

บทความวิจัย (Research Article)

การเสริมฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารต้านออกซิเดชันจากสารสกัดข้าวหอมมะลิแดง และสารสกัดข้าวเหนียวดำพันธุ์ดอยสะเก็ด

ขวัญจิต อิศระสุข¹, จิตรวดี ตั้งหิรัญรัตน์¹, อมรรัตน์ สีสุกอง², วรพจน์ หริตกุล³, ธรรมบุญ รุ่งสังข์⁴, กัลยา ภรณ์ จันตรี⁵ และ ปิยนุช พรหมภมร^{1*}

Synergistic antioxidant activity of antioxidant components from red brown rice and black glutinous rice extracts

Khwunjit Itsarasook¹, Jittarawadee Tanghiranrat¹, Amornrat Srisukong², Woraphot Haritakul³, Tammanoon Rungsang⁴, Kanlayaporn Chantree⁵ and Piyanuch prompamorn^{1*}

¹ Cosmetic Science Program, Faculty of Science and Technology, Suan Dusit University, Bangplad, Bangkok, 10700

² Biology Applied Program, Faculty of Science and Technology, Suan Dusit University, Bangplad, Bangkok, 10700

³ Chemical Technology Program, Faculty of Science and Technology, Suan Dusit University, Bangplad, Bangkok, 10700

⁴ Department of Cosmetic Science, School of Pharmaceutical Sciences, Phayao University, Meung, Phayao 56000

⁵ Cosmetic and Beauty Sciences Program, Faculty of Science and Technology, Kanchanaburi Rajabhat University, Kanchanaburi, 71000

*Corresponding author: piyanuch.ppm@gmail.com

Naresuan Phayao J. 2021;14(3):54-62

Received; 19 January 2021; Revised: 15 April 2021; Accepted: 7 September 2021

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการเสริมฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารต้านออกซิเดชันจากสารสกัดจากข้าวหอมมะลิแดงและข้าวเหนียวดำพันธุ์ดอยสะเก็ดเพื่อใช้ประโยชน์ในเครื่องสำอางบำรุงผิว วิเคราะห์หาปริมาณสารต้านออกซิเดชันในสารสกัดข้าวหอมมะลิแดงและข้าวเหนียวดำ; ฟีนอลิกรวม ฟลาโวนอยด์รวม แอนโทไซยานินรวม และโปรแอนโทไซยานินรวม ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu, Aluminium chloride, pH Differential และ Vanillin-sulfuric acid ตามลำดับ พร้อมทั้งทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสกัดข้าวหอมมะลิแดงและข้าวเหนียวดำ ด้วยวิธี DPPH assays และ ABTS assay พบว่า สารสกัดทั้ง 2 ชนิดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS⁺ ได้ และการเสริมฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดทั้ง 2 ชนิดพิจารณาจากอัตราส่วนค่าความเข้มข้นการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (IC₅₀) พบว่า ที่อัตราส่วน 3:1 ของสารสกัดข้าวเหนียวดำต่อสารสกัดข้าวหอมมะลิแดงสามารถเสริมฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ โดยมีค่าการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS⁺ ร้อยละเท่ากับ 70.32±0.87 และ 92.19±0.64

¹ หลักสูตรวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสวนดุสิต เขตบางพลัด กรุงเทพมหานคร 10700

² กลุ่มวิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสวนดุสิต เขตบางพลัด กรุงเทพมหานคร 10700

³ หลักสูตรเทคโนโลยีเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสวนดุสิต เขตบางพลัด กรุงเทพมหานคร 10700

⁴ สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา 56000

⁵ สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอางและความงาม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏกาญจนบุรี จังหวัดกาญจนบุรี 7100

ตามลำดับ จากผลการศึกษาทั้งหมดแสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากข้าวหอมมะลิแดงและข้าวเหนียวดำพันธุ์ดอยสะเก็ดเสริมฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและสามารถใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางบำรุงผิวได้

คำสำคัญ: การเสริมฤทธิ์, สารสกัดข้าวหอมมะลิแดง, สารสกัดข้าวเหนียวดำ, ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

Abstract

This present study aims to study the synergistic antioxidant activity of antioxidant components from red brown rice and black glutinous rice extracts for facial cosmetics application. The extracts from red brown rice and black glutinous rice were quantified the amount of antioxidant contents; total phenolic, total flavonoid, total anthocyanin and total pro-anthocyanidin according to Folin-Ciocalteu, Aluminium chloride, pH differential and Vanillin-sulfuric acid methods, respectively, including the anti-oxidation activity of extracts were tested by DPPH and ABTS assays. The obtained results showed that the antioxidant compounds from the extracts exhibited DPPH and ABTS⁺ radicals scavenging activities. The ratio of IC₅₀ value of the extracts was determined for synergistic effect of antioxidants. Results found that the most effective synergistic activity against radicals was the combination of 3:1 ratio of black glutinous rice extract and red brown rice extract which inhibited the DPPH and ABTS⁺ radicals were 70.32±0.87% and 92.19±0.64%, respectively. The sum of the findings indicated that the combined of red brown rice and black glutinous rice extracts had a potent synergistic antioxidant activity and it can be used as an active ingredient in facial cosmetic products.

