

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ระยะเฝ้า

Bioactive Compounds and Antioxidant Activity of Glutinous Rice RD 6 in Dough Stage

วิภาวดี พันธุ์หนองหว้า* อธิฐาน ฉัตรเงิน วิลาศิณี สีดามา วุฒิพงษ์ หาญประโคน อัญชลี จันทะวา

และ อัญวีร์ณ วชิระไชยกัมพล

Wipavadee Punnonngwa* Atitan Chatngern Wilasinee Seedama Wutipong Hanprakhon Anchalee Jantawa

and Anyawee Watchirachaikompol

สาขาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสุรินทร์

Department of Agro-Industry, Faculty of Agriculture and Technology, Rajamangala University of Technology Isan

Surin Campus

*E-mail: punnonngwa05@gmail.com

Received: Aug 24, 2022

Revised: Nov 10, 2022

Accepted: Jan 03, 2023

บทคัดย่อ

ข้าวระยะเฝ้าเป็นข้าวที่ยังไม่แก่เต็มที่ แต่อุดมไปด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ระยะเฝ้า การศึกษาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใช้วิธี high performance liquid chromatography (HPLC) และ ultra performance liquid chromatography (UPLC) ส่วนการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใช้วิธี 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate) assay (ABTS assay), ferric reducing antioxidant power assay (FRAP assay) และ thiobarbituric acid reactive substances assay (TBARS assay) จากการศึกษาด้วยวิธี HPLC พบว่าข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ระยะเฝ้า มี ไนอะซิน ไพริดอกซิน ไทอะมิน แอลฟาโทโคฟีรอล และแกมมาโอไรซานอล เท่ากับ 14.33 ± 0.02 , 36.18 ± 0.14 , 11.47 ± 0.02 , 274.27 ± 4.39 และ 259.59 ± 4.41 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ จากการใช่วิธี UPLC ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก พบว่าข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ระยะเฝ้ามีสารประกอบฟีนอลิกหลายชนิด โดยกรดซาลิไซลิกเป็นสารประกอบฟีนอลิกที่พบมากที่สุด เท่ากับ 122.81 ± 5.20 ไมโครกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ระยะเฝ้าด้วยวิธี ABTS assay, FRAP assay และ TBARS assay พบว่ามีค่าเท่ากับ ร้อยละ 92.18 ± 0.08 , ร้อยละ 71.25 ± 1.20 และ ร้อยละ 51.07 ± 1.21 ตามลำดับ งานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่าข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ระยะเฝ้าประกอบด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

คำสำคัญ: ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ระยะเฝ้า สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

Abstract

Rice in the dough stage is rice that is not yet fully mature but rich in bioactive compounds. The objective of this research was to study the content of bioactive compounds and antioxidant activity of glutinous rice RD 6 in dough stage. To study the content of bioactive compounds, high performance liquid chromatography (HPLC) and ultra performance liquid chromatography (UPLC) were used. To study antioxidant activity, 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate) assay (ABTS assay), ferric reducing antioxidant power assay (FRAP assay) and thiobarbituric acid reactive substances assay (TBARS assay) were used. By using HPLC, it was found that glutinous rice RD 6 in dough stage contained niacin, pyridoxine, thiamine, α -tocopherol and γ -oryzanol with the amount of 14.33 ± 0.02 , 36.18 ± 0.14 , 11.47 ± 0.02 , 274.27 ± 4.39 and 259.59 ± 4.41 mg/100 g dry weight, respectively. By using UPLC to study the content of phenolic compounds, it was found that glutinous rice RD 6 in dough stage

contained a variety of phenolic compounds. Sinapic acid was the most abundant phenolic compound with the amount of 122.81 ± 5.20 $\mu\text{g/g}$ dry weight. Antioxidant activity of glutinous rice RD 6 in dough stage studied by ABTS assay, FRAP assay and TBARS assay were $92.18 \pm 0.08\%$, $71.25 \pm 1.20\%$ and $51.07 \pm 1.21\%$, respectively. This research indicated that glutinous rice RD 6 in dough stage contained various bioactive compounds and exhibited antioxidant activity.

Keywords: Glutinous rice RD 6, Dough stage, Bioactive compounds, Antioxidant activity

1. บทนำ

ข้าวเป็นพืชส่งออกอันดับ 1 ของประเทศไทย สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทยรายงานว่าในปี พ.ศ. 2564 ประเทศไทยส่งข้าวออกปริมาณ 6.11 ล้านตัน ซึ่งจัดเป็นลำดับที่ 3 ของโลกรองจากอินเดีย และเวียดนามที่ส่งข้าวออกปริมาณ 19.55 และ 6.24 ล้านตัน ตามลำดับ [1] ข้าวเป็นอาหารที่นิยมรับประทานเป็นอาหารหลักของคนเอเชีย เช่น ไทย ญี่ปุ่น พม่า ฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย อินเดีย จีน เป็นต้น ถือเป็นอาหารหลักของคนเอเชีย ข้าวเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Oryza sativa* อยู่ในวงศ์ (Family) Gramineae ข้าวเอเชียแบ่งเป็น 3 ชนิดย่อย (Subspecies) ได้แก่ japonica, indica และ javanica โดยข้าวไทยจัดอยู่ในชนิดย่อย indica (*Oryza sativa* subsp. indica)

ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 เป็นพันธุ์ข้าวเหนียวหอม ที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์จากข้าวเจ้าพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 โดยวิธีการฉายรังสีแกมมาด้วยปริมาณรังสีเท่ากับ 20 Krad ในปี พ.ศ. 2508 ที่สำนักงานพลังงานปรมาณูเพื่อสันติแห่งประเทศไทย หลังจากการคัดเลือกพันธุ์ และทดลองปลูกพบว่า สายพันธุ์ KDML 105'65-G3U-68-254 (ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ข้าวเหนียวที่ให้ผลผลิตเฉลี่ยสูงสุด มีคุณสมบัติทนแล้งได้ดี เมื่อนำไปหุง ข้าวที่ได้มีความนุ่ม และกลิ่นหอม กรมวิชาการเกษตรจึงพิจารณาให้เป็นพันธุ์รับรอง และแนะนำให้เกษตรกรปลูก เมื่อวันที่ 4 พฤษภาคม 2520 [2]

ข้าวเป็นพืชที่มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด เช่น สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds), แอลฟาโทโคฟีรอล (α -Tocopherol), แกมมาออไรซานอล (γ -Oryzanol), กรดแกมมาอะมิโนบิวทีริก (γ -Aminobutyric acid, GABA) สารเหล่านี้มีคุณสมบัติหลายอย่างที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น ความสามารถในการต้าน หรือยับยั้งการสร้างอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity) ซึ่งได้แก่ Hydroxyl radical ($\text{OH}^\bullet$), Alkyl radical ($\text{L}^\bullet$), Alkoxy radical ($\text{LO}^\bullet$), Peroxy radical ($\text{LOO}^\bullet$), Nitric oxide ($\text{NO}^\bullet$) และ Superoxide radical ($\text{O}_2^\bullet$) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าข้าวมีสารที่สามารถป้องกันต่อต้าน

และยับยั้งโรคบางชนิด เช่น โรคหลอดเลือดตีบตัน โรคหัวใจ โรคความดันโลหิต ต่อต้านการอักเสบ ตลอดจนโรคมะเร็ง [3]-[9]

ระยะการพัฒนาของเมล็ดข้าว แบ่งเป็น 3 ระยะ คือ ระยะน้ำนม (Milky stage) ระยะเฒ่า (Dough stage) และระยะแก่เต็มที่ (Mature stage) เมล็ดข้าวในระยะน้ำนมภายในเมล็ดข้าวเป็นของเหลวสีขาวคล้ายน้ำนม เมล็ดข้าวในระยะเฒ่า ภายในเมล็ดข้าวเริ่มมีเนื้อแข็ง ไม่อ่อนนุ่มเกินไป เมล็ดข้าวมีสีเขียวอมน้ำตาล ส่วนเมล็ดข้าวในระยะแก่เต็มที่ภายในเมล็ดข้าวมีการสะสมแป้งมาก เมล็ดข้าวมีความแข็งและพร้อมที่จะเก็บเกี่ยว ข้าวแต่ละพันธุ์มีช่วงเวลาในการเข้าสู่ระยะต่าง ๆ ของระยะการพัฒนามีเมล็ดข้าวที่แตกต่างกันสำหรับข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ระยะเฒ่าจะใช้เวลาประมาณ 15-21 วันหลังดอกบานและผสมเกสรแล้ว ด้วยเหตุที่ข้าวระยะเฒ่าอุดมไปด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อผู้บริโภค [10] จึงมีการส่งเสริมการผลิตข้าวระยะเฒ่าเชิงพาณิชย์ หรือการนำข้าวระยะเฒ่าไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์เชิงพาณิชย์หลากหลายชนิด เพื่อสร้างมูลค่าเพิ่มให้แก่ข้าว

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ระยะเฒ่า เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญสำหรับการต่อยอดเพื่อเพิ่มมูลค่าเชิงพาณิชย์ของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ระยะเฒ่าต่อไป

2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

2.1. การเตรียมตัวอย่างข้าวเหนียว

ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ระยะเฒ่า (Glutinous rice RD 6 in dough stage) ที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นข้าวที่มีอายุ 15-18 วัน หลังออกดอก เมล็ดมีสีเขียว เอนโดสเปิร์ม (Endosperm) มีลักษณะแข็ง เปลือกหุ้มเมล็ดมีสีเขียว นำเมล็ดข้าวไปคั่วให้สุกแล้วนำไปตำด้วยครกเพื่อแยกเอาเปลือกออก จากนั้นอบแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบ Hot air oven ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เวลา 4 ชั่วโมง แล้วนำไปสีข้าวเอาเปลือกออก บดให้ละเอียด ร่อนด้วยตะแกรงขนาด 80 เมช (Mesh) เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ไว้สำหรับการทดลอง

