัดด้วยตัวทำละลายแสดงให้เห็นว่า เฮกเซน ถึงแม้ว่าจะสกัดน้ำมันได้ปริมาณมากกว่าแต่พบว่าได้ปริมาณสารแกมมาออร์ซานอลน้อยกว่าเอทานอล ดังนั้นความเข้มข้นของสารแกมมาออร์ซานอล เมื่อสกัดด้วยเอทานอลมีค่ามากกว่าสกัดโดยเฮกเซน ซึ่งสอดคล้องกับผลของงานวิจัยก่อนหน้านี้ ซึ่งได้ทำการทดลองสกัดสารแกมมาออร์ซานอลภายใต้ความดันบรรยากาศ พบว่าปริมาณสารแกมมาออร์ซานอลมากกว่าเมื่อใช้เอทานอลในการสกัดแทนเฮกเซน [11] ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากแกมมาออร์ซานอลเป็นสารที่มีขั้ว ประกอบด้วยไตรเทอปีน หรือ สเตอรอยด์และกรดเฟอรูลิก ดังนั้นจึงละลายได้ดีกว่า ถึงแม้ว่ามีผลได้ของสารแกมมาออร์ซานอลมากกว่าการใช้เฮกเซนเพียงแค่ร้อยละ 5.3

Table 1. Proximate chemical compositions of rice bran (n=3)

Compositions	%	Test methods
Protein	11.64±0.15	AOAC (2012)
Total fat	19.22±1.36	AOAC (2012)
Moisture	8.00±0.02	Asean Manual of Food Analysis, 2011
Ash	9.04±0.02	Asean Manual of Food Analysis, 2011
Crude fiber	15.11±0.04	AOAC (2012)

Table 2. Crude rice bran oil and γ -oryzanol yields extracted by different methods

Extraction method	Crude oil yield (%, g/g rice bran)	γ -Oryzanol concentration (mg/g of rice bran oil)	γ -Oryzanol yield (mg/g of rice bran)
Cold press	5.06	18.33 ± 1.55 ^c	0.93 ± 0.08 ^c
Maceration			
Hexane	13.80	20.23 ± 2.17 ^b	2.81 ± 0.30 ^b
Ethanol	10.24	28.92 ± 0.63 ^a	2.96 ± 0.06 ^a

Remark: values within each column with the same superscript character are not significantly different at $P < 0.05$

* Corresponding author e-mail: duangkamol.ru@kmitl.ac.th, modeliebe@gmail.com

¹ ภาควิชาชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ 10520 ประเทศไทย

² ภาควิชาสถิติ, คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ 10520 ประเทศไทย

³ สำนักเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพร, จังหวัดชุมพร 86160 ประเทศไทย

Figure 2 แสดงลักษณะทางกายภาพของน้ำมันรำข้าวดิบที่สกัดจากวิธีต่างๆ น้ำมันรำข้าวดิบที่ได้จากการสกัดด้วยกระบวนการบีบอัดด้วยอุณหภูมิต่ำมีสีน้ำตาลเข้มและกลิ่นหอมของข้าว ในขณะที่น้ำมันจากการสกัดเอทานอลเปลี่ยนจากสีน้ำตาลเป็นสีดำ และมี

กลิ่นหอมของข้าวเช่นเดียวกัน แต่มีตะกอนสีเหลืองเล็กน้อยด้านล่างภาชนะ น้ำมันรำข้าวดิบที่ได้จากการสกัดจากเฮกเซนมีสีน้ำตาลอ่อนและใสกว่าน้ำมันรำข้าวดิบที่ได้จากการสกัดด้วยเอทานอลและวิธีบีบอัดที่อุณหภูมิต่ำแต่ไม่มีกลิ่นหอมของข้าว



A. cold press
- Rice smell



B. hexane extraction
- No sweet smell



C. ethanol extraction
- Rice smell

Figure 2. Characteristics (color and smell) of crude rice bran oil extracted by different extraction methods; A. cold press B. hexane extraction C. ethanol extraction