Keywords: Synergistic effect, Red brown rice extract, Black glutinous rice extract, Anti-oxidant activity

คำนำ

อนุมูลอิสระ (Free Radicals) หมายถึงสารที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว (unpaired electrons) ในอะตอมหรือโมเลกุล เช่น Reactive oxygen species (ROS), Superoxide radical (O₂[•]) และ Hydroxyl radical (OH[•]) เป็นต้น เกิดจากกระบวนการผลิตพลังงานภายในเซลล์หรือจากกระบวนการเมแทบอลิซึม (Metabolism) หรือจากสิ่งแวดล้อมภายนอก เช่น แสงแดด ควันบุหรี่ และเขม่ารถยนต์ เป็นต้น อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นสามารถทำลายชีวโมเลกุลทุกประเภททั้งในเซลล์ และส่วนประกอบของเซลล์สิ่งมีชีวิต เช่น ลิพิด (lipid) โปรตีน (protein) เอนไซม์ (enzyme) และคอลลาเจน (collagen) เป็นต้น ซึ่งเป็นสาเหตุให้เซลล์ตาย เกิดการกลายพันธุ์ของดีเอ็นเอในเซลล์และก่อให้เกิดโรคต่าง ๆ ได้แก่ โรคชรา (aging) โรคมะเร็ง (cancer) และโรคเกี่ยวกับความผิดปกติของผิวหนัง เป็นต้น สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants) เป็นโมเลกุลที่ยับยั้งหรือหยุดปฏิกิริยาออกซิเดชันและชะลอหรือยับยั้งความเสียหายของเซลล์ สามารถป้องกันภาวะต่าง ๆ ที่เกิดจากผลของ

อนุมูลอิสระได้ โดยสารต้านอนุมูลอิสระมีกลไกการทำงานต้านอนุมูลอิสระด้วยกันหลายแบบ เช่น ดักจับอนุมูลอิสระ (radical scavenging) การยับยั้งการทำงานของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน (singlet oxygen quenching) จับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (metal chelation) หยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (chain-breaking) และเสริมฤทธิ์ (synergism) เป็นต้น [1] สารต้านอนุมูลอิสระประกอบด้วยสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (synthetic antioxidants) เช่น Butylated hydroxytoluene (BHT) และ Propyl gallate เป็นต้น และสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (natural antioxidants) สามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตทั้งพืชและสัตว์ เช่น วิตามินซี วิตามินอี และ Glutathione

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นผลิตผลทางการเกษตรที่สำคัญของประเทศไทย ข้าวเปลือกส่วนใหญ่ที่ผลิตได้จะนำมาใช้บริโภคภายในประเทศ ส่วนที่เหลือจะใช้ในการส่งออก เนื่องจากมีพื้นที่เพาะปลูกมาก และมีพันธุ์ข้าวหอมมะลิที่มีคุณภาพและราคาสูง โครงการที่เกี่ยวข้องกับการแปรรูปข้าวเพื่อสร้างมูลค่า

