

ปริมาณแอนโทไซยานิน ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย
และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากซังข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วง
ด้วยวิธีการสกัดแบบอัลตราโซนิก

ANTHOCYANIN CONTENT, ANTIBACTERIAL ACTIVITY
AND ANTIOXIDANT CAPACITY OF PURPLE CORN COB EXTRACT VIA
ULTRASONIC EXTRACTION

ฐานิดา ร่องสุพรรณ¹ และ สมใจ ขจรชีพนันธุ์งาม^{1,2*}

¹ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น 40002

²กลุ่มวิจัยการพัฒนางานด้านความรู้ทางด้านการยางพาราในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น 40002

Thanida Rongsuphan¹ and Somjai Kajorncheappunngam^{1,2*}

¹Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, KhonKaen University, KhonKaen, 40002

²Knowledge Development of Rubber Tree in Northeast research group, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

*E-mail: ksomja@kku.ac.th

Received: 2018-02-22

Revised: 2018-07-10

Accepted: 2018-07-17

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการสกัดสารแอนโทไซยานินจากซังข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วง ด้วยตัวทำละลายอะซีโตนในสภาวะกรดร่วมกับเทคนิคอัลตราโซนิก โดยมุ่งเน้นศึกษาหาปริมาณ สารแอนโทไซยานินที่สกัดได้ ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และความสามารถในการต้าน อนุมูลอิสระของสารที่สกัดได้จากซังแห่งของข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วง จากการศึกษาพบว่า สารสกัดที่ได้เมื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด ด้วยเทคนิค UV-VIS Spectroscopy พบว่ามีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด เท่ากับ 7,869.26 ไมโครกรัมสมมูล cyanidin-3-glucoside ต่อกรัมน้ำหนักซังแห้ง และนำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ต้าน เชื้อแบคทีเรียเพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (MIC) และ ความเข้มข้น ต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อ (MBC) ในเชื้อแบคทีเรีย 2 ชนิด คือ *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* พบว่าในเชื้อ *Escherichia coli* สารสกัดมีค่า MIC และ MBC เท่ากันคือ 25 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ในเชื้อ *Staphylococcus aureus* สารสกัดมีค่า MIC เท่ากับ 50 มิลลิกรัม

ต่อมิลลิลิตร ส่วนค่า MBC > 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อนำสารสกัดไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 2 วิธี คือ DPPH assay และ FRAP assay พบว่าสารสกัดสามารถให้ผลต้านอนุมูลอิสระทั้ง 2 วิธี โดยเฉพาะในวิธี DPPH assay สารสกัดให้ค่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่า วิตามินซี 1.5 เท่า และสูงกว่า วิตามินอี ถึง 4 เท่า

คำสำคัญ: แอนโทไซยานิน ข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วง การสกัด การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

ABSTRACT

This research work was a study of anthocyanin extraction from purple waxy corn cob using acetone acidified by hydrochloric acid as an extracting solvent accompany with ultrasonic technique. The work was emphasized on the amount of anthocyanin extract and the evaluation of their antimicrobial activity and antioxidant capacity. The extract was analyzed by UV-VIS spectroscopy for its total anthocyanin content. The results showed that the total anthocyanins content was 7,869.26 µg CGE/g DW. The antibacterial activity test of the extract was performed and determined for their minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) in two species of bacteria namely *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. It was found that the MIC and MBC values of *Escherichia coli* were similar and they were equal to 25 mg/mL. Whereas the MIC value of 50 mg/mL and the MBC value greater than 200 mg/mL were found for *Staphylococcus aureus*. The antioxidant capacity of anthocyanin extract was tested with two methods namely DPPH assay and FRAP assay. It was revealed that anthocyanin extract exhibited antioxidant characteristic in both tests. Result from DPPH assay showed that antioxidant activity of anthocyanin extract was 1.5 and 4 times higher than vitamin C and vitamin E, respectively.

Keywords: anthocyanin, purple waxy corn, extraction, antibacterial activity

บทนำ

ข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วง (Purple waxy corn) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Zea mays L.* ได้รับความนิยมนิยมจากผู้บริโภคมากขึ้นในปัจจุบันเพราะมีสารอาหารที่สำคัญที่เป็นประโยชน์คือ สารแอนโทไซยานิน พบมากในส่วนของเมล็ดและทั้งข้าวโพดสีม่วง โดยชนิดของสารแอนโทไซยานิน ในข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงประกอบ ด้วย cyanidin-3-glucoside, pelargonidin-3-glucoside,

peonidin-3-glucoside, cyaniding-3- (6" malonylglucoside) และ cyaniding-3- (3", 6"-dimalonylglucoside) (Harakotr et al., 2014) สารแอนโทไซยานิน ละลายได้ในน้ำและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) สูง (Yang & Zhai, 2010) สารแอนโทไซยานินมีสรรพคุณทางยาและถูกนำมาใช้เป็นยารักษาโรคของมนุษย์ เช่น ช่วยลดโอกาสการเกิดมะเร็งชนิดเนื้อเยื่อ มีฤทธิ์ช่วยเสริมให้ร่างกายต่อต้านเชื้อโรค และสมานแผล เสริมภูมิคุ้มกันในร่างกายให้ดีขึ้น (Hagiwara et al., 2001) สามารถลดความผิดปกติของไต และลดภาวะแทรกซ้อนทางระบบประสาทเนื่องจากโรคเบาหวาน (Li et al., 2011) เป็นต้น

