

การสกัดน้ำมันรำข้าวและสารต้านอนุมูลอิสระด้วย  
คลื่นอัลตราโซนิกแบบโพรบ

EXTRACTION OF RICE BRAN OIL AND ANTIOXIDANT BY  
ULTRASONIC PROBE



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต  
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
ปีการศึกษา 2558

การสกัดน้ำมันรำข้าวและสารต้านอนุมูลอิสระด้วย  
คลื่นอัลตราโซนิกแบบโพรบ

EXTRACTION OF RICE BRAN OIL AND ANTIOXIDANT BY  
ULTRASONIC PROBE



T149424

สิทธิโชค เกตุแก้ว  
สิทธิเดช ห่านพงษ์ศักดิ์  
อักษรา เอี่ยมชิว

เลขหมู่.....  
เลขทะเบียน 149424  
วันเดือนปี.ค. 8 อ.พ. 2561

b. 12884492  
i. ....

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต  
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
ปีการศึกษา 2558

EXTRACTION OF RICE BRAN OIL AND ANTIOXIDANT BY  
ULTRASONIC PROBE



A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF  
THE REQUIREMENT FOR  
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)  
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE  
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG  
ACADEMIC YEAR 2015

หัวข้อโครงการพิเศษ	การสกัดน้ำมันรำข้าวและสารต้านอนุมูลอิสระด้วยคลื่นอัลตราโซนิกแบบโพรบ			
	Extraction of rice bran oil and antioxidant by ultrasonic probe			
ชื่อนักศึกษา	นายสิทธิโชค	เกตูแก้ว	รหัสนักศึกษา	55051192
	นายสิทธิเดช	ห่านพงศ์ดี	รหัสนักศึกษา	55051193
	นางสาวอักษรา	เอี่ยมซิว	รหัสนักศึกษา	55051215
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)			
ภาควิชา	ชีววิทยา			
ปีการศึกษา	2558			
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.ดวงกมล เรือนงาม			

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) ประจำปีการศึกษา 2558

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
รศ.ดร.จิตติ ท่าไฉ่	
ประธานกรรมการ	
ดร.สมพิศ สอนโยธา	
กรรมการ	
ผศ.ดร.ดวงกมล เรือนงาม	
กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การสกัดน้ำมันรำข้าวและสารต้านอนุมูลอิสระด้วยคลื่นอัลตราโซนิกแบบโพรบ		
	Extraction of rice bran oil and antioxidant by ultrasonic probe		
ชื่อนักศึกษา	นายสิทธิโชค เกตุแก้ว	รหัสนักศึกษา	55051192
	นายสิทธิเดช ห่านพวงศักดิ์	รหัสนักศึกษา	55051193
	นางสาวอักษรา เอี่ยมชีวี	รหัสนักศึกษา	55051215
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)		
ภาควิชา	ชีววิทยา		
คณะ	วิทยาศาสตร์		
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)		
ปีการศึกษา	2558		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.ดวงกมล เรือนงาม		

### บทคัดย่อ

รำข้าวเป็นของเหลือทิ้งทางการเกษตรที่ได้จากกระบวนการขัดสีข้าวซึ่งเป็นส่วนที่พบว่ามีน้ำมันและสารต้านอนุมูลอิสระในปริมาณสูงโดยเฉพาะวิตามินอีและสาร  $\gamma$ -oryzanol ซึ่งในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดรำข้าวด้วยคลื่นอัลตราโซนิกแบบโพรบเพื่อให้ได้ปริมาณน้ำมันรำข้าว สาร  $\gamma$ -oryzanol สาร  $\gamma$ -tocopherol สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดมากที่สุด และทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ( $IC_{50}$ ) โดยพิจารณาผลของตัวทำละลาย (เฮกเซน เอทานอล และเอทิลอะซิเตต) ผลของอุณหภูมิ (30 40°C) ผลอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย (1:6 1:8 1:10 w/v) จากการทดลองพบว่า ชนิดของตัวทำละลาย อุณหภูมิ และอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลายมีผลต่อการสกัดสารดังกล่าวที่กล่าวมาข้างต้น โดยปริมาณน้ำมันรำข้าวที่สกัดได้สูงสุดเท่ากับ  $0.35 \pm 0.01$  g/g DW เมื่อสกัดด้วยเฮกเซนที่อุณหภูมิ 40°C อัตราส่วนตัวทำละลาย 1:10 (w/v) ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่สกัดได้สูงสุดเท่ากับ  $2.84 \pm 0.65$  mg GAE/g DW และ  $4.27 \pm 0.45$  mg QE/g DW เมื่อสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตที่อุณหภูมิ 30°C อัตราส่วนตัวทำละลาย 1:8 (w/v) ส่วนปริมาณสาร  $\gamma$ -oryzanol และสาร  $\gamma$ -tocopherol ที่สกัดได้สูงสุดเท่ากับ  $5.73 \pm 0.67$  mg/g DW และ  $392.38 \pm 37.62$  mg/g DW ตามลำดับ เมื่อสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตที่อุณหภูมิ 30°C อัตราส่วนตัวทำละลาย 1:8 (w/v) และค่า  $IC_{50}$  ที่น้อยที่สุดเท่ากับ  $4.43 \pm 0.21$  mg/ml เมื่อสกัดด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิ 30°C อัตราส่วนตัวทำละลาย 1:6 (w/v)

คำสำคัญ : โทโคฟีรอล, น้ำมันรำข้าว, สารต้านอนุมูลอิสระ, อัลตราโซนิกโพรบ, ออโรซานอล

Title	Extraction of rice bran oil and antioxidant by ultrasonic probe		
Student	Mr. Sittichoke Ketkaeo	Student	ID 55051192
	Mr. Sitthidech Hanphongsak	Student	ID 55051193
	Miss Aksara Aiemseiw	Student	ID 55051215
Degree	Bachelor of Science (Biotechnology)		
Department	Biology		
Faculty	Science		
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)		
Academic Year	2015		
Advisor	Asst. Prof. Dr. Duangkamol Ruen-ngam		

### Abstract

Rice bran is waste materials from milling process that contains highly amount of oil and antioxidants, especially vitamin E and  $\gamma$ -oryzanol. The objectives of this study were finding out the extraction condition to obtain the highest yield of oil,  $\gamma$ -oryzanol,  $\gamma$ -tocopherol, total phenolic content, total flavonoid content by ultrasonic probe and antioxidant activity also was determined by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) in term of  $IC_{50}$  (mg/ml). The conditions are various types of solvents (Hexane, Ethanol and Ethyl acetate), temperature (30 and 40°C) and materials ratio (1:6, 1:8 and 1:10 w/v). The results showed that all parameters are effect to the amount of antioxidants in the oil. The maximum amount of oil obtained from hexane at 40°C, 1:10 (w/v) ( $0.35 \pm 0.01$  g/g DW). The maximum total phenolic content and flavonoid content got from the same solvent at 40°C, 1:8 (w/v) ( $2.84 \pm 0.65$  mg GAE/g DW and  $4.27 \pm 0.45$  mg QE/g DW respectively). The maximum of  $\gamma$ -oryzanol and  $\gamma$ -tocopherol obtained from ethyl acetate at 30°C, 1:8 (w/v) and got around  $5.73 \pm 0.67$  mg/g DW and  $392.38 \pm 37.62$  mg/g DW respectively. For antioxidant activity ( $IC_{50}$ ) got the highest activity around  $4.43 \pm 0.21$  mg/ml at 30°C, 1:6 (w/v)

**Keywords :** Antioxidant, Oryzanol, Rice bran oil, Tocopherol, Ultrasonic extraction

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีด้วยความช่วยเหลือของอาจารย์ ผศ.ดร.ดวงกมล เรือนงามอาจารย์ที่ปรึกษาซึ่งท่านได้ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่าง ๆ อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการทำโครงการพิเศษฉบับนี้และให้ความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน อีกทั้งยังช่วยแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นระหว่างการทำโครงการพิเศษนอกจากนี้ขอขอบคุณครอบครัวและเพื่อน ๆ ทุกคนที่เป็นกำลังใจและให้ความช่วยเหลือในการทำโครงการพิเศษฉบับนี้

อนึ่งผู้วิจัยหวังว่า งานวิจัยฉบับนี้จะมีประโยชน์อยู่ไม่น้อย จึงขอมอบส่วนดีทั้งหมดนี้ให้แก่อาจารย์ที่ได้ประสิทธิประสาทวิชาจนทำให้ผลงานที่เป็นประโยชน์ต่อผู้ที่เกี่ยวข้อง และขอมอบความกตัญญู กตเวทิตาคุณแต่บิดามารดาและผู้มีพระคุณทุกท่านสำหรับข้อบกพร่องต่าง ๆ ที่อาจจะเกิดขึ้นนั้น ผู้วิจัยขอน้อมรับผิดเพียงผู้เดียวและยินดีที่จะรับฟังคำแนะนำจากทุกท่านที่ได้เข้ามาศึกษาเพื่อเป็นประโยชน์ในการพัฒนางานวิจัยต่อไป

นายสิทธิโชค

เกตุแก้ว

นายสิทธิเดช

ห่านพงษ์ศักดิ์

นางสาวอักษรา

เอี่ยมชี้้ว

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูป.....	ฉ
<b>บทที่ 1 บทนำ.....</b>	<b>1</b>
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
<b>บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....</b>	<b>4</b>
2.1 รำข้าว.....	4
2.2 น้ำมันรำข้าว.....	5
2.2.1 สารที่สำคัญของน้ำมันรำข้าว.....	5
2.3 อนุมูลอิสระ.....	6
2.4 สาร $\gamma$ -oryzanol.....	7
2.4.1 คุณสมบัติของ $\gamma$ -oryzanol ต่อสุขภาพมนุษย์.....	8
2.5 วิตามินอี (Vitamin E).....	9
2.6 สารฟลาโวนอยด์.....	10
2.7 สารประกอบฟีนอลิก.....	12
2.8 สารต้านอนุมูลอิสระ.....	12
2.9 การสกัดสารต้านอนุมูลอิสระด้วยตัวทำละลาย.....	14
2.10 การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Assay.....	15
2.11 คลื่นอัลตราโซนิก (Ultrasonic waves).....	16
2.12 ระบบอัลตราโซนิก.....	17
2.13 การสกัดด้วยคลื่นอัลตราโซนิก (Ultrasonic extraction).....	18

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.14 เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	21
2.14.1 ส่วนประกอบของเครื่อง HPLC.....	22
2.14.2 การดูดกลืนแสงของ Mobile phase.....	23
2.15 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	24
<b>บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....</b>	<b>28</b>
3.1 วัสดุและอุปกรณ์.....	28
3.1.1 รำข้าว.....	28
3.1.2 สารเคมีและอุปกรณ์.....	28
3.2 แผนผังสำหรับการดำเนินงาน.....	29
3.3 วิธีการทดลอง.....	31
3.3.1 การหาชนิดตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด.....	31
3.3.2 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัด.....	31
3.3.3 การหาอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด.....	32
3.4 การวิเคราะห์ total phenolic content.....	33
3.5 การวิเคราะห์ total flavonoid content.....	33
3.6 การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH assay.....	33
3.7 การวิเคราะห์หองค์ประกอบของ Tocopherol และ Oryzanol.....	34
3.8 การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	34
3.9 การคำนวณ.....	35
3.9.1 น้ำหนักรำข้าวแห้ง.....	35
3.9.2 ร้อยละความชื้นของรำข้าว.....	35
<b>บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล.....</b>	<b>36</b>
4.1 ปริมาณน้ำมันรำข้าว.....	36
4.2 ปริมาณสาร $\gamma$ -oryzanol.....	39
4.3 ปริมาณสาร $\gamma$ -tocopherol.....	42
4.4 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total Phenolics Content).....	45

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.5 ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total Flavonoid Content).....	48
4.6 ผลการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH.....	51
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	55
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	55
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	55
เอกสารอ้างอิง.....	56
ภาคผนวก.....	64
ภาคผนวก ก.....	65
ภาคผนวก ข.....	80



## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 งานวิจัยที่ใช้คลื่นอัลตราโซนิกร่วมในการสกัดสาระสำคัญของพืช.....	24
4.1 แสดงปริมาณน้ำมันรำข้าวที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ในอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6 (w/v) อุณหภูมิ 30 และ 40°C.....	36
4.2 แสดงปริมาณน้ำมันรำข้าวที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ในอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6, 1:8 และ 1:10 (w/v) อุณหภูมิ 30 และ 40°C.....	37
4.3 แสดงปริมาณสาร $\gamma$ -oryzanol ที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ในอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6 (w/v) อุณหภูมิ 30 และ 40°C.....	39
4.4 แสดงปริมาณสาร $\gamma$ -oryzanol ที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ในอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6, 1:8 และ 1:10 (w/v) อุณหภูมิ 30 และ 40°C.....	40
4.5 แสดงปริมาณสาร $\gamma$ -tocopherol ที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ในอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6 (w/v) อุณหภูมิ 30 และ 40°C.....	42
4.6 แสดงปริมาณสาร $\gamma$ -tocopherol ที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ในอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6, 1:8 และ 1:10 (w/v) อุณหภูมิ 30 และ 40°C.....	43
4.7 แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ในอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6 (w/v) อุณหภูมิ 30 และ 40°C.....	45
4.8 แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 30 และ 40°C ในอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6, 1:8 และ 1:10 (w/v).....	47
4.9 แสดงปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ในอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6 (w/v) ที่อุณหภูมิ 30 และ 40°C.....	49
4.10 แสดงปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ในที่อัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6, 1:8 และ 1:10 (w/v) อุณหภูมิ 30 และ 40°C .....	50
4.11 แสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ในอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6 (w/v) ที่อุณหภูมิ 30 และ 40°C.....	52
4.12 แสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ในอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6 (w/v) ที่อุณหภูมิ 30 และ 40°C.....	54
ก.1 แสดงความเข้มข้นของกรดแกลลิก (ug/ml) ต่อค่าการดูดกลืนแสงที่ 725 นาโนเมตร.....	67

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ก.2 แสดงความเข้มข้นของควอร์ซิทิน (ug/ml) ต่อค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 นาโนเมตร.....	68
ก.3 แสดงความเข้มข้นสาร $\gamma$ -oryzanol ต่อพื้นที่ใต้กราฟของสาร $\gamma$ -oryzanol ในแต่ละความเข้มข้น.....	69



# สารบัญญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 แสดงลักษณะ 4 โครงสร้างหลักทางเคมีของสาร $\gamma$ -oryzanol.....	8
2.2 แสดงลักษณะ 6 โครงสร้างทางเคมีของสารอนุพันธ์ของวิตามินอี.....	9
2.3 โครงสร้างพื้นฐานของฟลาโวนอยด์.....	10
2.4 โครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกโดยทั่วไป.....	12
2.5 ความถี่ของคลื่นอัลตราโซนิกในช่วงต่าง ๆ.....	17
2.6 อ่างอัลตราโซนิก (Ultrasonic baths).....	19
2.7 ลักษณะของฮอร์นชนิดต่าง ๆ.....	20
2.8 ระบบอัลตราโซนิกแบบโพรบ (ultrasonic probe systems).....	21
2.9 เครื่อง HPLC (High Performance Liquid Chromatography).....	22
3.1 แผนผังการทดลองทั้งหมด.....	29
3.2 ภาพฉายแบบออร์โทกราฟิกของบีกเกอร์และแท่งโพรบ ในระบบการสกัดอัลตราโซนิกแบบโพรบ.....	30
ก.1 กราฟมาตรฐานกรดแกลลิกสำหรับวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด.....	67
ก.2 กราฟมาตรฐานควอซิทินสำหรับวิเคราะห์สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด.....	68
ก.3 กราฟมาตรฐานสาร $\gamma$ -oryzanol สำหรับวิเคราะห์ปริมาณสาร $\gamma$ -oryzanol ในรำข้าว.....	70
ข.1 แสดงตัวอย่างและรายละเอียดโปรแกรม LC solution ในคอมพิวเตอร์.....	80
ข.2 แสดงลักษณะของเครื่อง Ultrasonic probe (CSIR, Japan).....	81
ข.3 คอนโทรลเลอร์ของเครื่องอัลตราโซนิกแบบโพรบ.....	81
ข.4 เครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary evaporators).....	82
ข.5 ปุ่มลมของเครื่องระเหยสุญญากาศ.....	83
ข.6 เครื่อง microplate reader ยี่ห้อ Biochrom Anthos รุ่น Multiread 4000.....	84
ข.7 การนำข้อมูลออกโดยการ Export data.....	85
ข.8 หน้าต่าง Export data as ASCII conversion.....	85

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ประเทศไทยนั้นมีการปลูกข้าวมาอย่างยาวนาน ข้าวสายพันธุ์ที่ปลูกมากที่สุดในประเทศคือข้าวหอมมะลิ ซึ่งเป็นข้าวประเภทที่มีคุณภาพสูง กลิ่นหอม และรสชาติดี ข้าวหอมมะลิให้ผลผลิตในปริมาณที่สูงทำให้มีรำข้าวที่ได้จากขัดสีจำนวนมาก จึงได้มีการนำรำข้าวที่ได้จากการขัดสีมาใช้ประโยชน์โดยสกัดเป็นน้ำมันรำข้าวเพื่อเพิ่มรายได้และใช้ประโยชน์ทางการศึกษาและทางการแพทย์ ซึ่งการสกัดน้ำมันรำข้าวสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การสกัดเย็น การสกัดโดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหนือจุดวิกฤติ การสกัดด้วยตัวทำละลาย เป็นต้น จากการสกัดน้ำมันรำข้าวพบว่าจะได้สารสกัดกลุ่ม tocopherols ประมาณร้อยละ 19-40 กลุ่ม tocotrienols ร้อยละ 51-81 และ oryzanol ซึ่งสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าวิตามินอีถึง 6 เท่า มีกรดไขมันอิ่มตัวร้อยละ 18 กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (Monounsaturated Fatty Acid : MUFA) ร้อยละ 45 กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (Polyunsaturated Fatty Acid : PUFA) ร้อยละ 37 (ฉลาย, 2555) นอกจากนี้รำข้าวยังมีประโยชน์ในด้านสุขภาพและทางการค้า โดยสาร  $\gamma$ -oryzanol เป็นสารสำคัญที่มีจุดเด่นในการช่วยลดอัตราเสี่ยงของโรคหลอดเลือดแข็งตัวตีบตัน เช่น โรคหัวใจขาดเลือด และหัวใจวายโดยช่วยยับยั้งการจับตัวของเกล็ดเลือด ทำให้เลือดสามารถไหลเวียนในร่างกายได้ดีขึ้น ช่วยควบคุมให้ระดับคอเลสเตอรอลในร่างกายเป็นไปอย่างปกติโดยเร่งกระบวนการกำจัดคอเลสเตอรอลให้ดีขึ้นและกรดไขมันอย่างกรดโอเลอิก (Oleic Acid) หรือโอเมก้า 9 (Omega 9) สามารถช่วยลดคอเลสเตอรอลชนิดเลว (LDL) ซึ่งคือการลดการเกาะตัวของไขมันที่ผนังหลอดเลือด ที่จะช่วยควบคุมระดับไขมันในเลือดและเพิ่มความยืดหยุ่นให้กับหลอดเลือด และยังมีสารอื่น ๆ ที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น Vitamin E, Alpha-linolenic Acid หรือ Omega 3 เป็นต้น (Orthoefer, 2005 และ Duttaroy, 2012) ในน้ำมันรำข้าวประกอบไปด้วยน้ำมันร้อยละ 15 โปรตีนร้อยละ 15 และคาร์โบไฮเดรตประมาณร้อยละ 50 ซึ่งแบ่งจะเป็นองค์ประกอบหลักของรำข้าว นอกจากนี้รำข้าวยังอุดมไปด้วยเส้นใยอาหาร สาร  $\gamma$ -oryzanol และวิตามินอีซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Saunders, 1985) นอกจากนี้ในน้ำมันรำข้าว ยังมีกรดไขมันเช่น กรด palmitic (ร้อยละ 13.9-22.1), oleic (ร้อยละ 35.96-49.2) และ linoleic (ร้อยละ 27.3-41.0) (Chen และคณะ, 2008)

การทดลองนี้จะศึกษากระบวนการสกัดสาร oryzanol จากรำข้าวโดยใช้คลื่นอัลตราโซนิค (ultrasonic wave) ซึ่งเป็นการสั่นสะเทือนที่มีความถี่สูงมากซึ่งมนุษย์ไม่สามารถได้ยิน โดยพลังงานที่เกิดจากคลื่นเสียงที่มีการสั่นของคลื่นประมาณ 20,000 ครั้งต่อวินาทีหรือสูงกว่า (Hoover, 2000) หรืออีก

ความหมายคือคลื่นความดัน (pressure waves) ที่มีความถี่ (frequency) สูงกว่าคลื่นเสียงปกติ (สูงกว่า 20,000 กิโลเฮิร์ตซ์, kHz) สมบัติคลื่นอัลตราโซนิกคือมีทิศทางที่สามารถเล็งคลื่นเสียงไปยังเป้าหมายที่ต้องการได้โดยเจาะจง การจะใช้คลื่นอัลตราโซนิกนี้ต้องใช้อุปกรณ์ที่มีแหล่งกำเนิดคลื่นที่สร้างขึ้นจากทรานสดิวเซอร์ (transducer) ซึ่งเป็นอุปกรณ์ที่เปลี่ยนพลังงานกลหรือพลังงานไฟฟ้าไปเป็นพลังงานเสียง โดยเครื่องอัลตราโซนิกมีหลายประเภท ในการทดลองนี้จะใช้ระบบอัลตราโซนิกแบบโพรบ (ultrasonic probe systems) สามารถขยายพลังงานหรือคลื่นเสียงที่เกิดขึ้นจากทรานสดิวเซอร์ได้ และวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี DPPH assay ซึ่งเป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน (antioxidant) โดยใช้ reagent คือ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl เป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว ง่ายต่อการวิเคราะห์ ให้ความถูกต้องและแม่นยำสูง (พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนาปนนท์, 2558) นอกจากนี้ยังวิเคราะห์สารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่อยู่ในกลุ่มของสาร Polyphenols ที่พบในพืช (Mircea Oroian และ Isabel Escriche, 2015)

ดังนั้นในการทดลองนี้จะทำการศึกษาปริมาณของสาร Oryzanol ที่ได้จากการสกัดรำข้าวด้วยระบบอัลตราโซนิกแบบโพรบ (ultrasonic probe systems) ศึกษาสภาวะของระบบอัลตราโซนิกแบบโพรบที่มีผลต่อการสกัดน้ำมันรำข้าวโดยเปรียบเทียบกับปริมาณสาร Oryzanol ที่สกัดได้และศึกษาประสิทธิภาพสารต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันรำข้าวที่สกัดด้วยระบบอัลตราโซนิกแบบโพรบ

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดรำข้าวโดยใช้ระบบสกัดอัลตราโซนิกแบบโพรบ เพื่อให้ได้ปริมาณน้ำมันรำข้าว, สาร oryzanol, สาร tocopherol, สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดมากที่สุด
2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพสารต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันรำข้าวที่สกัดได้จากระบบสกัดอัลตราโซนิกแบบโพรบ

## 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1. รำข้าวหอมมะลิสายพันธุ์สุพรรณ 105 ขนาด 850 ไมโครเมตรเก็บที่อุณหภูมิ 4°C
2. อัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6 1:8 และ 1:10 (w/v) (รำข้าว 5 กรัม) ตัวทำละลายที่ใช้ ได้แก่ เฮกเซน เอทานอล และเอทิลอะซิเตต
3. สกัดที่คลื่นเสียงความถี่สูง 20 kHz
4. เวลาที่ใช้ในการสกัด 20, 40 และ 60 นาที
5. อุณหภูมิที่ใช้ 30 และ 40°C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. สกัดด้วยคลื่นอัลตราโซนิกชนิดโพรบ
7. ใช้เครื่องกลั่นระเหยสุญญากาศ (Rotary evaporator) สำหรับระเหยตัวทำละลาย
8. วิเคราะห์ปริมาณสาร  $\gamma$ -oryzanol และวิตามินอี ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟฟีของเหลว ความดันสูง (HPLC) โดยใช้คอลัมน์ชนิด C18 (Reverse phase)
9. วัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ด้วยเครื่อง Spectrophotometer
10. วัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ด้วยเครื่อง Microplate reader
11. ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay
12. ทดสอบสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดโดยดัดแปลงวิธีของ Folin-Ciocalteu Colorimetric Method)
13. ทดสอบสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดโดยดัดแปลงวิธีของ Chang และคณะ, 2002

#### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดรำข้าวโดยใช้ระบบสกัดอัลตราโซนิกแบบโพรบ เพื่อให้ได้ปริมาณน้ำมันรำข้าว สาร oryzanol สาร tocopherol สารประกอบฟีนอลิก ทั้งหมดและสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดมากที่สุด
2. ทราบถึงประสิทธิภาพสารต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันรำข้าวที่สกัดด้วยระบบสกัด อัลตราโซนิกแบบโพรบ

## บทที่ 2

# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.1 รำข้าว

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นผลิตภัณฑ์ที่สำคัญของประชาชนส่วนใหญ่ทั่วโลก ข้าวเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญและมีหมู่ฟังก์ชันที่มีประโยชน์หลายอย่าง ซึ่งในการนำเมล็ดข้าวมาบริโภคเป็นอาหารนั้น จะต้องผ่านกระบวนการต่าง ๆ เช่น การทำความสะอาด การสี และกระบวนการภายหลังการขัดสีข้าว (การทำให้เมล็ดข้าวขาว ขัดแต่ง และการคัดเมล็ด) จะได้วัสดุหลากหลายออกมา เช่น แกลบ ข้าวขาว และรำ ซึ่งจากการสีข้าวได้ข้าว (เอนโดสเปิร์ม) เป็นผลิตภัณฑ์หลักร้อยละ 70 ส่วนผลพลอยได้ประกอบด้วย แกลบร้อยละ 20 รำร้อยละ 8 และเมล็ดพันธุ์อีกร้อยละ 2