ในเชิงพาณิชย์ จึงเป็นวิธีการหนึ่งในการหลีกเลี่ยงปัญหาด้านการส่งออกข้าวในอนาคต ข้าวสี (Pigmented rice) เป็นข้าวที่มีรงควัตถุในส่วนของเยื่อหุ้มเมล็ด องค์ประกอบทางเคมีหลักในข้าวสี ได้แก่ สารกลุ่มแอนโทไซยานิน (anthocyanins) โดยข้าวที่มีสีแดง และดำจะประกอบด้วยแอนโทไซยานิน ได้แก่ cyanidin-3-O- β -D-glucoside และ peonidin-3-O- β -D-glucoside ตามลำดับ [2] นอกจากนี้ยังพบสารกลุ่มฟีนอลิกในข้าวสีแดง และสีดำ ได้แก่ Ferulic acid, Protocatechuic, trans-p-Coumaric acid, Catechin, และ Caffeic acid [3,4] ส่วนสารกลุ่มฟลาโวนอยด์พบว่า ข้าวที่มีสีดำจะมีส่วนประกอบหลักเป็นแอนโทไซยานิน และข้าวสีแดงจะมีโปรแอนโทไซยานิน [5] โดยมีรายงานว่าสารสำคัญดังกล่าว มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาค่อนข้างกว้าง เช่น มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระ [6] ต้านการอักเสบ [7] ลดภาวะเบาหวาน [8] ลดไขมันในเลือด [9] และโรคหัวใจ [10] เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัย พบว่า สารสกัดจากข้าวสีของไทยมีฤทธิ์ยับยั้งการสลายตัวของเส้นใยคอลลาเจนและอีลาติน และยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ [11] แต่ยังไม่มีย่อยผลการนำสารสกัดจากข้าวมาศึกษาการเสริมฤทธิ์ต้านออกซิเดชันร่วมกัน เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเสริมฤทธิ์กันของสารต้านออกซิเดชันจากสารสกัดข้าวเหนียวดำพันธุ์ดอยสะเก็ด และสารสกัดข้าวหอมมะลิแดง เพื่อประยุกต์ใช้เป็นสารออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางบำรุงผิวหน้า และนอกจากการเสริมฤทธิ์กันจะช่วยเพิ่มฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีแล้ว ยังทำให้สามารถใช้สารสกัดแต่ละชนิดในปริมาณที่น้อยลง และป้องกันผลข้างเคียงของการใช้สารสกัดจากข้าวแต่ละชนิดในปริมาณสูง อีกทั้งยังเป็นการเพิ่มมูลค่าในเชิงพาณิชย์แก่ข้าวเหนียวดำพันธุ์ดอยสะเก็ดและข้าวหอมมะลิแดง

วัสดุและวิธีการ

การเตรียมพืช

นำข้าวหอมมะลิแดงจากกลุ่มแม่บ้านร่วมใจจังหวัดสุรินทร์และข้าวเหนียวดำสายพันธุ์ดอยสะเก็ดจากบ้านเย็นตาเกษตรอินทรีย์ อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่ มาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดสมุนไพร วิเคราะห์หาความชื้นของข้าวหอมมะลิแดงและข้าวเหนียวดำด้วยวิธี AOAC (2000) [12] ทำการทดลอง 3 ครั้ง (triplicate) แล้วคำนวณหาร้อยละปริมาณความชื้น จากสูตร

$$M = (W_1 - W_2 / W_1) \times 100$$

กำหนดให้ M ปริมาณความชื้น (ร้อยละ) W_1 คือน้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ และ W_2 คือน้ำหนักตัวอย่างหลังอบ

การสกัด

สกัดข้าวหอมมะลิแดงและข้าวเหนียวดำพันธุ์ดอยสะเก็ดด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 ใช้อัตราส่วนผงข้าวต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1:10 (w/v) เขย่าที่ความเร็วรอบ 130 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ทำการสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง จากนั้นนำสารละลายที่ได้กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman no.1 และระเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสารแบบลดความดัน (Rotary evaporator) จากนั้นคำนวณหาร้อยละของน้ำหนักร้อยละของสารสกัด (%Yield) ของสารสกัดหยาบ และเก็บสารสกัดที่ได้ในขวดสีชา และอุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป [13]

การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิกรวม

วิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu assay [11] ปิเปตต์สารสกัดที่ความเข้มข้น 1.0 mg/mL ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วเติมสารละลาย 10% v/v ของ Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที แล้วนำมาเติมสารละลาย Na_2CO_3 ความเข้มข้น 7.5 %w/v ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader ทำการทดลอง 3 ครั้ง (triplicate) นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในสารสกัด โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (Calibration standard curve) ของ Gallic acid ในรูปแบบมิลลิกรัมสมมูลของ Gallic acid ต่อสารสกัด 1 กรัม (gallic acid equivalent, mgGAE/g extract)

การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม

วิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมด้วยวิธี Aluminium chloride assay [14] ปิเปตต์สารสกัดที่ความเข้มข้น 1.0 mg/mL ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ผสมกับเอทานอลปริมาตร 75 ไมโครลิตร สารละลาย 10% AlCl_3 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร 1.0 M potassium acetate ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นปริมาตร 140 ไมโครลิตร ตามลำดับ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 40 นาที จึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate Reader ที่ความยาวคลื่น 415 nm ทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง (triplicate) นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาสารฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัด โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Quercetin ในรูปแบบมิลลิกรัมสมมูลของ Quercetin ต่อสารสกัด 1 กรัม (quercetin equivalent, mgQE/g extract)

การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินรวม

วิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินรวมในสารสกัดด้วยวิธี pH differential method [15] โดยผสมสารละลาย 0.2 M Potassium chloride buffer pH 1.0 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร หรือสารละลาย 1 M Sodium acetate buffer pH 4.5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร กับสารละลายของสารสกัดปริมาตร 2 มิลลิลิตร ตามลำดับ บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา

15 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 และ 700 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer จากนั้นคำนวณหาปริมาณแอนโทไซยานินในสารสกัดในรูปแบบมิลลิกรัมสมมูลของ Cyanidin-3-glucoside ต่อสารสกัด 1 กรัม คำนวณจากสมการ

$$A = (A_{510} - A_{700})_{\text{pH } 1.0} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH } 4}$$

ความเข้มข้นของแอนโทไซยานิน (mg/L) = $A \times MW \times 10^3 \times \text{Dilution factor} / \epsilon L$

กำหนดให้ A คือ ผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงระหว่างค่า pH 1.0 และ 4.5 ϵ คือ ค่าคงที่ Molar extinction ของ cyanidin-3-glucoside (26,900) L คือ ความยาวของเซลล์ Spectrophotometer (1.0 cm) และ MW คือ มวลโมเลกุลของ Cyanidin-3-glucoside (449.2 g/mol)

การวิเคราะห์ปริมาณโปรแอนโทไซยานิดินรวม

วิเคราะห์ปริมาณโปรแอนโทไซยานิดินรวมในสารสกัดด้วยวิธี vanillin-sulfuric acid [16] โดยปิเปตต์สารสกัดความเข้มข้น 1.0 mg/mL ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย 1.0% Vanillin ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และสารละลาย 25% sulfuric acid (H_2SO_4) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มในที่มืด อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader ทำการทดลอง 3 ครั้ง (triplicate) นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณโปรแอนโทไซยานิดินรวมในสารสกัด โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Catechin ในรูปแบบมิลลิกรัมสมมูลของ Catechin ต่อสารสกัด 1 กรัม (catechin equivalent, mgCE/g extract)

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay [17] เทียบกับสารมาตรฐาน Trolox (Trolox) โดยเตรียมสารสกัดให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ จากนั้นปิเปตต์สารสกัดแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 75 ไมโครลิตร เติมนลงใน 96 well plate และเติมสารละลาย 0.2 mM DPPH ปริมาตร 150 ไมโครลิตร จากนั้นตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 30 นาที วัดค่าการดูดกลืน

คลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader ทำการทดลอง 3 ครั้ง (triplicate)

ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระวิธี ABTS assay [18] เทียบกับสารมาตรฐาน Trolox (Trolox) โดยเตรียมสารละลาย 14 mM ABTS ผสมกับ 4.9 mM potassium persulfate ในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.70 ± 0.02 ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร แล้วผสมสารตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตร กับสารละลาย ABTS ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตรด้วยเครื่อง Microplate reader ทำการทดลอง 3 ครั้ง (triplicate)

นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS⁺ ดังสมการดังนี้

$$\text{Inhibition activity (\%)} = [(A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{blank}}] \times 100$$

เมื่อ A_{sample} คือค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารผสมระหว่างสารละลาย DPPH หรือ ABTS กับสารละลายสารสกัดหรือสารมาตรฐาน A_{blank} คือค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารละลาย DPPH หรือ ABTS จากนั้นคำนวณหาการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% (half maximal inhibition concentration, IC_{50}) จากกราฟระหว่างร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระและความเข้มข้นของสารตัวอย่าง

ศึกษาประสิทธิภาพการเสริมฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัด

โดยนำสารละลายของสารสกัดข้าวเหนียวดำพันธุ์ตอยสะเกิดและสารสกัดข้าวหอมมะลิแดงจากค่าความเข้มข้นการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) ผสมกันในอัตราส่วนดังนี้ 1:1, 1:2, 1:3, 2:1 และ 3:1 แล้วนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS assay และรายงานผลเป็นร้อยละการยับยั้งของอนุมูลอิสระของสารผสมที่อัตราส่วนต่าง ๆ นำค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารผสมข้างต้นมาคำนวณผลการเสริมฤทธิ์ของสารผสมระหว่างสาร

สกัดจากข้าวหอมมะลิแดงและข้าวเหนียวดำ เพื่อหาประสิทธิภาพการเสริมฤทธิ์ (Synergistic effect) [19] โดยใช้สมการดังนี้

$$SE = \text{Experiment value} / \text{Theoretical value}$$

เมื่อ Experiment value คือร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดข้าวแต่ละชนิด และ Theoretical value คือร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระเฉลี่ยของสารสกัดข้าวที่ผสมกันในอัตราส่วนต่าง ๆ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 50