แป้งข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ระยะเმაที่เตรียมได้มีความชื้นร้อยละ 10.73 ± 0.12 เถ้าร้อยละ 1.0 ± 0.03 ไขมันร้อยละ 2.03 ± 0.05 โปรตีนร้อยละ 11.4 ± 0.56 เส้นใยร้อยละ 1.00 ± 0.03 และคาร์โบไฮเดรต (Carbohydrates; CHO) ร้อยละ 73.39 ± 1.57 (Figure 1) (ตรวจสอบด้วยวิธีการมาตรฐานของ AOAC [11])

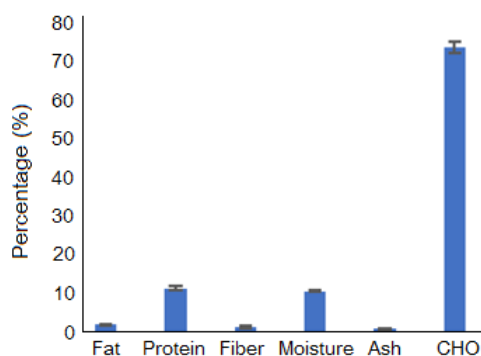


Figure 1 Proximate composition of ground glutinous rice RD 6 in dough stage

2.2. การวิเคราะห์ปริมาณสารในกลุ่มวิตามินบีด้วยวิธี HPLC

การวิเคราะห์ปริมาณสารในกลุ่มวิตามินบี ซึ่งได้แก่ ไทอะมีน (Thiamine) ไนอะซิน (Niacin) และไพริดอกซิน (Pyridoxine) ด้วยวิธี HPLC มีขั้นตอน ดังนี้ ชั่งตัวอย่างข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ระยะเมา 10 กรัม เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องโฮโมจีไนเซอร์ (Homogenizer) เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำมาเขย่าด้วยเครื่องอัลตราโซนิก (Ultrasonic bath) เป็นเวลา 20 นาที นำตัวอย่างที่ได้มากรองด้วยกระดาษเบอร์ 1 และเบอร์ 4 นำเฉพาะส่วนใสไประเหยให้แห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แล้วละลายกลับด้วยน้ำขจัดไอออน (Deionized water) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร และกรองด้วยแผ่นกรองสารชนิดไนลอน (Nylon membrane filter) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมโครเมตร นำสารที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณไทอะมีน ไนอะซิน และไพริดอกซิน ด้วยวิธี HPLC โดยใช้คอลัมน์วิเคราะห์ยี่ห้อ Shimadzu ชนิด Inertsil ODS (C18) ขนาดของคอลัมน์เท่ากับ 150 มิลลิเมตร x 4.5 มิลลิเมตร Particle size เท่ากับ 4 ไมโครเมตร ใช้เฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ประกอบด้วยอะซิโตนไนไตรล์ (Acetonitrile, ACN) และสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟต (Potassium phosphate, KH_2PO_4) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (Molar)

pH 6.5 ทำการเปลี่ยนอัตราส่วนของ ACN : KH_2PO_4 ตลอดการวิเคราะห์ โดยที่เวลาเริ่มต้นให้อัตราส่วนของ ACN : KH_2PO_4 เท่ากับ 90 : 10 เป็นเวลา 10 นาที อัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที จากนั้นให้อัตราส่วนของ ACN : KH_2PO_4 เท่ากับ 100 : 0 อัตราการไหลเท่ากับ 0.9 มิลลิลิตรต่อนาที จนกระทั่งเวลา 25 นาที ฉีดสารตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องตรวจวัดสัญญาณแบบยูวี ที่ความยาวคลื่น 325 นาโนเมตร (UV detector, HPLC, SPD-20A, Shimadzu, Japan) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

2.3. การวิเคราะห์ปริมาณแอลฟาโทโคฟีรอลและแกมมาโอไรซานอลด้วยวิธี HPLC

การวิเคราะห์ปริมาณแอลฟาโทโคฟีรอล (α -Tocopherol) และแกมมาโอไรซานอล (γ -Oryzanol) ด้วยวิธี HPLC มีขั้นตอน ดังนี้ นำตัวอย่างข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ระยะเมา 10 กรัม มาเติมด้วยสารผสมระหว่างไอโซโพรพานอล (Isopropanol) และไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane) ที่มีอัตราส่วนเท่ากับ 2 : 1 ปริมาตร 60 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องโฮโมจีไนเซอร์ (Homogenizer) เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำมาเขย่าด้วยเครื่องอัลตราโซนิก (Ultrasonic bath) เป็นเวลา 20 นาที นำตัวอย่างที่ได้มากรองด้วยกระดาษเบอร์ 1 และเบอร์ 4 นำเฉพาะส่วนใสไประเหยให้แห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แล้วละลายกลับด้วยสารผสมระหว่างไอโซโพรพานอล และไดคลอโรมีเทน ที่มีอัตราส่วนเท่ากับ 2 : 1 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร และกรองด้วยแผ่นกรองสารชนิดไนลอน (Nylon membrane filter) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมโครเมตร นำสารที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณแอลฟาโทโคฟีรอล และแกมมาโอไรซานอล ด้วยวิธี HPLC โดยใช้คอลัมน์วิเคราะห์ยี่ห้อ Shimadzu ชนิด Inertsil NH_2 ขนาดของคอลัมน์เท่ากับ 220 มิลลิเมตร x 4.6 มิลลิเมตร Particle size เท่ากับ 5 ไมโครเมตร ใช้เฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ประกอบด้วย เมทานอล (Methanol) และน้ำ ทำการเปลี่ยนอัตราส่วนของเมทานอลและน้ำตลอดการวิเคราะห์ โดยที่เวลาเริ่มต้นให้อัตราส่วนของ เมทานอล : น้ำ เท่ากับ 90 : 10 เป็นเวลา 10 นาที อัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที จากนั้นให้อัตราส่วนของ เมทานอล : น้ำ เท่ากับ 100 : 0 อัตราการไหลเท่ากับ 0.9 มิลลิลิตรต่อนาที จนกระทั่งเวลา 25 นาที ฉีดสารตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร วัดค่าการ