รำข้าวเป็นผลพลอยได้จากการขัดสีข้าว ซึ่งได้จากผิวนอกสีน้ำตาล โดยในแต่ละปีร้อยละ 90 ของรำข้าวที่ได้ถูกนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์เนื่องจากมีราคาถูก ส่วนที่เหลือนำมาใช้ในการสกัดน้ำมันรำข้าว รำข้าวมีอายุการเก็บรักษาสั้นมากเนื่องจากปริมาณไขมันสูงและมีเอนไซม์ไลเปสสามารถย่อยน้ำมันทำให้รำข้าวเหม็นหืน จึงมีการรักษาเสถียรภาพรำข้าวโดยการทำเอนไซม์ไลเปสไม่สามารถทำงานได้

รำข้าวถูกนำมาใช้อย่างมากมายในอุตสาหกรรมอาหาร เพื่อเพิ่มคุณภาพทางโภชนาการของอาหารแปรรูป รำข้าวมีเส้นใยอาหารสูงและรักษาโรคได้ นอกจากนี้ยังช่วยพัฒนาอาหารให้มีมูลค่ามากขึ้นหรือเป็นส่วนประกอบอาหารซึ่งมีความต้องการสูงในปัจจุบัน เช่น มีการเติมในขนมปัง เค้ก อาหารเส้น พาสต้า และไอศกรีม โดยปราศจากผลกระทบต่อคุณสมบัติเนื้อสัมผัส

องค์ประกอบของรำข้าว ข้าวประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 80 โปรตีนร้อยละ 7-8 ไขมันร้อยละ 3 และเส้นใยร้อยละ 3 และเมล็ดข้าวประกอบด้วยรำร้อยละ 5 ซึ่งร้อยละ 12-18.5 เป็นน้ำมัน รำข้าวเป็นผลพลอยได้จากการสีข้าว มีส่วนผสมได้แก่รำซึ่งเป็นผิวสีน้ำตาล และเซลล์สืบพันธุ์ (germ) โดยรำข้าวเป็นแหล่งโปรตีน แร่ธาตุ กรดไขมัน และเส้นใยอาหาร รำข้าวมีสารอาหารที่จำเป็นมากมายในปริมาณมากได้แก่ แร่ธาตุ วิตามิน เส้นใย กรดอะมิโน และสารต้านอนุมูลอิสระอันได้แก่ tocopherols, tocotrienol และ oryzanol ซึ่ง oryzanol เป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่า tocols

รำข้าวมีสาร phytochemicals จึงมีประโยชน์ต่อสุขภาพมนุษย์ ในน้ำมันรำข้าวมีสารต้านอนุมูลอิสระ ช่วยลดความเสี่ยงของโรคเรื้อรัง สเตอรอลที่เกิดในพืชมีทั้งที่อยู่ในรูปอิสระและในรูปของเอสเทอร์ เช่น ferulic acid esters ของสาร phytochemicals ที่รู้จักกันโดยทั่วไปคือ oryzanol ซึ่งหลาย

การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าในรำข้าวมี  $\gamma$ -oryzanol อย่างมากมาย โดย  $\gamma$ -oryzanol เป็นการผสม ferulic acid esters ของ triterpene alcohol กับ sterols (Gul และคณะ, 2015 และ Yilmaz, 2016)

## 2.2 น้ำมันรำข้าว

น้ำมันรำข้าว (Rice bran oil) เป็นหนึ่งในน้ำมันที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงและดีต่อสุขภาพซึ่งประกอบไปด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัวมากกว่าร้อยละ 80 ซึ่งส่วนใหญ่เป็นกรดไขมันโอเลอิกและลิโนเลอิกในอัตราส่วน 1:1 นอกจากนี้น้ำมันรำข้าวยังประกอบไปด้วย tocopherols และ oryzanol ในปริมาณสูง โดย oryzanol พบในน้ำมันรำข้าวเท่านั้น ซึ่งในปัจจุบันมีความต้องการผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพเพิ่มมากขึ้น และน้ำมันรำข้าวเป็นทางเลือกที่น่าสนใจของผู้บริโภค อย่างไรก็ตามยังมีความยุ่งยากในการทำน้ำมันรำข้าวให้บริสุทธิ์ เนื่องจากมีสิ่งเจือปน กรดไขมันอิสระ และสารสีในปริมาณสูง (Jin และคณะ, 2016)

รำข้าวเป็นแหล่งของ oryzanol และเนื่องจาก oryzanol มีประโยชน์ต่อสุขภาพมนุษย์จึงมีการพัฒนาวิธีที่สะดวกและง่ายในการแยก oryzanol ออกมา โดยวิธีการแยก oryzanol จากน้ำมันรำข้าวหลายวิธีมีหลายวิธี เช่น การกำจัดกัมม์ (Degumming) การกำจัดไข (Dewaxing) การทรีตด้วยด่าง (alkali treatment) การสกัดของแข็งด้วยตัวทำละลาย (solid-liquid extraction) การตกผลึก (crystallization) และการสกัดของเหลวด้วยของเหลว (liquid-liquid extraction) (Gul และคณะ, 2015)

น้ำมันรำข้าวมีสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น วิตามินอี ในกลุ่ม tocopherols ประมาณร้อยละ 19-40 และกลุ่ม tocotrienols ร้อยละ 51-81 และ oryzanol ซึ่งสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าวิตามินอีถึง 6 เท่า มีกรดไขมันอิ่มตัวร้อยละ 18 กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (Monounsaturated Fatty Acid : MUFA) ร้อยละ 45 กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (Polyunsaturated Fatty Acid : PUFA) ร้อยละ 37 น้ำมันรำข้าวเหมาะสำหรับผู้ที่ต้องการลดคอเลสเตอรอลที่ไม่ดี (LDL)

### 2.2.1 สารที่สำคัญของน้ำมันรำข้าว

#### 1) กลุ่ม Phospholipids

เช่น Lecithin, Cephalin, Lysolecithin ซึ่งมีความสำคัญในการนำไปสร้างและซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอของเซลล์ประสาทสมองและช่วยป้องกันเซลล์ประสาทจากสารที่เป็นพิษและอนุมูลอิสระต่าง ๆ ช่วยลดความเครียดและช่วยเสริมสร้างในด้านความจำ (Berg และคณะ, 2002)

## 2) กลุ่ม Ceramide

เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของชั้นใต้ผิวหนัง เป็นองค์ประกอบของสปีงโกซีลและกรดไขมัน ช่วยทำให้ผิวหนังมีความยืดหยุ่น ช่วยรักษาผิวพรรณให้สดใส ลดริ้วรอยก่อนเวลาอันควร นอกจากนี้ Ceramide ยังมีคุณสมบัติเป็น Whitener ซึ่งสามารถยับยั้งการสังเคราะห์ melanin อันเป็นสาเหตุให้เกิดฝ้า กระ จุดต่างดำบนผิวพรรณได้ดี (Hill และคณะ, 2009)

## 3) กลุ่ม Tocols

เป็นวิตามินอีธรรมชาติในรูปของ Tocopherols และ Tocotrienols มีประโยชน์ต่อร่างกายในการสร้างและซ่อมแซมเซลล์ต่าง ๆ ของร่างกาย และยังช่วยทำให้ร่างกายมีภูมิคุ้มกันต่อโรคต่าง ๆ ช่วยต้านอนุมูลอิสระซึ่งเป็นเหตุสำคัญของการเกิดโรคมะเร็ง อีกทั้งยังป้องกันโรคความดันเลือด โรคไต และโรคหลอดเลือดตีบ

## 4) กลุ่ม Linoleic Fatty Acid และ Linoleic

เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวและเป็นวิตามินประเภทที่ละลายในไขมันที่มีประโยชน์ช่วยให้ร่างกายเผาผลาญไขมันอิ่มตัวได้ดีขึ้นช่วยให้เซลล์ได้รับสารอาหารได้มากขึ้นโดยเป็นตัวบ่อนสารอาหารให้แก่เซลล์รักษาสมดุลของระบบการแข็งตัวของเลือดเสริมสร้างความแข็งแรงให้แก่ผนังหลอดเลือดและเยื่อหุ้มเซลล์ (Morel และคณะ, 2013)

## 5) กลุ่ม $\gamma$ -oryzanol

เป็นสารอนุมูลอิสระมีฤทธิ์ในการลดระดับคอเลสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ ทำให้ลดการตีตันของหลอดเลือด นอกจากนี้ยังและยังป้องกันแสงยูวีได้เมื่อใช้กินหรือใช้ทาทำให้ผิวหนังชุ่มชื้น (Patel และคณะ, 2004)

## 2.3 อนุมูลอิสระ

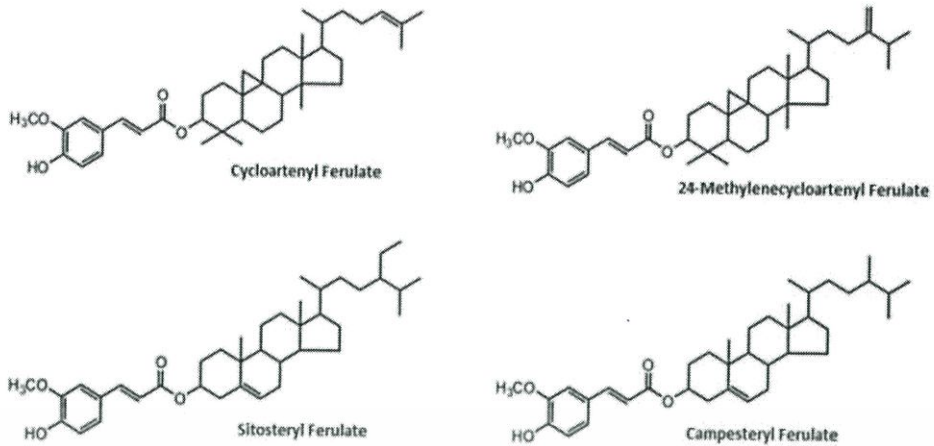
อนุมูลอิสระคือสารที่มีอะตอมของโมเลกุลหรือไอออนที่มีอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวซึ่งสามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะอย่างยิ่งในกระบวนการเมทาบอลิซึมภายในเซลล์โดยมีการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนออกจากโมเลกุลของออกซิเจนทำให้อิเล็กตรอนในโมเลกุลออกซิเจนไม่สมดุลกลายเป็นอนุมูลอิสระและว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยามากและสามารถดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นมาแทนที่อิเล็กตรอนที่ขาดหายไปเพื่อทำให้ตัวเองเกิดความสมดุลหรือเสถียร ซึ่งปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่

และเกิดขึ้นในเซลล์ตลอดเวลา (ไมตรี, 2555) อนุมูลอิสระอาจมีประจุเป็นบวก-ลบหรือเป็นศูนย์ก็ได้และอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวเหล่านี้ส่งผลทำให้อนุมูลอิสระว่องไวต่อปฏิกิริยาสูง

อนุมูลอิสระมีบทบาทสำคัญในการสันดาปพอลิเมอไรเซชันและกระบวนการทางเคมีอีกหลายอย่างในสิ่งมีชีวิต อนุมูลอิสระเกิดขึ้นเป็นปกติจากปฏิกิริยาในร่างกายอยู่แล้วโดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อมีธาตุเหล็ก ทองแดง แมงกานีส โคบอลต์ โครเมียมและนิกเกิลน้อย มักเกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ โดยร่างกายจะมีระบบกำจัดอนุมูลอิสระ แต่หากร่างกายได้รับสารอนุมูลอิสระจากภายนอก เช่น ได้รับจากอาหารบางชนิดจากขบวนการประกอบอาหาร เช่น การย่างเนื้อสัตว์ที่มีไขมันประกอบสูง การนำน้ำมันที่ใช้ทอดอาหารที่อุณหภูมิสูง ๆ มาใช้อีกหรือจากสิ่งแวดล้อม เช่น แสงอาทิตย์ซึ่งมีรังสีอัลตราไวโอเล็ต การแผ่รังสี รังสีเอ็กซ์ หรือจากมลพิษ เช่น คาร์บอนหรือ ก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์จากไอเสียรถยนต์มากเกินไป หรือในภาวะที่ร่างกายสามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้ลดลง ก็จะทำให้มีอนุมูลอิสระมากเกินไป เป็นสาเหตุของโรคภัยได้ (Herzberg, 1971) อนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้องกับอนุมูล มีบทบาทในทางชีวภาพแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่คือกลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive oxygen species, ROS) กลุ่มที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive nitrogen species, RNS) กลุ่มที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive chlorine species, RCS) สารบางชนิดจัดอยู่ได้ 2 กลุ่มเช่น เปอร์ออกซิไนไตรท์ ( $\text{ONOO}^-$ ) (โอภา และคณะ, 2550)

## 2.4 สาร $\gamma$ -oryzanol

$\gamma$ -oryzanol เป็นสารที่มีอยู่ประมาณร้อยละ 80 ในน้ำมันรำข้าวโดยครั้งแรกสันนิษฐานว่าเป็นองค์ประกอบเดียว แต่ต่อมาก็ถูกค้นพบว่าเป็นสารประกอบเชิงซ้อนโดยมี cycloartenyl ferulate, 24-methylenecycloartanyl ferulate, sitosteryl ferulate และ campesteryl ferulate เป็น 4 โครงสร้างหลัก (Ohara และคณะ, 2011)  $\gamma$ -oryzanol ที่พบในน้ำมันรำข้าวยังมีความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระ โดยพบว่า  $\gamma$ -oryzanol เป็นสารที่มีความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระได้มากกว่าวิตามินอีถึง 4 เท่า โดยคุณสมบัติในการต้านสารอนุมูลอิสระของ  $\gamma$ -oryzanol อาจเป็นเพราะมีโครงสร้างของ ferulic acid หรือกรดฟีโนลิก และ  $\gamma$ -oryzanol เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีความสามารถในการลดคอเลสเตอรอลในเลือด ลดการดูดซึมคอเลสเตอรอล และลดแข็งตัวของเกล็ดเลือด และ  $\gamma$ -oryzanol เป็นหนึ่งในองค์ประกอบของสารที่มีแนวโน้มนำมาใช้ทางด้านเภสัชโภชนศาสตร์ (อาหารเสริม) เภสัชและเวชสำอาง การแยกส่วนประกอบ  $\gamma$ -oryzanol ในน้ำมันรำข้าวสามารถแยกได้โดยใช้ high performance liquid chromatography (HPLC)



รูปที่ 2.1 แสดงลักษณะ 4 โครงสร้างหลักทางเคมีของสาร  $\gamma$ -oryzanol  
(ที่มา : Ohara และคณะ, 2011)

#### 2.4.1 คุณสมบัติของ $\gamma$ -oryzanol ต่อสุขภาพมนุษย์

##### 1. เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)

Antioxidant หรือ สารต้านอนุมูลอิสระคือสารที่สามารถยับยั้ง หรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดอนุมูลอิสระ (free radical) โดยอนุมูลอิสระเกิดขึ้นตามชาติในกระบวนการเมตาบอลิซึมภายในเซลล์ ซึ่งอนุมูลอิสระเป็นสาเหตุที่ทำให้ผนังเซลล์ โครงสร้างเซลล์ และสารพันธุกรรมเสียหายได้ แต่ในร่างกายมนุษย์มีวิตามินอีซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพในปริมาณมาก วิตามินอีจึงถูกใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกาย ส่วน  $\gamma$ -oryzanol พบในน้ำมันรำข้าวและมีแนวโน้มนำมาเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ หมู่ฟังก์ชันในสาร  $\gamma$ -oryzanol มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เพราะมีโครงสร้างของ ferulic acid โดย ferulic acid เป็นสารประกอบประเภท phenolic

##### 2. ผลต่อคอเลสเตอรอล (Cholesterol)

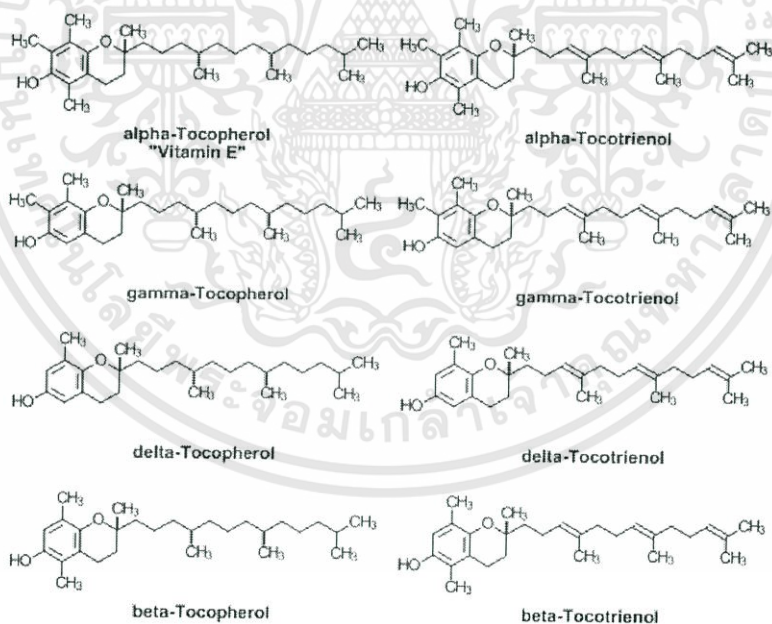
คุณสมบัติหนึ่งที่สำคัญของ  $\gamma$ -oryzanol คือมีคุณสมบัติช่วยลดคอเลสเตอรอลโดยทำการศึกษาทั้งในมนุษย์และสัตว์พบว่าน้ำมันรำข้าวมีคุณสมบัติช่วยลดปริมาณไขมัน low-density lipoprotein cholesterol (LDL) และคอเลสเตอรอลรวม (total serum cholesterol) และเพิ่ม high-density lipoprotein cholesterol (HDL) โดยมีการดูดซึมคอเลสเตอรอลที่อยู่ในอาหารที่เรารับประทาน (Dietary Cholesterol) หรือเปลี่ยนคอเลสเตอรอลให้เป็น fecal bile acids และสเตอรอล (Patel และคณะ, 2004 และ ORYZA OIL และ FAT CHEMICAL CO., LTD, 2010)

## 2.5 วิตามินอี (Vitamin E)

วิตามินอีหมายถึงสารประกอบทางเคมีในกลุ่ม tocopherols และ tocotrienols ซึ่งเป็นที่ยอมรับโดยทั่วไปว่าเป็นสารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิชนิดละลายได้ในลิพิด (primary lipid-soluble antioxidant) ที่พบในมนุษย์และต้านอนุมูลอิสระโดยใช้กลไกพื้นฐาน 2 วิธี คือ

1. การหยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (chain-breaking electron donor (CBD))
2. chain-breaking acceptor (CB-A) (Mircea Oroian และ Isabel Escriche, 2015)

วิตามินอี เป็นชื่อเรียกรวม ๆ ของของสารในกลุ่ม tocopherols ประกอบด้วย  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -tocopherol และ  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -tocotrienol รวม 8 ชนิด สารเหล่านี้ต้องได้รับจากภายนอกร่างกายจึงจัดเป็นวิตามิน โดยที่  $\alpha$ -tocopherol เป็นสารที่มีการศึกษากันมาก เป็นสารที่ถูกดูดซึมเข้าร่างกายได้ดีที่สุด  $\alpha$ -tocopherol เชื่อว่ามีบทบาทสำคัญมากที่สุดในการป้องกันเมมเบรนจากการถูกออกซิไดซ์ด้วยการจับทำลายฤทธิ์ของ ROS ได้แก่ lipid peroxy radical ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา lipid peroxidation  $\alpha$ -tocopherol ทำปฏิกิริยาเกิดเป็น tocopheryl radical ที่สามารถถูกรีดิซ์ ด้วย ascorbate, retinol หรือ ubiquinol ให้ได้  $\alpha$ -tocopherol กลับมาใช้งานใหม่บทบาทของ  $\alpha$ -tocopherol ยังเชื่อว่าเป็นสารส่งสัญญาณภายในเซลล์ ส่วน tocotrienol นั้นแม้มีรายงานว่ามีความสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชันสูงกว่า  $\alpha$ -tocopherol แต่บทบาทในร่างกายยังไม่ทราบแน่ชัด



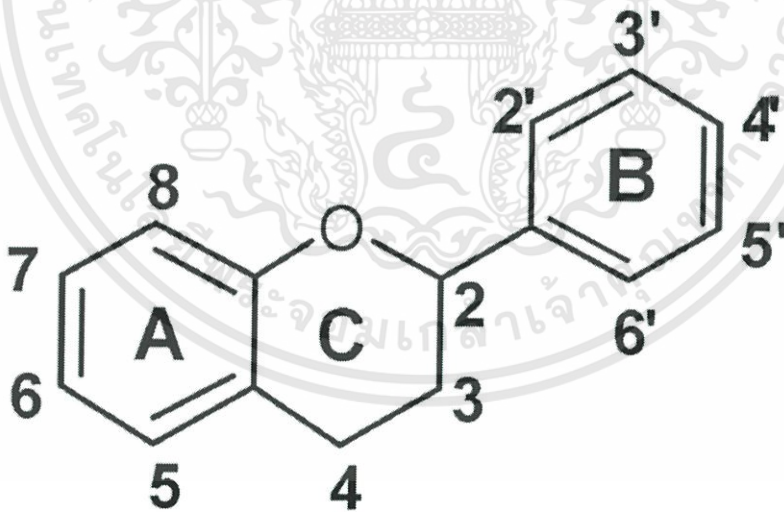
รูปที่ 2.2 แสดงลักษณะ 6 โครงสร้างทางเคมีของสารอนุพันธ์ของวิตามินอี  
(ที่มา : [www.vita-dose.com/benefits-of-vitamin-e.html](http://www.vita-dose.com/benefits-of-vitamin-e.html))

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้拿去ใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$\alpha$ -tocopherol สามารถยับยั้งการออกซิเดชันของ LDL และต้านออกซิเดชัน และยังมีฤทธิ์ antiplatelet ดังนั้นจึงมีบทบาทสำคัญในการป้องกันโรคหัวใจและหลอดเลือดทั้งหลายรวมทั้งมะเร็ง การศึกษาการป้องกันระบบไหลเวียนเลือด พบว่าการรับประทาน ascorbate (1 กรัมต่อวัน) และ  $\alpha$ -tocopherol (400 IU ต่อวัน) ในขนาดสูงมีผลปรับปรุงการทำงานของหลอดเลือด ลดภาวะ endothelial dysfunction ลดภาวะ arterial stiffness ในผู้ป่วยความดันเลือดสูง โดยมีความสัมพันธ์กับการลดภาวะเครียดออกซิเดชัน นอกจากนี้การได้รับ  $\alpha$ -tocopherol มีผลป้องกัน ischemic reperfusion injury ต่อดับเหมือนกับการทำ ischemic preconditioning 6 ขนาดที่แนะนำรับประทาน โดย Food and Nutrition Board (FNB) สำหรับเด็กโตขึ้นไปในรูป  $\alpha$ -tocopherol ขนาด 15 มิลลิกรัม หรือ 22.4 IU (วีรพล, 2014)

## 2.6 สารฟลาโวนอยด์

ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) จัดเป็นสารประกอบในกลุ่มโพลีฟีนอล (polyphenolic compounds) และสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่พบได้ในธรรมชาติมีมากกว่า 4,000 ชนิด โดยมีโครงสร้างพื้นฐานเป็นฟีนิลเบนโซไพโรน (phenylbenzopyrone) ซึ่งมีโมเลกุลขนาดเล็กและมีโครงสร้างประกอบด้วยการจัดเรียงตัวของคาร์บอน 15 ตัว (C6 - C3 - C6) เป็นวงแหวน 3 วง ได้แก่ วงแหวนเบนซีน (benzene ring) 2 วง (A and B) เชื่อมต่ออยู่กับวงแหวนไพแรน (heterocyclicpyran ring) ซึ่งอยู่ตรงกลางของโครงสร้าง (C)



รูปที่ 2.3 โครงสร้างพื้นฐานของฟลาโวนอยด์  
(ที่มา : Milvia Luisa Racchi, 2013)

สามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยตามโครงสร้างเคมีได้ 7 กลุ่ม ได้แก่

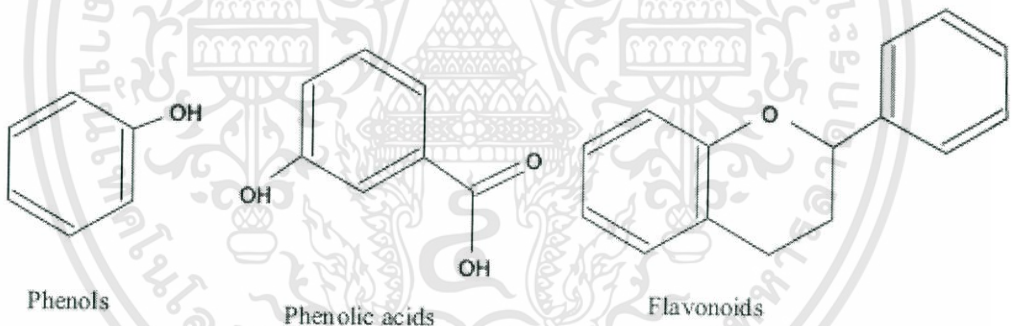
1. ฟลาโวนอล (flavonols) เช่น เควอซิทิน (quercetin), แคมป์เฟอร์อล (kaempferol), ไมริซิ-  
ติน (myricetin)
2. ฟลาโวน (flavones) เช่น ลูทีโอลิน (luteolin), อาพิจินิน (apigenin), ไครซิน (chrysin)
3. ฟลาวาโนน (flavanones) เช่น เฮสเพอริติน (hesperetin), นารินจินิน (naringenin), อีริ-  
โอดิคทืออล (eriodictyol)
4. ฟลาวานอล (flavanols) เช่น แคทชิน (catechin), แกลโลแคทชิน (gallocatechin), อีพิ-  
แคทชิน(epicatechin), อีพิแกลโลแคทชิน (epigallocatechin), อีพิแคทชิน-3-แกลเลต  
(epicatechin-3-gallate), และอีพิแกลโลแคทชิน-3-แกลเลต (epigallocatechin-3-  
gallate)
5. ฟลาวานอนอล (flavanonols) เช่น แทกซิโฟลีน (taxifolin)
6. ไอโซฟลาโวน (isoflavones) เช่น เดดซีน (daidzein), จินิสเติน (genistein), ไกลซิเติน  
(glycitein), ฟอร์โมนอนเนติน (formononetin)
7. แอนโทไซยานิดิน (anthocyanidins) เช่น ไซยานิดิน (cyanidin), เดลฟินิดิน (delphinidin),  
มาลวิดิดิน (malvidin), เพลาร์โกนินิดิน (pelargonidin), พีโอนิดิน (peonidin), พีทูนิดิน  
(petunidin)