2. กระบวนการกำจัดขี้ผึ้งและกัม

ในขั้นตอนการกำจัดขี้ผึ้งและสารเหนียวออกโดยใช้ตัวทำละลายเป็นอะซิโตน พบว่าสารที่กำจัดออกนี้มีลักษณะเป็นเมือกที่มีองค์ประกอบของฟอสโฟลิพิดและโลหะปนเปื้อน เรียกสารสถานะของแข็งนี้ว่าสถานะของแข็ง [13-23] และสารในสถานะของเหลวที่เป็นน้ำมันดิบที่ปราศจากขี้ผึ้งและสารเหนียวแล้วว่สถานะของเหลว จากการทำสมดุลมวลจะได้ปริมาณในขั้นตอนการกำจัดขี้ผึ้งและกัมสามารถรักษาปริมาณแกมมาออร์ซานอล (ร้อยละ 5.33 ± 0.01) ให้อยู่ในน้ำมันในสถานะของเหลวได้ปริมาณที่สูงกว่าเมื่อเทียบกับเฮกเซน (ร้อยละ 5.07 ± 0.01) อีกทั้งทำให้สัดส่วนสถานะของเหลวมีปริมาณมากกว่าสถานะของแข็ง ทั้งนี้เนื่องจากเฮกเซนช่วยดึงสารที่ไม่มีขี้ผึ้งออก ซึ่งได้แก่ขี้ผึ้งและกัม สิ่งที่เกิดขึ้นได้คือ แกมมาออร์ซานอลปริมาณน้อยมากที่หาย

จากน้ำมันรำข้าวดิบที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีการบีบเย็นและการสกัดด้วยเฮกเซน ในขณะที่ประมาณ ร้อยละ 25 หายไปจากน้ำมันรำข้าวดิบที่ได้จากการสกัดด้วยเอทานอล อย่างไรก็ตาม ปริมาณของแกมมาออร์ซานอลในน้ำมันรำข้าวที่ได้จากการสกัดที่ถูกนำขี้ผึ้งและสารเหนียวออกแล้วยังสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำมันรำข้าวดิบที่ได้จากการสกัดด้วยการบีบอัดด้วยความเย็นและการสกัดโดยใช้เฮกเซน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารแกมมาออร์ซานอลเป็นสารที่มีโครงสร้างใหญ่และน้ำหนักโมเลกุลมากอาจเป็นไปได้ว่าบางส่วนของโครงสร้างไปเกาะติดกับส่วนที่ไม่มีขี้ผึ้งของขี้ผึ้งและกัม

น้ำมันรำข้าวที่ได้จากการบีบเย็นที่กำจัดขี้ผึ้งและกัมออกแล้วมีสีขาวขุ่นและมีกลิ่นข้าว ในขณะที่น้ำมันรำข้าวที่ได้จากการสกัดด้วยเฮกเซนมีสีน้ำตาลใสและไม่มีความขุ่น ส่วนการสกัดน้ำมันรำข้าวที่ได้จากการสกัดด้วยเอทานอลมีสีน้ำตาลเข้มและมีกลิ่นอโรมา

* Corresponding author e-mail: duangkamol.ru@kmitl.ac.th, modeliebe@gmail.com

¹ Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL) Bangkok Thailand

² Department of Statistics, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL) Bangkok Thailand

³ Department of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang Prince of Chumphon Campus (KMITL PCC) Chumphon Thailand

ของข้าว การวิจัยข้างต้นนี้ชี้ให้เห็นถึงความจำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติมเพื่อค้นหาวิธีการลดการสูญเสียสาร
แกมมาออร์ซานอลในกระบวนการที่สกัดด้วยเอทานอล
ในงานวิจัยถัดไป

