



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 10

The 10th STOU National Research Conference

ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดข้าวหอมมะลิแดง

Antioxidant activities of red jasmine rice extracts

จิรัชญา กลิกรรมไพบูลย์ (Jiratchaya kasikumpaiboon)¹ นฤมล บุญมัน (Narumon Boonman)²

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากข้าวหอมมะลิแดง โดยนำข้าวบดละเอียดมาสกัดด้วยเฮกเซน แล้วสกัดข้าวส่วนที่เหลือด้วยเอทานอล 80% หรือเมทานอล 80% จากนั้นทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay, ABTS assay, FRAP assay และตรวจวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu assay พบว่าการสกัดแต่ละวิธีได้ปริมาณสารสกัดใกล้เคียงกัน โดยมีค่าร้อยละของสารสกัดที่ได้อยู่ที่ 4.00 - 5.68 % ซึ่งสารสกัดข้าวหอมมะลิแดงด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด โดยวิธี DPPH assay และ ABTS assay มีค่า IC₅₀ เท่ากับ $521.40 \pm 0.87 \mu\text{g/ml}$ และ $416.93 \pm 7.16 \mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ และวิธี FRAP assay มีค่าการต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ $6,888 \pm 543.64 \text{ mM TE/g extract}$ แต่ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดแต่ละชนิดไม่มีความแตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากข้าวหอมมะลิแดงที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ แต่ไม่สัมพันธ์กับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ดังนั้นจึงควรศึกษาหาสารเคมีสำคัญและกลไกการออกฤทธิ์เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากข้าวหอมมะลิแดงเพื่อสุขภาพต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ ข้าวหอมมะลิแดง สารสกัด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

¹ นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา

hong.jiratchayaaa@gmail.com

² อาจารย์ ดร. สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา narumon.bo@ssru.ac.th



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 10

The 10th STOU National Research Conference

Abstract

The objective of this research was to determine the antioxidant activities of red jasmine rice extracts. The ground rice was extracted with hexane, then further extracted the remaining rice with 80% ethanol or 80% methanol. The extracts were evaluated the antioxidant activities by DPPH, ABTS and FRAP assay and measured the amount of total phenolic contents by Folin-Ciocalteu assay. Each extraction method obtained the same amount of extract at 4.00 - 5.68 % yield. The ethanol extract exhibited the greatest antioxidant activities, by DPPH assay and ABTS assay, the IC_{50} values were 521.40 ± 0.87 $\mu\text{g/ml}$ and 416.93 ± 7.16 $\mu\text{g/ml}$, respectively and the FRAP assay had an antioxidant value of $6,888 \pm 543.64$ mM TE/g extract. However, the amount of total phenolic compounds in each extract was not statistically significant difference. The results suggested that the ethanol extract of red jasmine rice had the antioxidant activities with independent on the total phenolic compounds. Therefore, the further study on the chemical constituent and mechanism of action was required to develop the products from red jasmine rice for health in the future.

Keywords: Red jasmine rice, Extract, Antioxidant activities



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 10

The 10th STOU National Research Conference

บทนำ

อนุมูลอิสระ (Free radicals) เป็นสารที่มีอิเล็กตรอนอิสระ (Unpaired electron) อยู่ในวงนอกของอะตอมหรือโมเลกุล ในการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดที่ใช้ออกซิเจนจะมีอนุมูลอิสระของออกซิเจน เช่น อนุมูลไฮโดรเปอร์ออกซิล (Hydroperoxyl radical, $\text{HO}_2^{\cdot}$) ซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (Superoxide anion, $\text{O}_2^{\cdot-}$) และอนุมูลไฮดรอกซิล (Hydroxyl radical, $\text{OH}^{\cdot}$) เป็นต้น อนุมูลอิสระส่วนใหญ่ไม่คงตัวและมีความไวต่อปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลต่างๆ ที่อยู่รอบข้างในทันทีที่ถูกสร้างขึ้น ส่งผลให้เกิดผลเสียแก่องค์ประกอบต่างๆ ของเซลล์ภายในร่างกาย เช่น การทำลายโครงสร้างดีเอ็นเอ (DNA) การสร้างพันธะโควาเลนต์ (Covalent bond) กับโปรตีนหรือเอนไซม์บางชนิด จนทำให้โปรตีนหรือเอนไซม์บางชนิดนั้นทำงานผิดปกติ หรือการเปลี่ยนสภาพของโปรตีนตลอดจนไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์ (วัลยา เนาวรัตน์วัฒนา และพัชรี บุญศิริ, 2542) นอกจากนี้ปัจจัยจากสิ่งแวดล้อมภายนอก เช่น รังสียูวี (UV-ray) ควันจากท่อไอเสีย และควันบุหรี่ เป็นต้น ยังสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการก่อตัวของอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้นด้วย โดยสารเหล่านี้ส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์ในร่างกาย ซึ่งหากเกิดการสะสมมากเกินไปอาจนำไปสู่ความผิดปกติหรือพยาธิสภาพหลายอย่าง เช่น โรคมะเร็ง โรคหัวใจ โรคหลอดเลือด โรคสมอง โรคอัลไซเมอร์ ต้อกระจก และการแก่ก่อนวัย (Poprac *et al.*, 2017)

สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) คือสารที่ช่วยต่อต้านหรือกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation) ภายในร่างกาย บทบาทหน้าที่หลักของสารต้านอนุมูลอิสระคือ 1) ลดการสร้างอนุมูลอิสระในร่างกาย โดยเข้าจับกับตัวรับที่สามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือเข้าจับ (Chelate) กับโลหะ เพื่อยับยั้งการสร้างอนุมูลอิสระ และ 2) ลดอันตรายที่เกิดจากอนุมูลอิสระโดยดักจับ (Scavenge) อนุมูลอิสระโดยตรง (Nimse and Pal, 2015) ภายในร่างกายมีกลไกการต้านอนุมูลอิสระโดยใช้เอนไซม์ เช่น ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (Superoxide dismutase) กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (Glutathione peroxidase) และคะตะเลส (Catalase) เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถได้รับสารต้านอนุมูลอิสระจากอาหาร เช่น เบต้าแคโรทีน (β -carotene) วิตามินซี (Vitamin C) วิตามินอี (Vitamin E) รวมทั้งสารประกอบกลุ่มโพลีฟีนอล (Polyphenols) ต่างๆ ซึ่งมีรายงานว่าพบมากในพืช ผัก และผลไม้ทั่วไป จัดเป็นสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติที่ดีที่สุดอีกกลุ่มหนึ่ง (Sies, 1991; Wanna, 2019)

ข้าวหอมมะลิแดง (Red jasmine rice) เป็นข้าวเจ้าพันธุ์หนึ่งของประเทศไทย ปลูกได้ปีละ 1 ครั้ง เมล็ดข้าวมีรูปร่างเรียวยาว เป็นข้าวกล้องซึ่งผ่านขั้นตอนการสีเพียงครั้งเดียว โดยที่จมูกข้าวและเยื่อหุ้มเมล็ดข้าวยังคงอยู่ซึ่งเป็นส่วนที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง เยื่อหุ้มเมล็ดของข้าวหอมมะลิแดงมีสีน้ำตาลแดงเข้ม เมื่อหุงสุกเนื้อข้าว่วนให้รสสัมผัสคล้ายข้าวหอมมะลิ แต่คนไทยมักไม่ค่อยนิยมบริโภค อาจเพราะทัศนคติที่ว่าเป็นข้าวที่เลี้ยงผู้ต้องหาในเรือนจำ ทั้งที่ความจริงแล้วข้าวหอมมะลิแดงมีคุณสมบัติเด่นทางด้านโภชนาการ ได้แก่ อุดมด้วยธาตุเหล็กช่วยในการบำรุงเลือด มีดัชนีน้ำตาลต่ำกว่าข้าวทั่วไปค่อนข้างมาก ช่วยในการป้องกันและบรรเทาโรคเบาหวานได้ดี มีกลไกช่วยการขับถ่ายและดูดซับไขมัน นอกจากนี้ยังมีสารต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าข้าวธรรมดาดังถึง 31 เท่า ซึ่งช่วยลดอัตราการเกิดโรคมะเร็ง ลดอัตราเสี่ยงการเกิดโรคหลอดเลือดและโรคหัวใจรวมทั้งชะลอการเสื่อมของเซลล์ (สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว, 2017)



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 10

The 10th STOU National Research Conference

ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากข้าวหอมมะลิแดง จากบริษัท เกรซไปโอ จำกัด จังหวัดฉะเชิงเทรา ซึ่งเป็นข้าวปลูกแบบอินทรีย์และผ่านกรรมวิธีผลิตเป็นข้าวกล้องบรรจุถุงสุญญากาศ เพื่อเป็นแนวทางในการเพิ่มมูลค่าให้กับข้าวหอมมะลิแดง และส่งเสริมให้ประชาชนหันมาบริโภคข้าวหอมมะลิแดงกันมากขึ้น

วัตถุประสงค์

1. เพื่อเปรียบเทียบวิธีการสกัดสารจากข้าวหอมมะลิแดง
2. เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากข้าวหอมมะลิแดง