ถ้า SE มากกว่า 1 หมายความว่าสารสกัดทั้ง 2 ชนิดมีประสิทธิภาพเสริมฤทธิ์กัน (Synergistic effect) SE น้อยกว่า 1 หมายความว่าสารสกัดทั้ง 2 ชนิดไม่มีประสิทธิภาพเสริมฤทธิ์กัน (Antagonistic effect) และ SE เท่ากับ 1 หมายความว่าสารสกัดทั้ง 2 ชนิดมีแนวโน้มเสริมฤทธิ์ (Additive effect)

ข้อมูลจากการวิจัยเชิงปริมาณแสดงผลในรูปแบบค่าเฉลี่ย (Mean) $\pm$ ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) วิเคราะห์ผลทางสถิติ student t-test โดยใช้โปรแกรม Quick Cals ค่า $p < 0.05$ แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการศึกษา

การวิเคราะห์ความชื้นของข้าว พบว่า ข้าวหอมมะลิแดงและข้าวเหนียวดำมีปริมาณความชื้นเท่ากับ ร้อยละ 10.86 และ 10.42 ตามลำดับ และไม่เกินร้อยละ 15 ตามมาตรฐานสินค้าเกษตรข้าวไทย เนื่องจากความชื้นที่มีอยู่ในข้าวเป็นคุณสมบัติที่สำคัญของข้าว ซึ่งจะเป็นตัวบ่งชี้คุณภาพของข้าวรวมทั้งใช้เป็นข้อกำหนดในการซื้อขาย น้ำหนักของข้าวคุณภาพการสี และการเก็บรักษา ดังนั้นหากข้าวมีความชื้นสูงกว่าร้อยละ 15 ต้องนำไปลดความชื้นภายใน 24 ชั่วโมงก่อนจัดเก็บ เพื่อป้องกันการเกิดเชื้อราและปัญหาการเกิดข้าวเมล็ดเหลือง [20]

สารสกัดข้าวหอมมะลิแดงและสารสกัดข้าวเหนียวดำมีลักษณะทางกายภาพเป็นสีน้ำตาลเข้มอมแดงขุ่นหนืด และสีด้ามม่วงมีความขุ่นหนืดสูงตามลำดับ และมีร้อยละของสารสกัดหยาบเท่ากับร้อยละ 2.52 และ 2.46 ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวม ฟลาโวนอยด์รวม แอนโทไซยานินรวม และ

โปรแอนโทไซยานิดินรวม ของสารสกัดข้าวหอมมะลิแดง และสารสกัดข้าวเหนียวดำ พบว่า สารสกัดข้าวเหนียวดำ พันธุ์ดอยสะเก็ดมีปริมาณฟลาโวนอยด์รวม แอนโทไซยานินรวม และโปรแอนโทไซยานิดินรวมสูงกว่าสารสกัดข้าวหอมมะลิแดงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ส่วนสารสกัดข้าวหอมมะลิแดงมีปริมาณสารฟีนอลิกรวมสูงกว่าสารสกัดข้าวเหนียวดำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แสดงในตาราง 1

ตาราง 1 การวิเคราะห์ปริมาณสารต้านออกซิเดชันในสารสกัดข้าวหอมมะลิแดงและข้าวเหนียวดำพันธุ์ดอยสะเก็ด

สารสกัด	ฟีนอลิกรวม (mgGAE/g extract)	ฟลาโวนอยด์รวม (mgQE/g extract)	แอนโทไซยานินรวม (Cyanidin-3- glucoside/g extract)	โปรแอนโทไซยานิดินรวม (mgCE/g extract)
ข้าวหอมมะลิแดง	147.47±0.87*	2.37±0.34	1.10±0.23	143.01±1.79
ข้าวเหนียวดำ	128.88±0.51	30.96±0.60*	30.53±1.03*	247.75±1.36*

* $p<0.05$ (Student's *t* test) เปรียบเทียบระหว่างสารสกัดทั้ง 2 ชนิด

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay และ ABTS assay พบว่า สารสกัดข้าวหอมมะลิแดงร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS⁺ และมีค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (IC₅₀) ต่ำกว่าสารสกัดข้าว

เหนียวดำพันธุ์ดอยสะเก็ดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และสารสกัดทั้ง 2 ชนิด ให้ประสิทธิภาพการยับยั้งอนุมูลอิสระต่ำกว่าสารโทรลอคซ์ แสดงในตาราง 2

ตาราง 2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดข้าวหอมมะลิแดงและสารสกัดข้าวเหนียวดำพันธุ์ดอยสะเก็ด