Table 3. Yields of each phase from dewaxing & degumming process

Extraction method	Wax and gum yield in product (%)	RBO yield in product (%)	γ -Oryzanol yield in RBO (%)
Cold press	51.27 $\pm$ 0.15	48.73 $\pm$ 0.20	4.14 $\pm$ 0.00
Maceration			
(Rice bran:solvent 1:6 w/v)			
Hexane	54.31 $\pm$ 0.09	45.69 $\pm$ 0.30	5.07 $\pm$ 0.01
Ethanol	33.92 $\pm$ 0.10	66.08 $\pm$ 0.07	5.33 $\pm$ 0.01

Remark: wax and gum (solid phase), dewaxed and degummed rice bran oil (RBO) (liquid phase) and γ -oryzanol from dewaxing & degumming process

3. กระบวนการตกผลึก

ศึกษากระบวนการตกผลึก 2 ระบบ คือ ระบบที่ใช้เมทานอลผสมกับอะซีโตน และระบบเอทานอลผสมกับอะซีโตน จากการทดลองพบว่าส่วนที่เป็นของแข็งที่ถูกสกัดจากของเหลวหลักในขั้นตอนแรกของการตกผลึก SP1 และสถานะของเหลว LP1 แสดงดัง Figure 3 SP1 ประกอบด้วยสเตอรอล เอสเทอร์ และไตรอะซิลกลีเซอรอล และมีลักษณะดัง LP1 โดยที่ LP1 จะประกอบไปด้วยกรดไขมันอิสระ โมโนเอซิลกลีเซอรอล สควาลีน โทคอล ไฟโตสเตอรอยด์ และไดอะซิลกลีเซอรอล [13] และเมื่อนำ LP1 มา ตกผลึกในขั้นตอนที่ 2 จะได้ของเหลว LP2 โดยการสกัดด้วยวิธีบีบเย็นและวิธีที่ใช้สารละลายเฮกเซนจะได้ผลึกของแกมมาออร์ซานอลที่มีสีขาว ภายใน 3 วัน ในขณะที่การสกัดในเอทานอล จะเกิดผลึกของแกมมาออร์ซานอลภายใน 1 สัปดาห์ โดยน้ำหนักของส่วนของแข็งและของเหลวที่ได้และความเข้มข้นของสารแกมมาออร์ซานอลแสดงดัง Table 4 และสมบัติทางกายภาพ และความเข้มข้นของแกมมาออร์ซานอลในผลึกที่ได้จากน้ำมันรำข้าวดิบ 50 g แสดงดัง Table 5

จากผลการทดลองพบว่าวิธีการสกัดแบบบีบเย็นจะให้แกมมาออร์ซานอลใน LP1 สูงที่สุด และเมื่อ

เปรียบเทียบกับวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย พบว่าให้ผลเหมือนกัน (Table 4) SP1 ในระบบที่มีเมทานอล:อะซีโตนให้ความเข้มข้นของแกมมาออร์ซานอลสูงที่สุด สำหรับการสกัดแบบบีบเย็นเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่นๆ ในทางตรงกันข้าม น้ำมันรำข้าวดิบที่ได้จากการสกัดแบบบีบเย็นในระบบเอทานอล:อะซีโตนให้ปริมาณของแกมมาออร์ซานอลต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกระบวนการสกัดวิธีอื่นๆ ซึ่งก็หมายความว่า ปริมาณแกมมาออร์ซานอลจำนวนมากสูญเสียไปในระบบเมทานอล:อะซีโตนมากกว่าระบบเอทานอล:อะซีโตนในกระบวนการตกผลึกขั้นที่สอง