ระเบียบวิธีวิจัย

1. การเตรียมตัวอย่างและสกัดสารจากข้าวหอมมะลิแดง

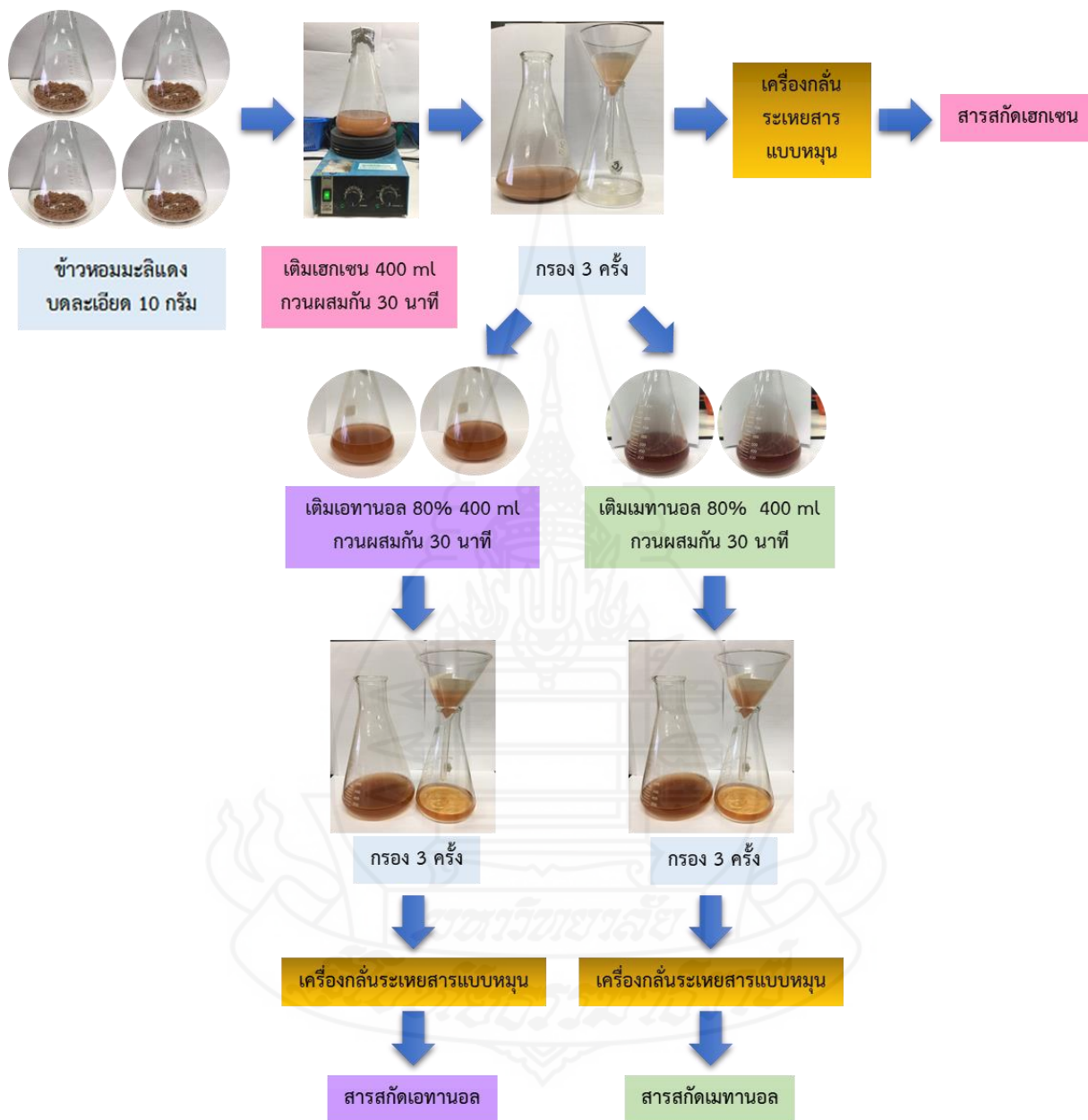
นำข้าวหอมมะลิแดงมาบดละเอียดและทำการร่อนผ่านตะแกรงที่มีรูขนาด 160 μm ทำการชั่งข้าวบดละเอียด 10 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 1 ลิตร จำนวน 4 ขวด เติมหอกเซนขวดละ 400 ml วางบนเครื่องกวนสารชนิดแม่เหล็ก กวนผสมกัน เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้รอให้ข้าวตกตะกอน กรองส่วนใสด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 3 ครั้ง ส่วนกากนำมาสกัดต่อโดยเติมเอทานอล 80% จำนวน 2 ขวดและเมทานอล 80% จำนวน 2 ขวด ขวดละ 400 ml กวนผสมกัน เป็นเวลา 30 นาที กรองส่วนใสเช่นเดียวกับการสกัดด้วยเฮกเซน ทำการระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุนที่อุณหภูมิ 50-55°C (ภาพที่ 1) จากนั้นระเหยตัวทำละลายออกให้หมดด้วยเครื่องปั๊มสุญญากาศ ชั่งน้ำหนักสารสกัด และคำนวณร้อยละของสารสกัดที่ได้ (% Yield) ดังนี้



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 10

The 10th STOU National Research Conference

ร้อยละของสารสกัดที่ได้ (% Yield) = (น้ำหนักสารสกัด/น้ำหนักข้าว) × 100



ภาพที่ 1 ขั้นตอนการสกัดสารจากข้าวหอมมะลิแดง

2. การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay

ดัดแปลงวิธีของ Kedare and Singh (2011) เตรียมสารสกัดตัวอย่างที่ความเข้มข้น 1,000, 500, 250, 125, 62.5 และ 31.25 µg/ml ปริมาตร 20 µl ผสมกับสารละลาย DPPH ปริมาตร 180 µl ใน 96-well plate ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 10

The 10th STOU National Research Conference

อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 nm ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (microplate reader) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหาค่าร้อยละของการยับยั้ง (% Inhibition) จากสมการ

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}} - \text{Blank})}{A_{\text{control}}} \times 100$$

โดย A_{control} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่ไม่เติมสารสกัด