การสกัดสารออกฤทธิ์จากวัสดุทางธรรมชาติมีอยู่หลายวิธี ได้แก่ การสกัดด้วยตัวทำละลายสารอินทรีย์ เช่น เอทานอล เมทานอล เฮกเซน อะซีโตน และปิโตรเลียมอีเธอร์ เป็นต้น วิธีนี้เป็นวิธีการสกัดธรรมดาที่ใช้กันทั่วไป เพราะเป็นวิธีที่สะดวกและง่าย แต่มีข้อเสียคือ ใช้ปริมาณตัวทำละลายปริมาณมาก ตัวทำละลายมีราคาสูง ตัวทำละลายตกค้างในสารสกัด และสารที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์ต่ำ การสกัดอีกวิธีหนึ่งคือการสกัดด้วยของไหลเหนือวิกฤติ (Supercritical fluid) โดยของไหลเหนือวิกฤติที่นิยมนำมาใช้ในการสกัดด้วยวิธีนี้คือ คาร์บอนไดออกไซด์เหนือวิกฤติ (Supercritical carbon dioxide) ข้อดีของการสกัดด้วยวิธีนี้คือ มีอัตราการถ่ายโอนมวลสาร (Mass transfer rate) เร็วกว่า สารที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์สูง ลดการใช้สารเคมีและมีความจำเพาะในการเลือกสกัดสารแต่ละชนิดที่มีอยู่ในวัสดุธรรมชาติที่นำมาสกัด โดยการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิและความดันที่ใช้ในการสกัด แต่มีข้อเสียคือ อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดมีราคาแพง เนื่องจากวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์เป็นวิธีที่ง่าย และอุปกรณ์ในการสกัดราคาไม่แพงเมื่อเทียบกับวิธีการสกัดด้วยของไหลเหนือวิกฤติ จึงได้มีความพยายามปรับปรุงวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ให้สามารถสกัดให้ได้สารสกัดในปริมาณที่มากขึ้นโดยการนำเทคนิคของอัลตราโซนิก (Ultrasonic extraction technique) มาใช้ร่วมกับวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ทั้งนี้เพราะคลื่นอัลตราโซนิกจะทำให้อนุภาคของสารที่นำมาสกัดเกิดการกระจายตัวที่ดีขึ้นทำให้โมเลกุลของตัวทำละลายสามารถละลายสารออกฤทธิ์หรือสารสำคัญที่มีอยู่ในอนุภาคออกมาได้ดีขึ้นทำให้อัตราการสกัดเร็วขึ้น ใช้ตัวทำละลายในการสกัดน้อยลง และใช้เวลาในการสกัดที่สั้นลง ดังนั้นเทคนิคอัลตราโซนิก จึงเป็นทางเลือกใหม่ในการสกัดที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในทางการค้าได้ (Tao et al., 2014)

จากการศึกษาและค้นคว้าพบว่าทีมงานวิจัยของ Harakotr et al. (2014) ที่ทำการสกัดสารแอนโทไซยานินจากข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงพันธุ์ต่าง ๆ โดยใช้อะซีโตนในสภาวะกรดเป็นตัวทำละลายเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงกับปริมาณสารแอนโทไซยานินที่มีอยู่ในข้าวโพด โดยงานวิจัยนี้มุ่งเน้นการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงเพื่อให้ได้พันธุ์ข้าวโพดที่มีปริมาณสารแอนโทไซยานินที่สูงขึ้น มากกว่าการมุ่งเน้นศึกษาฤทธิ์ของสารแอนโทไซยานินที่มีอยู่ในข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วง นอกจากนี้จากการค้นคว้าไม่พบรายงาน

วิจัยที่ทำการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารแอนโทไซยานินที่สกัดได้จากส่วนของชั่งข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะสกัดสารแอนโทไซยานินจากชั่งข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงโดยการนำเทคนิคอัลตราโซนิกมาใช้ร่วมกับการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์เพื่อให้ได้สารสกัดแอนโทไซยานินในปริมาณมากขึ้น โดยสารที่สกัดได้จะถูกนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารแอนโทไซยานินด้วยวิธี pH differential method รวมถึงการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย 2 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* และ ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารแอนโทไซยานินที่สกัดได้ ผลจากการศึกษาจะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการพัฒนาในขั้นสูงเพื่อใช้สารแอนโทไซยานินเป็นสารออกฤทธิ์บรรจุหรือกักเก็บไว้ในวัสดุแผ่นฟิล์ม เช่น พอลิเมอร์ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้เป็นแผ่นปิดแผล หรือแผ่นฟิล์มสำหรับฆ่าเชื้อ เป็นต้น

วิธีการวิจัย

1. สารเคมี

อาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton (MH, CRITERION™, USA), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH, Aldrich, USA), 2,4,6-Tri-2-pyridyl-2-Triazine (TPTZ, Fluka, Switzerland), Ferric chloride (FeCl_3 , Panreac, E.U.), Ferrous sulfate (FeSO_4 , Ajax Finechem®, Australia), Acetone ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$, RCI Labscan, Thailand), Potassium chloride (KCl, Ajax Finechem®, Australia), Sodium acetate (CH_3COONa , Ajax Finechem®, Australia) สารเคมีที่ใช้เป็นเกรดวิเคราะห์ (Analytical grade)

2. การเตรียมวัตถุดิบ

นำชั่งแห้งของข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วง (พันธุ์ข้าวเก่า) ซึ่งได้รับการอนุเคราะห์จากภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ไปอบให้แห้งด้วยตู้อบที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จนชั่งข้าวโพดแห้งสนิท ทำการบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดลดขนาดชนิดใบมีด จากนั้นทำการคัดแยกขนาดด้วยตะแกรงร่อนเบอร์ 100 จนได้ผงชั่งข้าวโพดขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง $1\text{-}150\ \mu\text{m}$ จากนั้นนำไปเก็บใส่ภาชนะที่ปิดสนิทเพื่อป้องกันความชื้น

3. การสกัดสารแอนโทไซยานินจากชั่งข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงร่วมกับอัลตราโซนิก

การสกัดแอนโทไซยานินจากชั่งข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วง ดัดแปลงจากวิธีของ Harakotr et al. (2014) โดยชั่งผงชั่งข้าวโพดขนาดอนุภาค $1\text{-}150\ \mu\text{m}$ น้ำหนัก 2 g ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ เติมน้ำอะซิโตนในสภาวะกรด (0.01% HCl ในสารละลายอะซิโตน (70%v/v)) ปริมาตร