สารแกมมาออร์ซานอลที่ตกผลึกด้วยระบบเอทานอล: อะซีโตนสูญหายไปยังของเหลวส่วนที่ 2 (LP2) วิธีการสกัดแบบบีบเย็นทำให้เกิดการสูญหายมากกว่าวิธีอื่น โดยมีการสูญเสียประมาณร้อยละ 72.25 และ 63.83 เมื่อเทียบกับการสกัดด้วยเฮกเซนและเอทานอลตามลำดับ อาจเป็นไปได้ว่าผลผลิตซีฟี่และสารเหนียวนั้นมีสารประกอบทั้งส่วนมีขี้และไม่ขี้ที่เชื่อมต่อกับแกมมาออร์ซานอล ดังนั้นทำให้สารแกมมาออร์ซานอลหายไปปริมาณมากในขั้นตอนนี้ ในขั้นตอนนี้นะแนะนำว่างานวิจัยในอนาคตควรเพิ่มความเข้มข้นของตัวทำละลาย

* Corresponding author e-mail: duangkamol.ru@kmitl.ac.th, modeliebe@gmail.com

¹ ภาควิชาชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ 10520 ประเทศไทย

² ภาควิชาสถิติ, คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ 10520 ประเทศไทย

³ สำนักเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพร, จังหวัดชุมพร 86160 ประเทศไทย

เพื่อให้เกิดการตกผลึกที่มีปริมาณสารแกมมาอริซานอลปริมาณมาก

ถึงแม้ว่าการสูญเสียแกมมาอริซานอลใน LP2 ในระบบที่ใช้เอทานอล:อะซีโตนมากกว่าระบบเมทานอล:อะซีโตน อย่างไรก็ตามน้ำหนักสุดท้ายของผลึกของแกมมาอริซานอลที่ได้จากระบบที่ใช้เอทานอล:อะซีโตนยังสูงกว่ายกเว้นสำหรับน้ำมันรำข้าวดิบที่สกัดด้วยเฮกเซน (Table 5) ผลึกแกมมาอริซานอลที่ได้จากระบบเอทา

นอล:อะซีโตนมีขนาดเล็กกว่าที่ได้จากระบบเมทานอล:อะซีโตน สำหรับในๆ ทุกสภาวะนั้น โดยน้ำหนักผลึกแกมมาอริซานอลมากที่สุดประมาณ 112.8 mg/ 50 g ของน้ำมันรำข้าวดิบได้จากการสกัดโดยการถูกบีบเย็นและตกผลึกในระบบเอทานอล:อะซีโตน รองลงมา คือระบบเอทานอล:อะซีโตนโดยการใช้้ำมันรำข้าวดิบที่ได้จากการสกัดด้วยเอทานอล



Figure 3. Characteristics of the solution in the first-step crystallisation by two crystallisation systems (LP1 in Figure 1); A. cold press B. hexane extraction C. ethanol extraction

Table 4. Yield of each phase produced using two crystallisation systems (methanol:acetone, ethanol:acetone)

Extraction methods	Weight (g)			γ -Oryzanol concentration (mg/g of each phase)		
<i>Methanol:acetone</i>						
	LP1	SP1	LP2	LP1	SP1	LP2
Cold press	2.40±0.06	3.62±0.38	1.51±0.11	123.43±1.46	51.07±21.67	45.10±4.80
Maceration						
Hexane	4.09±0.06	3.73±0.52	3.14±0.13	39.86±0.29	1.87±0.24	24.78±6.76
Ethanol	5.99±0.06	0.89±0.24	3.49±0.21	30.77±6.30	2.85±0.46	22.16±2.93
<i>Ethanol:acetone</i>						
	LP1	SP1	LP2	LP1	SP1	LP2
Cold press	2.72± 0.13	4.82 ± 0.43	1.83± 0.15	161.88±31.91	1.16±0.07	89.05±6.83
Maceration						
Hexane	3.91±0.20	1.74±0.11	2.90±0.14	44.61±1.63	2.90±0.14	32.68±0.55
Ethanol	6.22±0.44	1.33±0.09	3.28±0.39	40.81±5.77	3.28±0.39	30.35±1.76