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่เติมสารสกัด

Blank คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดในเอทานอลหรือเมทานอล

นำค่าร้อยละของการยับยั้งที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของการยับยั้งและความเข้มข้นของสารสกัด เพื่อคำนวณค่า IC_{50} คือค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของ DPPH ได้ 50%

3. การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay

ดัดแปลงวิธีของ Re *et al.* (1999) โดยทำการเตรียมสารละลาย ABTS ความเข้มข้น 7 mM แล้วเติมสารละลาย Potassium persulfate ที่ความเข้มข้น 2.45 mM ตั้งทิ้งไว้ในที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 12 - 16 ชั่วโมง ทำการเจือจางสารละลาย ABTS ด้วยเอทานอลหรือเมทานอล แบ่งตัวอย่างมาใส่ใน 96-well plate แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท ปรับความเข้มข้นของสารละลาย ABTS ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 1.10 ± 0.02 จากนั้นนำสารสกัดตัวอย่างที่ความเข้มข้น 1,000, 500, 250, 125, 62.5 และ 31.25 $\mu\text{g/ml}$ ปริมาตร 50 μl ผสมกับสารละลาย ABTS ที่ทำการเจือจางไว้ ปริมาตร 100 μl ใน 96-well plate ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหาค่าร้อยละของการยับยั้ง (% Inhibition) จากสมการ

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}} - \text{Blank})}{A_{\text{control}}} \times 100$$

โดย A_{control} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย ABTS ที่ไม่เติมสารสกัด

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย ABTS ที่เติมสารสกัด

Blank คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดในเอทานอลหรือเมทานอล



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 10

The 10th STOU National Research Conference

นำค่าร้อยละของการยับยั้งที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของการยับยั้งและความเข้มข้นของสารสกัด เพื่อคำนวณค่า IC_{50} คือค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของ ABTS ได้ 50%

4. การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay

ดัดแปลงวิธีของ Benzie and Strain (1996) โดยทำการเตรียม Acetate buffer 0.3 M (pH 3.6), TPTZ 1 mM ใน HCl 40 mM และสารละลาย $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 20 mM ในอัตราส่วน 10 : 1 : 1 โดยปริมาตรตามลำดับ ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำสารสกัดตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้น 500 $\mu g/ml$ ปริมาตร 60 μl ผสมกับสารละลาย FRAP reagent ปริมาตร 140 μl ใน 96-well plate ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท ทำการทดลอง 3 ซ้ำ คำนวณค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากสมการ

$$\text{Absorbance} = A - B - C$$

โดย A (sample) คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย FRAP reagent ที่เติมสารสกัด

B (blank) คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดใน Acetate buffer

C (control) คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย FRAP reagent ที่ไม่เติมสารสกัด

คำนวณหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย Trolox (Trolox) และรายงานผลเป็น Trolox equivalent (TE) ในหน่วย mM TE/g extract

5. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม โดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu assay

ดัดแปลงวิธีของ Marinova *et al.* (2005) โดยนำสารสกัดตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้น 500 $\mu g/ml$ ปริมาตร 20 μl ผสมกับสารละลาย 10% Folin-Ciocalteu Reagent 100 μl และ 7.5% Na_2CO_3 ปริมาตร 80 μl ใน 96-well plate ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท ทำการทดลอง 3 ซ้ำ คำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัด โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก (Gallic acid) รายงานผลเป็นค่า Gallic acid equivalent (GAE) ในหน่วย mg GAE/g extract

6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยวิธี One-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทีละคู่ด้วยวิธี Tukey's Test ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 24 กำหนดให้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อ $p < 0.05$



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 10

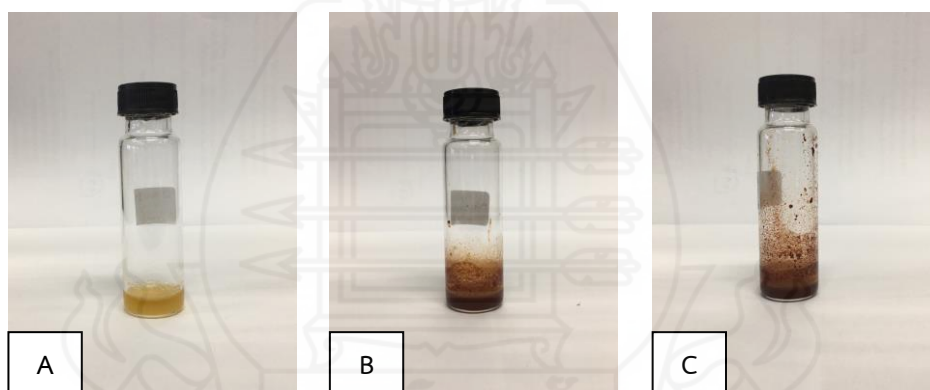
The 10th STOU National Research Conference

ผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้นำข้าวหอมมะลิแดงมาบดละเอียด แล้วสกัดสารด้วยเฮกเซน จากนั้นสกัดต่อด้วยเอทานอล 80% หรือเมทานอล 80% นำส่วนใสที่ได้จากการสกัดมาทำการระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน ทำการชั่งน้ำหนักของสารสกัดและคำนวณร้อยละของสารสกัดที่ได้ พบว่าการสกัดแต่ละวิธีได้ปริมาณสารสกัดใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 1 และภาพที่ 2)