25 mL จากนั้นนำไปจุ่มใน Ultrasonic Bath ด้วยความถี่ 38.5 kHz เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman no.1) ภายใต้สุญญากาศ เพื่อแยกกากผงซึ่งข้าวโพดออกจากสารละลาย จากนั้นล้างกากด้วยอะซิโตนในสภาวะกรด ปริมาตร 10 mL นำสารละลายที่ได้ใส่กรวยแยก และเติมคลอโรฟอร์มปริมาตร 15 mL เขย่าสารละลายให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ในที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการแยกชั้นของสารละลายอย่างสมบูรณ์ จากนั้นแยกของเหลวชั้นล่างออกและนำของเหลวส่วนบนของกรวยแยกไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำสารละลายที่สกัดได้ไปวิเคราะห์และคำนวณหาปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมด (Total anthocyanins) ที่สกัดได้ด้วยวิธี pH differential method

4. การวิเคราะห์หาปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมด (Total anthocyanins content, TAC)

วิเคราะห์หาค่า TAC โดยวิธี pH differential method ดัดแปลงจากวิธีของ Giusti & Wrolstad (2001) โดยปรับระดับความเจือจางของสารสกัดตัวอย่างด้วย โพแทสเซียมคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.025 M (pH 1.0) และ โซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.4 M (pH 4.5) แล้วตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 และ 700 nm ตามลำดับ ด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer โดยใช้ น้ำกลั่น เป็นตัวเปรียบเทียบ (Blank) จากนั้นคำนวณหาปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดตามสมการที่ (1) แล้วนำผลการคำนวณไปแปลงค่าให้อยู่ในหน่วย ไมโครกรัมสมมูลของ cyaniding 3-glucoside ต่อ 1 กรัมของซึ่งแห้งข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วง ($\mu\text{g CGE/g DW}$)

$$\text{ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (mg/L)} = (A \times MW \times DF \times 1000) / (\epsilon \times l) \quad (1)$$

เมื่อ A คือ ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) $= (A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH } 1.0} - (A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH } 4.5}$; MW คือ มวลโมเลกุลของ cyaniding-3-glucoside (C3G) = 449.2 g/mol; DF คือ Dilution factor ของตัวอย่าง; ϵ คือ โมลาร์แอบซอร์บิตีวิตี้ (Molar absorptivity) = 26,900 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ และ l คือ ความกว้างของ Cuvette = 1 cm

5. การทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

5.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

เพื่อเลี้ยงเชื้อให้ได้โคโลนีเดี่ยว ๆ จากนั้นเชี่ยโคโลนีเดี่ยวประมาณ 4–6 โคโลนี ของเชื้อ *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (Mueller Hinton Broth) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 4–6 ชั่วโมง จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อมาเติมลงในหลอดทดลองที่มีสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ที่ปราศจากเชื้อ (Sterile sodium chloride) บรรจุอยู่ 9 mL ปรับเติมจนกระทั่งได้ความขุ่นในหลอดเทียบเท่ากับความขุ่นของสารละลาย McFarland Standard No. 0.5 ซึ่งจะได้ความเข้มข้นของจำนวนเซลล์แบคทีเรียประมาณ 1.5×10^8 cell/mL หรือ 1.5×10^8 colony forming units (CFU)/mL จากนั้นทำการเจือจางต่อด้วยการเติมสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ที่ปราศจากเชื้อ โดยทำการเจือจางให้ความเข้มข้นลดลงทีละ 10 เท่า จนได้ความเข้มข้นของจำนวนเซลล์แบคทีเรียอยู่ในช่วงประมาณ 10^5 – 10^7 cell/mL

5.2 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimal inhibitory concentration, MIC) และ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (Minimal bactericidal concentration, MBC)

การทดสอบหาค่า MIC ด้วยวิธี Broth dilution technique ของเชื้อ *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* ของสารสกัด โดยเริ่มต้นนำหลอดทดลองซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 10 หลอด ทำการดูดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (Mueller Hinton Broth) ใส่ลงในหลอดที่ 2–10 หลอดละ 1 mL แล้วดูดสารสกัดความเข้มข้น 200 mg/mL (เตรียมโดยใช้อะซิโตนในสภาวะกรดเป็นตัวทำละลาย) ลงในหลอดที่ 1 และ 2 หลอดละ 1 mL จากนั้นดูดสารในหลอดที่ 2 จำนวน 1 mL ใส่ลงในหลอดที่ 3 ทำซ้ำทำนองเดียวกันนี้ไปจนถึงหลอดที่ 9 สำหรับหลอดที่ 9 เมื่อผสมสารสกัดและอาหารเลี้ยงเชื้อเข้ากันได้ดีแล้ว ดูดสารละลายทิ้งไป 1 mL โดยความเข้มข้นของสารสกัดในหลอดที่ 1–9 มีค่าเท่ากับ 200, 100, 50, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56 และ 0.78 mg/mL ตามลำดับ ส่วนหลอดที่ 10 จะมีแต่อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเพียงอย่างเดียว ไม่มีสารสกัด (ความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับศูนย์) จึงใช้เป็น Positive control จากนั้นเติมเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบลงไปในทุกหลอด หลอดละ 1 mL แล้วนำไปบ่มเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีออกซิเจน ภายใต้อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้สังเกตความขุ่นของเชื้อที่เกิดขึ้นในแต่ละหลอดเปรียบเทียบกับ Positive control (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) จากนั้นหาค่าความเข้มข้นของหลอดที่สารละลายใสไม่มีความขุ่นของเชื้อก็จะได้ค่า MIC จากค่า MIC สามารถนำมาหาค่า MBC ด้วยวิธี Agar dilution technique ได้โดยนำหลอดที่ไม่มีความขุ่นของเชื้อปริมาตร 100 μ L ไปเทและเกลี่ย ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (Mueller Hinton Agar) สำหรับทั้งเชื้อ *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* จากนั้นหาค่า MBC หรือความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อได้จากจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย

6. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

6.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging

การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระของสารที่สกัดได้ โดยใช้วิธีดักจับอนุมูลอิสระ DPPH[•] ดัดแปลงจากงานของ Brand-Williams et al. (1995) โดยเตรียมสารละลาย DPPH ให้มีความเข้มข้น 1 mM โดยใช้เมทานอลที่ปราศจากน้ำ (Absolute methanol) เป็นตัวทำละลาย และเตรียมสารสกัดตัวอย่างให้มีความเข้มข้น 1.04, 2.08, 3.13, 4.17, 5.21 และ 6.25 µg/mL (ความเข้มข้นสุดท้าย หลังการเติมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 1 mM ปริมาตร 200 µL) โดยใช้ Absolute methanol เป็นตัวทำละลาย โดยปิเปตส่วนผสมต่าง ๆ ลงในถาดขนาด 96 หลุม (96-well microplate) โดยให้ปริมาตรสุดท้ายในแต่ละหลุมเท่ากับ 300 µL แล้วนำถาดไปเก็บไว้ในที่มืด ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 nm ด้วยเครื่อง Microplate reader (Bio-Rad, Model 680, USA) ใช้ absolute methanol 300 µL โดยไม่มีการเติม DPPH เป็น Blank และใช้ absolute methanol 100 µL ที่เติม DPPH 200 µL เป็น control (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) คำนวณร้อยละของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (%DPPH inhibition) ตามสมการที่ (2)

$$\% \text{ DPPH inhibition} = [(A_{\text{Control}} - A_{\text{Sample}}) / A_{\text{Control}}] \times 100 \quad (2)$$

เมื่อ A_{Control} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่ไม่เติมสารสกัดตัวอย่าง
 A_{Sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH หลังเติมสารสกัดตัวอย่าง

จากนั้นพล็อตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดตัวอย่างกับร้อยละ DPPH inhibition ซึ่งจะได้กราฟเส้นตรงที่สามารถคำนวณหา EC_{50} (50% Effective concentration = ค่าความเข้มข้นของสารสกัดตัวอย่างที่สามารถทำให้ความเข้มข้นของ DPPH ลดลง 50%) แล้วทำการเปรียบเทียบค่า EC_{50} ของสารสกัดตัวอย่างกับสารมาตรฐาน 2 ชนิด ได้แก่ วิตามิน ซี และ วิตามิน อี ที่เตรียมในสภาวะเดียวกัน

6.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power assay (FRAP assay)

วิธีการทดสอบดัดแปลงมาจากงานของ Benzie & Strain (1996) โดยทำการเตรียมสารสกัดตัวอย่างให้มีความเข้มข้น 3.906, 7.813 และ 15.625 µg/µL โดยใช้ 50% เอทานอล เป็นตัวทำละลาย นำสารละลายสารสกัดตัวอย่างในแต่ละความเข้มข้นในปริมาตร 6 µL มาเติมน้ำกลั่น 18 µL เติม FRAP reagent 180 µL [โดย FRAP reagent เตรียมจาก ก) 300 mM sodium acetate buffer (pH 3.6) ข) 20 mM FeCl₃ solution และ

ค) 10 mM TPTZ solution in 40 mM HCl ในอัตราส่วนของ ก:ข:ค เท่ากับ 10:1:1 (v/v/v)] ผสมให้เข้ากันในภาชนะหลอดขนาด 96 หลุม (96-well microplate) และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ด้วยเครื่อง Microplate reader (Bio-Rad, Model 680, USA) โดย Blank ของสารสกัดตัวอย่างที่แต่ละความเข้มข้นทำการเตรียมเช่นเดียวกับการเตรียมสารสกัดตัวอย่างแต่เติม FRAP reagent (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) คำนวณหาค่า FRAP (FRAP value) จากกราฟมาตรฐานของเฟอร์ริสซัลเฟต (ใช้สารละลาย FeSO_4 ความเข้มข้น 0.014-0.280 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักของ FeSO_4 กับค่าการดูดกลืนแสง แล้วรายงานผลในรูปแบบไมโครกรัมสมมูลเฟอร์ริสซัลเฟต (FeSO_4) ต่อมิลลิกรัมของน้ำหนักสารสกัด ($\mu\text{g FeSO}_4/\text{mg}$)

ผลการวิจัยและวิจารณ์

1. ผลการสกัดแอนโทไซยานินจากชั่งแห้งของข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วง

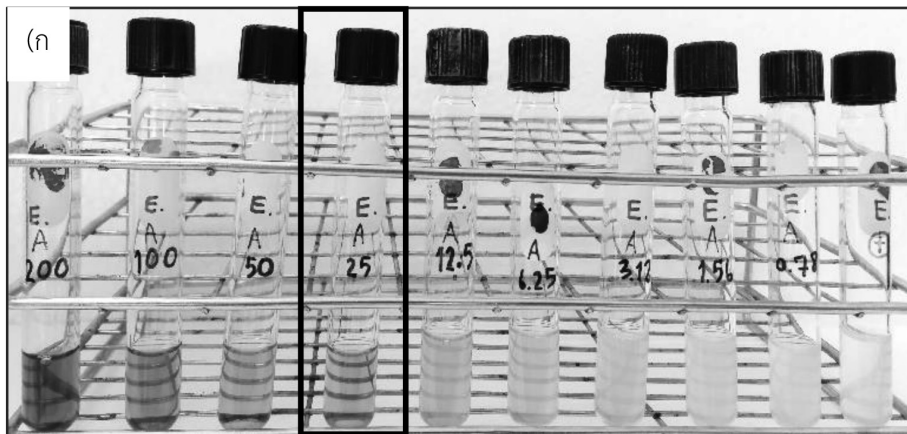
จากการนำชั่งแห้งของข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วง มาทำการสกัดด้วยอะซิโตน ในสภาวะกรด ร่วมกับเทคนิคอัลตราโซนิก จะได้สารสกัดที่มีสีม่วงแดงเข้ม เมื่อนำสารสกัดที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณแอนโทไซยานิน ด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer โดยใช้วิธี pH differential method พบว่ามีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด เท่ากับ 7,869.26 $\mu\text{g CGE/g DW}$ (7,869.26 ไมโครกรัมสมมูลของ cyaniding 3-glucoside ต่อ 1 กรัมของชั่งแห้งข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วง) ซึ่งมากกว่าปริมาณแอนโทไซยานินที่สกัดได้จากชั่งแห้งข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วง ที่เคยมีรายงานมาก่อนหน้านี้ ได้แก่ Harakotr et al. (2014) รายงานว่าปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในชั่งแห้ง ที่ทำการสกัดด้วยอะซิโตนในสภาวะกรดโดยไม่มีการใช้เทคนิคอัลตราโซนิกร่วมในการสกัดด้วย มีค่าเท่ากับ 5,160.4 $\mu\text{g CGE/g DW}$ และเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยปัจจุบันพบว่าการใช้อัลตราโซนิกร่วมในการสกัดจะให้ปริมาณสารแอนโทไซยานินสูงกว่าถึง 52% นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยอื่น ๆ เช่น Yang & Zhai (2010) รายงานว่า ชั่งข้าวโพดสีม่วงพันธุ์ Zihei ที่ทำการสกัดด้วยเมทานอล สามารถสกัดสารแอนโทไซยานินทั้งหมดได้ เท่ากับ 923 $\mu\text{g CGE/g DW}$ และ Srithong et al. (2014) รายงานว่าปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในชั่งแห้ง ที่ทำการสกัดด้วย 70% เอทานอล ร่วมกับเทคนิคอัลตราโซนิก มีค่าเท่ากับ 5,524.6 $\mu\text{g CGE/g DW}$ อีกทั้งยังสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Jing (2006) ที่รายงานว่ชั่งของข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงมีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดสูงกว่าที่ตรวจพบในพืชชนิดอื่น ๆ เช่น องุ่น (270 $\mu\text{g CGE/g DW}$) สตรอเบอรี่ (130 $\mu\text{g CGE/g DW}$) และแครอทสีม่วง (380 $\mu\text{g CGE/g DW}$)

ผลจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าชั่งแห้งของข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงสามารถเป็นแหล่งของสารแอนโทไซยานินได้ อีกทั้งการใช้เทคนิคอัลตราโซนิกในการสกัดช่วยเพิ่ม

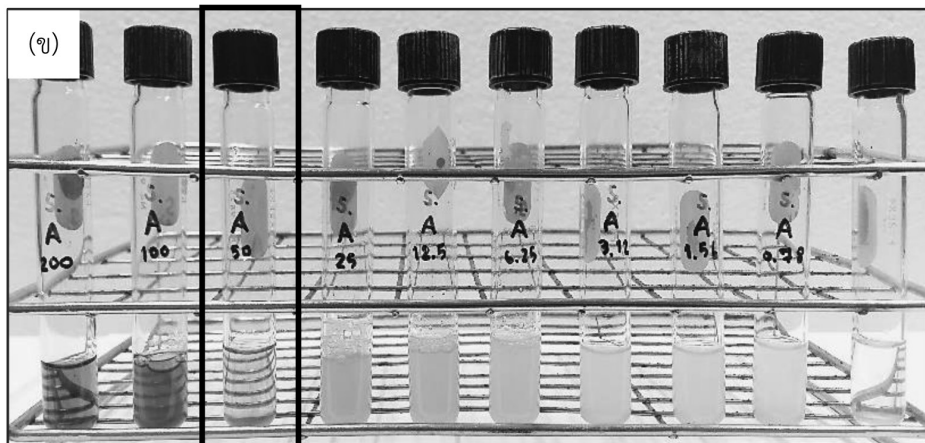
ประสิทธิภาพในการสกัดสารแอนโทไซยานินจากซังแห้งข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงได้สูงกว่าวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายที่มีการรายงานมาแล้วข้างต้น เนื่องมาจากปรากฏการณ์ Cavitation โดยคลื่นอัลตราโซนิกนั้นจะประกอบด้วยช่วงอัดและช่วงขยาย ในช่วงขยายเมื่อคลื่นเคลื่อนที่ผ่านตัวทำละลายจะทำให้เกิดฟอง (Bubble) ของตัวทำละลายขนาดเล็กจำนวนมาก จากนั้นเมื่อฟองได้รับแรงจากคลื่นในช่วงอัดจะทำให้ฟองนั้นแตกออก จะเกิดความดันและความร้อนอย่างมากในบริเวณนั้นจนสามารถเจาะทำลายผนังเซลล์ของอนุภาคของวัสดุที่นำมาสกัดได้ เมื่อผนังเซลล์แตกออกจะทำให้เพิ่มอัตราการถ่ายเทมวลได้ดียิ่งขึ้น ส่งผลให้สารออกฤทธิ์ที่ต้องการสกัดละลายในตัวทำละลายได้ดีขึ้น (Soria & Villamiel, 2010)

2. ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารแอนโทไซยานินที่สกัดได้

ผลการตรวจหาค่า MIC ของสารสกัดจากซังแห้งของข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงด้วยวิธี Broth dilution technique เริ่มต้นศึกษาที่ค่าความเข้มข้นของสารสกัดตัวอย่างที่ 200 mg/mL การอ่านผลเพื่อหาค่า MIC ให้สังเกตความขุ่นของเชื้อที่เกิดขึ้นในแต่ละหลอดเปรียบเทียบกับหลอด positive control โดยความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งเชื้อได้มีลักษณะคือมีการตกตะกอนของเชื้ออยู่ก้นหลอดและสารละลายด้านบนมีลักษณะใส แสดงว่าสารสกัดนั้นสามารถยับยั้งเชื้อได้ แต่ถ้าพบว่าสารละลายมีลักษณะขุ่น แสดงว่ามีการเจริญเติบโตของเชื้อ ในงานวิจัยนี้พบว่าค่า MIC หรือค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* คือที่ความเข้มข้น 25 และ 50 mg/mL ตามลำดับ ลักษณะความใส-ขุ่นของสารละลายในแต่ละหลอดทดสอบแสดงในรูปแบบที่ 1(ก) และ 1(ข) ตามลำดับ จากค่า MIC ที่ได้ข้างต้น สามารถนำมาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อได้ (Minimal bactericidal concentration, MBC) ของสารสกัดจากซังแห้งของข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงโดยนำหลอดที่ไม่มีความขุ่น (ตั้งแต่หลอดที่มีความเข้มข้นสูงกว่าค่า MIC ขึ้นไป) ไปเทและเกลี่ย ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (MHA) สำหรับทั้งเชื้อ *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* การอ่านผลค่า MBC คือ ค่าความเข้มข้นของสารสกัดต่ำสุดที่ไม่พบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว พบว่าค่า MBC ของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อ *Escherichia coli* ได้คือที่ความเข้มข้น 25 mg/mL ดังแสดงในรูปแบบที่ 2 (ก) ซึ่งไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อของสารสกัดที่เข้มข้นต่ำสุด 25 mg/mL ส่วนในเชื้อ *Staphylococcus aureus* ต้องใช้สารสกัดที่มีความเข้มข้นมากกว่า 200 mg/mL จึงจะฆ่าเชื้อได้ ดังแสดงในรูปแบบที่ 2 (ข) ซึ่งสังเกตพบการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในทุกจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของสารสกัดในช่วง 25-200 mg/mL แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากซังข้าวโพดแห้งมีความสามารถในการต้านเชื้อ *Escherichia coli* ได้ดีกว่าเชื้อ *Staphylococcus aureus*