สารสกัดหยาบ/ สารมาตรฐาน	DPPH assay		ABTS ⁺ assay	
	ร้อยละการยับยั้ง สูงสุด	IC ₅₀ (mg/mL)	ร้อยละการยับยั้ง สูงสุด	IC ₅₀ (mg/mL)
สารสกัดข้าวหอมมะลิแดง	74.83±0.81*	0.140±0.001*	81.36±0.59*	0.140±0.002*
สารสกัดข้าวเหนียวดำ	72.32±0.52	0.560±0.010	77.68±1.55	0.430±0.010
โทรลอคซ์ (Trolox)	84.85±0.85*	0.074±0.010*	82.86±1.60	0.0092±0.0004*

* $p<0.05$ (Student's *t* test) เปรียบเทียบระหว่างสารสกัดทั้ง 2 ชนิด และสารมาตรฐาน

ศึกษาการเสริมฤทธิ์ร่วมกันในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS⁺ ของสารสกัดข้าวเหนียวดำพันธุ์ดอยสะเก็ด และข้าวหอมมะลิแดง ผลการทดสอบแสดงในตาราง 3 จะเห็นได้ว่า ที่อัตราส่วน 3:1 มีร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS⁺ สูงกว่าอัตราส่วนอื่น โดยมีค่าเท่ากับร้อยละ 70.32±0.87 และ 92.19±0.64 ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับฤทธิ์

ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดข้าวเหนียวดำพันธุ์ดอยสะเก็ด (อัตราส่วน 1:0) และสารสกัดข้าวหอมมะลิแดง (อัตราส่วน 0:1) ซึ่งให้ประสิทธิภาพการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS เท่ากับร้อยละ 50 พบว่า ที่อัตราส่วน 3:1 จึงให้ประสิทธิภาพสูงกว่าการใช้สารสกัดชนิดเดียวในการทดสอบ

ตาราง 3 ผลการเสริมฤทธิ์ (Synergistic effect, SE) ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS⁺ ของสารสกัดข้าวเหนียวดำพันธุ์ต๋อยสะเก็ด และข้าวหอมมะลิแดง

อัตราส่วนของสารผสมระหว่าง สารสกัดข้าวเหนียวดำพันธุ์ต๋อยสะเก็ด ต่อสารสกัดข้าวหอมมะลิแดง	Experimental value		Synergistic effect (SE)	
	DPPH assay	ABTS assay	DPPH assay	ABTS assay
1:1	69.26±0.83	90.24±0.45*	1.39±0.017	1.80±0.009
1:2	66.28±0.57*	90.77±0.45	1.33±0.011	1.82±0.009
1:3	67.50±0.47*	91.16±0.43	1.35±0.009	1.82±0.009
2:1	69.59±0.56	91.33±0.21	1.39±0.011	1.83±0.004
3:1	70.32±0.87	92.19±0.64	1.41±0.017	1.84±0.013

* $p < 0.05$ (Student's t test) เปรียบเทียบในแต่ละอัตราส่วนของสารผสมของสารสกัดทั้ง 2 ชนิด

วิจารณ์

การวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในสารสกัดข้าวหอมมะลิแดงและข้าวเหนียวดำพันธุ์ต๋อยสะเก็ด พบว่า ประกอบด้วยกลุ่มฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ แอนโทไซยานิน และโปรแอนโทไซยานิน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่มีรายงานว่าสารฟีนอลิกที่มีในพันธุ์ข้าวสีดํา ได้แก่ Ferulic acid, Protocatechuic และ trans-p-Coumaric acid ส่วนสารฟีนอลิกที่มีในพันธุ์ข้าวสีแดง ได้แก่ Catechin, Protocatechuic และ Caffeic acid ส่วนข้าวที่มีสีแดง และดำจะประกอบด้วยแอนโทไซยานิน cyanidin-3-O-β-D-glucoside และ peonidin-3-O-β-D-glucoside ตามลำดับ [3, 13] นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า ข้าวที่มีปริมาณฟลาโวนอยด์สูงสุด คือ ข้าวเหนียวดำ รองลงมาคือ ข้าวเหนียวดำชุมพวง และข้าวหอมมะลิแดง ตามลำดับ [20] ทั้งนี้ความแตกต่างของปริมาณฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ในข้าวแต่ละสายพันธุ์อาจมีสาเหตุมาจากสายพันธุ์ สถานที่เพาะปลูก สภาพแวดล้อม ระยะเวลาการเก็บรักษา และวิธีการสกัดสารฟีนอลิก [5]

สารสกัดข้าวหอมมะลิแดงร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS⁺ และมีค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (IC₅₀) ต่ำกว่าสารสกัดข้าวเหนียวดำพันธุ์ต๋อยสะเก็ดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับสารมาตรฐานโทรลอคซ์ พบว่า สารสกัดทั้ง 2 ชนิด ให้ประสิทธิภาพการยับยั้งอนุมูลอิสระต่ำกว่า ทั้งนี้เนื่องจากสารมาตรฐานเป็นสารสังเคราะห์บริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยตรง ส่วน