ฟลาโวนอยด์เป็นสารเมแทบอลิท์ชั้นทุติยภูมิในพืชสร้างจากกรดอะมิโนที่มีวงแหวน (aromatic amino acids) ได้แก่ phenylalanine, tyrosine และ malonate โดยทำหน้าที่เป็นสารให้สีที่สำคัญในพืช ช่วยในการกรองรังสีอัลตราไวโอเล็ตและการช่วยตรึงไนโตรเจน ฟลาโวนอยด์พบได้ในผักผลไม้ ธัญพืช พืชตระกูลถั่ว เครื่องเทศ สมุนไพร ลำต้น กิ่งก้านดอก และเมล็ด รวมถึงเครื่องดื่มบางชนิด เช่น ชา โกโก้ เบียร์และไวน์ เป็นต้นฟลาโวนอยด์ที่พบในพืชส่วนใหญ่อยู่ในรูปที่จับอยู่กับน้ำตาลในรูปเบต้าไกลโคไซด์ ( $\beta$ -glycosides) ในระบบทางเดินอาหารฟลาโวนอยด์จะถูกละลายโดยน้ำย่อยและถูกดูดซึมที่ลำไส้เล็กเป็นส่วนใหญ่ ส่วนฟลาโวนอยด์ที่ไม่ถูกดูดซึมที่ลำไส้เล็กและฟลาโวนอยด์ที่ถูกดูดซึมแล้วถูกขับออกทางน้ำดีจะเข้าสู่ลำไส้ใหญ่และถูกสลายโดยจุลินทรีย์บางชนิดทำให้ได้กรดฟีนอลิกซึ่งจะถูกดูดซึมกลับเข้ากระแสเลือดอีกครั้ง โดยฟลาโวนอยด์ที่อยู่ในกระแสเลือดก็จะไปยังเนื้อเยื่อของอวัยวะต่าง ๆ ทั่วร่างกาย และสามารถถูกกำจัดได้ทางไต โดยที่เซลล์ของเนื้อเยื่อต่าง ๆ ฟลาโวนอยด์อาจผ่านกระบวนการเมแทบอลิซึมหรือเปลี่ยนแปลงโครงสร้างซึ่งอาจทำให้ฤทธิ์ทางชีวภาพเปลี่ยนแปลงไปได้ (วิภพ, 2556)

## 2.7 สารประกอบฟีนอลิก

สารประกอบฟีนอลหรือสารประกอบฟีนอล เป็นสารที่พบตามธรรมชาติในพืชหลายชนิด เช่น ผัก ผลไม้ เครื่องเทศ สมุนไพร ถั่วเมล็ดแห้ง เมล็ดธัญพืช ซึ่งถูกสร้างขึ้นเพื่อประโยชน์ในการเจริญเติบโต สารประกอบฟีนอลมีโภชนเภสัช ซึ่งสรรพคุณที่ดีต่อสุขภาพคือ มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสามารถละลายได้ในน้ำสารประกอบฟีนอล มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนที่เป็นอนุพันธ์ของวงแหวนเบนซีน มีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH group) อย่างน้อยหนึ่งหมู่ต่ออยู่ สารประกอบฟีนอลพื้นฐานคือสารฟีนอล (phenol) ในโมเลกุลประกอบด้วยวงแหวนเบนซีน 1 วง และหมู่ไฮดรอกซิล 1 หมู่

สารประกอบฟีนอลที่พบในธรรมชาติมีมากมายหลายชนิด และมีลักษณะสูตรโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกันตั้งแต่กลุ่มที่มีโครงสร้างอย่างง่าย เช่น กรดฟีนอลิก ไปจนถึงกลุ่มที่มีโครงสร้างเป็นพอลิเมอร์ เช่น ลิกนิน กลุ่มใหญ่ที่สุดที่พบคือสารประกอบฟลาโวนอยด์ (flavonoid) สารประกอบฟีนอลที่พบในพืชมักจะรวมอยู่ในโมเลกุลของน้ำตาลในรูปของสารประกอบไกลโคไซด์ (glycoside) น้ำตาลชนิดที่พบมากที่สุดในโมเลกุลของสารประกอบฟีนอลคือ น้ำตาลกลูโคสและพบว่าอาจมีการรวมตัวกันระหว่างสารประกอบฟีนอลด้วยกันเอง หรือสารประกอบฟีนอลกับสารประกอบอื่น ๆ เช่น กรดอินทรีย์ (organic acid) รวมอยู่ในโมเลกุลของโปรตีน แอลคาลอยด์ (alkaloid) และเทอร์พีนอยด์ (terpenoid) เป็นต้น



รูปที่ 2.4 โครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกโดยทั่วไป  
(ที่มา : Afam และคณะ, 2014)

## 2.8 สารต้านอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ (free radical หรือ oxidant) คือ โมเลกุลหรือไอออนที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวอยู่รอบนอกเป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียรและมีความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมีในลักษณะเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลต่าง ๆ ที่อยู่รอบข้างในทันทีที่ถูกสร้างขึ้น ส่งผลให้เกิดความเสียหายแก่องค์ประกอบต่าง ๆ ของเซลล์ภายในร่างกาย ไม่ว่าจะเป็นการทำลายโครงสร้างดีเอ็นเอ (DNA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเปลี่ยนสภาพโปรตีนและไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์ หรือการสร้างพันธะโควาเลนต์ (covalent bond) กับโปรตีนหรือเอนไซม์บางชนิดจนทำให้การทำงานของโปรตีนหรือเอนไซม์เหล่านั้นผิดปกติเป็นสาเหตุสำคัญของโรคหลายชนิดอนุมูลอิสระ เกิดจากผลพลอยได้จากการใช้ออกซิเจนของกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ รวมทั้งปัจจัยจากสิ่งแวดล้อมภายนอก ได้แก่ มลพิษ การติดเชื้อโรครังสียูวี โอโซน ควันจากท่อไอเสียรถยนต์ และควันบุหรี่ อนุมูลอิสระเหล่านี้สามารถถูกกำจัดหรือลดความรุนแรงด้วยสารที่เรียกว่า สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) ที่สามารถจับกับอนุมูลอิสระ แล้วเกิดเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ที่เสถียรกว่า ทำให้หยุดการเกิดอนุมูลอิสระตัวใหม่ได้ โดย สารต้านอนุมูลอิสระคือสารปริมาณน้อยที่สามารถป้องกันหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลอิสระได้ สารเหล่านี้มีกลไกในการต้านอนุมูลอิสระหลายแบบ เช่น ดักจับอนุมูลอิสระโดยตรง ยับยั้งการสร้างอนุมูลอิสระหรือเข้าจับกับโลหะเพื่อป้องกันการสร้างอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระ เป็นสารประกอบที่ทนต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในเซลล์โดยทั่วไป สารต้านอนุมูลอิสระสามารถพบได้ในธรรมชาติจากสารหลายชนิด เช่น สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) สารประกอบไนโตรเจน และแคโรทีนอยด์

บทบาทสำคัญของสารต้านอนุมูลอิสระคือ ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกาย ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่าง ๆ ของมนุษย์ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันที่เป็นสาเหตุหลักของการเสื่อมคุณภาพในอาหาร ปัจจุบันองค์กรที่เกี่ยวข้องในอุตสาหกรรมอาหารและยาได้พยายามพัฒนาสารต้านอนุมูลอิสระที่มาจากธรรมชาติเช่น สาหร่ายทะเล แบคทีเรีย เชื้อรา และพืชชั้นสูงอย่างไรก็ตามในภาวะปกติร่างกายของคนเรา จะมีการป้องกันการสะสมสารอนุมูลอิสระอยู่แล้วซึ่งแบ่งออกเป็นสองส่วนคือ ส่วนแรกเกิดจากร่างกายสร้างเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระขึ้นมาควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในภาวะที่สมดุล และส่วนที่สองคือ กลุ่มของสารต้านอนุมูลอิสระที่มาจากวิตามินเอ ซี อี หรือ เบต้าแคโรทีนรวมทั้งสารประกอบโพลีฟีนอล ซึ่งเป็นพฤษเคมีที่สามารถพบได้ในพืชผักและผลไม้ เพื่อเข้าไปช่วยเสริมสร้างระบบการต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกายให้มีประสิทธิภาพในการทำลายอนุมูลอิสระได้ดียิ่งขึ้น ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระที่พบในร่างกาย เช่น เอนไซม์คะตาเลส (catalase), กลูตาไธโอนเพอรอกซิเดส (glutathione peroxidase) และซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dismutase) หรือสารประกอบโปรตีนบางอย่าง เช่น อัลบูมิน (albumin), บิลิรูบิน (bilirubin), เซอรูโลพลาสมิน (ceruloplasmin), กลูตาไธโอน (glutathione), ทรานสเฟอริน (transferrin), ยูบิควินอล (ubiquinol) และยูเรต (urate) เป็นต้น สารเหล่านี้มีหน้าที่คอยควบคุมอนุมูลอิสระต่าง ๆ ให้อยู่ในระดับพอเหมาะ แต่ถ้ามืดที่มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นในปริมาณมากเกินไปที่ระบบป้องกันจะยับยั้งได้หมดจะทำให้เกิดสภาวะที่เรียกว่า “oxidative stress” ขึ้นภายใต้สภาวะดังกล่าวอนุมูลอิสระจะทำอันตรายต่ออวัยวะและเนื้อเยื่อ

ต่าง ๆ ของร่างกาย ซึ่งถ้าสะสมมาก ๆ อาจนำไปสู่ความผิดปกติหลายอย่าง (เจนจิรา และประสงค์, 2554)

## 2.9 การสกัดสารต้านอนุมูลอิสระด้วยตัวทำละลาย

การสกัดด้วยตัวทำละลาย เป็นการใช้ตัวทำละลาย (solvent) เพื่อสกัดหรือแยกสารประกอบที่ต้องการออกจากของผสม โดยในการสกัดด้วยตัวทำละลายอาศัยปัจจัยเรื่องสมดุลเคมี (chemical equilibrium) ของสารประกอบระหว่างเฟสของตัวถูกละลายและตัวทำละลาย หลักการของการสกัดคือ ใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมเข้าไปละลายสารที่ต้องการออกมา แบ่งได้ 3 วิธีคือ

- 1) Solid/Liquid Extraction เป็นการใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมละลายสารที่ต้องการออกมาจากสารผสมซึ่งเป็นของแข็งการสกัดแบบนี้มีหลักการไม่แตกต่างจากการหาตัวทำละลายเพื่อตกผลึกสาร
- 2) Liquid/Liquid Extraction เป็นการใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมละลายสารที่ต้องการออกมาจากสารผสมซึ่งเป็นของเหลว
- 3) Acid/Base Extraction เป็นการใช้ปฏิกิริยากรดเบสเพื่อแยกสารอินทรีย์ที่มีสมบัติเป็นกรดแก่กรดอ่อนกลางและเบสออกจากกัน (สุภาพ และคณะ, 2540)

และตัวทำละลายควรมีคุณสมบัติดังต่อไปนี้

- 1) มีประสิทธิภาพสูงในการละลายตัวถูกละลายที่จะแยกได้ดี
- 2) ละลายสารประกอบที่ต้องการได้ในปริมาณมากและละลายสารประกอบอื่นได้น้อย
- 3) เสถียรทางเคมี (ไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการสกัด)
- 4) สามารถแยกออกมาจากสารที่ต้องการได้
- 5) ควรเสถียรทางเคมี (ไม่เสียสภาพเมื่อทำปฏิกิริยากับสารประกอบ)
- 6) สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้
- 7) ความหนืดต่ำ

คุณสมบัติความมีขั้วเป็นคุณสมบัติที่เห็นได้ชัดของตัวทำละลาย โดยโมเลกุลมีคุณสมบัติเป็นไดโพล (electric dipole) และอะตอมมีค่า electronegativities ที่แตกต่างกัน เมื่อของเหลวที่ไม่มีขั้วเข้ามาในสนามไฟฟ้า จะมีเพียงอิเล็กตรอนในอะตอมเท่านั้นที่ตอบสนองต่อไฟฟ้าภายนอกเป็นผลให้เกิดอะตอมมิโกลาไรเซชัน (atomic polarization) ซึ่งการสร้างค่าความนำสนามไฟฟ้าสัมพัทธ์ (relative permittivity) นี้ทำให้เกิดโมเลกุลที่มีขั้ว และอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุล (Intermolecular Interactions) ระหว่างโมเลกุลของตัวทำละลายและตัวถูกละลายสามารถกำหนดความสามารถในการละลายเข้าด้วยกัน (Mutual solubility) ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอทานอลเป็นตัวทำละลายหนึ่งที่น่าิยมใช้ในการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากมีราคาถูก นำกลับมาใช้ใหม่ได้ ไม่เป็นพิษ และสารสกัดสามารถนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้ การสกัดสารฟีนอล ด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ สามารถแยกฟีนอลิกออกมาได้โดยใช้คุณสมบัติของการมีขั้ว และในการสกัดฟีนอลิกโดยใช้ความเข้มข้นของเอทานอลที่สูงจะให้ค่าผลได้ของฟีนอลิกสูงกว่า รวมทั้งกรดไฮดรอกซีซินนามิก (Hydroxycinnamic Acid) ฟลาโวนอยด์ (flavonols) และ o-diphenols

เมทานอลมีราคาถูกกว่าเอทานอล แต่ไม่นิยมเนื่องจากมีความเป็นพิษมากกว่าเอทานอล จึงไม่สามารถนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้ ในทางตรงกันข้ามสาร carotenoids เช่น ไลโคปีนในมะเขือเทศสามารถละลายในไขมันได้ดีกว่า ดังนั้นจึงควรเลือกใช้ตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว ซึ่งในกรณีนี้ตัวทำละลายควรจะต้องเอาออกจากสารสกัดให้หมดก่อนนำไปใส่ในผลิตภัณฑ์อาหาร ซึ่งในการสกัดสารฟีนอล แคโรทีนอยด์ และสารที่ให้กลิ่น บางครั้งต้องใช้กระบวนการใช้ความดัน (pressurized process) และกระบวนการกลั่นร่วมด้วย ซึ่งจะช่วยให้กระบวนการในการสกัดที่ระเหยง่าย (volatile compounds) ได้การใช้ตัวทำละลายสกัดสารต้านอนุมูลอิสระ สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดได้โดยใช้อุณหภูมิ โดยที่อุณหภูมิสูงจะมีสัมประสิทธิ์การแพร่ (diffusion coefficient) สูงกว่า แต่ปัญหาที่สำคัญในการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระคือการเก็บรักษา เนื่องจากสารต้านอนุมูลอิสระจะมีคุณสมบัติคงที่เพียงช่วงหนึ่ง (Mircea และคณะ, 2015)

## 2.10 การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Assay

DPPH หรือ 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate เป็นสารอนุมูลอิสระ (free radical) ที่นำมาใช้วิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้หลักการถ่ายเทอิเล็กตรอน (electron-transfer) ที่ทำให้ได้สารละลายสีม่วงในเอทานอล ซึ่งสารอนุมูลอิสระนี้เสถียรที่อุณหภูมิห้องและทำให้โมเลกุลสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ลดลง ส่งผลให้สีของสารละลายสีม่วงจางลง วิธีนี้เป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็วเมื่อใช้วิธีการเทียบความทึบแสง (Spectrophotometry) สามารถประเมินตัวอย่างได้หลากหลายในเวลาเดียวกัน (Eugenio และคณะ, 2012)

วิธี DPPH เป็นวิธีที่ทั่วไปที่ใช้วัดสารต้านอนุมูลอิสระในเมล็ดข้าวสาลี รำข้าว พืชผัก conjugated linoleic acids สมุนไพร น้ำมันจากเมล็ดพืช และแป้ง ในตัวทำละลายต่าง ๆ เช่น เอทานอล อะซีโตน เมทานอล สารละลายแอลกอฮอล์ และเบนซีน DPPH มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 นาโนเมตรในเมทานอล หลักการคือ DPPH จะรับอะตอมไฮโดรเจนจากโมเลกุลสารต้านอนุมูลอิสระ เป็นผลให้เกิดการรีดักชัน DPPH เป็น DPPH<sub>2</sub> เปลี่ยนสารละลายสีม่วงให้เป็นสีเหลือง (Krishnan และคณะ, 2012)



เมื่อพิจารณางานวิจัยต่าง ๆ ที่ผ่านมา มีหลายกลุ่มงานวิจัยที่ใช้วิธีการทดลองที่แตกต่างกันเช่น ความเข้มข้นของ DPPH ใช้ตั้งแต่ 22.5 ถึง 250 ไมโครโมล บ่มที่เวลา 5 นาทีถึง 60 นาที ปฏิกริยาของตัวทำละลาย และ pH ซึ่งที่ความเข้มข้นของ DPPH สูงจะให้ค่าการดูดกลืนแสงที่มีความแม่นยำมากกว่าผลของสภาวะที่แตกต่างกันนี้ทำให้การหาค่า IC<sub>50</sub> จากสารมาตรฐานวิตามินซี (ascorbic acid) และสาร butylated hydroxytoluene (BHT) มีความแปรปรวนอย่างมาก ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่จะเปรียบเทียบผลจากการทดลองที่มีสภาวะที่แตกต่างกันได้ นอกจากนี้ แสง ออกซิเจน และ pH มีผลต่อค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH ด้วย (Sharma และ Bhat, 2009)

$$\% \text{Radical Scavenging} = [ (AB - AA) / AB ] \times 100$$

เมื่อ AA = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารตัวอย่างผสมกับ DPPH

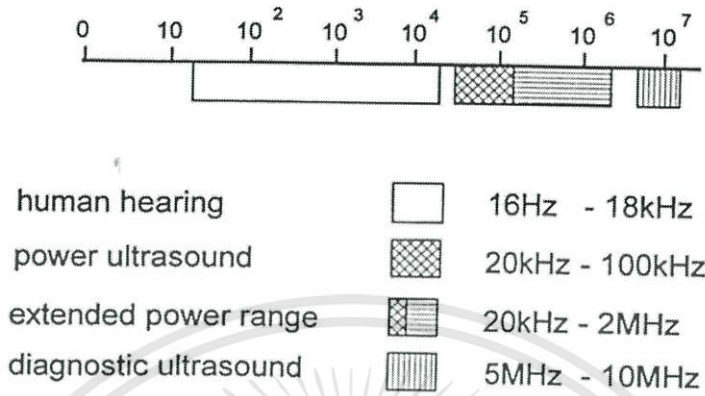
AB = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารละลาย DPPH

การศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชัน ในสารตัวอย่างนิมรายนเป็นค่า 50% effective concentration (EC<sub>50</sub>) ซึ่งหมายถึงปริมาณสารต้านออกซิเดชันที่ทำให้ความเข้มข้นของ DPPH ลดลง 50% โดยสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารตัวอย่างกับค่าการดูดกลืนแสง แล้วหาค่า EC<sub>50</sub> จากกราฟแสดงค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่สามารถทำให้ความเข้มข้นของ DPPH ลดลง 50% แล้วใช้ค่า EC<sub>50</sub> ในการเปรียบเทียบความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระระหว่างตัวอย่างที่ทดสอบกับสารมาตรฐาน BHT คำนวณ % Radical Scavenging (เปอร์เซ็นต์การออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ) (พรณิ, 2550)

## 2.11 คลื่นอัลตราโซนิค (Ultrasonic waves)

คลื่นอัลตราซาวด์หรือคลื่นอัลตราโซนิค (ultrasonic waves) เป็นพลังงานที่เกิดจากคลื่นเสียงที่มีการสั่นของคลื่นประมาณ 20,000 ครั้งต่อวินาทีหรือสูงกว่า (Hoover, 2000) หรือหมายถึงคลื่นความดัน (pressure waves) ที่มีความถี่ (frequency) สูงกว่าคลื่นเสียงปกติ (สูงกว่า 20,000 กิโลเฮิร์ตซ์, kHz) ส่วนคำว่าอัลตราโซนิคส์ (ultrasonics) หรือโซนิเคชันส์ (sonications) หมายถึงการศึกษาเกี่ยวกับคลื่นเสียงหรืออัลตราซาวด์ในช่วงความถี่ดังกล่าวซึ่งมนุษย์ไม่สามารถได้ยินโดยทั่วไปแล้วคลื่นเสียงที่มนุษย์ได้ยินนั้นเกิดจากการสั่นสะเทือนของตัวกลางที่ยืดหยุ่นที่มีความถี่อยู่ในช่วง 20 – 20,000 kHz คลื่นเสียงจะผ่านเข้าสู่ตัวกลางที่ยืดหยุ่นในลักษณะที่เป็นคลื่นตามยาว (longitudinal waves) แต่คลื่นเสียงที่ผ่านเข้าไปภายในวัตถุที่เป็นของแข็งอาจอยู่ในลักษณะที่เป็นคลื่นตามยาวหรือคลื่นตามขวาง (transverse

waves) ในการศึกษาการใช้ประโยชน์จากอัลตราซาวนด์ตั้งแต่ต้นจนถึงปัจจุบันพบว่ามี การนำอัลตราซาวนด์ มาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมหรือในกระบวนการแปรรูปอาหาร (Mason, 1998)



รูปที่ 2.5 ความถี่ของคลื่นอัลตราโซนิกในช่วงต่าง ๆ (ที่มา : Mason, 1998)

## 2.12 ระบบอัลตราโซนิก

การสกัดด้วยระบบอัลตราโซนิกเป็นการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงในการเข้าไปทำปฏิกิริยากับ เมทริกซ์ของของแข็งเพื่อชะสารที่ต้องการออกมา ดังนั้นการวางระบบและการออกแบบระบบการสกัด ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกจึงมีความสำคัญ โดยสรุปแล้วระบบอัลตราโซนิกจะต้องมีอุปกรณ์ที่สำคัญและจำเป็น อยู่ 3 ส่วนได้แก่

### 1) เครื่องกำเนิดกระแสไฟฟ้า (generator)

เป็นการเปลี่ยนกระแสไฟฟ้ากระแสตรงไปเป็นกระแสสลับที่ความถี่ที่ต้องการและผ่านเข้าสู่ ทรานส์ดิวเซอร์

### 2) ทรานส์ดิวเซอร์ (transducer)

ทำหน้าที่เปลี่ยนไฟฟ้ากระแสสลับความถี่สูงไปเป็นการสั่นเนื่องจากพลังงานกลทรานส์ดิวเซอร์ที่ นิยมในปัจจุบันคือชนิดที่ใช้เทคโนโลยีพีโซอิเล็กทริกโดยที่รูปร่างและขนาดของทรานส์ดิวเซอร์ที่นำมา ประกอบกันจะขึ้นอยู่กับความถี่ที่ต้องการใช้งานและพลังงานจากทรานส์ดิวเซอร์แต่ละชนิดจะแปรผกผันกับ กำลังสองของความถี่ ดังนั้นในการประยุกต์ใช้ฟาวเวอร์อัลตราซาวนด์จึงมักใช้ในช่วงความถี่ต่ำโดยตัว

ทรานส์ดีวเซอร์จะอยู่ติดกับบูสเตอร์ (booster) หรือฮอร์น (horn) ด้านบนและเชื่อมต่อกับระบบส่งถ่ายพลังงาน

### 3) ระบบส่งถ่ายพลังงาน (delivery systems)

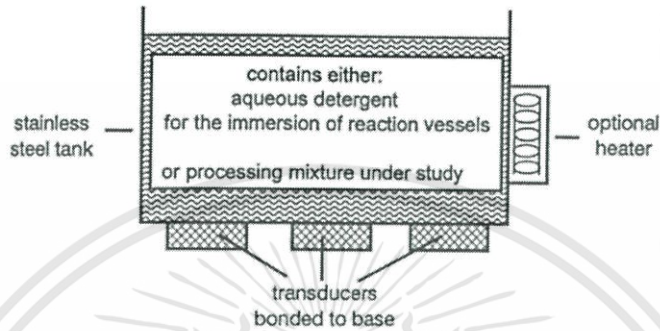
ซึ่งจะทำหน้าที่ส่งถ่ายพลังงานจากการสั่นสะเทือนไปยังของเหลวในกรณีที่เป็นอ่างอัลตราโซนิก (ultrasonic bath) ตัวทรานส์ดีวเซอร์จะอยู่บริเวณฐานตรงด้านล่างของตัวอ่างหรือถังและส่งถ่ายพลังงานโดยตรงไปยังของเหลวที่อยู่ภายในอ่าง ส่วนระบบที่ต้องการพลังงานที่สูงกว่านี้จะใช้วิธีขยายสัญญาณหรือพลังงานและส่งถ่ายพลังงานไปยังของเหลวโดยใช้อุปกรณ์ที่เรียกว่าฮอร์นซึ่งเป็นแท่งโลหะที่มีรูปร่างแตกต่างกันและจะติดกับทรานส์ดีวเซอร์โดยตัวฮอร์นมักทำจากวัสดุที่ทำให้เกิดขนาดของความยาวคลื่นครึ่งหนึ่งหรือเพิ่มขึ้นเป็นจำนวนเท่าตัวของความยาวคลื่นเสียงนิยมใช้ส่วนปลายฮอร์นชนิดที่ถอดเข้าออกได้และเป็นเกลียวซึ่งสามารถเปลี่ยนได้ง่าย