ดูดกลืนแสงด้วยเครื่องตรวจวัดสัญญาณแบบยูวี ที่ความยาวคลื่น 325 นาโนเมตร (UV detector, HPLC, SPD-20A, Shimadzu, Japan) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

2.4. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกด้วยวิธี UPLC

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกด้วยวิธี UPLC ใช้เครื่องรุ่น Acquity™ Ultra Performance Liquid Chromatography ที่มีตัวตรวจวัดสัญญาณแบบ Photodiode array (Waters Corporation, USA) มีขั้นตอนการดำเนินการดังนี้ นำตัวอย่างข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ระยะเม่า 10 กรัม มาเติมด้วยเมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 (70% methanol) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำมาเขย่าด้วยเครื่องอัลตราโซนิก (Ultrasonic bath) เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบเท่ากับ 10,000 xg เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนที่เป็นของเหลวไประเหยให้แห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แล้วละลายกลับด้วยเมทานอลปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำสารที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกด้วยวิธี UPLC โดยใช้คอลัมน์สำหรับวิเคราะห์ชนิด C18 ยี่ห้อ Waters Corporation ขนาดของคอลัมน์เท่ากับ 150 มิลลิเมตร $\times$ 4.6 มิลลิเมตร Particle size เท่ากับ 5 ไมโครเมตร ก่อนทำการวิเคราะห์กรองด้วยเยื่อกรองขนาดรูพรุน 0.2 ไมโครเมตร ฉีดตัวอย่างที่ 10 ไมโครลิตร ด้วยระบบฉีดตัวอย่างแบบอัตโนมัติ ให้เฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ที่เป็นสาร A คือกรดอะซิติก (Acetic acid) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และสาร B คืออะซิโตไนไตรล์ (Acetonitrile) มีอัตราการไหลเท่ากับ 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที เริ่มต้นให้สาร B ที่ความเข้มข้นร้อยละ 7 จากนั้นเพิ่มความเข้มข้นของสาร B เป็นร้อยละ 15 (ที่เวลา 0-10 นาที) เพิ่มความเข้มข้นของสาร B เป็นร้อยละ 35 (ที่เวลา 10-15 นาที) และเพิ่มความเข้มข้นของสาร B เป็นร้อยละ 55 (ที่เวลา 15-20 นาที) หลังจากนั้นเพิ่มความเข้มข้นของสาร B เป็นร้อยละ 100 (ที่เวลา 20-25 นาที) ปั่นทิ้งไว้ 15 นาทีเพื่อทำการล้างคอลัมน์ ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ใช้การทดสอบชนิดของสารฟีนอลิกด้วยสารมาตรฐาน โดยทดสอบแบบใช้สารมาตรฐานภายนอก (External standard) และยืนยันชนิดของกรดฟีนอลิกด้วยการเติมสารมาตรฐานลงไปในตัวอย่ (Spike test) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

2.5. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay มีขั้นตอน ดังนี้ นำตัวอย่างข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ระยะเม่า 10 กรัม มาเติมด้วยเมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 (70% Methanol) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องโฮโมจีไนเซอร์ (Homogenizer) เป็นเวลา 10 นาที นำตัวอย่างที่ได้มากรองด้วยกระดาษเบอร์ 1 เก็บของเหลวที่ได้จากการกรองไว้ใช้ในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (ในข้อ 2.5., 2.6. และ 2.7.) สารที่ใช้วิเคราะห์เตรียมโดยผสมสารละลาย ABTS ที่มีความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร กับสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต (Potassium persulfate) ที่มีความเข้มข้น 140 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 88 ไมโครลิตร การวิเคราะห์ทำโดยนำตัวอย่างข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ระยะเม่าที่เตรียมไว้ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มาผสมกับสารวิเคราะห์ที่เตรียมไว้ (ABTS) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ในการทดลองนี้ใช้เมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 เป็นชุดควบคุม และใช้ Trolox เป็นสารมาตรฐาน นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาคำนวณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยสมการต่อไปนี้
$$\frac{(A_c - A_s)/A_c}{A_s} \times 100$$
 เมื่อ A_c คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม และ A_s คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