สารสกัดจากข้าวมีองค์ประกอบทางเคมีหลากหลาย เช่น สารฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ แอนโทไซยานิน และโปรแอนโทไซยานิน ส่งผลให้ประสิทธิภาพการยับยั้งอนุมูลอิสระต่ำกว่าสารบริสุทธิ์ [11] จากผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารต้านออกซิเดชันและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดข้าวหอมมะลิแดง และข้าวเหนียวดำพันธุ์ต๋อยสะเก็ด จะเห็นว่า ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดเป็นผลมาจากกลไกการต้านอนุมูลอิสระของสารฟีนอล ซึ่งเป็องค์ประกอบของสารกลุ่มดังกล่าวโดยสารกลุ่มฟีนอลิกจะให้ไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระ อนุมูลอิสระของฟีนอลิกที่เกิดขึ้นจะมีความเสถียร และไม่ทำปฏิกิริยาต่ออนุมูลอิสระของฟีนอลิกจะรวมตัวกับอนุมูลอิสระอื่น ส่งผลให้สารฟีนอลิกสามารถลดอนุมูลอิสระได้ถึง 2 เท่า [11, 13]

การศึกษาการเสริมฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากธรรมชาติ เป็นการทดสอบคุณสมบัติการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดตั้งแต่ 2 ชนิดเมื่อผสมกัน (combined extracts) เพื่อทดสอบแนวโน้มการออกฤทธิ์เสริมกัน และการต้านการออกฤทธิ์ของสารผสมในการทดลองจึงทำการศึกษการเสริมฤทธิ์ร่วมกันในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS⁺ ของสารสกัดข้าวเหนียวดำพันธุ์ต๋อยสะเก็ด และข้าวหอมมะลิแดง เพื่อสามารถนำสารสกัดทั้ง 2 ชนิดประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางสำหรับผิว และยังลดผลข้างเคียงจากการใช้สารออกฤทธิ์กลุ่มสังเคราะห์ จากการทดลอง พบว่า ที่อัตราส่วน 3:1 ของสารผสมของสารสกัดข้าวเหนียวดำพันธุ์ต๋อยสะเก็ดต่อสารสกัดข้าวหอมมะลิแดง มีร้อยละ

การต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS⁺ สูงกว่าอัตราส่วนอื่น โดยมีค่าเท่ากับร้อยละ 70.32±0.87 และ 92.19±0.64 ตามลำดับ เมื่อคำนวณหาประสิทธิภาพการเสริมฤทธิ์ (Synergistic effect (SE) พบว่า ทุกอัตราส่วนให้ค่า SE มากกว่า 1 นั้นแสดงว่า สารสกัดจากข้าวทั้ง 2 ชนิดมีประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS⁺ แบบเสริมฤทธิ์ร่วมกัน (Synergistic) จากผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่มีรายงานพบว่า ผลเสริมฤทธิ์กันของสารต้านออกซิเดชันในสารสกัดพืชจะช่วยเพิ่มฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดี ทำให้สามารถใช้สารสกัดแต่ละชนิดในปริมาณที่น้อยลง และป้องกันผลข้างเคียงของการใช้สารสกัดจากพืชแต่ละชนิดจำนวนมาก [21, 22]

จากผลการวิจัยสรุปได้ว่า สารสกัดจากข้าวหอมมะลิแดงและข้าวเหนียวดำพันธุ์ดอยสะเก็ดมีสารต้านออกซิเดชันกลุ่มฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ แอนโทไซยานิน และโปรแอนโทไซยานิน และสารสกัดทั้ง 2 ชนิดสามารถเสริมฤทธิ์ต้านออกซิเดชันร่วมกัน สามารถประยุกต์ใช้สารสกัดจากข้าวหอมมะลิแดงและข้าวเหนียวดำพันธุ์ดอยสะเก็ดร่วมกันเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางสำหรับผิวได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) และสถาบันวิจัยและพัฒนา (สวพ.) มหาวิทยาลัยสวนดุสิต ประจำปีงบประมาณ 2562