## 2.13 การสกัดด้วยคลื่นอัลตราโซนิก (Ultrasonic extraction)

การสกัดด้วยคลื่นอัลตราโซนิกนิยมนำมาใช้สกัดสารกึ่งระเหย (Semi-volatile) และระเหยยาก (Non-volatile Organic Compounds) จากตัวอย่างของแข็ง เช่น ดิน ตัวอย่างชีวภาพ น้ำ หรือ อื่น ๆ โดยคลื่นอัลตราโซนิกเป็นคลื่นเสียงที่มีความถี่สูงเกินกว่าที่มนุษย์จะได้ยิน มีความถี่สูงกว่า 20 kHz ขึ้นไป สาเหตุที่มีการนำเอาคลื่นย่านอัลตราโซนิกมาใช้ก็เพราะว่าเป็นคลื่นที่มีทิศทางทำให้เราสามารถเลี้ยงคลื่นเสียงไปยังเป้าหมายที่ต้องการได้โดยเจาะจง ในวิธีการสกัดเราจะใส่ตัวทำละลายที่ใช้สกัดลงไป ตัวอย่าง (เลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมกับสารที่จะสกัดออกมา) ซึ่งขบวนการสกัดจะเป็นการสัมผัสกันระหว่างตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดและตัวอย่าง ซึ่งวิธีนี้จำเป็นที่จะต้องกำจัดความชื้นออกจากตัวอย่างก่อนเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการสกัด หลังจากนั้นจึงเติมตัวทำละลายลงไป โดยตัวอย่างจะไปแขวนลอยอยู่ในตัวทำละลาย หลังจากนั้นก็นำภาชนะที่บรรจุตัวอย่างและตัวทำละลายวางใน Ultrasonic bath คลื่นอัลตราโซนิกจะไปรบกวนและเขย่าตัวทำละลายทำให้เกิดการสั่นของโมเลกุลตัวทำละลาย เพื่อช่วยให้สารที่ต้องการวิเคราะห์ละลายออกมา (จากตัวอย่างมาสู่สารละลาย) ได้ดียิ่งขึ้นหรือบางครั้งอาจใช้ Ultrasonic probe จุ่มลงโดยตรงก็ได้ (เกศญา, 2004) เครื่องอัลตราโซนิกที่ใช้อยู่ทั่วไปในปัจจุบันมีความแตกต่างกันตรงที่การออกแบบแหล่งกำเนิดไฟฟ้า แหล่งกำเนิดคลื่นและตัวเครื่องหรือเซลล์ที่ใช้ร่วมกับแหล่งกำเนิดคลื่นโดย สามารถแบ่งเป็นชนิดต่าง ๆ ดังนี้

## 1) อ่างอัลตราโซนิก (ultrasonic baths)

อ่างอัลตราโซนิกเป็นอุปกรณ์ที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายและมีการนำมาใช้เป็นเวลานานแล้ว โดยเฉพาะในห้องปฏิบัติการเนื่องจากมีราคาไม่แพงเมื่อเปรียบเทียบกับเครื่องที่ใช้ระบบโพรบโดยทั่วไป ทรานส์ดีวเซอร์จะติดอยู่กับบริเวณฐานด้านล่างของอ่างและความถี่ที่ใช้งานส่วนใหญ่ประมาณ 40 kHz (Mason,1998)



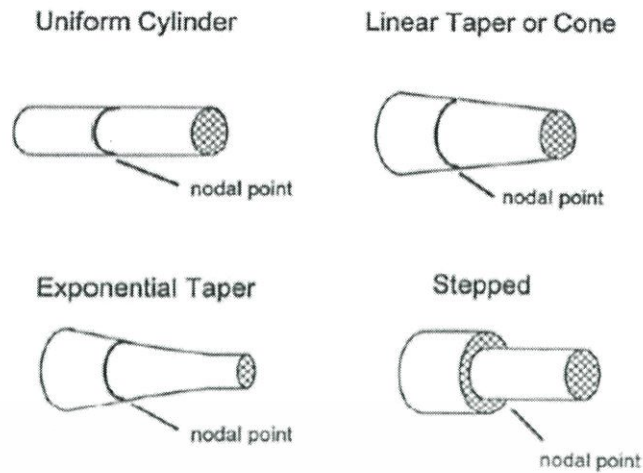
รูปที่ 2.6 อ่างอัลตราโซนิก (Ultrasonic baths)

(ที่มา : Mason, 1998)

อ่างอัลตราโซนิกนั้นมีอุปกรณ์เสริมประเภทต่าง ๆ ที่นำมาใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานให้ดีขึ้น เช่น อุปกรณ์ควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (thermostatically controlled heating) อุปกรณ์กระจายคลื่น (frequency sweeps) อุปกรณ์ปรับระดับพลังงาน สวิตช์เปิดปิดแบบจิ้งหหวะหรือนาฬิกาจับเวลา เป็นต้น อ่างอัลตราโซนิกทั่วไปมักจะให้พลังงานต่ำ เพื่อหลีกเลี่ยงความเสียหายจากแคพิเทชัน (การแตกตัวอย่างรวดเร็วในของเหลว) ที่เกิดขึ้นตรงบริเวณผนังด้านในของอ่างนอกจากนั้นของเหลวที่เติมในอ่างมักมีปริมาณมากทำให้ปริมาณพลังงานมีค่าลดลง รูปแบบของอ่างอัลตราโซนิกอีกประเภทหนึ่งเรียกว่า คัพฮอร์น (cup horn) โดยจัดว่าเป็นอ่างอัลตราโซนิกที่สร้างพลังงานได้สูงมาก ทั้งนี้เนื่องจากบริเวณผิวหน้าที่เกิดคลื่นอัลตราซาวด์ซึ่งติดอยู่กับทรานส์ดีวเซอร์จะสัมผัสโดยตรงกับของเหลวและลักษณะการทำให้เกิดพลังงานหรือคลื่นจะขึ้นอยู่กับปัจจัยที่เกี่ยวข้องและระดับของของเหลวซึ่งมีความสำคัญมาก

## 2) ระบบอัลตราโซนิกแบบโพรบ (ultrasonic probe systems)

ระบบอัลตราโซนิกแบบโพรบจะมีความแตกต่างกับอ่างอัลตราโซนิกตรงที่อ่างอัลตราโซนิกจะมีทรานส์ดีวเซอร์จะติดอยู่กับบริเวณฐานด้านล่างของอ่างและความถี่ประมาณ 40 kHz ต่างกับระบบอัลตราโซนิกแบบโพรบที่ทรานส์ดีวเซอร์จะต่อเข้ากับฮอร์นโดยตรง ซึ่งฮอร์นจะเป็นส่วนที่นำไปจุ่มลงไปในตัวตัวอย่างเพื่อสกัดและความถี่ที่ใช้ จะใช้ประมาณ 20 kHz ซึ่งฮอร์นก็จะมีลักษณะที่แตกต่างกันออกไป

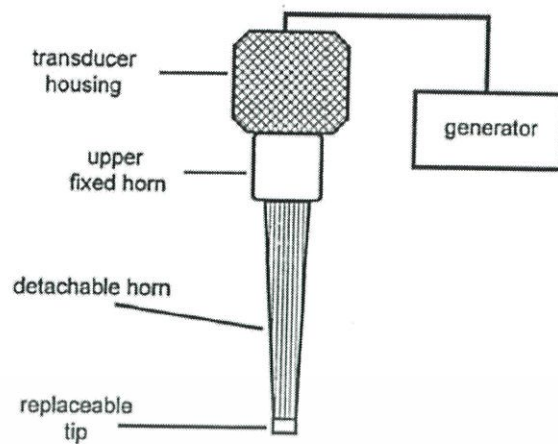


รูปที่ 2.7 ลักษณะของฮอร์นชนิดต่าง ๆ

(ที่มา : Mason, 1998)

แอมพลิจูดที่สร้างขึ้นจากระบบนี้จะขึ้นกับรูปร่างลักษณะของฮอร์นสำหรับฮอร์นที่มีลักษณะเป็นแท่งทรงกระบอก (uniform cylinder) นั้นแอมพลิจูดจะไม่มีเปลี่ยนแปลง แต่ฮอร์นจะทำหน้าที่ขยายหรือเพิ่มการส่งถ่ายพลังงานเสียง ในขณะที่ฮอร์นชนิด Stepped จะมีความสามารถในการขยายสัญญาณได้สูงกว่า

ขนาดของพลังงานสูงสุดที่ได้จากแหล่งกำเนิดพลังงานนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยที่สำคัญสองส่วน ได้แก่ คุณสมบัติของวัสดุที่ใช้ในการผลิตทรานส์ดิวเซอร์และพื้นผิวที่ปลดปล่อยคลื่น (emitting surface) ซึ่งในส่วนของวัสดุที่นำมาใช้ผลิตทรานส์ดิวเซอร์นั้น นิยมใช้วัสดุที่สามารถยืดและคืนตัวกลับได้ดี เช่นไทเทเนียม (titanium) หรืออะลูมิเนียมอัลลอย (aluminium alloy) ซึ่งวัสดุทั้งสองชนิดมีความทนต่อการล้าเนื่องจากแรงกล แต่อะลูมิเนียมอัลลอยนั้นไม่เหมาะสมที่จะสัมผัสกับของเหลวที่เกิดปฏิกิริยาแคปวิเตชัน (การแตกตัวอย่างรวดเร็วในของเหลว) เนื่องจากถูกกัดกร่อนได้ง่าย จึงควรใช้วัสดุพวกไทเทเนียมอัลลอยแทน สำหรับพื้นผิวที่ปลดปล่อยคลื่นนั้น พบว่าพื้นที่ขนาดเล็กจะให้ประสิทธิภาพที่สูงกว่า แต่ที่แอมพลิจูดสูงจะมีข้อจำกัดเนื่องจากฟองอากาศที่เกิดขึ้นบริเวณพื้นผิวหน้าจากปฏิกิริยาแคปวิเตชันจะรบกวนการส่งถ่ายของพลังงานไปยังของเหลว

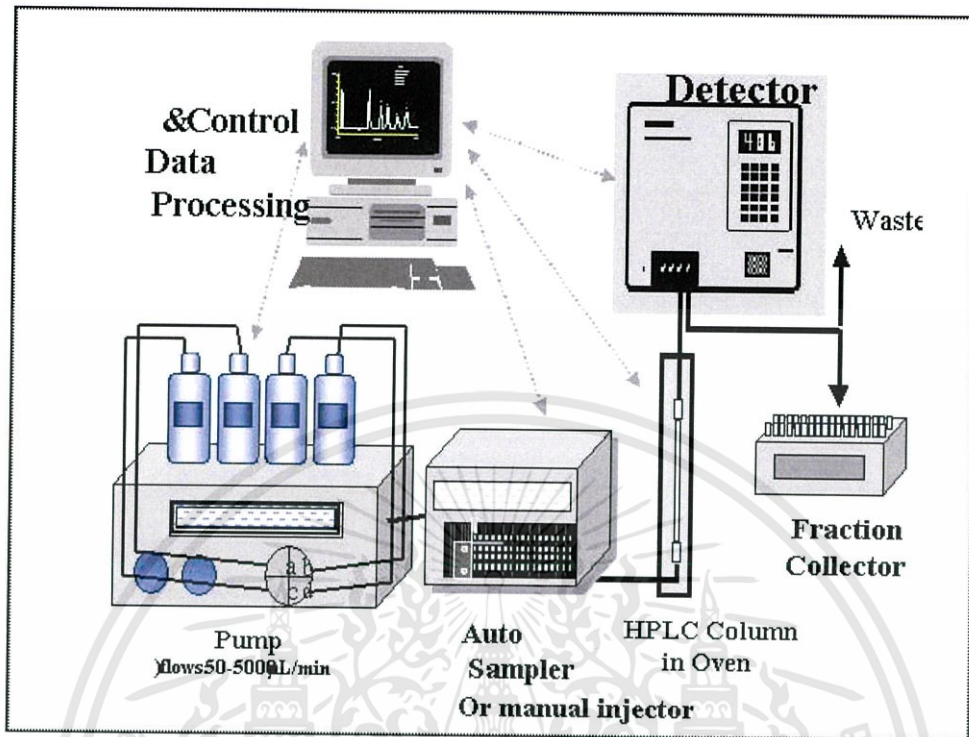


รูปที่ 2.8 ระบบอัลตราโซนิกแบบโพรบ (ultrasonic probe systems)

(ที่มา : Mason, 1998)

## 2.14 เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

เครื่อง HPLC (High Performance Liquid Chromatography) เป็นเครื่องมือใช้สำหรับแยกสารประกอบที่สนใจที่ผสมอยู่ในตัวอย่าง โดยกระบวนการแยกสารประกอบที่สนใจจะเกิดขึ้นระหว่างเฟส 2 เฟส คือ เฟสอยู่กับที่ (column) กับ เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ซึ่งสารจะถูกแยกออกมาในเวลาที่แตกต่างกัน โดยสารผสมที่อยู่ในตัวอย่างสามารถถูกแยกออกจากกันได้นั้น ขึ้นอยู่กับความสามารถในการเข้ากันได้ดีของสารนั้นกับ mobile phase หรือ stationary phase สารประกอบตัวไหนที่สามารถเข้ากันได้ดีกับ mobile phase จะเคลื่อนที่ผ่าน column ได้เร็วสารนั้นก็就会被แยกออกมาก่อน ส่วนสารที่เข้ากันได้ไม่ดีกับ mobile phase หรือเข้ากันได้ดีกับ stationary phase จะเคลื่อนที่ผ่าน column ได้ช้าก็就会被แยกออกมาทีหลัง โดยสารที่ถูกแยกออกมาได้นี้จะถูกตรวจวัดสัญญาณด้วยตัวตรวจวัด สัญญาณที่บันทึกได้จากตัวตรวจวัดจะมีลักษณะเป็นพีค ซึ่งจะเรียกว่า โครมาโทแกรมโดย HPLC สามารถทดสอบได้ทั้งเชิงคุณภาพ และทดสอบเชิงปริมาณ โดยการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน



รูปที่ 2.9 เครื่อง HPLC (High Performance Liquid Chromatography)  
(ที่มา : Shulamit Levin, 2010)

#### 2.14.1 ส่วนประกอบของเครื่อง HPLC

1) ตัวทำละลาย (Mobile Phase) ตัวทำละลายเป็นตัวแปรที่มีความสำคัญมากในการแยกสาร ตัวอย่างออกเป็นองค์ประกอบย่อย ตัวทำละลายที่ใช้เป็น Mobile Phase ใน HPLC ได้แก่ ตัวทำละลายอินทรีย์รวมทั้ง Aqueous Solution ของเกลือชนิดต่าง ๆ โดยคุณสมบัติที่สำคัญบางประการของ Mobile Phase ที่ใช้ใน HPLC คือสามารถละลายสารตัวอย่างได้ไม่ทำปฏิกิริยากับ Column หรือ Packing Material ซึ่งจะทำให้คุณสมบัติในการแยกสารผิด โดยต้องปราศจาก Particulate และ Dissolved Gas Solvent ที่ทำให้เกิดการอุดตันใน Column และสารละลายต้องบริสุทธิ์ปราศจากสิ่งเจือปนซึ่งรวมถึงพวก Preservative และ Stabilizer ต่าง ๆ โดยตัวอย่างทุกชนิดก่อนการวิเคราะห์ด้วย HPLC ควรกรองผ่านกระดาษกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.45 – 0.5 ไมโครเมตรและกำจัดก๊าซในสารละลายโดยใช้เครื่อง Ultrasonic Bath สำหรับน้ำกลั่นจะต้องปราศจากสารอินทรีย์และแบคทีเรียต่าง ๆ และเลือกใช้ Detector ที่มีความเหมาะสม

2) ปั๊ม (Pump) ทำหน้าที่สูบ Mobile Phase เพื่อส่งเข้าสู่ Column ในอัตราเร็วที่เราเลือก ความดันของระบบจะขึ้นอยู่กับอัตราการเคลื่อนที่ของ Mobile Phase (ถ้าความเร็วสูงจะทำให้เกิดความ

ตันสูง) นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับความหนืดของ Mobile Phase ขนาดของ Packing Material และความยาวของ Column อีกด้วย โดยปกติความดันที่ใช้มักไม่เกิน 4,000 psi โดยปั๊มสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 แบบคือ Isocratic pump ใช้อัตราส่วนของ Mobile Phase ได้คงที่ตลอดเวลาและ Gradient Pump เป็นปั๊มที่สามารถควบคุมการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของ Mobile Phase ได้ตามเวลาที่กำหนด

3. เข็มฉีดยา (Injector) เป็นอุปกรณ์ที่ใช้ฉีดสารเข้าสู่ Column มี 2 แบบ ได้แก่ Manual Injector และ Auto samples Injector

4. คอลัมน์ (Column) ทำด้วย Stainless Steel แก้ว หรือ Teflon มีขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1- 25 มิลลิเมตรในงานวิเคราะห์ใช้ขนาด 1 – 5 มิลลิเมตร โดย Analysis Column ซึ่งเป็น Column ที่ใช้ในการแยกสารเพื่อการวิเคราะห์และควบคุมคุณภาพจะประกอบด้วย Guard Column จะอยู่ก่อน Analysis Column ทำหน้าที่ป้องกันอันตรายซึ่งจะเกิดแก่ Column ช่วยให้ Column มีอายุการใช้งานนานขึ้นและ Precolumn Material ทำหน้าที่กรอง Particle

5. ตัวตรวจวัด (Detector) ที่นิยมใช้กันมากมี 2 ชนิด คือ 1. UV- Detector สารที่จะวิเคราะห์ต้องสามารถดูดกลืนแสง UV ได้เมื่อต้องการใช้ UV Detector อาจเตรียม derivative ของสารประกอบที่วิเคราะห์เพื่อให้ได้สารสามารถดูดกลืนคลื่นแสง UV ได้ 2 RI Detector จะใช้เมื่อต้องการเปรียบเทียบความแตกต่างของ Refractive Index ของสารตัวอย่างและสารมาตรฐาน 2. Fluorescence Detector ใช้ได้กับสารที่เมื่อดูดกลืนคลื่นแสง UV จากแหล่งแสงใน Detector แล้วสามารถเปล่ง Fluorescence ได้ (Kupiec 2004)

#### 2.14.2 การดูดกลืนแสงของ Mobile phase

ความบริสุทธิ์ของตัวทำละลายมีความสำคัญต่อการใช้ประโยชน์ของเครื่องตรวจวัด HPLC ที่มี sensitivity สูงโดยค่าออกซิเจนที่ละลายอยู่ใน mobile phase ทำให้เพิ่ม background ในช่วง UV ต่ำ ดังนั้นการไล่อากาศสามารถช่วยแก้ปัญหาได้ และเกลือที่เป็นสาร ion-pairing เช่น tetramethylammonium salts (TMA) มักมีสารปนเปื้อนที่ดูดกลืนแสง UV จึงควรเลือกชนิดที่มีความบริสุทธิ์สูงเท่านั้น

## 2.15 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ตารางที่ 2.1 งานวิจัยที่ใช้คลื่นอัลตราโซนิกร่วมในการสกัดสารสำคัญจากพืช

ผู้แต่ง	วัตถุดิบ	วิธีการสกัด	ความถี่	สภาวะที่ใช้ในการสกัด	ผลที่ได้จากงานวิจัย
Wang และคณะ, 2014	กะเม็ง (Eclipta prostrate L)	ultrasonic probe	20 kHz	เวลา : 1-15 นาที อุณหภูมิ : 20, 30, 40, 50 และ 60°C ตัวทำละลาย : Ethanol : น้ำ, Methanol : น้ำ	สภาวะที่เหมาะสมคือ ใช้ตัวทำละลายเอทานอล 48% อุณหภูมิ 40°C กำลังอัลตราโซนิก 90 วัตต์ อัตราส่วนตัว ทำละลายต่อวัสดุ 50 มิลลิลิตรต่อกรัม เวลาสกัด 11 นาที นอกจากนี้การใช้อัลตราโซนิกโพรบช่วยในการสกัดได้ ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด และเปอร์เซ็นต์ฤทธิ์ต้าน อนุมูลอิสระ DPPH สูงกว่าการสกัดโดยใช้อ่างอัลตราโซนิก
Hossain และคณะ , 2014	เปลือก มะเขือเทศ	ultrasonic probe	20 kHz	เวลา : 3, 5, 10, 15 และ 17 นาที อุณหภูมิ : - ตัวทำละลาย : เมทานอล แอมพลิจูด : 24.40, 30.5, 42.70, 54.9 และ 61.0	การใช้อัลตราโซนิกช่วยในการสกัด steroidal alkaloids เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ โดยได้รับอิทธิพลจากแอมพลิจูด เป็นหลักแม้ว่าเวลาที่ใช้มีผลต่อการสกัด $\alpha$ -solanine และ demissidine อย่างมีนัยสำคัญ ผลของแอมพลิจูดใน การสกัด มีอิทธิพลมากกว่าเวลาที่ใช้ การใช้อัลตราโซนิก ช่วยในการสกัดมีความเหมาะสมในการสกัดสาร alkaloid

ผู้แต่ง	วัตถุดิบ	วิธีการสกัด	ความถี่	สภาวะที่ใช้ในการสกัด	ผลที่ได้จากงานวิจัย
ชุตติมา และคณะ, 2556	หัวแก่นตะวัน	ultrasonic probe	20 kHz	เวลา : 1, 5 และ 10 นาที อุณหภูมิ : 25 และ 80°C ตัวทำละลาย : น้ำร้อนที่อุณหภูมิ 80°C แอมพลิจูด : 20, 40, 60, 80 และ 100	ร้อยละการสกัดอินนูลินด้วยน้ำร้อนเพียงอย่างเดียวมีค่า 49.8 (โดยน้ำหนักแห้ง) และการพรีทรีตเมนต์ด้วย อัลตราซาวด์ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดอินนูลินได้ ประสิทธิภาพการสกัดมีแนวโน้มสูงขึ้นเมื่อพรีทรีตเมนต์ที่ ค่าแอมพลิจูดและเวลาที่สูงขึ้นและการพรีทรีตเมนต์ที่ อุณหภูมิ 80°C ช่วยเพิ่มร้อยละการสกัดได้มากกว่าที่ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
Centeno และ คณะ,2015	กากองุ่น (Vitis vinifera L.)	ultrasonic probe	55±5 kHz	เวลา :2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 20,25, 30, 40, 50 และ 60 นาที อุณหภูมิ :20±2, 35±3 และ 50± 4°C ตัวทำละลาย : น้ำ	เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและสาร ต้านอนุมูลอิสระค่อย ๆ เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และมี ค่าสูงสุดเมื่อใช้เสียงช่วยในการสกัด ตามผลการทดลองที่ อุณหภูมิต่ำและเวลาที่น้อยกว่า การใช้เสียงช่วยในการ สกัดจะได้สารฟีนอลิกและสารต้านอนุมูลอิสระคล้ายกับวิธี ปกติ โดยเฉพาะสารประกอบฟีนอลิกที่ได้จากการสกัดวิธี ปกติ ที่อุณหภูมิ 35 และ 50°C ไม่แตกต่างอย่างมี นัยสำคัญกับอุณหภูมิ 20, 35 องศาเซลเซียสของวิธีที่ใช้ เสียงในการสกัดและการใช้เสียงใช้เวลาน้อยกว่า

ผู้แต่ง	วัตถุดิบ	วิธีการสกัด	ความถี่	สถานะที่ใช้ในการสกัด	ผลที่ได้จากงานวิจัย
Hromádková และคณะ, 2008	รำข้าวสาลี (wheat bran)	sonic power 100 W	20 kHz	เวลา : 5-10 นาที ตัวทำละลาย : NaOH 0.5%, 2% และ 5%	เปรียบเทียบการสกัดวิธีธรรมดาและวิธีการใช้อัลตราโซนิกช่วยในการสกัดสารฟีนอลิกใน heteroxylans จากรำข้าวสาลีพบว่า โพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากการสกัดมีสมบัติจำเพาะ ได้แก่ ค่าผลได้ องค์ประกอบของสารเคมี และการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยเมื่อใช้คลื่นอัลตราซาวด์ช่วยในการสกัดเป็นเวลาสั้น ๆ ในขั้นตอนแรก (ไม่เกิน 10 นาที) และใช้ NaOH 0.5-2% ค่าผลได้รวม (total yields) มีความคล้ายคลึงกับวิธีธรรมดาซึ่งใช้เวลานานกว่า 60 นาที ทำให้ลดขั้นตอนกระบวนการลง 60% และใช้ NaOH น้อยลง
Klen และคณะ, 2012	น้ำมันมะกอก	ultrasonic probe	30 kHz	เวลา : 5, 10, 20 นาที ตัวทำละลาย : 100%, 80%, 50% (เมทานอล)	การใช้อัลตราโซนิกแบบโพรบช่วยในการสกัดของเหลวด้วยเหลว (US-LLE) ร่วมกับการแช่แข็งตะกอนไขมันที่สะอาดแล้วและ HPLC-DAD-FLD-MS ในการวิเคราะห์ฟีนอลของน้ำมันมะกอกบริสุทธิ์ โดยสามตัวแปรในการสกัด คือ ชนิดของตัวทำละลาย 100%, 80%, 50% เมทานอล เวลา 5, 10, 20 นาที พบว่าการใช้อัลตราโซนิกสามารถช่วยในการสกัดได้

ผู้แต่ง	วัตถุดิบ	วิธีการสกัด	ความถี่	สภาวะที่ใช้ในการสกัด	ผลที่ได้จากงานวิจัย
Wang และคณะ, 2008	รำข้าวสาลี	Ultrasonic bath	40 kHz, 250 W	เวลา : 10-50 นาที อุณหภูมิ : 25-75°C ตัวทำละลาย : เอทานอล 20-95% (V/V)	ศึกษาการสกัดสารฟีนอลิกโดยใช้อัลตราโซนิกพบว่าในกระบวนการ ภายใต้สภาวะดังกล่าวได้สารฟีนอลิก 3.12 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมจากรำข้าวสาลีที่สภาวะที่เหมาะสมที่สุดคือ เอทานอล 64% อุณหภูมิ 60°C เวลา 25 นาที และเวลาในการสกัดเป็นปัจจัยที่มีนัยสำคัญในการทดสอบ