2.6. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay มีขั้นตอน ดังนี้ เตรียมตัวอย่างข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ระยะเม่าเช่นเดียวกับที่กล่าวไว้ในหัวข้อ 2.5. ส่วนสารที่ใช้วิเคราะห์เตรียมโดยผสมสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ (Acetate buffer) ที่มีความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ pH 3.6 กับสารละลาย TPTZ (2,4,6-Tripyridyl-s-triazine) ที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) ที่มีความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ ในอัตราส่วน 10:1:1 การวิเคราะห์ทำโดยนำตัวอย่างข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ระยะเม่าที่เตรียมไว้ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร มาผสมกับสารวิเคราะห์ที่เตรียมไว้ ปริมาตร 4.75 มิลลิลิตร บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ใน

การทดลองนี้ใช้เมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 เป็นชุดควบคุม และใช้ Trolox เป็นสารมาตรฐาน นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาคำนวณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยสมการต่อไปนี้ $[(A_c - A_s)/A_c] \times 100$ เมื่อ A_c คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม และ A_s คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

2.7. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี TBARS assay

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี TBARS assay มีขั้นตอน ดังนี้ นำไข่แดงมาตีด้วยเครื่องโฮโมจีไนเซอร์ (Homogenizer) เพื่อตีไขมันในไข่แดงให้แตกตัว จากนั้นนำไข่แดงที่ได้ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร มาผสมกับตัวอย่างข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ระยะเฝ้า (ที่เตรียมตามข้อ 2.5.) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร น้ำกลั่นปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร และสารละลายเฟอร์ริกซัลเฟต ($FeSO_4$) ที่มีความเข้มข้น 0.07 โมลาร์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร บ่มเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมกรดอะซิติก (Acetic acid) ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 20 (pH 3.5) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และกรดไทโอบาร์บิทริก (Thiobarbituric acid) ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.8 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำให้เย็น แล้วเติมสารบิวทานอล (Butanol) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 xg เป็นเวลา 10 นาที นำเฉพาะส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 532 nm ในการทดลองนี้ใช้เมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 เป็นชุดควบคุม และใช้ Trolox เป็นสารมาตรฐาน นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาคำนวณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยสมการต่อไปนี้ $[(A_c - A_s)/A_c] \times 100$ เมื่อ A_c คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม และ A_s คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3. ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

3.1. การวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยวิธี HPLC

จากการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ระยะเฝ้าด้วยวิธี HPLC พบว่าแบ่งที่เตรียม

จากข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ระยะเฝ้ามีสารในกลุ่มวิตามินบี ดังนี้ โทอะมิน (หรือวิตามินบี 1) ไนอะซิน (หรือวิตามินบี 3) และไพรีดอกซีน (หรือวิตามินบี 6) ในปริมาณเท่ากับ 11.47 ± 0.02 , 14.33 ± 0.02 และ 36.18 ± 0.14 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (Table 1 and Figure 2A) นอกจากนี้ยังพบแอลฟาโทโคฟีรอล (หรือวิตามินอี) และแกมมาโอโรซานอล ในปริมาณเท่ากับ 274.27 ± 4.39 และ 259.59 ± 4.41 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (Table 2 and Figure 2B)

จากงานวิจัยที่ผ่านมา ซึ่งศึกษาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในข้าวขาวดอกมะลิ 105 ระยะเฝ้า พบว่าข้าวดังกล่าวมีปริมาณโทอะมินน้อยกว่า แต่มีปริมาณไนอะซินมากกว่า เมื่อเทียบกับข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ระยะเฝ้า ส่วนไพรีดอกซีน แอลฟาโทโคฟีรอล และแกมมาโอโรซานอลพบได้ในปริมาณใกล้เคียงกันในข้าวทั้งสองพันธุ์ [3]

3.2. การวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกด้วยวิธี UPLC

จากการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกในข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ระยะเฝ้าด้วยวิธี UPLC พบว่าแบ่งที่เตรียมจากข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ระยะเฝ้ามีสารประกอบฟีนอลิกหลายชนิด ได้แก่ กรดแกลลิก (Gallic acid), กรดโธแคตชินิก (proto-Catechuic acid), กรดไฮดรอกซีเบนโซอิก (Hydroxy-benzoic acid), กรดวานิลลิก (Vanillic acid), กรดไซริงิก (Syringic acid), กรดคูมาริก (p-Coumaric acid), กรดทรานส์เฟอรูลิก (trans-Ferulic acid), เควอร์ซีทิน (Quercetin) และกรดซินแนปิก (Sinapic acid) ซึ่งมีปริมาณแตกต่างกัน (Figure 3) โดยกรดซินแนปิกเป็นสารประกอบฟีนอลิกที่พบได้มากที่สุด เท่ากับ 122.81 ± 5.20 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง

ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลงานวิจัยที่เคยมีการรายงาน ที่ทำการศึกษาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกในข้าวไทยระยะเฝ้า ซึ่งพบว่าข้าวในระยะนี้มีทั้งสารประกอบฟีนอลิกอิสระ (Free form) และสารประกอบฟีนอลิกที่ติดแน่นที่ผนังเซลล์ของข้าว (Bound form) โดยชนิดของสารประกอบฟีนอลิกทั้งสองรูปแบบที่พบไม่แตกต่างจากสารประกอบฟีนอลิกที่พบในข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ระยะเฝ้าในการศึกษานี้ เพียงแต่ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดอาจแตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับพันธุ์ของข้าว [12], [13]