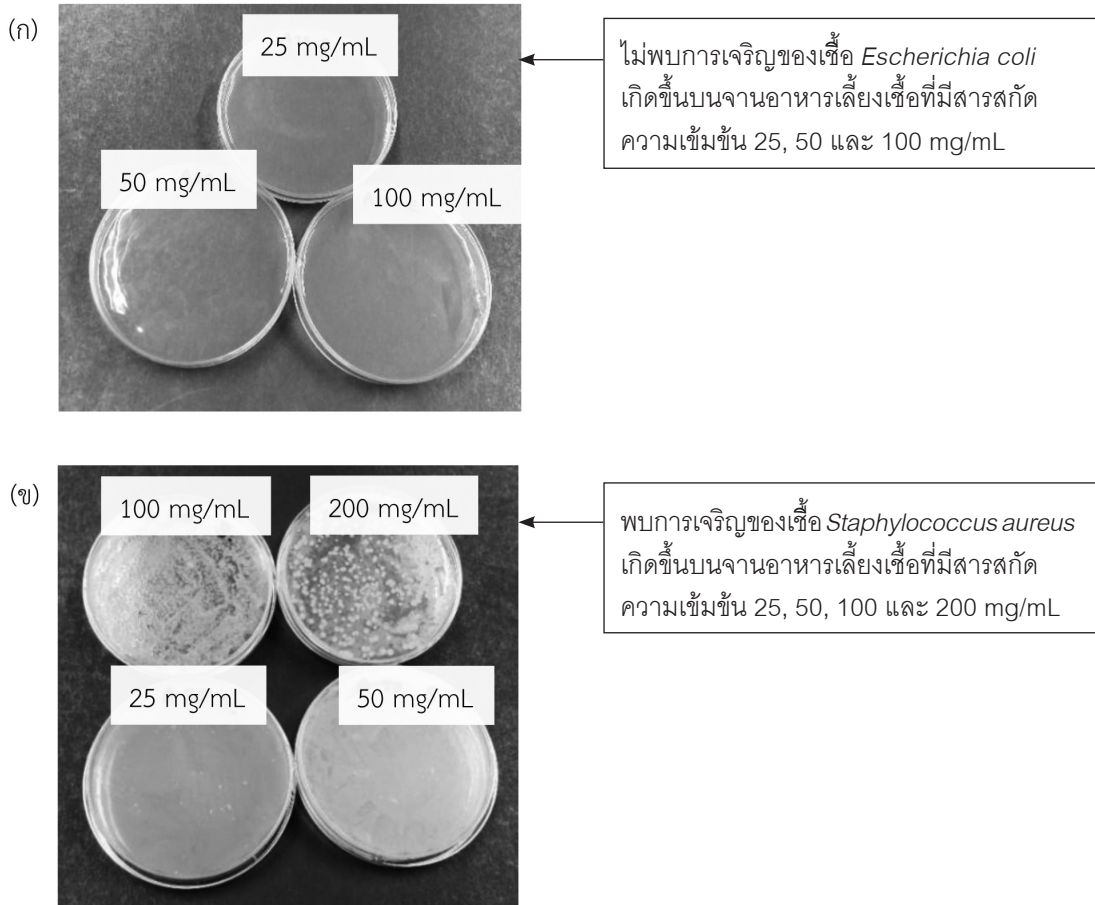


Conc.(mg/mL) 200 100 50 25 12.5 6.25 3.12 1.56 0.78 Control



Conc.(mg/mL) 200 100 50 25 12.5 6.25 3.12 1.56 0.78 Control

รูปที่ 1 ลักษณะความใส-ขุ่นของสารละลายในแต่ละหลอดทดลอง
ที่ได้จากการทดสอบการหาค่า MIC
ของสารสกัดในเชื้อ (ก) *Escherichia coli* และ (ข) *Staphylococcus aureus*



รูปที่ 2 การเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ
ที่มีความเข้มข้นของสารสกัดต่าง ๆ กัน
(ก) *Escherichia coli* และ (ข) *Staphylococcus aureus*

ผลจากการศึกษาทำให้ทราบว่าสารสกัดแอนโทไซยานินจากชั่งแห้งของข้าวโพด ข้าวเหนียวสีม่วงที่สกัดได้ในงานวิจัยนี้มีความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* ได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยอื่น ๆ ที่ได้ทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อทั้งสองชนิดนี้ของสารแอนโทไซยานินที่สกัดได้จากเมล็ดข้าวสีม่วง (Somted et al., 2015) จากมันฝรั่งสีม่วง (Rath et al., 2016) และจากกะหล่ำปลีสีม่วง (Hafidh et al., 2012) ก็รายงานว่าสามารถยับยั้งเชื้อทั้งสองชนิดนี้ได้เช่นกัน อย่างไรก็ตามเนื่องจากว่าชั่งข้าวโพดเป็นวัสดุเหลือทิ้งที่มีราคาถูกจึงจัดว่าเป็นแหล่งที่ให้สารแอนโทไซยานินที่น่าสนใจเมื่อเทียบกับแหล่งแอนโทไซยานินจากวัสดุธรรมชาติอื่น ๆ ดังนั้นการพัฒนากำหนดเอาสารแอนโทไซยานินที่มีอยู่ในปริมาณมากในชั่งข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมทางด้านเภสัชภัณฑ์จึงควรมีการศึกษาและพัฒนาต่อไปอย่างต่อเนื่อง

3. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารแอนโทไซยานินที่สกัดได้

การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay เป็นวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีฟิฟิเอซ (DPPH[•], diphenyl-picrylhydrazyl radical) ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัว มีสีม่วง และสามารถดูดกลืนคลื่นแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 515 nm เมื่อ DPPH[•] ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจะทำให้สีม่วงจางลง ๆ จนเป็นสีเหลือง ทำให้สามารถหาการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างแอนโทไซยานินที่สกัดได้จากการคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH[•] ตามสมการที่ (2) และรายงานผลในรูป EC₅₀ (50% Effective concentration) ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นของสารสกัดตัวอย่างที่สามารถทำให้ความเข้มข้นของ DPPH ลดลง 50 % โดยค่าตัวเลข EC₅₀ ยิ่งต่ำแสดงว่าสารสกัดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระยิ่งสูง สารแอนโทไซยานินที่สกัดได้มีค่า EC₅₀ เท่ากับ 2.972 µg/mL และเมื่อนำค่า EC₅₀ ของสารสกัดเปรียบเทียบกับค่า EC₅₀ ของสารมาตรฐาน 2 ชนิดได้แก่ วิตามินซี และ วิตามินอี ที่เตรียมในสถานะเดียวกัน จะได้ผลดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าค่า EC₅₀ ของสารสกัดแอนโทไซยานินจากซังข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงมีค่าต่ำกว่า วิตามินซี และ วิตามินอี แสดงว่าสารสกัดแอนโทไซยานินที่สกัดได้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สูงกว่าวิตามินซี และวิตามินอี โดยมีค่าสูงกว่า วิตามินซี และวิตามินอี 1.5 เท่า และ 4 เท่า ตามลำดับ แสดงว่าสารสกัดแอนโทไซยานินในซังข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงมีสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สูง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Department of Science Service (2010) ที่รายงานว่าแอนโทไซยานินมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่า วิตามินซี และวิตามินอี และเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Butkhup (2013) ที่สกัดแอนโทไซยานินจากผลหม่อน 8 สายพันธุ์ที่สกัดโดยใช้เมทานอล (60% v/v) ร่วมกับเทคนิคอัลตราโซนิก พบว่าสารสกัดจากผลหม่อนพันธุ์นครราชสีมา 60 มีค่า EC₅₀ ต่ำสุด คือ 241.83 µg/mL และ Muangrat et al. (2015) ซึ่งสกัดสารแอนโทไซยานินจากซังแห้งข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงโดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลายร่วมกับเทคนิคอัลตราโซนิก พบว่าค่า EC₅₀ มีค่าประมาณ 5093 µg/mL ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่างานวิจัยนี้

วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารแอนโทไซยานินที่สกัดได้จากซังข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงด้วยการวัดความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระ (Ferric ion reducing antioxidant power, FRAP assay) โดยอาศัยหลักการของสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถถ่ายเทอิเล็กตรอนให้กับสารประกอบเชิงซ้อนของ Fe (III) ทำให้เปลี่ยนเป็น Fe (II) ปริมาณสารประกอบเชิงซ้อนของ Fe (II) ที่เกิดขึ้นสามารถนำมาใช้ในการประมาณการความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารได้ในรูปของค่า FRAP (FRAP value) เทียบกับกราฟมาตรฐานของเฟอร์รัสซัลเฟต (FeSO₄) โดยผลการทดสอบได้ค่า FRAP ของสารสกัดแอนโทไซยานินเท่ากับ 6.555 µg FeSO₄/mg โดยค่า FRAP สูงหมายความว่า มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูง

ซึ่งเมื่อเทียบกับงานวิจัยของ Khampas (2014) ที่ประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของข้าวโพดประเภทต่าง ๆ ที่มีสีเมล็ดแตกต่างกัน จำนวน 13 สายพันธุ์ที่สกัดโดยใช้ 1% กรดซิตริก ความเข้มข้น 1 M ในเมทานอล พบว่าข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงพันธุ์ WP2 มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP สูงสุดเท่ากับ $0.02584 \mu\text{g FeSO}_4/\text{mg}$ ซึ่งค่า FRAP ที่ได้มีค่าค่อนข้างต่ำเช่นกัน

โดยทั่วไปแล้วค่าที่ได้จากผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP ไม่จำเป็นต้องเท่ากับผลการทดสอบโดยวิธี DPPH ทั้งนี้เป็นเพราะว่าปฏิกิริยาในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในแต่ละวิธีทดสอบมีความจำเพาะและความไวแตกต่างกัน นอกจากนั้นในแต่ละวิธีทดสอบมีมาตรฐานในการทดสอบและมีการใช้ปริมาณของสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในปริมาณที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงทำให้ไม่สามารถเปรียบเทียบผลกิจกรรมการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของทั้ง 2 วิธีดังกล่าวได้

ตารางที่ 1 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดแอนโทไซยานินโดยวิธี DPPH assay เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน วิตามิน ซี และ วิตามิน อี

สารตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ	EC ₅₀ (mean $\pm$ SD) ($\mu\text{g/mL}$)
สารสกัดแอนโทไซยานิน	2.972 $\pm$ 0.058
วิตามิน ซี	4.541 $\pm$ 0.033
วิตามิน อี	12.034 $\pm$ 0.048