## บทที่ 3

# วิธีการดำเนินงานวิจัย

### 3.1 วัสดุและอุปกรณ์

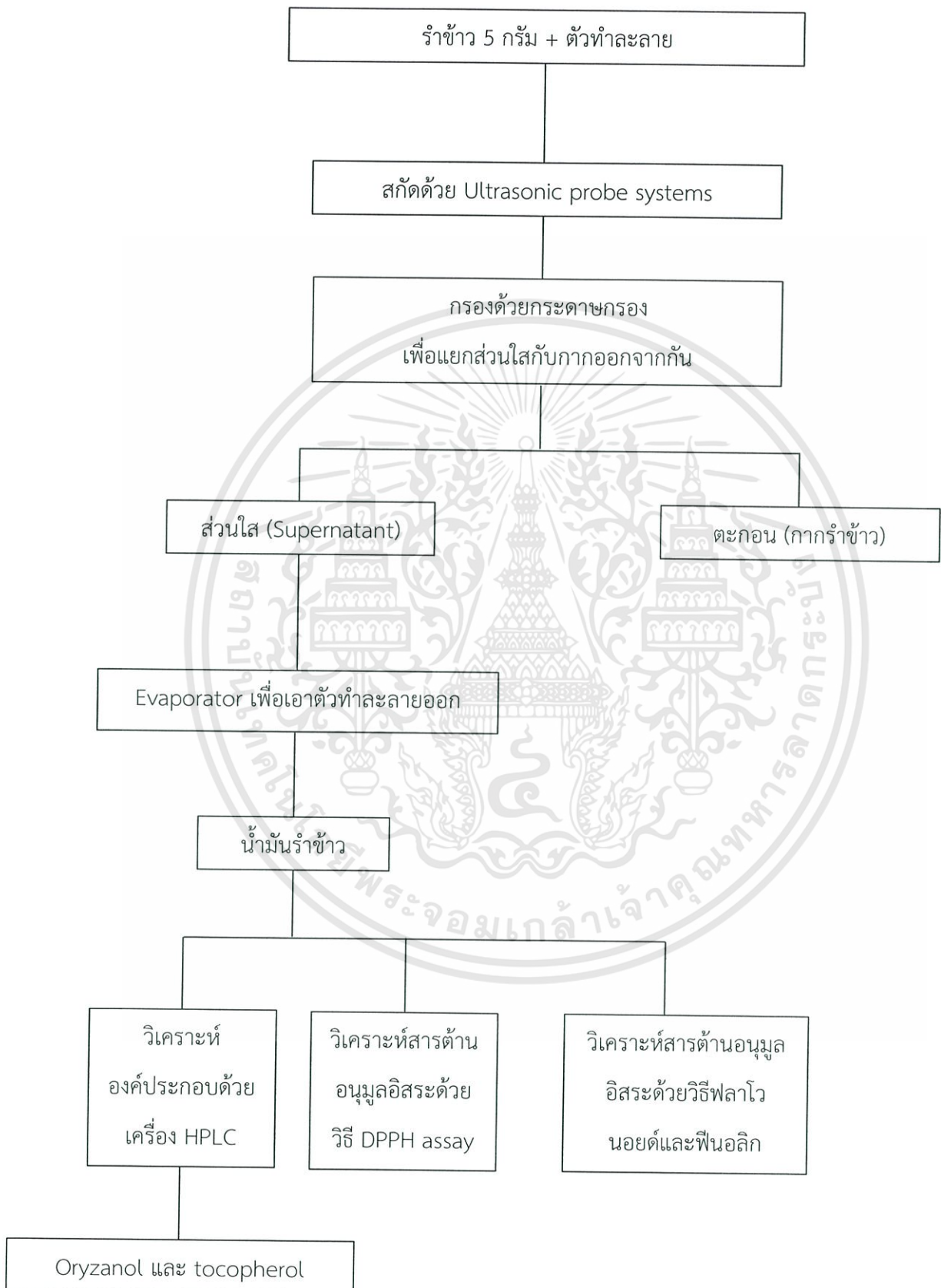
#### 3.1.1 ไร่ข้าว

ไร่ข้าวหอมมะลิสายพันธุ์สุพรรณ 105 ขนาด 850 ไมโครเมตร เก็บรักษาที่ อุณหภูมิ 4 °C

#### 3.1.2 สารเคมีและอุปกรณ์

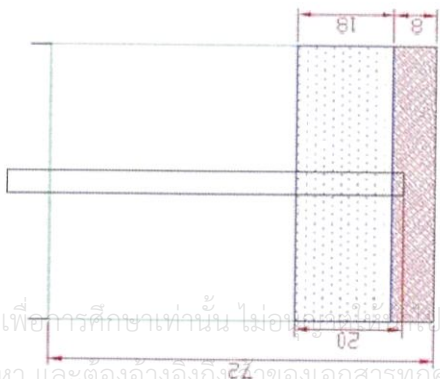
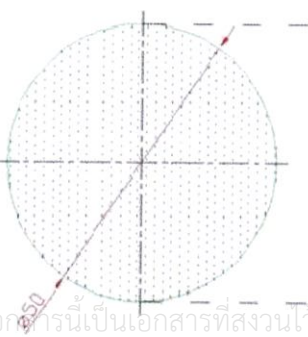
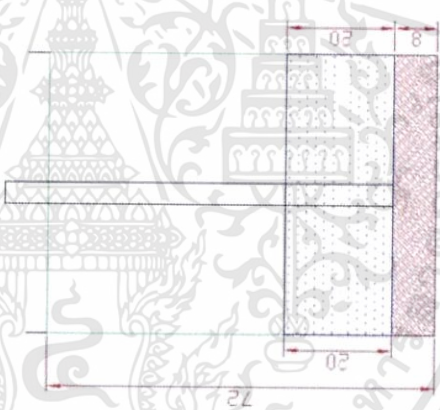
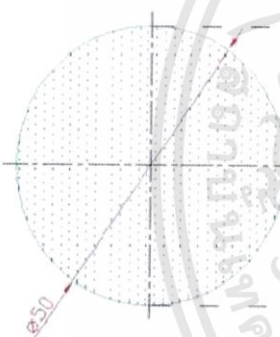
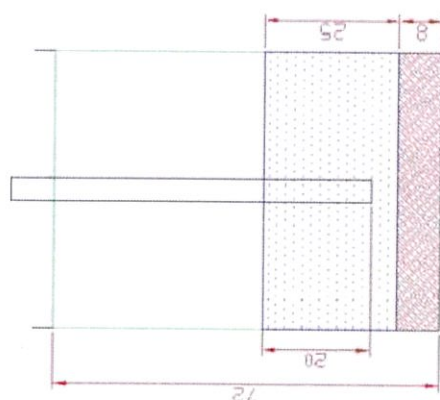
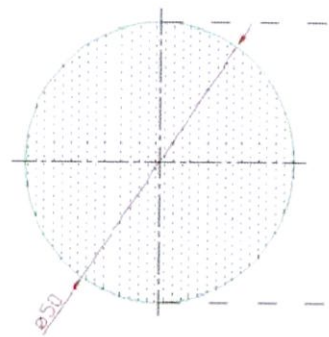
- 1) Hexane (HPLC grade , B&J ACS, USA)
- 2) เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 (องค์การสุรา กรมสรรพสามิต)
- 3) Absolute Ethanol (ACS grade, VWR International, Pty Ltd., Australia)
- 4) Ethyl acetate (LC1070-G4L HPLC grade, RCI LAB SCAN CO.,LTD)
- 5) Methanol (HPLC grade, RCI LAB SCAN CO.,LTD)
- 6) กระดาษกรอง (What man No.5)
- 7) เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (SHIMADZU L201046, Japan)
- 8) Injector 50 µl. (SGE Analytical Science, Australia)
- 9) HPLC Column ACE5 C18 (Dimensions 250x4.6 mm, UK)
- 10) ชุดกรองบุชไนเจอร์
- 11) ปีมล (GAST manufacturing Inc., USA)
- 12) เครื่องซั่ง 4 ตำแหน่ง (ARC2140, Ohous Corp, USA)
- 13) เครื่องซั่ง 2 ตำแหน่ง (ARC120, Ohous Corp, USA)
- 14) Rotary Evaporator (Heidolph), Heating bath (Hei-VAP, EU), Base (Hei-VAP ML Adv/Pre, EU)
- 15) Probe sonicator (CREST, USA) (ดังแสดงในรูปที่ 3.2)
- 16) Spectrophotometer (Helios Alpha, American Laboratory Trading, Inc., USA)
- 17) Microplate reader (MultiRead 400, Biochrom Ltd., UK)

## 3.2 แผนผังสำหรับการดำเนินงาน



รูปที่ 3.1 แผนผังการทดลองทั้งหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.2 ภาพฉายแบบออร์โทกราฟิกของบีกเกอร์และแท่งโฟรบ ในระบบการสกัดอัลตราโซนิคแบบโฟรบ โดยพื้นที่สีแดงคือเฟสของแข็ง (รำข้าว), พื้นที่สีน้ำเงินคือเฟสของเหลว (ตัวทำละลาย) และความยาวทั้งหมดมีหน่วยเป็นมิลลิเมตร

### 3.3 วิธีการทดลอง

ดัดแปลงจากวิธีของ ดวงกลมและคณะ (2014)

#### 3.3.1 การหาชนิดตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด

- 1) ชั่งรำข้าวหอมมะลิสายพันธุ์สุพรรณ 105 ขนาด 850 ไมโครเมตรปริมาณ 5 กรัม ใส่บีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร และเติมตัวทำละลายเอทานอล เฮกเซน และ เอทิลอะซิเตตปริมาตร 30 มิลลิลิตร ซึ่งอัตราส่วนระหว่างรำข้าวต่อตัวทำละลาย คือ 1:6 (w/v)
- 2) จากนั้นนำตัวอย่างในบีกเกอร์เข้าเครื่องอัลตราโซนิกเพื่อทำการสกัด โดยนำหัวโพรบจุ่มลงในบีกเกอร์ให้ลึกประมาณ 2.5 เซนติเมตร (รูปที่ 3.2) แล้วนำแผ่นพาราฟิล์มปิดฝาบีกเกอร์ และเจาะรูเพื่อนำเทอร์โมมิเตอร์ใส่เพื่อใช้วัดอุณหภูมิ โดยควบคุมสภาวะการสกัดที่คลื่นเสียงความถี่สูง 20 kHz อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 20 40 และ 60 นาที
- 3) หลังจากเสร็จสิ้นการสกัด นำตัวอย่างที่ได้ไปกรองด้วยกระดาษกรอง (What man No.5) เพื่อแยกเอาส่วนที่เป็นของเหลว
- 4) นำของเหลวที่กรองได้ไปเข้าเครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary evaporator) เพื่อระเหยตัวทำละลายออกให้เหลือเฉพาะส่วนที่เป็นน้ำมันนำน้ำมันที่ได้ไปชั่งเพื่อวัดน้ำหนักและแบ่งน้ำมันเป็นสองส่วน ส่วนแรกนำไปเข้าเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (SHIMADZU L201046, Japan) เพื่อวิเคราะห์ สาร oryzanol และ tocopherol และอีกส่วนนำไปวิเคราะห์ สารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์และสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH assay แล้วนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบเพื่อหาตัวทำละลายที่ดีที่สุด

#### 3.3.2 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัด

- 1) ชั่งรำข้าวหอมมะลิสายพันธุ์สุพรรณ 105 ขนาด 850 ไมโครเมตรปริมาณ 5 กรัม ใส่บีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร และเติมตัวทำละลายที่ได้จากหัวข้อ 3.3.1 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ซึ่งอัตราส่วนระหว่างรำข้าวต่อตัวทำละลายคือ 1:6 (w/v)
- 2) จากนั้นนำตัวอย่างในบีกเกอร์เข้าเครื่องอัลตราโซนิกเพื่อทำการสกัด โดยนำหัวโพรบจุ่มลงในบีกเกอร์ให้ลึกประมาณ 2.5 เซนติเมตร (รูปที่ 3.2) แล้วนำแผ่นพาราฟิล์มปิดฝาบีกเกอร์และเจาะรูเพื่อนำเทอร์โมมิเตอร์ใส่เพื่อใช้วัดอุณหภูมิโดยควบคุมสภาวะการสกัดที่คลื่นเสียงความถี่สูง 20 kHz อุณหภูมิ 30 และ 40°C เป็นเวลา 20 40 และ 60 นาที
- 3) หลังจากเสร็จสิ้นการสกัด นำตัวอย่างที่ได้ไปกรองด้วยกระดาษกรอง (What man No.5) เพื่อแยกเอาส่วนที่เป็นของเหลว

- 4) นำของเหลวที่กรองได้ไปเข้าเครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary evaporator) เพื่อระเหยตัวทำละลายออกให้เหลือเฉพาะส่วนที่เป็นน้ำมันน้ำมันที่ได้ไปซึ่งเพื่อวัดน้ำหนักและแบ่งน้ำมันเป็นสองส่วน ส่วนแรกนำไปเข้าเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (SHIMADZU L201046, Japan) เพื่อวิเคราะห์สาร oryzanol และ tocopherol และอีกส่วนนำไปวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์และสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH assay แล้วนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบเพื่อหาตัวทำละลายที่ดีที่สุด

### 3.3.3 การหาอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด

- 1) ชั่งรำข้าวหอมมะลิสายพันธุ์สุพรรณ 105 ขนาด 850 ไมโครเมตรปริมาณ 5 กรัม ใส่บีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร และเติมตัวทำละลายที่ได้จากหัวข้อ 3.3.1 ปริมาตร 30, 40 และ 50 มิลลิลิตร ซึ่งอัตราส่วนระหว่างรำข้าวต่อตัวทำละลาย คือ 1:6, 1:8 และ 1:10 (w/v)
- 2) จากนั้นนำตัวอย่างในบีกเกอร์เข้าเครื่องอัลตราโซนิกเพื่อทำการสกัด โดยนำหัวโพรบจุ่มลงในบีกเกอร์ให้ลึกประมาณ 2.5 เซนติเมตร (รูปที่ 3.2) แล้วนำแผ่นพาราฟิล์มปิดฝาบีกเกอร์และเจาะรูเพื่อนำเทอร์โมมิเตอร์ใส่เพื่อใช้วัดอุณหภูมิโดยควบคุมสภาวะการสกัดที่คลื่นเสียงความถี่สูง 20 kHz อุณหภูมิที่ได้จากหัวข้อ 3.3.2 เป็นเวลา 20 40 และ 60 นาที
- 3) หลังจากเสร็จสิ้นการสกัด นำตัวอย่างที่ได้ไปกรองด้วยกระดาษกรอง (What man No.5) เพื่อแยกเอาส่วนที่เป็นของเหลว
- 4) นำของเหลวที่กรองได้ไปเข้าเครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary evaporator) เพื่อระเหยตัวทำละลายออกให้เหลือเฉพาะส่วนที่เป็นน้ำมันน้ำมันที่ได้ไปซึ่งเพื่อวัดน้ำหนักและแบ่งน้ำมันเป็นสองส่วน ส่วนแรกนำไปเข้าเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (SHIMADZU L201046, Japan) เพื่อวิเคราะห์สาร oryzanol และ tocopherol และอีกส่วนนำไปวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์และสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH assay แล้วนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบเพื่อหาตัวทำละลายที่ดีที่สุด

### 3.4 การวิเคราะห์ total phenolic content (ดัดแปลงวิธี Folin-Ciocalteu Colorimetric Method) (ภาคผนวก ก)

- 1) ใส่ Folin-Ciocalteu reagent ที่เจือจางแล้ว 10X ลงในหลอดทดลองปริมาตร 1 มิลลิลิตรและใส่สารมาตรฐาน (สำหรับทำกราฟมาตรฐาน) หรือตัวอย่างปริมาตร 200 ไมโครลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex
- 2) ใส่  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
- 3) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex และบ่มในที่มืดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- 4) จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer
- 5) คำนวณหาปริมาณ total Phenolic content (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) จากกราฟมาตรฐาน Gallic acid และคำนวณในหน่วยของ มิลลิกรัมกรดแกลิกต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (mg GAE/g DW)

### 3.5 การวิเคราะห์ total flavonoid content (ดัดแปลงวิธีของ C. Chang และคณะ, 2002) (ภาคผนวก ก)

- 1) ใส่สารมาตรฐาน (สำหรับทำกราฟมาตรฐาน) หรือตัวอย่างปริมาตร 500 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลองและใส่  $\text{NaNO}_2$  ความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 150 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลอง
- 2) จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex จากนั้นทำการใส่  $\text{AlCl}_3$  ความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตรและใส่  $\text{NaOH}$  ความเข้มข้นร้อยละ 4.3 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
- 3) จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex และบ่มในที่มืดเป็นเวลา 40 นาที
- 4) จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer
- 5) คำนวณหาปริมาณ total flavonoid content (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) จากกราฟมาตรฐาน Quercetin และคำนวณในหน่วยของมิลลิกรัม Quercetin ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (mg QE/g DW)

### 3.6 การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH assay (ดัดแปลงวิธีของ Bao Yang และคณะ, 2008) (ภาคผนวก ก)

- 1) เตรียม 96 well-plate สำหรับทดสอบตัวอย่าง
- 2) หยอด control (เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95) จำนวน 6 หลุมหลุมละ 100 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3) หยอดตัวอย่างและสารมาตรฐานที่เตรียมไว้ลงหลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร
- 4) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer เพื่อทำการวัด Blank
- 5) หยดสาร DPPH ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงในหลุมที่มีตัวอย่างสารมาตรฐานและตัวควบคุมจากนั้นป่มในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร ซึ่งค่าการดูดกลืนแสงของ control ควรอยู่ในช่วงค่าการดูดกลืนแสง 0.6-0.8
- 6) นำค่าที่ได้มาหา %inhibition เพื่อหาค่า  $IC_{50}$

### 3.7 การวิเคราะห์องค์ประกอบของ Tocopherol และ Oryzanol

นำน้ำมันรำข้าวที่สกัดได้ไปวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (SHIMADZU L201046, Japan) ซึ่งภายในระบบประกอบไปด้วย degasser, ป้อนลม (GAST manufacturing Inc., USA), D2 detector ซึ่งการวิเคราะห์องค์ประกอบของ tocopherol และ oryzanol จะใช้คอลัมน์ Phenomenex Kinetex ACE5 C18 (250 มิลลิเมตร x 4.6 มิลลิเมตร) ภายใต้อุณหภูมิ 30°C บรรจุตัวอย่างเข้าระบบปริมาตร 20 ไมโครลิตรโดยใช้ injector (SGE Analytical Science, Australia) ปริมาตร 50 ไมโครลิตรใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น เมทานอล : โพรพานอล : เอทิลอะซีเตต ในอัตราส่วน 47.5 : 40 : 12.5 ใช้แบบระบบ Isocratic ตั้งความยาวคลื่นของ detector ไว้ที่ 295 นาโนเมตรเพื่อตรวจสอบองค์ประกอบของ tocopherol และ oryzanol และก่อนจะเริ่มการทำงานจะทำการปรับสภาพของคอลัมน์ก่อนโดยปล่อยให้เฟสเคลื่อนที่ไหลเข้าสู่คอลัมน์ประมาณ 30 นาทีจนได้กราฟเส้นตรงก่อน

### 3.8 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลทางสถิติจะแสดงออกมาในค่าเฉลี่ยของตัวอย่างสามซ้ำค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานค่าความเชื่อมั่นอยู่ที่ร้อยละ 95 ( $p \leq 0.05$ ) โดยคำนวณด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test เป็นการเปรียบเทียบแบบ multiple ranges ใช้กับกลุ่มตัวอย่างที่มีขนาดเท่ากัน เปรียบเทียบหลายคู่พร้อมกันภายใต้ความแปรปรวนที่เท่ากัน และวิธี Tukey's Multiple Comparison test ซึ่งเป็นเทคนิคในการเปรียบเทียบผลต่างแต่ละคู่เช่นเดียวกับ LSD และ Duncan's แต่สามารถเลือกใช้กับกลุ่มตัวอย่างที่มีขนาดเท่ากันหรือใกล้เคียงกันเปรียบเทียบทีละคู่ภายใต้ความแปรปรวนที่เท่ากัน และในการคำนวณทางสถิติจะใช้โปรแกรม IBM SPSS version 22 ในการคำนวณ

### 3.9 การคำนวณ

#### 3.9.1 น้ำหนักรำข้าวแห้ง

นำรำข้าวขนาด 850 ไมโครเมตรปริมาณ 5 กรัม ไปทำการอบที่อุณหภูมิ 105°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำให้เย็นโดยใส่ไว้ในเดซิเคเตอร์ แล้วชั่งน้ำหนักโดยทำทั้งหมด 3 ซ้ำรายงานผลออกมาเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

#### 3.9.2 ร้อยละความชื้นของรำข้าว

การหาปริมาณความชื้นหรือร้อยละความชื้นของรำข้าวนิยมรายงานผลเป็นร้อยละหรือเปอร์เซ็นต์

$$\frac{W_1 - W_2}{W_{\text{sample}}} \times 100$$

กำหนดให้:  $W_1$  คือน้ำหนักรำข้าวก่อนอบ (กรัม)

$W_2$  คือน้ำหนักรำข้าวหลังอบ (กรัม)

$W_{\text{sample}}$  คือน้ำหนักรำข้าวตัวอย่าง (กรัม)

## บทที่ 4

# ผลการวิจัยและอภิปรายผล

### 4.1 ปริมาณน้ำมันรำข้าว

การทดลองการสกัดรำข้าวที่มีความชื้นร้อยละ 95.06 และน้ำหนักแห้งเท่ากับ  $0.95 \pm 0.01$  กรัม ด้วยคลื่นอัลตราโซนิคแบบโพรบเพื่อศึกษาชนิดตัวทำละลายที่มีผลต่อการสกัดน้ำมันรำข้าวให้ได้มากที่สุด โดยพิจารณาอุณหภูมิในการสกัดที่  $30^{\circ}\text{C}$  อัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6 (w/v) จากตัวทำละลายเฮกเซน เอทานอล และเอทิลอะซิเตต เมื่อสกัดรำข้าวที่อุณหภูมิ  $30^{\circ}\text{C}$  ปริมาณน้ำมันรำข้าวที่สกัดได้จะมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) ดังแสดงในคอลัมน์ที่ 2 ในตารางที่ 4.1 เมื่อสกัดรำข้าวที่อุณหภูมิ  $40^{\circ}\text{C}$  ปริมาณน้ำมันรำข้าวที่สกัดได้จะมีความแตกต่างกันในแต่ละตัวทำละลาย โดยเฮกเซนมีผลในการสกัดได้น้ำมันมากกว่าเอทานอลและเอทิลอะซิเตตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) ดังแสดงในคอลัมน์ที่ 3 ในตารางที่ 4.1 สาเหตุที่เฮกเซนสามารถสกัดได้น้ำมันรำข้าวได้มาก เนื่องจากเฮกเซนเป็นสารที่มีขั้วต่ำ ทำให้สามารถเข้าไปสกัดรำข้าวเพื่อดึงน้ำมันออกมาได้มากโดยอาศัยหลักการ like dissolves like ทำให้เกิดแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลที่เป็นแรงแวนเดอร์วาลส์ประเภทแรงลอนดอน (London force) อย่างอ่อนและเฮกเซนเป็นตัวทำละลายที่มีความสามารถในการละลายในน้ำมันได้มากกว่าตัวทำละลายชนิดอื่น

ตารางที่ 4.1 แสดงปริมาณน้ำมันรำข้าวที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ในอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6 (w/v) อุณหภูมิ 30 และ  $40^{\circ}\text{C}$

ชนิดตัวทำละลาย	น้ำมันรำข้าว (g/g DW)	
	$30^{\circ}\text{C}$	$40^{\circ}\text{C}$
เฮกเซน	$0.16 \pm 0.00^{aB}$	$0.22 \pm 0.01^{aA}$
เอทานอล	$0.15 \pm 0.01^{aA}$	$0.13 \pm 0.01^{bB}$
เอทิลอะซิเตต	$0.15 \pm 0.00^{aA}$	$0.12 \pm 0.00^{bB}$

หมายเหตุ : a, b ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่ต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างของปริมาณน้ำมันรำข้าวที่สกัดได้จากตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )  
A, B ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ที่ต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างของปริมาณน้ำมันรำข้าวที่สกัดได้จากตัวทำละลายชนิดเดียวกัน ที่อุณหภูมิต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานโดยวิธี Duncan's New Multiple Rang Test

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 4.1 เมื่อทำการศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการสกัดน้ำมันรำข้าวโดยพิจารณาจากตัวทำละลายเฮกเซน, เอทานอล และเอทิลอะซิเตตที่อัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6 (w/v) พบว่าเมื่อสกัดด้วยเฮกเซนที่อุณหภูมิ 40°C จะให้ปริมาณน้ำมันรำข้าวมากกว่าการสกัดที่อุณหภูมิ 30°C อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) ทั้งนี้เนื่องจากอุณหภูมิจะช่วยในการคลายโครงสร้างของเมทริกซ์ในตัวอย่างและเพิ่มความคล่องตัวในการซึมผ่านารสกัดของตัวทำละลายทำให้การสกัดมีประสิทธิภาพมากขึ้น (Hu และคณะ, 1996 และ Xu และ Godber, 2000) เมื่อสกัดด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิ 30°C จะให้ปริมาณน้ำมันรำข้าวมากกว่าการสกัดที่อุณหภูมิ 40°C อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) และเมื่อสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตที่อุณหภูมิ 30°C จะให้ปริมาณน้ำมันรำข้าวมากกว่าการสกัดที่อุณหภูมิ 40°C อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางที่ 4.2 แสดงปริมาณน้ำมันรำข้าวที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ในอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6, 1:8 และ 1:10 (w/v) อุณหภูมิ 30 และ 40°C

ตัวทำละลาย	อัตราส่วน (w/v)	น้ำมันรำข้าว (g/g DW)	
		30°C	40°C
เฮกเซน	1:6	0.16±0.00 <sup>ab</sup>	0.22±0.01 <sup>c</sup>
	1:8	0.10±0.00 <sup>b</sup>	0.28±0.02 <sup>b</sup>
	1:10	0.15±0.00 <sup>a</sup>	0.35±0.01 <sup>aA</sup>
เอทานอล	1:6	0.15±0.00 <sup>ab</sup>	0.12±0.01 <sup>a</sup>
	1:8	0.14±0.01 <sup>b</sup>	0.13±0.01 <sup>a</sup>
	1:10	0.16±0.00 <sup>ab</sup>	0.13±0.02 <sup>ab</sup>
เอทิลอะซิเตต	1:6	0.15±0.01 <sup>a</sup>	0.11±0.01 <sup>b</sup>
	1:8	0.17±0.00 <sup>aA</sup>	0.16±0.01 <sup>a</sup>
	1:10	0.15±0.02 <sup>a</sup>	0.16±0.00 <sup>ab</sup>

หมายเหตุ : a, b, c ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่ต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างของปริมาณน้ำมันรำข้าวที่สกัดได้จากตัวทำละลายชนิดเดียวกัน อุณหภูมิเดียวกันแต่ใช้อัตราส่วนตัวทำละลายแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