ตารางที่ 1 ลักษณะของสารสกัด น้ำหนัก และร้อยละของสารสกัดที่ได้ (% Yield) จากข้าวหอมมะลิแดง

ตัวทำละลาย	ลักษณะของสารสกัด	น้ำหนักข้าว (g)	น้ำหนักสารสกัด (g)	ร้อยละของสารสกัดที่ได้ (%)
เฮกเซน	น้ำมันเหลวสีเหลืองขุ่น	40.00	2.27	5.68
เอทานอล	ของเหลวเหนียวหนืดสีแดงเข้ม	20.00	0.80	4.00
เมทานอล	ของเหลวเหนียวหนืดสีน้ำตาลแดง	20.00	1.03	5.15



ภาพที่ 2 สารสกัดจากข้าวหอมมะลิแดง A) สารสกัดเฮกเซน B) สารสกัดเอทานอล C) สารสกัดเมทานอล

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay จากการศึกษาพบว่าค่าเฉลี่ย IC_{50} ของสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลายแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยสารสกัดจากข้าวหอมมะลิแดงที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ $521.40 \pm 0.87 \mu\text{g/ml}$ รองลงมาคือสารที่สกัดด้วยเมทานอล ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ $1,180.39 \pm 51.96 \mu\text{g/ml}$ แต่สารที่สกัดด้วยเฮกเซนมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ $7,907.06 \pm 1,703.39 \mu\text{g/ml}$ ในการศึกษาครั้งนี้ใช้วิตามินซีเป็นตัวควบคุมเชิงบวก (Positive control) เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากข้าวหอมมะลิแดงที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด พบว่าวิตามินซีมีค่า IC_{50} เท่ากับ $154.09 \pm 30.07 \mu\text{g/ml}$ (ตารางที่ 2 และภาพที่ 3A)



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 10

The 10th STOU National Research Conference

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay พบว่าให้ผลในทำนองเดียวกับ DPPH assay โดยค่าเฉลี่ย IC_{50} ของสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลายแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยสารสกัดจากข้าวหอมมะลิแดงที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS สูงที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ $416.93 \pm 7.16 \mu\text{g/ml}$ รองลงมาคือสารที่สกัดด้วยเมทานอล ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ $767.44 \pm 6.02 \mu\text{g/ml}$ แต่สารที่สกัดด้วยเฮกเซนมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ $6,411.87 \pm 216.37 \mu\text{g/ml}$ ส่วนวิตามินซีซึ่งเป็นตัวควบคุมเชิงบวกมีค่า IC_{50} เท่ากับ $35.53 \pm 0.40 \mu\text{g/ml}$ (ตารางที่ 2 และภาพที่ 3B)

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay จากการศึกษาพบว่าค่าเฉลี่ย FRAP value ของสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลายแต่ละชนิดที่ระดับความเข้มข้น $500 \mu\text{g/ml}$ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยสารสกัดจากข้าวหอมมะลิแดงที่สกัดด้วยเอทานอลมีความสามารถในการรีดิวซ์สูงที่สุด โดยมีค่า FRAP value เท่ากับ $6,888 \pm 543.64 \text{ mM TE/mg extract}$ รองลงมาคือสารที่สกัดด้วยเมทานอล ซึ่งมีค่า FRAP value เท่ากับ $1,291 \pm 181.92 \text{ mM TE/mg extract}$ แต่สารที่สกัดด้วยเฮกเซนไม่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยการรีดิวซ์ สำหรับวิตามินซีมีค่า FRAP value เท่ากับ $2,499 \pm 72.16 \text{ mM TE/mg extract}$ (ตารางที่ 2 และภาพที่ 3C)

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu assay จากการศึกษาพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดแต่ละชนิดไม่มีความแตกต่างกัน ($p > 0.05$) โดยสารสกัดจากข้าวหอมมะลิแดงที่สกัดด้วยเฮกเซนมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม เท่ากับ $6,613 \pm 655.22 \text{ mg GAE/g extract}$ สารที่สกัดด้วยเอทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม เท่ากับ $5,482 \pm 170.58 \text{ mg GAE/g extract}$ และสารที่สกัดด้วยเมทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม เท่ากับ $7,024 \pm 882.14 \text{ mg GAE/g extract}$ (ตารางที่ 2 และภาพที่ 3D)

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระตามวิธีต่างๆ และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากข้าวหอมมะลิแดง

ตัวทำละลาย	IC_{50} DPPH ($\mu\text{g/ml}$)	IC_{50} ABTS ($\mu\text{g/ml}$)	FRAP value (mM TE/g extract)	ปริมาณฟีนอลิกรวม (mg GAE/g extract)
เฮกเซน	$7,907.06 \pm 1,703.39$	$6,411.87 \pm 216.37$	ND	$6,613 \pm 655.22^a$
เอทานอล	521.40 ± 0.87^b	416.93 ± 7.16^b	$6,888 \pm 543.64^c$	$5,482 \pm 170.58^a$
เมทานอล	$1,180.39 \pm 51.96^c$	767.44 ± 6.02^c	$1,291 \pm 181.92^a$	$7,024 \pm 882.14^a$
วิตามินซี	154.09 ± 30.07^a	35.53 ± 0.40^a	$2,499 \pm 72.16^b$	-