Remark: LP1 = Liquid phase 1, LP2 = Liquid phase 2, SP1 = Solid phase 1

* Corresponding author e-mail: duangkamol.ru@kmitl.ac.th, modeliebe@gmail.com

¹ Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL) Bangkok Thailand

² Department of Statistics, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL) Bangkok Thailand

³ Department of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang Prince of Chumphon Campus (KMITL PCC) Chumphon Thailand

Table 5. γ -Oryzanol content and characteristics of the crystal product (SP2)

<i>Crystallization solvent: Methanol & acetone</i>			
Extraction methods	γ -Oryzanol weight (mg/50 g crude rice bran oil)	Physical appearance crystal	Remarks
Cold press	86.6 $\pm$ 3.1 (9.45%*)		Large-sized crystals with opaque white color
Maceration			
Hexane	70.4 $\pm$ 0.8 (6.96%*)		Large-sized crystals with pale yellow color
Ethanol	53.6 $\pm$ 2.6 (3.71%*)		Fine crystals with shiny white color
<i>Crystallization solvent: Ethanol & acetone</i>			
Cold press	112.8 $\pm$ 3.0 (12.31%*)		Small-sized crystals with opaque white colour
Maceration			
Hexane	52.6 $\pm$ 2.5 (5.20%*)		Small crystals with white colour
Ethanol	82.2 $\pm$ 3.3 (5.68%*)		Fine crystals with shiny white colour

Remark: * is γ -oryzanol yield, weight percent of γ -oryzanol in crystal product (%) and crude rice bran oil (g)
The crystal was obtained from 5g CRBO

* Corresponding author e-mail: duangkamol.ru@kmitl.ac.th, modeliebe@gmail.com

¹ภาควิชาชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ 10520 ประเทศไทย

²ภาควิชาสถิติ, คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ 10520 ประเทศไทย

³สำนักเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพร, จังหวัดชุมพร 86160 ประเทศไทย

ร้อยละความบริสุทธิ์ของสารแกมมาออริซานอล มีค่าใกล้เคียงกันทุกๆ กระบวนการสกัดและทั้งสอง กระบวนการตกผลึกดังที่แสดงใน Table 6 อย่างไรก็ตาม ระบบการตกผลึกทั้งสองระบบนั้นเพิ่มร้อยละ

ประสิทธิภาพของการทำให้บริสุทธิ์ของน้ำมันรำข้าวดิบที่ได้จากการสกัดโดยการบีบเย็นที่ประมาณ ร้อยละ 82-84 ขณะที่ทั้งวิธีการสกัดด้วยเฮกเซนและเอทานอลได้ค่าเป็นร้อยละ 74 และ 62 ตามลำดับ

Table 6. Purification yield and purity of γ -oryzanol in the final products obtained by different methods

Extraction methods	Purification yield (mg of γ -oryzanol/mg of crystal)	% γ -Oryzanol purity	% Purification efficiency
<i>Methanol:acetone</i>			
Cold press	6.65 $\pm$ 0.20 ^{ab}	93.69 $\pm$ 1.86 ^b	82.84 $\pm$ 0.22 ^b
Maceration (Rice bran:solvent 1:6 w/v)			
Hexane	6.88 $\pm$ 0.88 ^{ab}	96.24 $\pm$ 0.61 ^a	73.60 $\pm$ 1.11 ^c
Ethanol	4.63 $\pm$ 0.11 ^c	95.81 $\pm$ 0.17 ^a	61.86 $\pm$ 0.28 ^d
<i>Ethanol:acetone</i>			
Cold press	7.81 $\pm$ 1.36 ^a	94.71 $\pm$ 0.28 ^{bc}	84.83 $\pm$ 0.54 ^a
Maceration (Rice bran:solvent 1:6 w/v)			
Hexane	6.17 $\pm$ 0.90 ^b	96.29 $\pm$ 0.44 ^a	73.70 $\pm$ 0.79 ^c
Ethanol	6.62 $\pm$ 0.72 ^{ab}	95.93 $\pm$ 0.18 ^a	62.05 $\pm$ 0.30 ^d