A, B ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ที่ต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างของชนิดตัวทำละลายที่มีผลต่อปริมาณน้ำมันรำข้าวโดยเลือกจากอัตราส่วนตัวทำละลายที่ให้ปริมาณน้ำมันสูงสุด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานโดยวิธี Duncan's New Multiple Rang Test

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นทำการศึกษาผลของอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลายที่มีผลต่อการสกัดน้ำมันรำข้าวในอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6, 1:8 และ 1:10 (w/v) โดยพิจารณาจากอุณหภูมิในการสกัด 30 และ 40°C ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน, เอทานอล และเอทิลอะซิเตต ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.2 เมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 30°C ด้วยเฮกเซน พบว่าอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6 และ 1:10 (w/v) สามารถสกัดให้ปริมาณน้ำมันรำข้าวไม่แตกต่างกัน แต่แตกต่างกับอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:8 (w/v) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) เมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 30°C ด้วยเอทานอล พบว่าอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6 และ 1:10 (w/v) สามารถสกัดให้ปริมาณน้ำมันรำข้าวไม่แตกต่างกัน แต่แตกต่างกับอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:8 (w/v) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) เมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 30°C ด้วยเอทิลอะซิเตต พบว่าอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6, 1:8 และ 1:10 (w/v) สามารถสกัดให้ปริมาณน้ำมันรำข้าวไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

เมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 40°C ด้วยเฮกเซน พบว่าอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:10 (w/v) สามารถสกัดให้ปริมาณน้ำมันรำข้าวมากกว่าอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6 และ 1:8 (w/v) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) เมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 40°C ด้วยเอทานอล พบว่าอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6, 1:8 และ 1:10 (w/v) สามารถสกัดให้ปริมาณน้ำมันรำข้าวไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) เมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 40°C ด้วยเอทิลอะซิเตต พบว่าอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:8 และ 1:10 (w/v) สามารถสกัดให้ปริมาณน้ำมันรำข้าวไม่แตกต่างกัน แต่แตกต่างกับอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6 (w/v) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ผลการศึกษาพบว่าอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลายอุณหภูมิและชนิดของตัวทำละลายมีผลต่อการสกัดน้ำมันรำข้าว โดยเมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 30°C อัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:8 (w/v) ด้วยเอทิลอะซิเตต สามารถสกัดได้น้ำมันรำข้าวสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

เมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 40°C อัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:10 (w/v) ด้วยเฮกเซน สามารถสกัดได้น้ำมันรำข้าวสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Weicheng และคณะ (1996) ที่ทำการศึกษาค่าผลของอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลายในการสกัดน้ำมันรำข้าวด้วยตัวทำละลายเฮกเซน โดยใช้อัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:2 และ 1:3 (รำข้าว 25 กรัม) โดยเมื่อเพิ่มปริมาณตัวทำละลาย จะส่งผลต่อการสกัดให้ได้ปริมาณน้ำมันรำข้าวเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้อุณหภูมิและอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลายมีอิทธิพลร่วมกันต่อการสกัดน้ำมันรำข้าว

## 4.2 ปริมาณสาร $\gamma$ -oryzanol

ทำการทดลองการสกัดรำข้าวด้วยคลื่นอัลตราโซนิกแบบโพรบเพื่อศึกษาชนิดตัวทำละลายที่มีผลต่อการสกัดสาร  $\gamma$ -oryzanol ให้ได้มากที่สุด โดยพิจารณาอุณหภูมิในการสกัดที่ 30°C อัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6 (w/v) จากตัวทำละลายเฮกเซน เอทานอล และเอทิลอะซิเตต เมื่อสกัดรำข้าวที่อุณหภูมิ 30°C พบว่าเอทิลอะซิเตตสามารถสกัดสาร  $\gamma$ -oryzanol ได้มากกว่าเฮกเซนแล้วเอทานอลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ดังแสดงในคอลัมน์ที่ 2 ในตารางที่ 4.3

เมื่อสกัดรำข้าวที่อุณหภูมิ 40°C พบว่าปริมาณสาร  $\gamma$ -oryzanol ที่ได้จากตัวทำละลายทั้งสามชนิดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ดังแสดงในคอลัมน์ที่ 3 ในตารางที่ 4.3 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของปริตววรรณและคณะ (2014) ที่ทำการศึกษาปัจจัยของตัวทำละลายต่อการสกัดสาร  $\gamma$ -oryzanol โดยใช้ตัวทำละลายสองชนิดคือเอทานอลและไอโซโพรพานอล พบว่ารำข้าวที่สกัดด้วยไอโซโพรพานอลจะให้ปริมาณสาร  $\gamma$ -oryzanol มากกว่า ซึ่งไอโซโพรพานอลมีความเป็นขี้ (P') ใกล้เคียงกับเอทิลอะซิเตต นอกจากนั้นเอทิลอะซิเตตเป็นตัวทำละลายที่มีความเป็นขี้มากกว่าเฮกเซน (Xu และ Godber, 2000) เอทิลอะซิเตตจึงมีความสามารถในการสกัดสาร  $\gamma$ -oryzanol ในรำข้าวสูงกว่าเฮกเซน ดังนั้นเอทิลอะซิเตตจึงมีประสิทธิภาพในการสกัดสาร  $\gamma$ -oryzanol ได้ดีกว่าเฮกเซนและเอทานอล

ตารางที่ 4.3 แสดงปริมาณสาร  $\gamma$ -oryzanol ที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ในอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6 (w/v) อุณหภูมิ 30 และ 40°C

ชนิดตัวทำละลาย	$\gamma$ -oryzanol (mg/g DW)	
	30°C	40°C
เฮกเซน	3.20±0.11 <sup>cA</sup>	3.28±0.60 <sup>aA</sup>
เอทานอล	4.48±0.48 <sup>bA</sup>	2.34±0.34 <sup>aB</sup>
เอทิลอะซิเตต	5.61±0.57 <sup>aA</sup>	3.16±0.34 <sup>aB</sup>

หมายเหตุ : a, b ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่ต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างของปริมาณสาร  $\gamma$ -oryzanol ที่สกัดได้จากตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ที่อุณหภูมิเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

A, B ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ที่ต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างของปริมาณสาร  $\gamma$ -oryzanol ที่สกัดได้จากตัวทำละลายชนิดเดียวกัน ที่อุณหภูมิต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานโดยวิธี Duncan's New Multiple Rang Test

จากตารางที่ 4.3 เมื่อทำการศึกษาค่าผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการสกัดสาร  $\gamma$ -oryzanol โดยพิจารณาจากตัวทำละลายเฮกเซน เอทานอล และเอทิลอะซีเตตที่อัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6 (w/v) พบว่าเมื่อสกัดด้วยเฮกเซนที่อุณหภูมิ 30 และ 40°C จะให้ปริมาณสาร  $\gamma$ -oryzanol ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) เมื่อสกัดด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิ 30°C จะให้ปริมาณน้ำมันรำข้าวมากกว่าการสกัดที่อุณหภูมิ 40°C อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) และเมื่อสกัดด้วยเอทิลอะซีเตตที่อุณหภูมิ 30°C จะให้ปริมาณน้ำมันรำข้าวมากกว่าการสกัดที่อุณหภูมิ 40°C อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Srisaipet และคณะ (2014) ที่ทำการศึกษาศักยภาพในการสกัดสาร  $\gamma$ -oryzanol ในน้ำมันรำข้าว โดยสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน บิวทานอล ไอโซโพรพานอล และเอทิลอะซีเตตที่อุณหภูมิ 27–120°C พบว่าเมื่อสกัดด้วยเอทิลอะซีเตต ปริมาณสาร  $\gamma$ -oryzanol จะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น

ตารางที่ 4.4 แสดงปริมาณสาร  $\gamma$ -oryzanol ที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ในอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6, 1:8 และ 1:10 (w/v) อุณหภูมิ 30 และ 40°C

ตัวทำละลาย	อัตราส่วน (w/v)	$\gamma$ -oryzanol (mg/g DW)	
		30°C	40°C
เฮกเซน	1:6	3.20 $\pm$ 0.11 <sup>ab</sup>	3.28 $\pm$ 0.60 <sup>a</sup>
	1:8	2.80 $\pm$ 0.55 <sup>b</sup>	3.71 $\pm$ 0.23 <sup>a</sup>
	1:10	3.78 $\pm$ 0.50 <sup>aB</sup>	4.27 $\pm$ 0.84 <sup>aAB</sup>
เอทานอล	1:6	4.48 $\pm$ 0.48 <sup>a</sup>	2.34 $\pm$ 0.34 <sup>ab</sup>
	1:8	3.59 $\pm$ 0.29 <sup>aB</sup>	2.88 $\pm$ 0.36 <sup>aB</sup>
	1:10	3.57 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>	2.10 $\pm$ 0.21 <sup>b</sup>
เอทิลอะซีเตต	1:6	5.61 $\pm$ 0.57 <sup>a</sup>	3.16 $\pm$ 0.34 <sup>b</sup>
	1:8	5.73 $\pm$ 0.67 <sup>aA</sup>	4.79 $\pm$ 0.80 <sup>aA</sup>
	1:10	5.00 $\pm$ 0.65 <sup>a</sup>	4.39 $\pm$ 0.70 <sup>ab</sup>

หมายเหตุ : a, b ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่ต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างของปริมาณ  $\gamma$ -oryzanol ที่สกัดได้จากตัวทำละลายชนิดเดียวกัน อุณหภูมิเดียวกัน ในอัตราส่วนต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

A, B ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ที่ต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างของชนิดตัวทำละลายที่มีผลต่อปริมาณสาร  $\gamma$ -oryzanol โดยเลือกจากอัตราส่วนตัวทำละลายที่ให้ปริมาณสาร  $\gamma$ -oryzanol สูงที่สุด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )  
เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานโดยวิธี Duncan's New Multiple Rang Test

จากนั้นทำการศึกษาผลของอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลายที่มีผลต่อการสกัดสาร  $\gamma$ -oryzanol ในอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6, 1:8 และ 1:10 (w/v) โดยพิจารณาจากอุณหภูมิในการสกัด 30 และ 40°C ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน, เอทานอล และเอทิลอะซิเตต ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.4

เมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 30°C ด้วยเฮกเซน พบว่าอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:10 (w/v) สามารถสกัดให้ปริมาณสาร  $\gamma$ -oryzanol ไม่แตกต่างกับอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6 (w/v) แต่แตกต่างกับอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:8 (w/v) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) เมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 30°C ด้วยเอทานอล พบว่าอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6, 1:8 และ 1:10 (w/v) สามารถสกัดให้ปริมาณสาร  $\gamma$ -oryzanol ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) เมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 30°C ด้วยเอทิลอะซิเตต พบว่าอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6, 1:8 และ 1:10 (w/v) สามารถสกัดให้ปริมาณสาร  $\gamma$ -oryzanol ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

เมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 40°C ด้วยเฮกเซน พบว่าอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6, 1:8 และ 1:10 (w/v) สามารถสกัดให้ปริมาณสาร  $\gamma$ -oryzanol ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) เมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 40°C ด้วยเอทานอล พบว่าอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6 และ 1:8 (w/v) สามารถสกัดให้ปริมาณสาร  $\gamma$ -oryzanol ไม่แตกต่างกัน แต่แตกต่างกับอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:10 (w/v) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) เมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 40°C ด้วยเอทิลอะซิเตต พบว่าอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:8 และ 1:10 (w/v) สามารถสกัดให้ปริมาณสาร  $\gamma$ -oryzanol ไม่แตกต่างกัน แต่แตกต่างกับอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6 (w/v) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ผลการศึกษาพบว่าอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลายอุณหภูมิและชนิดของตัวทำละลายมีผลต่อการสกัดสาร  $\gamma$ -oryzanol โดยเมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 30°C อัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:8 (w/v) ด้วยเอทิลอะซิเตต สามารถสกัดได้สาร  $\gamma$ -oryzanol สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

เมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 40°C อัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:8 (w/v) ด้วยเอทิลอะซิเตต สามารถสกัดได้สาร  $\gamma$ -oryzanol สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

### 4.3 ปริมาณสาร $\gamma$ -tocopherol

ทำการทดลองการสกัดรำข้าวด้วยคลื่นอัลตราโซนิคแบบโพรบเพื่อศึกษาชนิดตัวทำละลายที่มีผลต่อการสกัดสาร  $\gamma$ -tocopherol โดยพิจารณาอุณหภูมิในการสกัดที่ 30°C อัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6 (w/v) จากตัวทำละลายเฮกเซน เอทานอล และเอทิลอะซิเตต เมื่อสกัดรำข้าวที่อุณหภูมิ 30°C ตัวทำละลายเอทานอลมีผลในการสกัดได้สาร  $\gamma$ -tocopherol มากกว่าเฮกเซนและเอทิลอะซิเตตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) ดังแสดงในคอลัมน์ที่ 2 ในตารางที่ 4.5 เมื่อสกัดรำข้าวที่อุณหภูมิ 40°C เอทานอลมีผลในการสกัดได้สาร  $\gamma$ -tocopherol ไม่แตกต่างกับเฮกเซน แต่แตกต่างกับเอทิลอะซิเตตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) ดังแสดงในคอลัมน์ที่ 3 ในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 แสดงปริมาณสาร  $\gamma$ -tocopherol ที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ในอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6 (w/v) อุณหภูมิ 30 และ 40°C

ชนิดตัวทำละลาย	$\gamma$ -tocopherol (mg/g DW)	
	30°C	40°C
เฮกเซน	266.38±5.37 <sup>ba</sup>	187.60±0.00 <sup>abB</sup>
เอทานอล	339.83±18.34 <sup>aA</sup>	253.52±28.41 <sup>aA</sup>
เอทิลอะซิเตต	257.20±8.83 <sup>ba</sup>	153.53±35.71 <sup>bbB</sup>

หมายเหตุ : a, b ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่ต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างของปริมาณน้ำมันรำข้าวที่สกัดได้จากตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

A, B ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ที่ต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างของปริมาณน้ำมันรำข้าวที่สกัดได้จากตัวทำละลายชนิดเดียวกัน ที่อุณหภูมิต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานโดยวิธี Duncan's New Multiple Rang Test

จากตารางที่ 4.5 เมื่อทำการศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการสกัดสาร  $\gamma$ -tocopherol โดยพิจารณาจากตัวทำละลายเฮกเซน เอทานอล และเอทิลอะซิเตตที่อัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6 (w/v) พบว่าเมื่อสกัดด้วยเฮกเซนที่อุณหภูมิ 30°C จะให้ปริมาณสาร  $\gamma$ -tocopherol มากกว่าที่ 40°C อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) เมื่อสกัดด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิ 30°C จะให้ปริมาณสาร  $\gamma$ -tocopherol ไม่แตกต่างกับการสกัดที่อุณหภูมิ 40°C อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) และเมื่อสกัด

ด้วยเอทิลอะซีเตตที่อุณหภูมิ 30°C จะให้ปริมาณสาร  $\gamma$ -tocopherol มากกว่าการสกัดที่อุณหภูมิ 40°C อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางที่ 4.6 แสดงปริมาณสาร  $\gamma$ -tocopherol ที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ในอัตราส่วนรำข้าว ต่อตัวทำละลาย 1:6, 1:8 และ 1:10 (w/v) อุณหภูมิ 30 และ 40°C

ตัวทำละลาย	อัตราส่วน (w/v)	$\gamma$ -tocopherol (mg/g DW)	
		30°C	40°C
เฮกเซน	1:6	266.37 $\pm$ 5.37 <sup>aA</sup>	187.59 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>
	1:8	80.89 $\pm$ 24.36 <sup>b</sup>	272.49 $\pm$ 0.00 <sup>aA</sup>
	1:10	210.89 $\pm$ 5.17 <sup>ab</sup>	167.87 $\pm$ 24.37 <sup>b</sup>
เอทานอล	1:6	339.83 $\pm$ 18.34 <sup>a</sup>	253.51 $\pm$ 28.41 <sup>aA</sup>
	1:8	378.68 $\pm$ 82.03 <sup>aA</sup>	152.25 $\pm$ 2.79 <sup>b</sup>
	1:10	230.39 $\pm$ 24.92 <sup>a</sup>	102.38 $\pm$ 23.78 <sup>b</sup>
เอทิลอะซีเตต	1:6	257.20 $\pm$ 8.83 <sup>a</sup>	153.52 $\pm$ 35.71 <sup>a</sup>
	1:8	392.38 $\pm$ 37.62 <sup>aA</sup>	238.24 $\pm$ 41.40 <sup>aA</sup>
	1:10	242.81 $\pm$ 10.74 <sup>a</sup>	209.17 $\pm$ 55.89 <sup>a</sup>

หมายเหตุ : a, b ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่ต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างของปริมาณ  $\gamma$ -tocopherol ที่สกัดได้จากตัวทำละลายชนิดเดียวกัน อุณหภูมิเดียวกัน ในอัตราส่วนต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

A, B ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ที่ต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างของชนิดตัวทำละลายที่มีผลต่อปริมาณสาร  $\gamma$ -tocopherol โดยเลือกจากอัตราส่วนตัวทำละลายที่ให้ปริมาณสาร  $\gamma$ -tocopherol สูงที่สุด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานโดยวิธี Duncan's New Multiple Rang Test

จากนั้นทำการศึกษาผลของอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลายที่มีผลต่อการสกัดสาร  $\gamma$ -tocopherol ในอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6, 1:8 และ 1:10 (w/v) โดยพิจารณาจากอุณหภูมิในการสกัด 30 และ 40°C ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เอทานอล และเอทิลอะซิเตต ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.6

เมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 30°C ด้วยเฮกเซน พบว่าอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6 และ 1:10 (w/v) สามารถสกัดให้ปริมาณสาร  $\gamma$ -tocopherol ไม่แตกต่างกัน แต่แตกต่างกับอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:8 (w/v) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) เมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 30°C ด้วยเอทานอล พบว่าอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6, 1:8 และ 1:10 (w/v) สามารถสกัดให้ปริมาณสาร  $\gamma$ -tocopherol ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) เมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 30°C ด้วยเอทิลอะซิเตต พบว่าอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6, 1:8 และ 1:10 (w/v) สามารถสกัดให้ปริมาณสาร  $\gamma$ -tocopherol ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

เมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 40°C ด้วยเฮกเซน พบว่าอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:8 (w/v) สามารถสกัดให้ปริมาณสาร  $\gamma$ -tocopherol มากกว่าอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6 และ 1:10 (w/v) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) เมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 40°C ด้วยเอทานอล พบว่าอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6 (w/v) สามารถสกัดให้ปริมาณสาร  $\gamma$ -tocopherol มากกว่าอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:8 และ 1:10 (w/v) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) เมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 40°C ด้วยเอทิลอะซิเตต พบว่าอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6, 1:8 และ 1:10 (w/v) สามารถสกัดให้ปริมาณสาร  $\gamma$ -tocopherol ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ผลการศึกษาพบว่าอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลายอุณหภูมิและชนิดของตัวทำละลายมีผลต่อการสกัดสาร  $\gamma$ -tocopherol โดยเมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 30°C อัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:8 (w/v) ด้วยเอทานอลและเอทิลอะซิเตต สามารถสกัดได้สาร  $\gamma$ -tocopherol มากกว่าเฮกเซนแต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) และเมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 40°C อัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6 (w/v) ด้วยเอทานอลสามารถสกัดได้สาร  $\gamma$ -tocopherol สูงสุดแต่ไม่แตกต่างกับสภาวะอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

#### 4.4 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total Phenolics Content)

การสกัดรำข้าวด้วยคลื่นอัลตราโซนิคแบบโพรบเพื่อศึกษาชนิดตัวทำละลายที่มีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่ดีที่สุดโดยดัดแปลงวิธีการ Folin-Ciocalteu Colorimetric Method ซึ่งคำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกโดยใช้กราฟความเข้มข้นมาตรฐาน (calibration curve) จากสารมาตรฐานกรดแกลลิก  $y=0.0089x-0.1462$  และ  $R^2 = 0.9934$  เมื่อ  $y$  คือค่าการดูดกลืนแสงและ  $x$  คือความเข้มข้นของสารละลายกรดแกลลิก ( $\mu\text{g/ml}$ ) ค่าที่ได้จะแสดงในหน่วยของมิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัม น้ำหนักแห้ง (mg GAE/g DW) โดยการทดลองจะควบคุมอุณหภูมิในการสกัดที่  $30^{\circ}\text{C}$  อัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6 (w/v) จากตัวทำละลายเฮกเซนเอทานอล และเอทิลอะซิเตต โดยเมื่อสกัดรำข้าวที่อุณหภูมิ  $30^{\circ}\text{C}$  พบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่สกัดได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) ดังแสดงในคอลัมน์ที่ 2 ในตารางที่ 4.7

เมื่อสกัดรำข้าวที่อุณหภูมิ  $40^{\circ}\text{C}$  พบว่าเฮกเซนและเอทานอลมีผลในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่แตกต่างจากเอทิลอะซิเตตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) ดังแสดงในคอลัมน์ที่ 3 ในตารางที่ 4.7 ซึ่งสาเหตุที่เอทานอลสกัดสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดได้มากที่สุดเนื่องจากคุณสมบัติของการมีขั้ว และในการสกัดฟีนอลิกโดยใช้ความเข้มข้นของเอทานอลที่สูงจะให้ค่าผลได้ของฟีนอลิกสูงกว่า และผลการทดลองนี้ยังสอดคล้องกับการทดลองของ Reza Tabaraki และคณะ (2011) ที่พบว่าเอทานอลสกัดได้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงกว่าเอทิลอะซิเตตและเฮกเซน

ตารางที่ 4.7 แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ในอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6 (w/v) ที่อุณหภูมิ 30 และ  $40^{\circ}\text{C}$

ชนิดตัวทำละลาย	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/g DW)	
	$30^{\circ}\text{C}$	$40^{\circ}\text{C}$
เฮกเซน	$1.76 \pm 0.08^{aA}$	$1.59 \pm 0.17^{aA}$
เอทานอล	$1.76 \pm 0.00^{aA}$	$1.73 \pm 0.20^{aA}$
เอทิลอะซิเตต	$1.71 \pm 0.13^{aA}$	$0.96 \pm 0.14^{bB}$

หมายเหตุ : a, b ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่ต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่สกัดได้จากตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

A, B ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ที่ต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่สกัดได้จากตัวทำละลายชนิดเดียวกัน ที่อุณหภูมิต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานโดยวิธี Duncan's New Multiple Rang Test

จากตารางที่ 4.7 เมื่อทำการศึกษามลของอุณหภูมิที่มีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดยพิจารณาจากตัวทำละลายเฮกเซน เอทานอล และเอทิลอะซิเตตที่อัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6 (w/v) พบว่าเมื่อสกัดด้วยเฮกเซนที่อุณหภูมิ 30°C จะให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดไม่แตกต่างจากการสกัดที่อุณหภูมิ 40°C อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) เมื่อสกัดด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิ 30°C จะให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดไม่แตกต่างจากการสกัดที่อุณหภูมิ 40°C อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) และเมื่อสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตที่อุณหภูมิ 30°C จะให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงกว่าที่สกัดด้วยอุณหภูมิ 40°C อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

จากนั้นทำการศึกษามลของอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลายที่มีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6, 1:8 และ 1:10 (w/v) โดยพิจารณาจากอุณหภูมิในการสกัด 30 และ 40°C ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เอทานอล และเอทิลอะซิเตตแสดงผลในตารางที่ 4.8 จากการทดลองพบว่าเมื่อสกัดด้วยเฮกเซนที่อุณหภูมิ 30°C อัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6 และ 1:8 (w/v) สามารถสกัดให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดไม่แตกต่างกันแต่อัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6 (w/v) แตกต่างกับอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:10 (w/v) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) เมื่อสกัดด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิ 30°C อัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:8 และ 1:10 (w/v) สามารถสกัดให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดไม่แตกต่างกัน แต่แตกต่างกับอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6 (w/v) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) และเมื่อสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตที่อุณหภูมิ 30°C อัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลายทั้ง 1:6, 1:8 และ 1:10 (w/v) สามารถสกัดให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

เมื่อสกัดด้วยเฮกเซนที่อุณหภูมิ 40°C อัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:8 และ 1:10 (w/v) สามารถสกัดให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่แตกต่างจากอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6 (w/v) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) เมื่อสกัดด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิ 40°C อัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6, 1:8 และ 1:10 (w/v) สามารถสกัดให้ปริมาณ

สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) และเมื่อสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตที่อุณหภูมิ 40°C อัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:8 และ 1:10 (w/v) สามารถสกัดให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดไม่แตกต่างกัน แต่แตกต่างกับอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6 (w/v) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ผลการศึกษาพบว่าอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย อุณหภูมิ และชนิดของตัวทำละลายมีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิก โดยเมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 30°C ในทุกตัวทำละลาย อัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6, 1:8 และ 1:10 (w/v) สามารถสกัดให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

และเมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 40°C อัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:8 (w/v) เฮกเซนและเอทานอลสามารถสกัดให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่แตกต่างจากเอทิลอะซิเตตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยของ Tabaraki และคณะ (2011) ที่ในงานวิจัยได้เปรียบเทียบผลของอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย (เอทานอล) 1:10 1:20 1:40 และ 1:80 (w/v) พบว่าที่อัตราส่วน 1:20 (w/v) ขึ้นไปปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่ได้มีค่าคงที่และสูงกว่าอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:10 (w/v)

ตารางที่ 4.8 แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 30 และ 40 °C ในอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6, 1:8 และ 1:10 (w/v)

ตัวทำละลาย	อัตราส่วน (w/v)	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/g DW)	
		30°C	40°C
เฮกเซน	1:6	1.76±0.08 <sup>aA</sup>	1.59±0.17 <sup>b</sup>
	1:8	1.36±0.45 <sup>ab</sup>	2.84±0.65 <sup>aA</sup>
	1:10	1.14±0.08 <sup>b</sup>	2.45±0.29 <sup>a</sup>
เอทานอล	1:6	1.76±0.00 <sup>b</sup>	1.73±0.20 <sup>a</sup>
	1:8	1.97±0.00 <sup>a</sup>	1.96±0.12 <sup>aAB</sup>
	1:10	2.04±0.10 <sup>aA</sup>	1.50±0.10 <sup>a</sup>
เอทิลอะซิเตต	1:6	1.71±0.13 <sup>a</sup>	0.96±0.14 <sup>b</sup>
	1:8	2.03±0.24 <sup>aA</sup>	1.62±0.39 <sup>aB</sup>
	1:10	1.58±0.24 <sup>a</sup>	1.61±0.21 <sup>a</sup>