สรุปผลการวิจัย

การสกัดสารแอนโทไซยานินจากขั้วแห้งของข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงด้วยตัวทำละลายอะซิโตนในสภาวะกรดร่วมกับเทคนิคอัลตราโซนิก สามารถสกัดได้ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในปริมาณที่สูงถึง $7,869.26 \mu\text{g CGE/g DW}$ ซึ่งได้สารสกัดแอนโทไซยานินเพิ่มขึ้นประมาณ 52% เมื่อเทียบกับการสกัดขั้วข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงที่ไม่ได้ใช้เทคนิคอัลตราโซนิกร่วมในการสกัด สารสกัดที่ได้มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *Escherichia coli* ได้ดีกว่า เชื้อ *Staphylococcus aureus* โดยในเชื้อ *Escherichia coli* จะมีค่า MIC และ MBC เท่ากันคือเท่ากับ 25 mg/mL ในขณะที่ในเชื้อ *Staphylococcus aureus* จะมีค่า MIC เท่ากับ 50 mg/mL และมีค่า MBC $> 200 \text{ mg/mL}$ นอกจากนี้สารสกัดที่ได้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าวิตามินซี 1.5 เท่า และสูงกว่าวิตามินอี 4 เท่า ผลจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าขั้วแห้งข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงมีศักยภาพในการนำไปพัฒนาเพื่อประยุกต์เป็นอาหารเพื่อสุขภาพและงานทางด้านเภสัชภัณฑ์ได้

กิตติกรรมประกาศ

คณะวิจัยขอขอบคุณกลุ่มวิจัยการพัฒนางานด้านความรู้ทางด้านการเกษตรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มหาวิทยาลัยขอนแก่นที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยนี้จนสำเร็จไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- Benzie, I.F.F. & Strain, J.J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, 239(1), 70-76.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. & Berset, C. (1995). Use of Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **LWT-Food Science and Technology**. 28(1), 25-30.
- Butkhup, L. (2013). **Comparative Study of Flavonoid Contents and Antioxidant Property of Different Mulberry Fruits**. Bangkok: The Thailand Research Fund. (in Thai)
- Department of Science Service. (2010). **Anthocyanin**. Bangkok: Ministry of Science and Technology. (in Thai)
- Giusti, M.M. & Wrolstad, R.E. (2001). Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. In **Current Protocols in Food Analytical Chemistry** (pp. F1.2.1-F1.2.13). New York: John Wiley & Sons Inc.
- Hafidh, S., Breznenová, K. & Honys, D. (2012). De Novo Post-Pollen Mitosis II Tobacco Pollen Tube Transcriptome. **Plant Signaling & Behavior**. 7(8), 918-921.
- Hagiwara, A., Miyashita, K., Nakanishi, T., Sano, M., Tamano, S., Kadota, T. & Shirai, T. (2001). Pronounced Inhibition by a Natural Anthocyanin, Purple Corn Color, of 2-Amino-1-Methyl-6-Phenylimidazo [4,5-b] Pyridine (PhIP)-Associated Colorectal Carcinogenesis in Male F344 Rats Pretreated with 1,2-Dimethylhydrazine. **Cancer Letters**. 171(1), 17-25.
- Harakotr, B., Suriharn, B., Tangwongchai, R. & Lertrat, K. (2014). Effects of Harvesting Times and Cooking Methods on Anthocyanin Content and Antioxidant Activity in Purple Waxy Corn Hybrids. **Khon Kaen Agriculture journal**. 42(3), 337-346. (in Thai)
- Jing, P. (2006). **Purple Corn Anthocyanins: Chemical Structure, Chemoprotective Activity and Structure/Function Relationships**. Doctoral Dissertation, The Ohio State University, USA.

- Khampas, S. (2014). **Effects of Locations on Phenolic Anthocyanin, Carotenoid Contents and Antioxidant Capacity in Vegetable Corn**. Master of Science Thesis in Agronomy, Graduate School, Khon Kaen University. (in Thai)
- Li, J., Walker, C.E. & Faubion, J.M. (2011). Acidulant and Oven Type Affect Total Anthocyanin Content of Blue Corn Cookies. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 91(1), 38-43.
- Muangrat, R., Suwan, S. & Suthakit, P. (2015). Effect of Various Conditions in Ultrasonic Extraction on Total Anthocyanin Content of Purple Waxy Corn. **Journal of Science and Technology**. 23(5), 783-796. (in Thai)
- Rath, D., George, J., Mukherjee, A., Naskar, S.K. & Mohandas, C. (2016). Antibacterial Activity of Leaf and Tuber Extract of Orange, Purple Flesh Antioxidants Rich Sweet Potato (*Ipomoea batatas* (L.)). **Merit Research Journal of Agricultural Science and Soil Sciences**. 4(4), 67-71.
- Somted, P., Peeraphunth, S., Amnueysit, K. & Amnueysit, P. (2015). Antibacterial Activity of Purple Rice Extracts on Growth Inhibition of Human Pathogenic Bacteria. In **Proceedings of 53rd Kasetsart University Annual Conference: Plants, Animals, Veterinary Medicine, Fisheries, Agricultural Extension and Home Economics** (PP. 574-581). Bangkok: The Thailand Research Fund. (in Thai)
- Soria, A.C. & Villamiel, M. (2010). Effect of Ultrasound on the Technological Properties and Bioactivity of Food: A Review. **Trends in Food Science & Technology**. 2(17), 323-331.
- Srithong, P., Kajsongkram, T., Bangchonglikitkul, C. & Boonsupthip, W. (2014). Effects of Solvent Type and Solid to Solvent Ratio on Antioxidant Compounds Extraction from Purple Corn (*Zea mays* L.) Seed and cob. In **Proceedings of 52nd Kasetsart University Annual Conference: Agro-Industry** (PP. 138-145). Bangkok: The Thailand Research Fund. (in Thai)
- Tao, Y., Wu, D., Zhang, Q.A. & Sun, D.W. (2014). Ultrasound-assisted Extraction of Phenolics from Wine Lees: Modeling Optimization and Stability of Extracts during Storage. **Ultrasonics Sonochemistry**. 21(2), 706-715.
- Yang, Z. & Zhai, W. (2010). Identification and Antioxidant Activity of Anthocyanins Extracted from the Seed and Cob of Purple Corn (*Zea mays* L.). **Innovative Food Science & Emerging Technologies**. 11(1), 169-176.