Remark: values within each column with the same superscript character are not significantly different at $P < 0.05$

4. การต้านอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์แกมมาออริซานอล

การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ได้ผล IC₅₀ แสดงใน Table 7 ซึ่งพบว่าร้อยละการสลายตัวของ DPPH มีการเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ตามความเข้มข้นของปริมาณแกมมาออริซานอลที่เพิ่มขึ้นและมีค่าสูงสุดประมาณร้อยละ 80 และคงที่ที่ระดับเดียวกันกับทั้งสองกระบวนการตกผลึก ผลิตภัณฑ์แกมมาออริซานอลที่ได้จากน้ำมันดิบที่สกัดด้วยการบีบเย็น และการสกัดด้วยเอทานอลมีประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด ออริซานอลที่ได้จากการสกัดด้วยเฮกเซน

และตกผลึกด้วยระบบเอทานอล:อะซีโตน มีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่าในระบบการตกผลึกที่ใช้เมทานอล: อะซีโตน อาจเป็นไปได้ว่าความเข้มข้นของสารละลายผสมทำให้เกิดตัวทำละลายที่แตกต่างกันทำให้มีผลต่อละลายสารละลายแกมมาออริซานอลได้น้อยลง อย่างไรก็ตาม ในกรณีของการสกัดด้วยเอทานอล พบว่าออริซานอลที่ได้มีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระไม่แตกต่างกันในทั้งสองระบบการตกผลึก เมื่อนำค่าความสามารถของกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของแกมมาออริซานอลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่ BHT และแกมมาออริซานอลในทาง

* Corresponding author e-mail: duangkamol.ru@kmitl.ac.th, modeliebe@gmail.com

¹ Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL) Bangkok Thailand

² Department of Statistics, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL) Bangkok Thailand

³ Department of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang Prince of Chumphon Campus (KMITL PCC) Chumphon Thailand

การค้า ได้ผลดังแสดงใน Table 7 โดยพบว่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของผลึกของแกมมาออริซานอลมีค่าอยู่ในช่วงเดียวกันกับ BHT แต่ต่ำกว่าของแกมมาออริซานอล

ที่ขายในท้องตลาด ซึ่งอาจเป็นผลจากการปนเปื้อนของสารบางอย่างที่เกิดระหว่างกระบวนการเอาซีฟิ้งและกัมออก

Table 7. IC₅₀ of the purified γ -oryzanol and well-known standard

Extraction methods/Mixed solvents	IC ₅₀ (mg/ml)	
	Methanol:acetone	Ethanol:acetone
Cold press	0.187±0.049 ^b	0.171±0.018 ^b
Hexane ¹	0.433±0.020 ^c	0.249±0.049 ^b
Ethanol ¹	0.193±0.015 ^b	0.182±0.020 ^b
BHT	0.185±0.022 ^b	0.185±0.022 ^b
γ -Oryzanol standard	0.065 ±0.004 ^a	0.065±0.004 ^a

Remark: ¹ Maceration by rice bran:solvent 1:6 w/v

a, b and c values within each column with the same superscript character are not significantly different at $P < 0.05$.

สรุปผล

กระบวนการสกัดน้ำมันรำข้าวดิบด้วยการบีบเย็นสามารถผลิตผลึกแกมมาออริซานอลได้มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดน้ำมันรำข้าวดิบด้วยวิธีอื่น ได้แก่ การแช่ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน และ เอทานอล โดยกระบวนการตกผลึกทั้งระบบ เมทานอล:อะซิโตน และ เอทานอล:อะซิโตน สามารถผลิตผลึกสารแกมมาออริซานอลมากถึง 86.6 และ 112.8 mg/50 g น้ำมันรำข้าวดิบ ซึ่งมีความเข้มข้นของสารแกมมาออริซานอลประมาณร้อยละ 9.45 และ 12.31 ตามลำดับ จากงานวิจัยทั้งหมดนี้พบว่าสภาวะที่ดีที่สุดคือการสกัดน้ำมันรำข้าวดิบด้วยการบีบเย็นตามด้วยการตกผลึกด้วยระบบเอทานอล:อะซิโตน และงานวิจัยนี้ได้นำเสนอวิธีที่ปลอดภัยในการตกผลึกเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความบริสุทธิ์สูงและมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (IC₅₀) เป็น 0.171 mg/ml