หมายเหตุ : a, b ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่ต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่สกัดได้จากตัวทำละลายชนิดเดียวกัน อุณหภูมิเดียวกัน ในอัตราส่วนต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

A, B ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ที่ต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างของชนิดตัวทำละลายที่มีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิก โดยเลือกจากอัตราส่วนตัวทำละลายที่ให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงสุด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานโดยวิธี Duncan's New Multiple Rang Test

#### 4.5 ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total Flavonoid Content)

การสกัดรำข้าวด้วยคลื่นอัลตราโซนิคแบบโพรบเพื่อศึกษาชนิดตัวทำละลายที่มีผลต่อปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดที่ดีที่สุดโดยดัดแปลงวิธีการ Chang และคณะ (2002) ซึ่งคำนวณปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดโดยใช้กราฟความเข้มข้นมาตรฐาน (calibration curve) จากสารมาตรฐานเคอร์ซีทิน  $y = 0.0027x + 0.0416$  และ  $R^2 = 0.9915$  เมื่อ  $y$  คือค่าการดูดกลืนแสง และ  $x$  คือความเข้มข้นของสารละลายเคอร์ซีทิน ( $\mu\text{g/ml}$ ) ค่าที่ได้จะแสดงในหน่วยของมิลลิกรัมเคอร์ซีทินต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ( $\text{mg QE/g DW}$ ) โดยการทดลอง จะสกัดที่อุณหภูมิในการสกัดที่  $30^\circ\text{C}$  อัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6 (w/v) จากตัวทำละลายเฮกเซน เอทานอล และเอทิลอะซิเตต โดยเมื่อสกัดรำข้าวที่อุณหภูมิ  $30^\circ\text{C}$  พบว่า ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดที่สกัดด้วยเอทานอล มีความแตกต่างกับเฮกเซนและเอทิลอะซิเตตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ดังแสดงในตารางที่ 4.9

เมื่อสกัดรำข้าวที่อุณหภูมิ  $40^\circ\text{C}$  พบว่า เฮกเซนมีผลในการสกัดสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงกว่าเอทานอลและเอทิลอะซิเตตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ดังแสดงในตารางที่ 4.9 โดยผลของการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของวีรยุทธและจรัสศักดิ์ (2556) ซึ่งได้ทำงานวิจัยโดยเปรียบเทียบผลของตัวทำละลายอินทรีย์ 6 ชนิดในการสกัดสารจากรำข้าว 3 ชนิด และทำการวิเคราะห์สารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ซึ่งพบว่าเอทานอลให้ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงกว่าเอทิลอะซิเตต ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณของสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดโดยทั่วไปลดลงเมื่อสกัดด้วยตัวทำละลายที่มีความเป็น hydrophobic (ไม่มีขั้ว) เพิ่มขึ้น

ตารางที่ 4.9 แสดงปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ในอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6 (w/v) ที่อุณหภูมิ 30 และ 40°C

ชนิดตัวทำละลาย	ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (mg QE/g DW)	
	30°C	40°C
เฮกเซน	0.86±0.16 <sup>bB</sup>	1.86±0.07 <sup>aA</sup>
เอทานอล	2.99±0.25 <sup>aA</sup>	1.03±0.12 <sup>bB</sup>
เอทิลอะซิเตต	0.98±0.13 <sup>bA</sup>	0.79±0.07 <sup>cA</sup>

หมายเหตุ : a, b ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่ต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างของปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดที่สกัดได้จากตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

A, B ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ที่ต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างของปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดที่สกัดได้จากตัวทำละลายชนิดเดียวกัน ที่อุณหภูมิต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานโดยวิธี Duncan's New Multiple Rang Test

จากตารางที่ 4.9 เมื่อทำการศึกษาค่าผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดโดยพิจารณาจากตัวทำละลายเฮกเซน เอทานอล และเอทิลอะซิเตตที่อัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6 (w/v) พบว่าเมื่อสกัดด้วยเฮกเซนที่อุณหภูมิ 40°C จะให้ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงกว่าการสกัดที่อุณหภูมิ 30°C อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) เมื่อสกัดด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิ 30°C จะให้ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงกว่าการสกัดที่อุณหภูมิ 40°C อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) และเมื่อสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตที่อุณหภูมิ 30°C จะให้ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดไม่แตกต่างจากการสกัดด้วยอุณหภูมิ 40°C อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

ตารางที่ 4.10 แสดงปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ในอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6, 1:8 และ 1:10 (w/v) อุณหภูมิ 30 และ 40°C

ตัวทำละลาย	อัตราส่วน (w/v)	ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (mg QE/g DW)	
		30°C	40°C
เฮกเซน	1:6	0.86±0.16 <sup>b</sup>	1.86±0.07 <sup>c</sup>
	1:8	1.15±0.21 <sup>b</sup>	4.27±0.45 <sup>aA</sup>
	1:10	2.33±0.18 <sup>aA</sup>	2.93±0.53 <sup>b</sup>
เอทานอล	1:6	2.99±0.25 <sup>aA</sup>	1.03±0.12 <sup>a</sup>
	1:8	1.62±0.03 <sup>c</sup>	1.45±0.06 <sup>aB</sup>
	1:10	2.38±0.07 <sup>b</sup>	1.39±0.46 <sup>a</sup>
เอทิลอะซิเตต	1:6	0.98±0.13 <sup>b</sup>	0.79±0.07 <sup>b</sup>
	1:8	2.44±0.30 <sup>aA</sup>	0.97±0.25 <sup>ab</sup>
	1:10	0.82±0.19 <sup>b</sup>	1.32±0.04 <sup>aB</sup>

หมายเหตุ : a, b, c ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่ต่างกันในแต่ละแถว แสดงถึงความแตกต่างของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่สกัดได้จากตัวทำละลายชนิดเดียวกัน อุณหภูมิเดียวกัน ในอัตราส่วนต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )  
A, B ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ที่ต่างกันในแต่ละแถว แสดงถึงความแตกต่างของชนิดตัวทำละลายที่มีผลต่อปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ โดยเลือกจากอัตราส่วนตัวทำละลายที่ให้ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์สูงที่สุด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )  
เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานโดยวิธี Duncan's New Multiple Rang Test

จากนั้นทำการศึกษผลของอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลายที่มีผลต่อปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6, 1:8 และ 1:10 (w/v) โดยพิจารณาจากอุณหภูมิในการสกัด 30 และ 40°C ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เอทานอล และเอทิลอะซิเตตข้อมูลทั้งหมดแสดงดังในตารางที่ 4.10

เมื่อสกัดด้วยเฮกเซนที่อุณหภูมิ 30°C อัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:10 (w/v) สามารถสกัดให้ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงกว่าอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6 และ 1:8 (w/v) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อสกัดด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิ 30°C อัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำ

ละลาย 1:6 (w/v) สามารถสกัดให้ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงกว่าอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:8 และ 1:10 (w/v) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) และเมื่อสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตที่อุณหภูมิ 30°C อัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:8 (w/v) สามารถสกัดให้ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงกว่าอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6 และ 1:8 (w/v) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

เมื่อสกัดด้วยเฮกเซนที่อุณหภูมิ 40°C อัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:8 (w/v) สามารถสกัดให้ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงกว่าอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6 และ 1:10 (w/v) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) เมื่อสกัดด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิ 40°C อัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6, 1:8 และ 1:10 (w/v) สามารถสกัดให้ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) และเมื่อสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตที่อุณหภูมิ 40°C อัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:8 และ 1:10 (w/v) สามารถสกัดให้ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดไม่แตกต่างกัน แต่แตกต่างกับอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6 (w/v) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ผลการศึกษาพบว่าอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย อุณหภูมิ และชนิดของตัวทำละลายมีผลต่อปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด โดยเมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 30°C อัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6, 1:8 และ 1:10 (w/v) สามารถสกัดให้ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงสุดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

และเมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 40°C อัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:8 (w/v) ด้วยเฮกเซน สามารถสกัดได้ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

#### 4.6 ผลการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (1-1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) ดัดแปลงวิธีของ Yang และคณะ (2008) โดยการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ซึ่งนิยามรายงานผลเป็นค่า  $IC_{50}$  หมายถึง ความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ ที่ทำให้ความเข้มข้นของอนุมูลอิสระลดลง 50% โดยพิจารณาจากค่าที่มีค่าน้อยจะมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่สูง (วิภาดา และคณะ, 2011) จากการทดลองสกัดรำข้าวที่อุณหภูมิ 30°C พบว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่สกัดได้จากเอทานอลมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่าเอทิลอะซิเตตและเฮกเซนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) ดังแสดงในตารางที่ 4.11

เมื่อสกัดรำข้าวที่อุณหภูมิ 40°C พบว่าเอทานอลมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระดีกว่าเอทิลอะซิเตต แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) ดังแสดงในตารางที่ 4.11 ซึ่งผลที่ได้นี้สอดคล้องกับ

ผลงานวิจัยของวีรยุทธและจิรศักดิ์ (2556) ซึ่งเปรียบเทียบผลของตัวทำละลายอินทรีย์ 6 ชนิดในการสกัดสารจากรำข้าว 3 ชนิด และทำการวิเคราะห์สารทั้งฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และ DPPH พบว่าการสกัดด้วยเอทานอลให้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าเอทิลอะซีเตต และเฮกเซน เนื่องจากเพราะเอทานอลสกัดได้ปริมาณสารฟีนอลิกสูงกว่าเอทิลอะซีเตตและเฮกเซนจึงทำให้มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่ดี

ตารางที่ 4.11 แสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ในอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6 (w/v) ที่อุณหภูมิ 30 และ 40°C

ชนิดตัวทำละลาย	IC <sub>50</sub> (mg/ml)	
	30°C	40°C
เฮกเซน	10.99±0.15 <sup>cA</sup>	8.32±0.62 <sup>bA</sup>
เอทานอล	4.43±0.21 <sup>aA</sup>	5.18±0.60 <sup>aA</sup>
เอทิลอะซีเตต	5.96±0.75 <sup>bA</sup>	5.49±0.23 <sup>abA</sup>

หมายเหตุ : a, b, c ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่ต่างกันในแนวดิ่ง แสดงถึงความแตกต่างของฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่สกัดได้จากตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

A ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ที่เหมือนกันในแนวนอน แสดงถึงความไม่แตกต่างของฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่สกัดได้จากตัวทำละลายชนิดเดียวกัน ที่อุณหภูมิต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานโดยวิธี Duncan's New Multiple Rang Test

จากตารางที่ 4.11 เมื่อทำการศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยพิจารณาจากตัวทำละลายเฮกเซน เอทานอล และเอทิลอะซีเตตที่อัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6 (w/v) พบว่าเมื่อสกัดด้วยเฮกเซนที่อุณหภูมิ 30°C จะให้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระไม่แตกต่างจากการสกัดที่อุณหภูมิ 40°C อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) เมื่อสกัดด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิ 30°C จะให้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระไม่แตกต่างจากการสกัดที่อุณหภูมิ 40°C อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) เมื่อสกัดด้วยเอทิลอะซีเตตที่อุณหภูมิ 30°C จะให้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระไม่แตกต่างจากการสกัดด้วยอุณหภูมิ 40°C อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

จากนั้นทำการศึกษาผลของอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลายที่มีผลต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6, 1:8 และ 1:10 (w/v) โดยพิจารณาจากอุณหภูมิในการสกัด 30

และ 40°C ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เอทานอล และเอทิลอะซิเตต แสดงผลในตารางที่ 4.12 เมื่อสกัดด้วย เฮกเซนที่อุณหภูมิ 30°C พบว่าอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:10 (w/v) สามารถสกัดให้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระแตกต่างจากอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6 และ 1:8 (w/v) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อสกัดด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิ 30°C อัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6 และ 1:8 (w/v) สามารถสกัดให้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระไม่แตกต่างกัน แต่แตกต่างกับอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:10 (w/v) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) และเมื่อสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตที่อุณหภูมิ 30°C อัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลายทั้ง 1:8 (w/v) สามารถสกัดให้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกับอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6 และ 1:10 (w/v) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

เมื่อสกัดด้วยเฮกเซนที่อุณหภูมิ 40°C อัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6 (w/v) สามารถสกัดให้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระแตกต่างจากอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:8 และ 1:10 (w/v) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อสกัดด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิ 40°C อัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6 และ 1:8 (w/v) สามารถสกัดให้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่แตกต่างจากฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่อัตราส่วน 1:10 (w/v) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) และเมื่อสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตที่อุณหภูมิ 40°C อัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6 และ 1:10 (w/v) สามารถสกัดให้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระไม่แตกต่างกัน แต่อัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6 (w/v) แตกต่างกับอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:8 (w/v) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

ผลการศึกษาพบว่าอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย อุณหภูมิ และชนิดของตัวทำละลายมีผลต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุดโดยเมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 30°C อัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6 (w/v) ที่สกัดด้วยเอทานอล และอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:8 (w/v) ที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตต พบว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญแต่แตกต่างจากอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:10 ที่ใช้เฮกเซนในการสกัด

และเมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 40°C อัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6 (w/v) สามารถสกัดให้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Reza และ Ashraf (2011) ซึ่งในงานวิจัยได้เปรียบเทียบผลของอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย (เอทานอล) 1:10 1:20 1:40 และ 1:80 (w/v) พบว่าที่อัตราส่วน 1:20 (w/v) ขึ้นไป ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่ได้มีค่าลดลง

ตารางที่ 4.12 แสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ในอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6, 1:8 และ 1:10 (w/v) ที่อุณหภูมิ 30 และ 40°C

ตัวทำละลาย	อัตราส่วน (w/v)	IC <sub>50</sub> (mg/ml)	
		30°C	40°C
เฮกเซน	1:6	10.99±0.15 <sup>b</sup>	8.32±0.62 <sup>ab</sup>
	1:8	12.07±0.30 <sup>c</sup>	16.86±0.18 <sup>c</sup>
	1:10	7.34±0.37 <sup>ab</sup>	14.08±0.34 <sup>b</sup>
เอทานอล	1:6	4.43±0.21 <sup>aA</sup>	5.18±0.60 <sup>aA</sup>
	1:8	4.87±0.09 <sup>a</sup>	5.68±0.57 <sup>a</sup>
	1:10	6.31±0.43 <sup>b</sup>	9.14±0.10 <sup>b</sup>
เอทิลอะซิเตต	1:6	5.96±0.75 <sup>b</sup>	5.49±0.23 <sup>aA</sup>
	1:8	4.48±0.11 <sup>aA</sup>	8.13±0.91 <sup>b</sup>
	1:10	7.32±0.12 <sup>b</sup>	7.21±0.16 <sup>ab</sup>

หมายเหตุ : a, b, c ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่ต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างของฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่สกัดได้จากตัวทำละลายชนิดเดียวกัน อุณหภูมิเดียวกัน ในอัตราส่วนต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

A, B ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ที่ต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างของชนิดตัวทำละลายที่มีผลต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ โดยเลือกจากอัตราส่วนตัวทำละลายที่ให้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานโดยวิธี Duncan's New Multiple Rang Test

## บทที่ 5

# สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

### 5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดรำข้าวโดยใช้การสกัดด้วยคลื่นอัลตราโซนิคแบบ โพรบ เพื่อให้ได้ปริมาณน้ำมันรำข้าว สาร  $\gamma$ -oryzanol สาร  $\gamma$ -tocopherol สารประกอบฟีนอลิก และสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดมากที่สุด และทำการศึกษาศักยภาพการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันรำข้าวด้วยวิธี DPPH assay โดยพิจารณาผลของตัวทำละลายเฮกเซน เอทานอล และเอทิลอะซิเตต ผลของอุณหภูมิที่ 30 และ 40°C ผลอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6, 1:8 และ 1:10 (w/v) พบว่าชนิดของตัวทำละลาย, อุณหภูมิ และอัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลายมีผลต่อการสกัด

การสกัดด้วยเฮกเซนที่อุณหภูมิ 40°C อัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:10 (w/v) จะให้ปริมาณน้ำมันรำข้าวสูงสุดเท่ากับ  $0.35 \pm 0.01$  g/g DW การสกัดด้วยเฮกเซนที่อุณหภูมิ 40°C อัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:8 (w/v) จะให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงสุดเท่ากับ  $2.84 \pm 0.65$  mg GAE/g DW และ  $4.27 \pm 0.45$  mg QE/g DW ตามลำดับ การสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตที่อุณหภูมิ 30°C อัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:8 (w/v) จะให้ปริมาณสาร  $\gamma$ -oryzanol และสาร  $\gamma$ -tocopherol สูงสุดเท่ากับ  $5.73 \pm 0.67$  mg/g DW และ  $392.38 \pm 37.62$  mg/g DW ตามลำดับ และการสกัดด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิ 30°C อัตราส่วนรำข้าวต่อตัวทำละลาย 1:6 (w/v) จะให้ค่า  $IC_{50}$  น้อยที่สุดเท่ากับ  $4.43 \pm 0.21$  mg/ml

### 5.2 ข้อเสนอแนะ

การสกัดน้ำมันรำข้าวและสารในน้ำมันรำข้าว มีปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการสกัดทั้งอุณหภูมิ ชนิดตัวทำละลาย อัตราส่วนตัวทำละลาย ดังนั้นในการวิจัยต่อไปควรศึกษาปัจจัยของคลื่นอัลตราโซนิคเช่น ความถี่คลื่นและแอมพลิจูดของคลื่น เพื่อศึกษาผลของปัจจัยร่วมกันในการสกัดและศึกษาผลของคลื่นอัลตราโซนิคต่อการสกัดรำข้าวเช่น การทำปฏิกิริยาของคลื่นต่อรำข้าวเชิงกล หรือการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างเคมีของรำข้าวเมื่อสกัดด้วยคลื่นอัลตราโซนิค ตลอดจนผลของคลื่นที่มีผลต่อการสกัดสารภายในรำข้าวและนำมาประยุกต์ใช้ในระดับ Pilot scale เพื่อเพิ่มผลได้ในการสกัด

## เอกสารอ้างอิง

- เจนจิรา จิรัมย์ และประสงค์ สีหานาม. 2554. “อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ: แหล่งที่มาและกลไกการเกิดปฏิกิริยา.” วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยราชภัฏกาฬสินธุ์. 1(1) : 59-70.
- ฉลวย ทับศรี ม่วงพรวน. 2555. “การศึกษาผลการบริโภคผลิตภัณฑ์เสริมอาหารน้ำมันรำข้าวและจมูกข้าว P2PLUS.” [Online]. Available : <http://www.organellelife.com/pdf/P2Plus.pdf>.
- ชุติมา วันเพ็ญ, บุชราภรณ์ งามปัญญา, สุวัฒนา พุกษะศรี, พิมพ์ชนก จตุรพิริย์ และปราโมทย์ คุวิจิตรจากรุ. 2556. “ผลของการพรีทรีตเมนต์ด้วยอัลตราซาวด์ต่อการสกัดอินนูลินจากหัวแก่นตะวัน.” วารสารวิจัยและพัฒนา มจร. 36(2) : 249-258.
- ช่อสมน สอดสี, ธัญญลักษณ์ หนูมอ และมณีนุชา ตีอิ่ง. 2557. “การศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดน้ำมันรำข้าว และสารสำคัญจากรำข้าวหอมมะลิ.” ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ปรีดาวรรณ ขอช่วยกลาง และวรนุช ศรีใจภูวรักษ์. 2556. “การเปรียบเทียบวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายต่อการสกัดวิตามินอีและแกมมา-โอโรซานอลจากรำข้าวพันธุ์ กข 6.” วารสารวิจัย มข. 13(2) : 10-17.
- พรรณี เด่นรุ่งเรือง. 2550. “ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของเปลือกต้นวงศ์อบเชย.” รายงานผลงานวิจัยประจำปี พ.ศ. 2550, กรมป่าไม้. 19-26.
- ระวีวรรณ แก้วอมตวงศ์ และทรงพร จึงมั่นคง. 2549. “ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และปริมาณสารฟีนอลรวมของสารสกัดพืชสมุนไพรไทยบางชนิด.” วารสารวิชาการ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 8(2) : 76-88.
- วิภพ สุทธนะ. 2556. “ฤทธิ์ต้านมะเร็งของฟลาโวนอยด์ : กลไกการออกฤทธิ์.” ศรีนครินทร์เวชสาร. 28(4) : 567-582.
- วิภาดา กันทยศ และยิ่งยง ไพสุขสานติวัฒนา. 2011. “ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณเคอร์คูมินอยด์รวมในพืชสกุลขิงที่พบในประเทศไทย.” Proceedings of the 49th Kasetsart University Annual Conference, Kasetsart University. (1) : 37-44.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี. 2558. น้ำมันรำข้าว.

[Online]. Available : <https://th.wikipedia.org/wiki/น้ำมันรำข้าว>.

วีรยุทธ โตสิงหราช และจิรศักดิ์ คงเกียรติขจร. 2556. “การเปรียบเทียบตัวทาละลายอินทรีย์สำหรับการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากรำข้าว.” วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม. 6 : 776-783.

ศูนย์สุขภาพธรรมชาติบำบัด. 2555. สาร Gamma-Oryzanol คืออะไร.

[Online]. Available : <http://www.npc-se.co.th/>.

สุภาพ บุญยะรัตเวช และ เกสร วีระชาโต. 2540. ปฏิบัติการเคมีอินทรีย์, พิมพ์ครั้งที่ 6, 2540 สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อรพิน โกมุติบาล. 2014. “ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากแก่นมะหาด.” วารสารวิจัยมสส สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 7(2) : 33-41.

Anakhaorn Srisaipet and Mayurachat Nuddagul. 2014. “Influence of Temperature on Gamma-Oryzanol Stability of Edible Rice Bran Oil during Heating.” International Journal of Chemical Engineering and Applications. 5(4) : 303-306.

A.V. Narayan, Rajendrakumar Barhate and K.S.M.S. Raghavarao. 2006. “Extraction and Purification of Oryzanol from Rice Bran Oil and Rice Bran Oil Soapstock.” Industrial Chemistry and Chemical Engineering. 83(8) : 663-670.

Afam I O Jideani, Henry Silungwe, Thakhani Takalani, Tonna A. Anyasi, Henry Udeh and Adewale Omolola. 2014. “Antioxidant-Rich Natural Grain Products and Human Health.” Antioxidant-Antidiabetic Agents and Human Health.

Aleksandra Zielinska and Izabela Nowak. 2014. “Tocopherols and tocotrienols as vitamin E.” CHEMIK. 68(7) : 585-591.

Aman Paul, Dorcus Masih, Justin Masih and Priyanka Malik. 2012. “Comparitive Analysis of Heat Degradation of Oryzanol in Rice Bran Oil, Mustard Oil and Sunflower Oil by Microwave and Pan Heating.” International Journal of Food And Nutritional Sciences. 1(1) : 110-116.

- Anne-Gaëlle Sicaire, Maryline Abert Vian, Frédéric Fine, Patrick Carré, Sylvain Tostain and Farid Chemat. 2016. “Ultrasound induced green solvent extraction of oil from oleaginous seeds.” *Ultrasonics Sonochemistry*. 31 : 319-329.
- Axel Fleischer, Christine Titel and Rudolf Ehwald. 1998. “The Boron Requirement and Cell Wall Properties of Growing and Stationary Suspension-Cultured *Chenopodium album* L. Cells1.” *Plant Physiol*. 117 : 1401-1410.
- Bao Yang, Mouming Zhao, John Shi, Ning Yang and Yueming Jiang. 2008. “Effect of ultrasonic treatment on the recovery and DPPH radical scavenging activity of polysaccharides from longan fruit pericarp.” *Food chemistry*. 106(2) : 685–690.
- Cao Yu-Pin, Yan Li-Zhen, Huang Hong-Li and Deng Bi-Yang. 2015. “Determination of Selenium Species in Burdock and Panax Notoginseng Using Ultrasonic Assistant Extraction Combined with High Performance Liquid Chromatography-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry.” *Chinese Journal of Analytical Chemistry*. 43(9) : 1329-1334.
- Chia-Chi Chang, Ming-Hua Yang, Hwei-Mei Wen AND Jiing-Chuan Chern. 2002. “Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods.” *J. Food Drug Anal.* 10(3) : 178–182.
- Duangkamol Ruen-Ngam, Chitti Thawai and Sujitra Sukonthamut. 2016. “Pretreatment to increase yield and antioxidant activity of  $\gamma$ -oryzanol in rice bran oil.” *ScienceAsia*. 42 : 75–82.
- Eugenio José Garcia, Tatiane Luiza Cadorin Oldoni, Severino Matias de Alencar, Alessandra Reis, Alessandro D. Loguercio and Rosa Helena Miranda Grande. 2012. “Antioxidant Activity by DPPH Assay of Potential Solutions to be Applied on Bleached Teeth.” *Braz Dent J*. 23(1) : 22-27.

- Fatemeh Arab, Iran Alemzadeh and Vida Maghsoodi. 2011. "Determination of antioxidant component and activity of rice bran extract." *Scientia Iranica*. 18(6) : 1402-1406.
- Huaming Lei, Z. Huang, W. Liang, Y. Mao and P.W. Que. 2009. "Ultrasonic Pig for Submarine Oil Pipeline Corrosion Inspection." *Russian Journal of Nondestructive Testing*. 45(4) : 285-291.
- I.G. Zigoneanu, L. Williams, Z. Xu and C.M. Sabliov. 2008. "Determination of antioxidant components in rice bran oil extracted by microwave-assisted method." *Bioresource Technology*. 99 : 4910-4918.
- Imola G. Zigoneanu. 2006. "Alpha-tocopherol : Extraction from Rice Bran by Microwave-assisted Method, and Entrapment and Release from Polymeric Nanoparticles." *Master of Science in Biological and Agricultural Engineering*.
- Jia Zhao, Sean Colloms and Susan Rosser. 2014. "Construction of a genetically encoded binary counting module in *Escherichia coli*." *New Biotechnology*. 315 : S147.
- Jing Wang, Baoguo Sun, Yanping Cao, Yuan Tian and Xuehong Li. 2008. "Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran." *Food Chemistry*. 106(2) : 804-810.
- Jun Jin Dan Xie, Hanqing Chen, Xiaosan Wang, Qingzhe Jin and Xingguo Wang. 2016. "Production of Rice Bran Oil with Light Color and High Oryzanol Content by Multi-stage Molecular Distillation" *J Am Oil Chem Soc*. 93(1) : 145-153.
- Khalid Gul, Basharat Yousuf, A.K. Singh, Preeti Singh and Ali Abas Wani. 2015. "Rice bran: Nutritional values and its emerging potential for development of functional food- A review." *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*. 6(1) : 24-30.