เอกสารอ้างอิง

- Phansawan B. Free radicals, antioxidants and antioxidant activity determination. J Sci Tech. 2013;21(3):275–286. (in Thai)
- Pereira-Caro G, Cros G, Yokota T, Crozier A. Phytochemical profiles of black, red, brown, and white rice from the Camargue region of France. J Agric Food Chem. 2013;61(33):7976–7986.
- Sumczynski D, Kotásková E, Družbíkova H, Miček J. Determination of contents and antioxidant activity of free and bound phenolics compounds and in vitro digestibility of commercial black and red rice (*Oryza sativa* L.) varieties. Food Chem. 2016;211:339–346.
- Gong ES, Luo SJ, Li T, Liu CM, Zhang GW, Chen J, Zeng ZC, Liu RH. Phytochemical profiles and antioxidant activity of brown rice varieties. Food Chem. 2017;227:432–443.
- Goufo P, Trindade H. Rice antioxidants: phenolic acids, flavonoids, anthocyanins, proanthocyanidins, α -tocopherols, toco-trienols, γ -oryzanol, and phytic acid. Food Sci Nutr. 2014;2(2):75–104.
- Maisuthisaku P, Changchub L. Effect of extraction on phenolic antioxidant of different Thai Rice (*Oryza Sativa* L.) genotypes. Int J Food Prop. 2014;17(4):855–865.
- Kitisin T, Saewan N, Luplertlop N. Potential anti-inflammatory and anti-oxidative properties of Thai colored-rice extracts. Plant Omics. 2015;8(1):69–77.
- Terashima Y, Nagai Y, Kato H, Ohta A, Tanaka Y. Eating glutinous brown rice for one day improves glycemic control in Japanese patients with type 2 diabetes assessed by continuous glucose monitoring. Asia Pac J Clin Nutr. 2017;26(3):421–426.
- Shen KP, Hao CL, Yen HW, Chen CY, Chen JH, Chen FC, Lin HL. Pre-germinated brown rice prevented high fat diet induced hyperlipidemia through ameliorating lipid synthesis and metabolism in C57BL/6J mice. J Clin Biochem Nutr. 2016;59(1):39–44.

10. Kazemzadeh M, Safavi SM, Nematollahi S, Nourieh Z. Effect of brown rice consumption on inflammatory marker and cardiovascular risk factors among overweight and obese non-menopausal female adults. *Int J Prev Med*. 2014;5(4):478–488.
11. Teeranachaideekul V, Wongrakpanich A, Leanpolchareanchai J, Thirapanmethee K, Sirichaovanichkarn C. Characterization, biological activities and safety evaluation of different varieties of Thai pigmented rice extracts for cosmetic applications. *Asian J Pharm Sci*. 2018;45(3):140-153.
12. A.O.A.C. Official Methods of the Association of official Analytical Chemists. (14thed.) Washington D.C: Association official Analytical Chemist; 2000.
13. Thitipramote N, Pradmeeteekul P, Nimkamnerd J, Chaiwut P, Pintathong P, Thitilerdecha N. Bioactive compounds and antioxidant activities of red (Brown Red Jasmine) and black (Kam Leum Pua) native pigmented rice. *Int Food Res J*. 2016;23(1):410-414.
14. Sulaiman SF, Yusoff NAM, Eldeen IM, Seow EM, Sajak AB, Ooi KL. Correlation between total phenolic and mineral contents with antioxidant activity of eight Malaysian banana (*Musa* sp.). *J Food Compost Anal*. 2011;24(1):1-10.
15. Sutharut J, Sudarat J. Total anthocyanin content and antioxidant activity of germinated colored rice. *Int Food Res J*. 2012;19(1): 215-221.
16. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic*. 1965;16:144-158.
17. Itsarasook K, Ingkaninan K, Viyoch J. Artocarpin-enriched extract reverses collagen metabolism in UV-exposed fibroblasts. *Biologia*, 2014;69(7):943-951.
18. Vongsak B, Kongkiatpaiboon S, Jaisamut S, Konsap K. Comparison of active constituents, antioxidant capacity, and α -glucosidase inhibition in *Pluchea indica* leaf extracts at different maturity stages. *Food Biosci*. 2018;25:68-73.
19. Nedamani ER, Mahoonak AS, Ghorbani M, Kashaninejad M. Evaluation of antioxidant interactions in combined extracts of green tea (*Camellia sinensis*), rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and oak fruit (*Quercus branti*). *J Food Sci Technol*. 2015; 52(7):4565-4571.
20. Posoongnoen S, Thummawongsa T. Some chemical compositions and antioxidant properties of local rice in Nakhon Ratchasima province, Thailand. *Bu Sci J*. 2018;23(2):971-984. (in Thai).
21. Jain DP, Pancholi HS, Patel R. Synergistic antioxidant activity of green tea with some herbs. *J Adv Pharm Technol*. 2011;2(3):177–183.
22. Xu X, Li F, Zhang X, Li P, Zhang X, Wu Z, Li D. In vitro synergistic antioxidant activity and identification of antioxidant components from *Astragalus membranaceus* and *Paeonia lactiflora*. *Plos One*, 2014;9(5):e96780. doi: 10.1371/journal.pone.0096780.