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณบริษัท Lopburi Vegetable Oil Company จังหวัดลพบุรี ประเทศไทย ที่สนับสนุนเครื่องสกัดเย็น นอกจากนี้งานวิจัยนี้สนับสนุนโดยกองทุนวิจัย รหัสโครงการ KREF025603 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารอ้างอิง

- [1] Childs, N. (2014). Rice outlook. Situation and Outlook, ISSN: 1554-9089: Economic Research Service, USDA, USA.
- [2] Marshall, W.E. and Wadsworth, J.I. (1994). Rice science and technology. Marcel Dekker, Inc., New York.
- [3] Butsat, S. and Siriamornpun, S. (2010). Antioxidant capacities and phenolic compounds of the husk, bran and endosperm of Thai rice. Food Chemistry. 119(2): 606–613.

* Corresponding author e-mail: duangkamol.ru@kmitl.ac.th, modeliebe@gmail.com

¹ ภาควิชาชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ 10520 ประเทศไทย

² ภาควิชาสถิติ, คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ 10520 ประเทศไทย

³ สำนักเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพร, จังหวัดชุมพร 86160 ประเทศไทย

- [4] Lerma-García, J.M., Herrero-Martínez, M.J., Simó-Alfonso, F.E., Mendonça, C.R.B. and Ramis-Ramos, G. (2009). Review composition, industrial processing and applications of rice bran γ -oryzanol. *Food Chemistry*. 115(2): 389-404.
- [5] Devi, R.R., Jayalekshmy, A. and Arumugan, C. (2008). Original article, Antioxidant efficacy of phytochemical extracts from defatted rice bran in in-vitro model emulsions. *International Journal of Food Science & Technology*. 43(5): 878-885.
- [6] Tuncel, N.B. and Yilmaz, N. (2011). Gamma-oryzanol content, phenolic acid profiles and antioxidant activity of rice milling fractions. *European Food Research and Technology*. 233(4): 577-585.
- [7] Sawadikiat, P. and Hongprabhas, P. (2014). Original article, Phytosterols and γ -oryzanol in rice bran oils and distillates from physical refining process. *International Journal of Food Science & Technology*. 49(9): 2030-2036.
- [8] Piebep, G. and Henrique, T. (2014). Rice antioxidants: phenolic acids, flavonoids, anthocyanins, proanthocyanidins, tocopherols, tocotrienols, γ -oryzanol, and phytic acid. *Food Science and Nutrition*. 2(2): 75-104.
- [9] Pestana-Bauer, V.R., Zambiasi, R.C., Mendonça, C.R.B., Beneito-Cambra, M. and Ramis-Ramos, G. (2012). γ -Oryzanol and tocopherol contents in residues of rice bran oil refining. *Food Chemistry*. 134(3): 1479-1483.
- [10] Juliano, C., Cossu, M., Alamanni, M.C. and Piu, L. (2005). Antioxidant activity of gamma-oryzanol: Mechanism of action and its effect on oxidative stability of pharmaceutical oils. *International Journal of Pharmaceutics*. 299(1-2): 146-154.
- [11] Imsanguan, P., Roaysubtawee, A., Borirak, R., Pongamphai, S., Dougl, S. and Douglas, P.L. (2008). Extraction of α -tocopherol and γ -oryzanol from rice bran. *LWT-Food Science and Technology*. 41(8): 1417-1424.
- [12] Xu, Z. and Godber, S.J. (2000). Comparison of supercritical fluid and solvent extraction methods in extracting γ -oryzanol from rice bran. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 77(5): 547-551.
- [13] Zullaikah, S., Melwita, E. and Ju, Y. (2009). Isolation of oryzanol from crude rice bran oil. *Bioresource Technology*. 100(1): 299-302.
- [14] Rodrigues, C.C.E. and Oliveira, R. (2010). Original article, Response surface methodology applied to the analysis of rice bran oil extraction process with ethanol. *International Journal of Food Science & Technology*. 45(4): 813-820.
- [15] Jesus, S.P., Grimaldi, R. and Hense, H. (2010). Recovery of γ -oryzanol from rice bran oil byproduct using