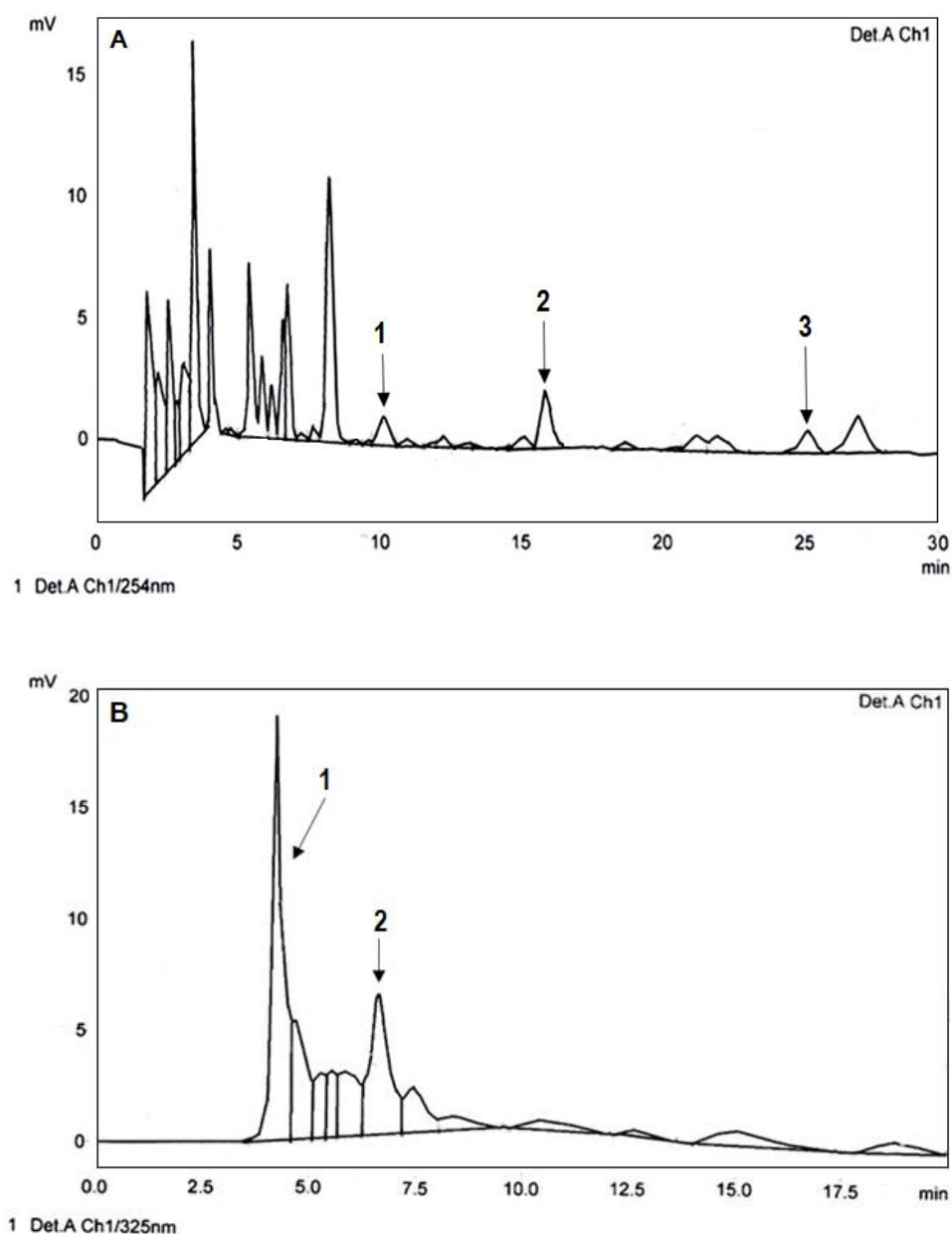


Figure 2 HPLC chromatograms obtained from the analysis of glutinous rice RD 6 in dough stage
(A) 1 = niacin, 2 = pyridoxine, 3 = thiamine; (B) 1 = α -tocopherol, 2 = γ -oryzanol

Table 1 Retention times, peak areas and concentrations of B group vitamins detected in glutinous rice RD 6 in dough stage as analyzed by HPLC

Peak	Substance	Retention time	Peak area	Concentration (mg/100 g dry weight)
1	niacin	10.589	4123 $\pm$ 110	14.33 $\pm$ 0.02
2	pyridoxine	16.258	14293 $\pm$ 506	36.18 $\pm$ 0.02
3	thiamine	25.698	3185 $\pm$ 136	11.47 $\pm$ 0.14

Table 2 Retention times, peak areas and concentrations of α -tocopherol and γ -oryzanol detected in glutinous rice RD 6 in dough stage as analyzed by HPLC

Peak	Substance	Retention time	Peak area	Concentration (mg/100 g dry weight)
1	α -tocopherol	4.063	25374 $\pm$ 536	274.27 $\pm$ 4.39
2	γ -oryzanol	6.583	23970 $\pm$ 727	259.59 $\pm$ 4.41