หมายเหตุ - รายงานผลเป็นค่า mean $\pm$ S.D. (n=3) โดยตัวอักษรต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลภายในคอลัมน์เดียวกันด้วยวิธี Tukey's multiple test ($p < 0.05$)

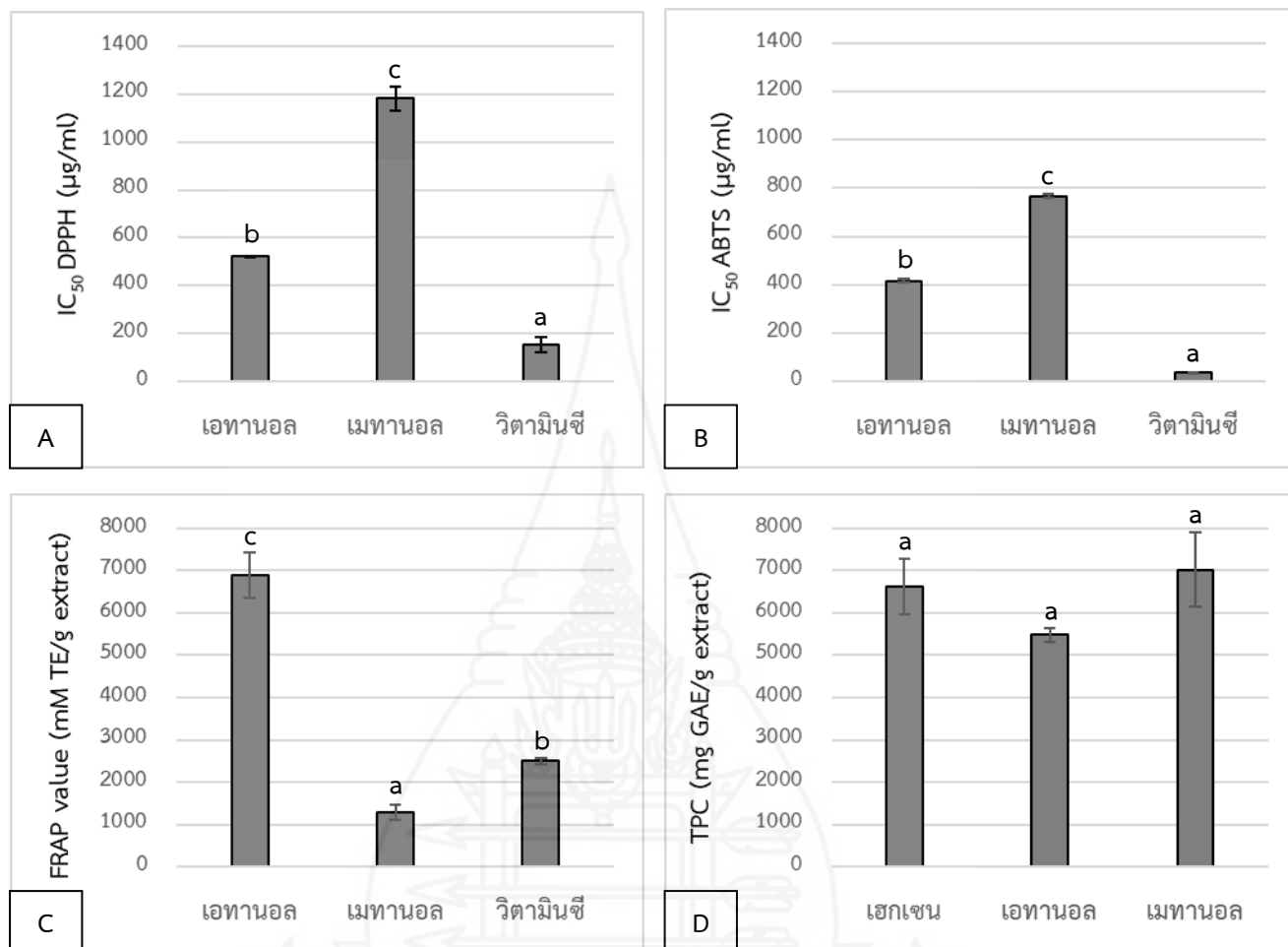
- ค่า IC_{50} ของสารสกัดจากข้าวหอมมะลิแดงที่สกัดด้วยเฮกเซนที่ทดสอบด้วย DPPH assay และ ABTS assay มีค่าสูงมาก จึงไม่นำมาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

- ND: ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการทดสอบสารสกัดด้วยเฮกเซนน้อยจนไม่สามารถคำนวณค่า FRAP value ได้



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 10

The 10th STOU National Research Conference



ภาพที่ 3 แผนภูมิแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากข้าวหอมมะลิแดง A) IC₅₀ DPPH B) IC₅₀ ABTS C) FRAP value D) ปริมาณฟีนอลิกรวม

อภิปรายผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้ทำการเปรียบเทียบวิธีการสกัดสารจากข้าวหอมมะลิแดง เนื่องจาก Wanna *et al.* (2015) ได้ทำการสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ด้วยเอทานอลหรือเมทานอลที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอล 80% และเมทานอล 80% มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงที่สุด และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารต้านอนุมูลอิสระที่สกัดได้จากข้าวไรซ์เบอร์รี่มีคุณสมบัติค่อนข้างมีขั้ว ดังนั้นในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยจึงทดลองใช้การสกัด 2 ขั้นตอน โดยขั้นแรกใช้เฮกเซนซึ่งเป็นตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว เพื่อดึงสารที่ไม่มีขั้วในข้าวหอมมะลิแดงออกมาก่อน ได้แก่ ไขมัน น้ำมันหอมระเหย ไตรเทอร์ปีน สเตียรอยด์ และแคโรทีนอยด์ จากนั้นจึงนำข้าวส่วนที่เหลือมาสกัดต่อในขั้นตอนที่ 2 ด้วยเอทานอล 80% หรือเมทานอล 80% ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่ค่อนข้างมีขั้ว อาจทำให้ได้สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ฟีนอล แอนโธไซยานิน และแทนนิน เป็นต้น (Iloki-Assanga *et al.*, 2015) พบว่าการสกัดข้าวหอมมะลิแดงด้วยแต่ละวิธีได้ปริมาณสารสกัดใกล้เคียงกัน คือมีค่าร้อยละของสารสกัดที่ได้อยู่ที่ 4.00 - 5.68%



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 10

The 10th STOU National Research Conference

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดข้าวหอมมะลิแดงด้วยวิธี DPPH assay, ABTS assay, FRAP assay และตรวจวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu assay พบว่าสารสกัดจากข้าวหอมมะลิแดงที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด โดยวิธี DPPH assay และ ABTS assay มีค่า IC_{50} เท่ากับ 521.40 ± 0.87 $\mu\text{g/ml}$ และ 416.93 ± 7.16 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ และวิธี FRAP assay มีค่าการต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ $6,888 \pm 543.64$ mM TE/g extract แต่ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดแต่ละชนิดไม่มีความแตกต่างกัน คืออยู่ระหว่าง 5,482 - 7,024 mg GAE/g extract ผลที่ได้จากการวิจัยนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ ฌมลวรรณ ทองเต็ม และปณณีย์ ธีรศรีณยานนท์ (2562) ที่ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในส่วนสกัดเอทานอลของข้าวที่มีสีบางสายพันธุ์ ได้แก่ ข้าวไรซ์เบอร์รี่ ข้าวสังข์หยด ข้าวกล้องหอมมะลิแดง เปรียบเทียบกับข้าวที่มีสีขาว ได้แก่ ข้าวหอมปทุม และข้าวเสาไห้ โดยทดสอบฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH และความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก พบว่าสารสกัดข้าวกล้องหอมมะลิแดงมีค่า IC_{50} ของ DPPH assay เท่ากับ 0.53 ± 1.86 $\mu\text{g/ml}$ และมีค่าการรีดิวซ์เฟอร์ริกมากที่สุด คือ 665.60 ± 0.02 mg FeSO_4/g extract และสอดคล้องกับ Fidrianny et al. (2016) ที่ได้ทำการสกัดสารจากข้าว 3 สายพันธุ์ คือ ข้าวดำ ข้าวแดง และข้าวขาว ด้วยตัวทำละลายที่มีคุณสมบัติความมีขั้วต่างกัน คือ เฮกเซน เอธิลอะซิเตท และเอทานอล พบว่าข้าวดำและข้าวแดงที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH assay และ FRAP assay แสดงให้เห็นว่าตัวทำละลายมีผลอย่างมากต่อชนิดและปริมาณของสารที่สกัดได้ รวมถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด

อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองที่ได้ในงานวิจัยนี้พบว่าการสกัดข้าวหอมมะลิแดงด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิดได้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมที่ไม่แตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าทั้งเฮกเซน เอทานอล 80% และ เมทานอล 80% สามารถสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากข้าวหอมมะลิแดงได้ แต่อาจเป็นสารประกอบฟีนอลิกคนละชนิดกัน จึงออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้แตกต่างกัน นอกจากนี้งานวิจัยของ Maisuthisakul and Changchub (2014) ที่ได้ทำการสกัดสารจากข้าวไทย 9 สายพันธุ์ ซึ่งรวมถึงข้าวหอมมะลิแดง โดยเปรียบเทียบระหว่างการสกัดด้วยเอทานอล 95% ในอัตราส่วน 1:3 (w/v) และการสกัดด้วยเอทานอล 95% ที่ผสม 1.5 N HCl ในอัตราส่วน 1:3 (w/v) เช่นเดียวกัน พบว่าการสกัดที่ใช้กรดทำให้ได้สารประกอบฟีนอลิกเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH assay เพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมกับฤทธิ์ยับยั้ง DPPH ของสารสกัดมีความสัมพันธ์กันในทางบวก โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์เท่ากับ 0.709 และยังพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในสารสกัดที่ใช้กรดมีความสัมพันธ์กับปริมาณแอนโธไซยานิน โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์เท่ากับ 0.759 ดังนั้นจากงานวิจัยครั้งนี้เมื่อสกัดสารจากข้าวหอมมะลิแดงด้วยเฮกเซนแล้ว ถ้านำข้าวมาสกัดต่อด้วยเอทานอลที่มีกรดด้วย น่าจะทำให้ได้แอนโธไซยานินเพิ่มขึ้นและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้มากขึ้นอีก