* Corresponding author e-mail: duangkamol.ru@kmitl.ac.th, modeliebe@gmail.com

¹ Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL) Bangkok Thailand

² Department of Statistics, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL) Bangkok Thailand

³ Department of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang Prince of Chumphon Campus (KMITL PCC) Chumphon Thailand

- supercritical fluid extraction. The Journal of Supercritical Fluids. 55(1): 149-155.
- [16] Chen, H.H. and Chiu, T.H. (2011). Phytochemicals characterization of solvent extracts from taro-scented japonica rice bran. Journal of Food Science. 76(4): C656-C662.
- [17] Manosroi, A., Ruksiriwanich, W., Abe, M., Sakai, H., Manosroi, W. and Manosroi, J. (2010). Biological activities of the rice bran extract and physical characteristics of its entrapment in niosomes by supercritical carbon dioxide fluid. The Journal of Supercritical Fluids. 54(2): 137-144.
- [18] Tomita, K., Machmudah, S., Wahyudiono, R., Fukuzato, R., Kanda, H., Quitain, A.T., Sasaki, M. and Goto, M. (2014). Extraction of rice bran oil by supercritical carbon dioxide and solubility consideration, Sep. Separation and Purification Technology. 125: 319-325.
- [19] Rajan, R.G.R. and Krushna, G.A.G. (2014). A simple method for purification of deodorizer distillate from Indian rice (*Oryza Sativa*) bran oil and preparation of phytosterols. Grasas Aceites. 65(4): e050. doi: <http://dx.doi.org/10.3989/gya.00229141>.
- [20] Ruen-ngam, D., Thawai, C., Nokkoul, R. and Sukonthamut, S. (2014). Gamma-oryzanol extraction from upland rice bran. International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics. 4(4): 252-255.
- [21] Association of Official Analytical Chemists (AOAC International). (2012). Official methods of analysis (19th ed.), Washington, D.C.
- [22] ASEANFOODS. (2011). Asean manual of food analysis, 1st Edn., Regional Center of Asean Network of Food Data System, Institute of Nutrient, Mahidol University, Nakhon Pathom, Thailand, 2011, 1-39.
- [23] Vaisali, C., Charanyaa, S., Belur, P.D. and Regupathi, I. (2015). Review, refining of edible oils: a critical appraisal of current and potential technologies. International Journal of Food Science & Technology. 50(1): 13-23.
- [24] Ruen-ngam, D., Thawai, C. and Chaiteerapatarapong, S. (2014). HPLC condition for analysis of gamma oryzanol in upland rice bran crude oil. Proceeding of the 1st Joint ACS AGFD - ACS ICST Symposium on Agricultural and Food Chemistry, Thailand, March 4-5, 2014, 109-113.

* Corresponding author e-mail: duangkamol.ru@kmitl.ac.th, modeliebe@gmail.com

¹ภาควิชาชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ 10520 ประเทศไทย

²ภาควิชาสถิติ, คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ 10520 ประเทศไทย

³สำนักเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพร, จังหวัดชุมพร 86160 ประเทศไทย