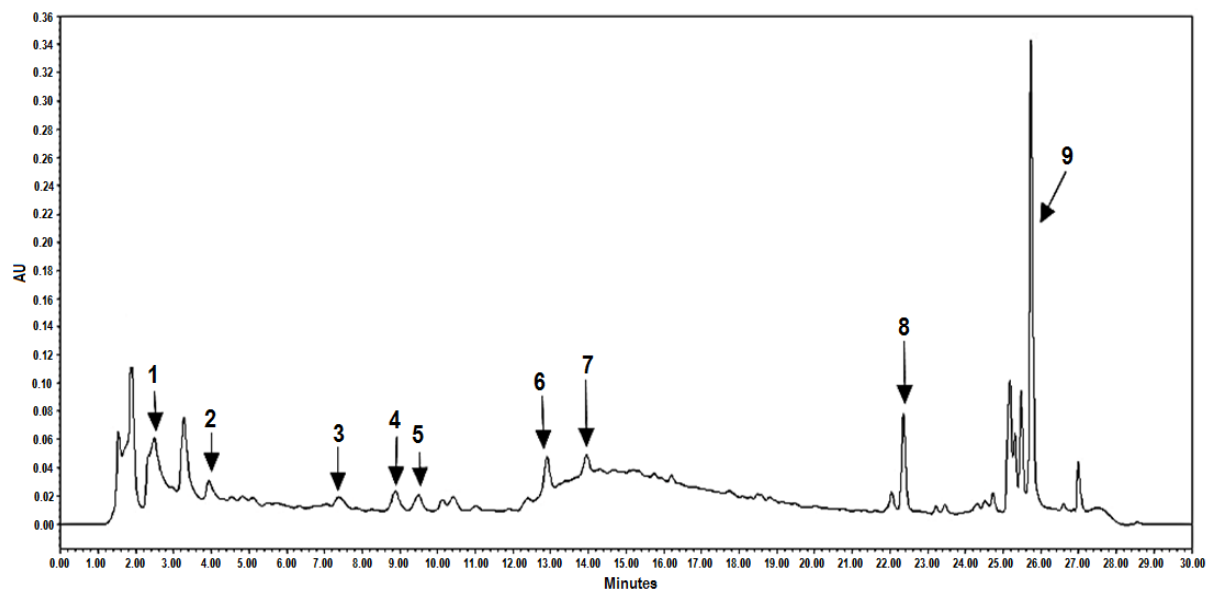


Figure 3 UPLC chromatogram obtained from the analysis of glutinous rice RD 6 in dough stage

1 = gallic acid, 2 = proto-catechuic acid, 3 = hydroxy-benzoic acid, 4 = vanillic acid, 5 = syringic acid, 6 = p-coumaric acid, 7 = trans-ferulic acid, 8 = quercetin, 9 = sinapic acid

3.3. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS, FRAP and TBARS assays

จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS, FRAP and TBARS assays พบว่าแป้งที่เตรียมจากข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ระยะเม้ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เท่ากับ ร้อยละ 92.18 $\pm$ 0.08, 71.25 $\pm$ 1.20 และ 51.07 $\pm$ 1.21 ตามลำดับ (Figure 4)

ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลงานวิจัยที่เคยมีการรายงาน ซึ่งทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในข้าวไทยระยะเม้า โดยใช้วิธี DPPH assay ซึ่งพบว่าข้าวในระยะนี้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่เป็นผลมาจากสารประกอบฟีนอลิกอิสระมีค่ามากกว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่เป็นผลมาจากสารประกอบฟีนอลิกที่ติดแน่นที่ผนังเซลล์ของ

ข้าว ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารประกอบฟีนอลิกที่อยู่ในสองรูปแบบมีชนิดและปริมาณที่แตกต่างกัน [13] จากการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในงานวิจัยนี้ด้วยวิธี HPLC และ UPLC เป็นไปได้ว่าสารที่มีผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ระยะเม้าอาจเป็นสารประกอบฟีนอลิกแอลฟาโทโคฟีรอล และแกมมาโอไรซานอล เนื่องจากสารเหล่านี้มีรายงานว่าสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ [14]-[16]

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสารเหล่านี้สามารถเปลี่ยน ABTS จากรูปที่เป็นอนุมูลอิสระให้ไปอยู่ในรูปที่ไม่เป็นอนุมูลอิสระได้ โดยการไฮโดรเจนอะตอมและอิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระ ABTS และสามารถเปลี่ยน FRAP จากรูปที่เป็นอนุมูลอิสระให้ไปอยู่ในรูปที่ไม่เป็นอนุมูลอิสระได้ โดยการอิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระ FRAP [17]

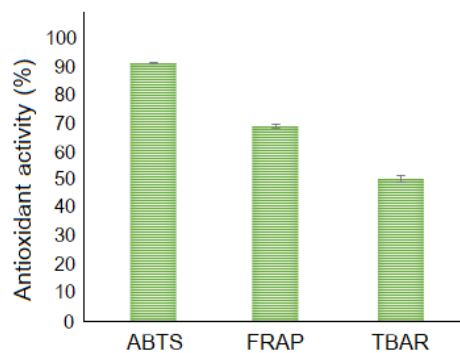


Figure 4 Antioxidant activity of glutinous rice RD 6 in dough stage as studied by ABTS, FRAP and TBARS assays