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 10

The 10th STOU National Research Conference

ข้อเสนอแนะ

1. เนื่องจากสารสกัดในงานวิจัยนี้ยังเป็นสารสกัดหยาบ ซึ่งอาจประกอบด้วยสารหลายชนิดทั้งที่มีฤทธิ์และไม่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้นจึงควรศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับองค์ประกอบทางพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical screening) ของสารสกัดจากข้าวหอมมะลิแดง เพื่อให้ทราบองค์ประกอบหลักในสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้
2. ควรมีการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระในข้าวหอมมะลิแดงเพิ่มเติม เพื่อพัฒนาวิธีการสกัดสารและการประยุกต์ใช้สารเหล่านี้ให้มีประสิทธิภาพมากที่สุด
3. ควรศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากข้าวหอมมะลิแดง เพื่อความปลอดภัยในการบริโภคหรือการนำสารสกัดมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพต่อไปในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากงบประมาณรายได้ของมหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา ประจำปีงบประมาณ 2563 และขอขอบคุณบริษัท เกรซไบโอ จำกัด จังหวัดฉะเชิงเทรา ที่ได้อนุเคราะห์ข้าวหอมมะลิแดงสำหรับงานวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

- ธมลวรรณ ทองเต็ม และบุญยวีร์ ธีรศรีณยานนท์. (2562). ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของส่วนสกัดเอทานอลจากเมล็ดข้าวที่มีสีบาสายพันธุ์ที่บริโภคในประเทศไทย.งานนำเสนอผลงานวิชาการห้องเรียน วิทยาศาสตร์โครงการ รวม. ครั้งที่ 9 ณ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร. สืบค้นเมื่อ 28 สิงหาคม 2563 จาก https://sciusforum.mhesi.go.th/file/extended_abstract/752.pdf.
- วัลยา เนาวรัตน์วัฒนา และพัชรี บุญศรี. (2542). โปรออกซิแดนซ์: อภิธานศัพท์ของแอนติออกซิแดนซ์. *วารสารวิทยาศาสตร์*, 53(3), 196-198.
- สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว. 2017. ข้าวหอมมะลิแดง พันธุ์ข้าวและโภชนาการ. สืบค้นเมื่อ 28 สิงหาคม 2563 จาก <https://www.thairicedb.com/rice-detail.php?id=11>.
- Benzie, I. 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.
- Fidrianny, I., Puspitaningrum, D. A., & Ruslan, K. (2016). Antioxidant Capacities of Various Grains Extracts of Three Kinds of Rice Grown in Central Java-Indonesia. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 8(6), 997-1002.
- Iloki-Assanga, S. B., Lewis-Luján, L. M., Lara-Espinoza, C. L., Gil-Salido, A. A., Fernandez-Angulo, D., Rubio-Pino, J. L., & Haines, D. D. (2015). Solvent effects on phytochemical constituent profiles and antioxidant activities, using four different extraction formulations for analysis of *Bucida buceras* L. and *Phoradendron californicum*. *BMC research notes*, 8(1), 396.



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 10

The 10th STOU National Research Conference

- Kedare, S. B., & Singh, R. P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of food science and technology*, 48(4), 412-422.
- Maisuthisakul, P., & Changchub, L. (2014). Effect of extraction on phenolic antioxidant of different Thai rice (*Oryza Sativa* L.) Genotypes. *International Journal of Food Properties*, 17(4), 855-865.
- Marinova, D., Ribarova, F., & Atanassova, M. (2005). Total phenolics and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. *Journal of the university of chemical technology and metallurgy*, 40(3), 255-260.
- Nimse, S. B., & Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *Rsc Advances*, 5(35), 27986-28006.
- Poprac, P., Jomova, K., Simunkova, M., Kollar, V., Rhodes, C. J., & Valko, M. (2017). Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases. *Trends in pharmacological sciences*, 38(7), 592-607.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Sies, H., Stahl, W. & Sundquist, A. (1991). Antioxidant functions of vitamins, vitamin E and C, beta-carotene and other carotenoids. *Annals of the New York Academy of sciences*. 368: 7-19.
- Wanna, A., Singanusong, R., Wichaphon, J., & Klangpetch, W. (2015). Effect of extraction solvents on antioxidant and antibacterial activities of riceberry bran extracts. *17th Food Innovation Asia Conference 2015 (FIAC 2015) Innovative ASEAN Food Research towards the World Bangkok, Thailand*, 423-428.
- Wanna, C. (2019). Free radical scavenging capacity and total phenolic contents in peel and fleshy crude extracts of selected vegetables. *Pharmacognosy Journal*, 11(6), 1351-1358.