4. บทสรุป

การศึกษานี้พบว่าข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ระยะเม้ามีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลายชนิดทั้งสารที่อยู่ในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก และวิตามินต่าง ๆ โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญที่พบได้ในข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ระยะเม้า ได้แก่ กรดแกลลิก กรดโพลีฟีนอลิก กรดไฮดรอกซิลเบนโซอิก กรดวานิลลิก กรดไซรินจิก กรดคูมาริก กรดทรานส์เฟอร์ูลิก เควอร์ซิทิน กรดซิแนปิก ไทอะมิน (หรือวิตามินบี 1) ไนอะซิน (หรือวิตามินบี 3) ไพรีดอกซีน (หรือวิตามินบี 6) แอลฟา โทโคฟีรอล (หรือวิตามินอี) และแกมมาโอไรซานอล ด้วยเหตุที่สารเหล่านี้มีความสามารถในการเปลี่ยนอนุมูลอิสระให้กลายเป็นสารที่ไม่อยู่ในรูปของอนุมูลอิสระ (อาจจะโดยการให้อิเล็กตรอน และ/หรือให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูลอิสระ) จึงทำให้ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ระยะเม้ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้จะมีประโยชน์ต่อการต่อยอดเพื่อเพิ่มมูลค่าเชิงพาณิชย์ของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ระยะเม้าต่อไป

5. References

[1] Bangkokbiznews, 2022. **Thai Rice Exports in 2021, Losing to India and Vietnam.** <https://www.bangkokbiznews.com/business/985817>. Accessed 15 July 2022.

[2] Jansamood, C. and et al. 2017. Soil properties for glutinous rice RD 6 between Khao-wong and Namon district Kalasin province. **Chalermkanchana Academic Journal.** 4(2): 15-20. (in Thai)

[3] Punnonnongwa, W. and et al. 2022. Bioactive compounds and antioxidant activities of Khao Khaow Dawk Mali 105. **Agriculture and Technology Journal.** 3(1): 89-102. (in Thai)

[4] Liu, R. and et al. 2021. Antioxidant interaction of α -tocopherol, γ -oryzanol and phytosterol in rice bran oil. **Food Chemistry.** 343: 128431.

[5] Kim, S.K. and et al. 2019. Use of rice bran for preparation of GABA (γ -aminobutyric acid)-rich sourdough. **Food Science and Technology Research.** 25(3): 399-404.

[6] Morarach, A. and Hemathulin, S. 2022. Development of healthy fermented mushroom products with colored rice. **Journal of Science and Technology, Ubon Ratchathani University.** 24(10): 40-53. (in Thai)

[7] Saji, N. and et al. 2019. Rice bran derived bioactive compounds modulate risk factors of cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus: An updated review. **Nutrients.** 11(11): 2736.

[8] Yu, Y. and et al. 2019. The anti-cancer activity and potential clinical application of rice bran extracts and fermentation products. **RSC Advances.** 9, 18060-18069.

[9] Tan, X.W. and et al. 2020. Antioxidative attributes of rice bran extracts in ameliorative effects of atherosclerosis-associated risk factors. **Heliyon.** 6(12): e05743.

[10] Teravecharoenchai, J., Chalermchaiwat, P. and Thuwapanichayanan, R. 2021. Principal component analysis application on nutritional, bioactive compound and antioxidant activities of pigmented dough grain. **Chiang Mai University Journal of Natural Sciences.** 20(2): e2021036.

[11] Association Official Analytical Chemists (AOAC). 2000. **Official Method of Analysis of AOAC International.** 17th edition. Gaithersburg, MD: AOAC International.

- [12] Butsat, S., Weerapreeyakul, N. and Siriamornpun, S. 2009. Changes in phenolic acids and antioxidant activity in Thai Rice husk at five growth stages during grain development. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 57(11): 4566–4571.
- [13] Shao, Y. and et al. 2014. Phenolic acids, anthocyanins, and antioxidant capacity in rice (*Oryza sativa* L.) grains at four stages of development after flowering. **Food Chemistry**. 145: 90-96.
- [14] Galli, F. and et al. 2022. Vitamin E (alpha-tocopherol) metabolism and nutrition in chronic kidney disease. **Antioxidants**. 11(5): 989.
- [15] Minatel, I.O. and et al. 2016. Antioxidant activity of γ -oryzanol: A complex network of interactions. **International Journal of Molecular Sciences**. 17(8): 1107.
- [16] Pang, Y. and et al. 2018. Bound phenolic compounds and antioxidant properties of whole grain and bran of white, red and black rice. **Food Chemistry**. 240: 212-221.
- [17] Punnongwa, W. and et al. 2022. Application of mild-subcritical alkaline water extraction: optimum condition for phenolic antioxidant extracted from coldpressed defatted KDML 105 rice bran and its phenolic profile. **Food Research**. 6(1): 120-131.