- Krishnan VCA, Kuriakose S and Rawson A. 2015. "Ultrasound Assisted Extraction of Oil from Rice Bran: A Response Surface Methodology Approach." *Journal of Food Processing & Technology*. 6(6) : 1-7.
- Krishnanand Mishra, Himanshu Ojha and Nabo Kumar Chaudhury. 2012. "Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay : A critical review and results." *Food Chemistry*. 130(4) : 1036-1043.
- Madhumita Patel and Satyanatayan Nalk. 2004. "Gamma-oryzanol from rice bran oil-A review." *Journal of Scientific & Industrial Research*. 63 : 569-578.
- Reyes González-Centeno, F. Comas-Serra, Antoni Femenia, C. Rosselló and Susana Simal. 2015. "Effect of power ultrasound application on aqueous extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity from grape pomace (*Vitis vinifera* L.) : Experimental kinetics and modeling." *Ultrasonics Sonochemistry*. 22 : 506-514.
- Malcolm J.W. Povey and Timothy J. Marson. 1998. "Power ultrasound in food processing – the way forward." 105-126. In *Ultrasound in Food Processing*. Povey, M. J. W. and Mason, T. J. (eds.). Blackie Academic & Professional, London.
- Mannan Hajimahmoodi, Mohammad Reza Oveisi, Naficeh Sadeghi, Behrooz Jannat, Zahra Bahaeddin and Sadollah Mansoori. 2008. "Gamma Tocopherol Content of Iranian Sesame Seeds." *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 7(2) : 135-139.
- Maria Laura Colombo. 2010. "An Update on Vitamin E, Tocopherol and Tocotrienol-Perspectives." *Molecules*. 15 : 2103-2113.
- Marwan M.A. Rashed, Qunyi Tong, Mandour H. Abdelhai, Mohammed A.A. Gasmalla, Jean B. Ndayishimiye, Long Chen and Fei Ren. 2016. "Effect of ultrasonic treatment on total phenolic extraction from *Lavandula pubescens* and its application in palm olein oil industry." *Ultrasonics Sonochemistry*. 29 : 39-47.

- Maryam Khoei and Fereshteh Chekin. (2016). “The ultrasound-assisted aqueous extraction of rice bran oil.” *Food Chemistry*. 194 : 503–507.
- Milvia Luisa Racchi. 2013. “Antioxidant Defenses in Plants with Attention to Prunus and Citrus spp.” *Antioxidants*. 2(4) : 340-369.
- Mircea Oroian and Isabel Escriche. 2015. “Antioxidants : Characterization, natural sources, extraction and analysis.” *Food Research International*. 74 : 10-36.
- Mircea Vinatoru. 2001. “An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs.” *Ultrasonics Sonochemistry*. 8 : 303-313.
- Mohammad B. Hossain, Brijesh K. Tiwari, Nirupama Gangopadhyay, Colm P. O’Donnell, Nigel P. Brunton and Dilip K. Rai. 2014. “Ultrasonic extraction of steroidal alkaloids from potato peel waste.” *Ultrasonics Sonochemistry*. 21(4) : 1470–1476.
- Nese Yilmaz. 2016. “Middle infrared stabilization of individual rice bran milling fractions.” *Food Chemistry*. 190 : 179–185.
- O. V. Abramov, V. O. Abramov, S. K. Myasnikov and M. S. Mullakaev. 2009. “Ultrasonic Technologies for Extracting Oil Products from Oil-Bearing Sands and Contaminated Soils.” *Theoretical Foundations of Chemical Engineering*. 43(4) : 504-510.
- Om P. Sharma and Tej K. Bhat. 2009. “DPPH antioxidant assay revisited.” *Food Chemistry*. 113(4) : 1202-1205.
- ORYZA OIL & FAT CHEMICAL CO., LTD. 2010. **GAMMA ORYZANOL Food and Cosmetic Ingredient**. [Online]. Available [http://www.oryza.co.jp/html/english/pdf/Oryzanol\\_e%202.0.pdf](http://www.oryza.co.jp/html/english/pdf/Oryzanol_e%202.0.pdf)
- Photchanathip Imsanguan, Amorn Roaysubtawee, Ratsuda Borirak, Suwassa Pongamphai, Supaporn Douglas and Peter L. Douglas. 2008. “Extraction of  $\alpha$ -tocopherol and  $\gamma$ -oryzanol from rice bran.” *LWT*. 41 : 1417-1424.

- Quy Diem Do, Artik Elisa Angkawijaya, Phuong Lan Tran-Nguyen, Lien Huong Huynh, Felycia Edi Soetaredjo, Suryadi Ismadji and Yi-Hsu Ju. 2014. "Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatic*." *Journal of Food and Drug Analysis*. 22(3) : 296–302.
- Ramon Oliveira, Vinicius Oliveira, Keila Kazue Aracava and Christianne Elisabete da Costa Rodrigues. 2012. "Effects of the extraction conditions on the yield and composition of rice bran oil extracted with ethanol-A response surface approach." *food and bioproducts processing*. 90 : 22-31.
- Renata Heidtmann-Bemvenuti, Náthali Saião Nora and Eliana Badiale-Furlong. 2012. "Extraction of  $\gamma$ -oryzanol from Rice Bran." *Ciência e Agrotecnologia*. 36(6) : 665-673.
- Reza Tabaraki and Ashraf Nateghi. 2011. "Optimization of ultrasonic-assisted extraction of natural antioxidants from rice bran using response surface methodology." *Ultrasonics Sonochemistry*. 18 : 1279-1286.
- Sheng Geng, Yang Liu, Hanjun Ma and Chungang Chen. 2015. "Extraction and Antioxidant Activity of Phenolic Compounds from Okra Flowers." *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 14(5) : 807-814.
- Tina Jerman Klen and Branka Mozetic Vodopivec. 2012. "Optimisation of olive oil phenol extraction conditions using a high-power probe ultrasonication." *Food Chemistry*. 134(4) : 2481–2488.
- Tapati Bhanja Dey and Ramesh Chander Kuhad. 2014. "Enhanced production and extraction of phenolic compounds from wheat by solid-state fermentation with *Rhizopus oryzae* RCK2012." *Biotechnology Reports*. 4 : 120–127.
- Tom Kupiec, PhD. 2004. "Quality-Control Analytical Methods : High-Performance Liquid Chromatography." *International Journal of Pharmaceutical Compounding*. 8(3) : 223-227.
- Veerapol Kukongviriyapan. 2014. "Essential Role of Antioxidant Network of Vitamins and Enzymes." *Srinagarind Med J*. 29(1) : 59-70.

- Widiastuti Setyaningsih, E. Duros, M. Palma and C.G. Barroso. 2016. "Optimization of the ultrasound-assisted extraction of melatonin from red rice (*Oryza sativa*) grains through a response surface methodology." *Applied Acoustics*. 103 : 129–135.
- Weicheng Hu, John Henry Wells, Tai-Sun Shin and J. Samuel Godber. 1996. "Comparison of Isopropanol and Hexane for Extraction of Vitamin E and Oryzanol from Stabilized Rice bran." *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 73 : 1653-1656.
- Wenjie Wang, Jooyeoun Jung, Elizabeth Tomasino and Yanyun Zhao. 2016. "Optimization of solvent and ultrasound-assisted extraction for different anthocyanin rich fruit and their effects on anthocyanin compositions." *LWT - Food Science and Technology*. 72 : 229-238.
- Xinsheng Fang, Jianhua Wang, Yingzi Wang and Lixiang Zhu. 2014. "Optimization of ultrasonic-assisted extraction of wedelolactone and antioxidant polyphenols from *Eclipta prostrata* L using response surface methodology." *Separation and Purification Technology*. 138 : 55–64.
- Xu Huaneng, Zhang Yingxin and He Chaohong. 2007. "Ultrasonically Assisted Extraction of Isoflavones from Stem of *Pueraria Zobata* (Willd.) Ohwi and Its Mathematical Model." *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 15(6) : 861-867.
- Zhimin Xu, and J. Samuel Godber. 2000. "Comparison of supercritical fluid and solvent extraction methods in extracting  $\gamma$ -oryzanol from rice bran." *J of the American Oil Chemists' Society*. 77 : 1127–1131.
- Zdenka Hromádková, Z. Košťálová and A. Ebringerová. 2008. "Comparison of conventional and ultrasound-assisted extraction of phenolics-rich heteroxylans from wheat bran." *Ultrasonics Sonochemistry*. 15(6) : 1062-1068.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ก

### 1. การเตรียมสาร DPPH ความเข้มข้น 0.2 mM

- 1) เตรียมสาร DPPH ชั่งมา 0.0040 กรัม ละลายในเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร
- 2) นำไปทำการ sonication เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นห่อฟรอยด์แล้วเก็บในตู้เย็น

### 2. การเตรียมสารมาตรฐาน BHT

- 1) ใช้ความเข้มข้น 0, 50, 100, 150, 200, 250 และ 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 เป็นตัวทำละลาย

### 3. การเตรียมตัวอย่าง

- 1) เตรียมตัวอย่างความเข้มข้น 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและใช้เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 เป็นตัวทำละลาย

### 4. การเตรียมสารเพื่อใช้ทดสอบสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

- 1) Folin-Ciocalteu reagent 10X
- 2)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ความเข้มข้นร้อยละ 10 และเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70
- 3) Gallic acid (สารมาตรฐาน) ความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120 และ 140 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 เป็นตัวทำละลาย
- 4) ตัวอย่างความเข้มข้น 6000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 เป็นตัวทำละลาย

### 5. การเตรียมสารเพื่อใช้ทดสอบสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

- 1)  $\text{AlCl}_3$  ความเข้มข้นร้อยละ 5
- 2) NaOH ความเข้มข้นร้อยละ 4.3 และเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70
- 3) Quercetin (สารมาตรฐาน) ความเข้มข้น 0, 40, 80, 120, 160, 200 และ 240 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 เป็นตัวทำละลาย
- 4) ตัวอย่างความเข้มข้น 6000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 เป็นตัวทำละลาย

## 6. การเตรียมสารตัวอย่างสำหรับฉีด HPLC

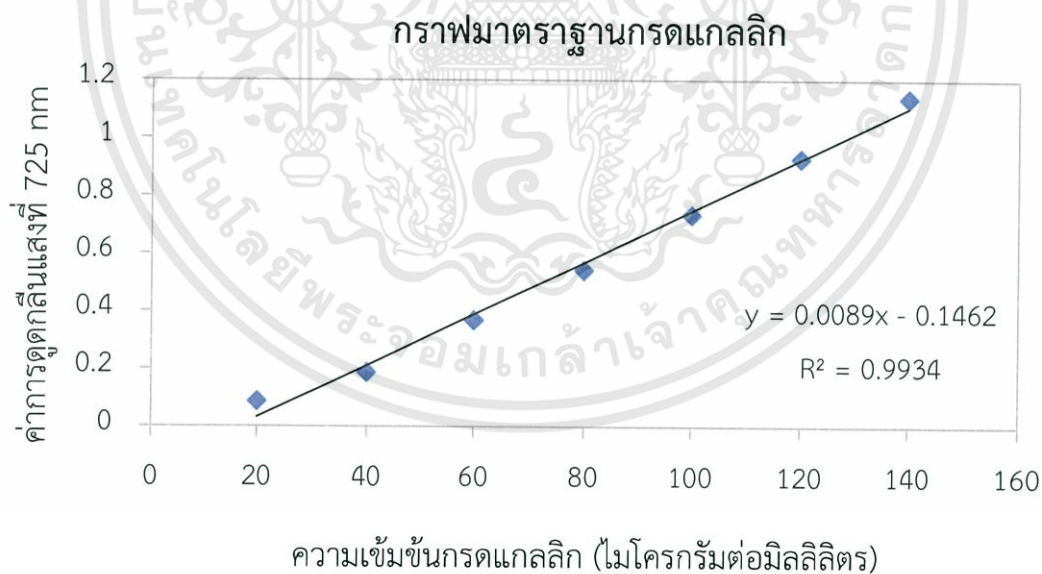
- 1) เตรียมตัวอย่างน้ำมัน (crude oil) ที่จะนำไปทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC
- 2) นำหลอด Eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร มาทำการ label ชื่อสถานะน้ำมันต่าง ๆ ทำการชั่งน้ำมันใส่หลอด Eppendorf โดยใช้เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (รุ่น AR 2140, Ohaus Corp., USA)
- 3) ชั่งสารปริมาณ 0.0010 กรัม จากนั้นเติมสารละลาย mobile phase ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงใน Eppendorf จะได้ความเข้มข้นของน้ำมันเท่ากับ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- 4) นำหลอด Eppendorf ไปทำการ vortex ให้น้ำมันกับสารละลาย mobile phase ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
- 5) จากนั้นนำ Eppendorf อีกหลอดมาทำการเติมสารละลาย mobile phase 900 ไมโครลิตรแล้วทำการดูดสารจาก Eppendorf หลอดแรกที่มีความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดูดมาปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงใน Eppendorf หลอดที่ 2 จะได้ความเข้มข้นใน Eppendorf หลอดที่ 2 เท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- 6) นำ Eppendorf หลอดที่ 2 ไปทำการ vortex
- 7) นำตัวกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตรและ syringe สำหรับกรองมาต่อเข้าด้วยกัน แล้วนำสารละลายใน Eppendorf หลอดที่ 2 มาทำการกรองผ่าน syringe และตัวกรอง
- 8) นำ injector (SGE Analytical Science, Australia) สำหรับฉีดสารเข้าเครื่อง HPLC มาทำการดูดสารจาก Eppendorf หลอดที่ 2 ที่ผ่านการกรองแล้ว ปริมาตร 20-30 ไมโครลิตร แล้วทำการฉีดเข้าเครื่อง HPLC

## ภาคผนวก ก (ต่อ)

### 7. กราฟมาตรฐานปริมาณกรดแกลลิก

ตารางที่ ก.1 แสดงความเข้มข้นของกรดแกลลิก (ug/ml) ต่อค่าการดูดกลืนแสงที่ 725 นาโนเมตร

ความเข้มข้นกรดแกลลิก (ug/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 725 นาโนเมตร
20	0.086
40	0.186
60	0.368
80	0.542
100	0.734
120	0.928
140	1.137



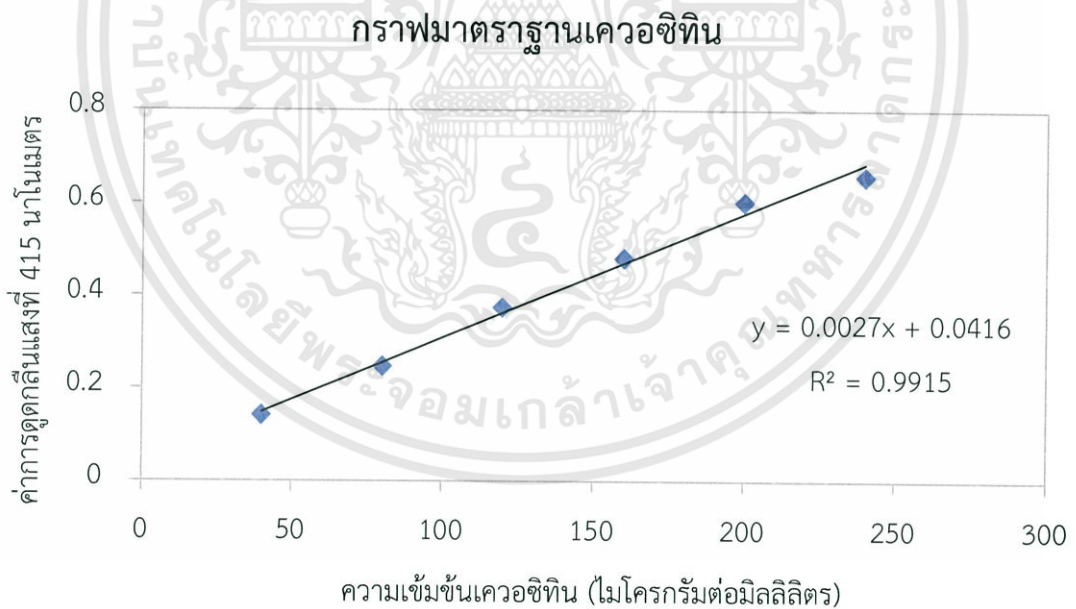
รูปที่ ก.1 กราฟมาตรฐานกรดแกลลิกสำหรับวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

## ภาคผนวก ก (ต่อ)

### 8. กราฟมาตรฐานปริมาณเคออสิติน

ตารางที่ ก.2 แสดงความเข้มข้นของเคออสิติน (ug/ml) ต่อค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 นาโนเมตร

ความเข้มข้นเคออสิติน (ug/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 นาโนเมตร
40	0.140
80	0.247
120	0.374
160	0.480
200	0.601
240	0.657



รูปที่ ก.2 กราฟมาตรฐานเคออสิตินสำหรับวิเคราะห์สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

## ภาคผนวก ก (ต่อ)

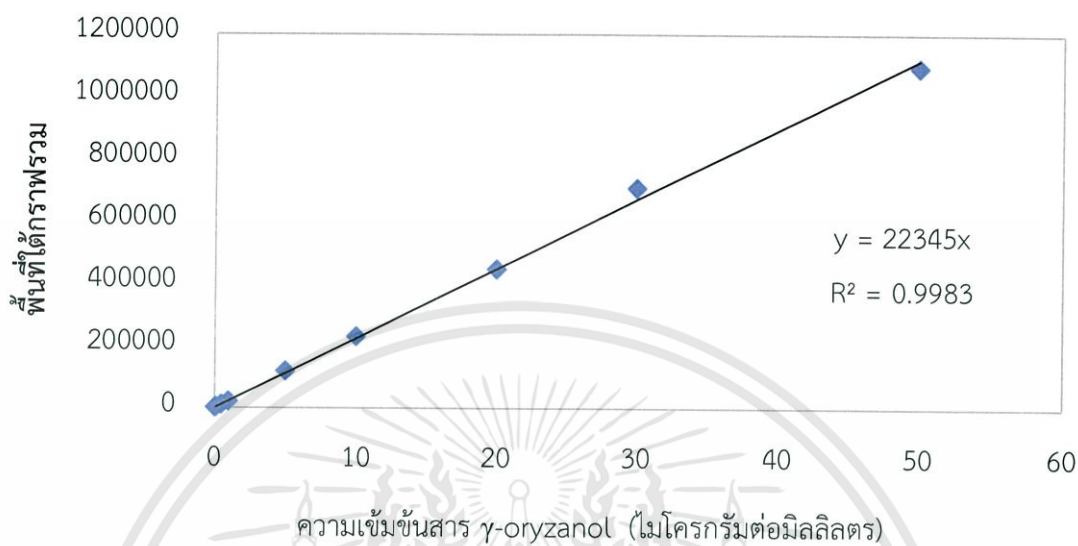
### 9. กราฟมาตรฐานสาร $\gamma$ -oryzanol

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานแกมมาโอไรซานอลที่ใช้ได้แก่ 50 30 20 10 5 1 0.5 0.1 และ 0.05 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ ก.3 แสดงความเข้มข้นสาร  $\gamma$ -oryzanol (ug/ml) ต่อพื้นที่ใต้กราฟของสาร  $\gamma$ -oryzanol ในแต่ละความเข้มข้น

ความเข้มข้นสาร $\gamma$ -oryzanol (ug/ml)	พื้นที่ใต้กราฟ
50	845079
30	548598
20	343583
10	176010
5	91709
1	15838
0.5	8587
0.1	2175
0.05	1118

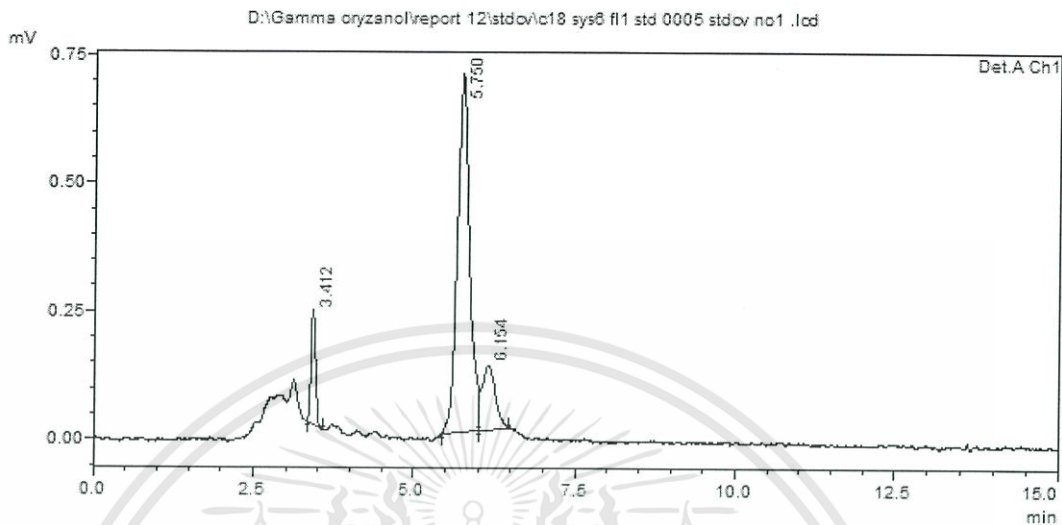
กราฟมาตรฐานของสาร  $\gamma$ -oryzanol



รูปที่ ก.3 กราฟมาตรฐานสาร  $\gamma$ -oryzanol สำหรับวิเคราะห์ปริมาณสาร  $\gamma$ -oryzanol ในรำข้าว

9.1 สารละลายมาตรฐาน  $\gamma$ -oryzanol ความเข้มข้น 0.05 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

## &lt;Chromatogram&gt;

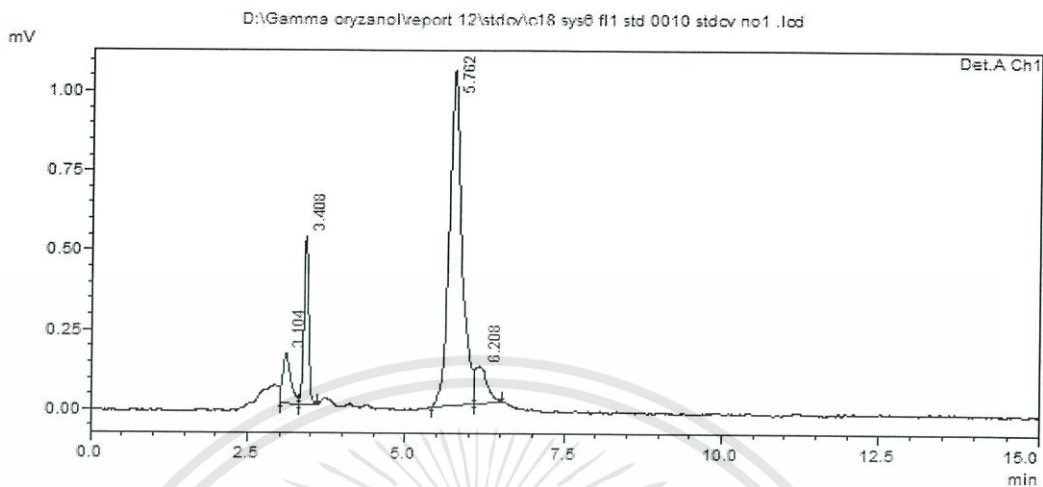


Peak	Ret. Time	Area	Height	Area%	Height%
1	3.412	1138	223	9.523	21.288
2	5.750	9061	699	75.792	66.744
3	6.154	1756	125	14.685	11.938
Total		11955	1046	100.000	100.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9.2 สารละลายมาตรฐาน  $\gamma$ -oryzanol ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

&lt;Chromatogram&gt;

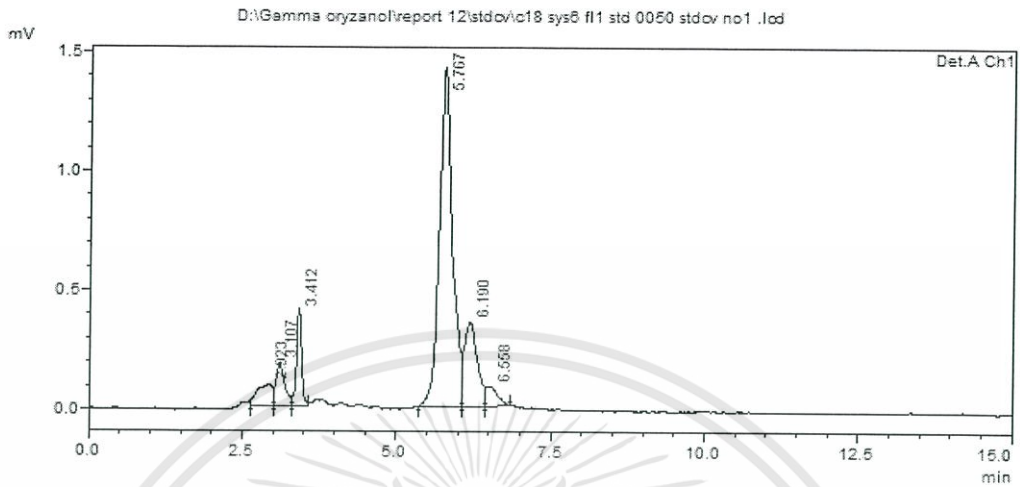


Peak	Ret. Time	Area	Height	Area%	Height%
1	3.104	1374	158	6.784	8.560
2	3.408	2840	525	14.025	28.406
3	5.762	14482	1053	71.526	57.025
4	6.208	1552	111	7.665	6.009
Total		20248	1847	100.000	100.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 9.3 สารละลายมาตรฐาน $\gamma$ -oryzanol ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

#### <Chromatogram>

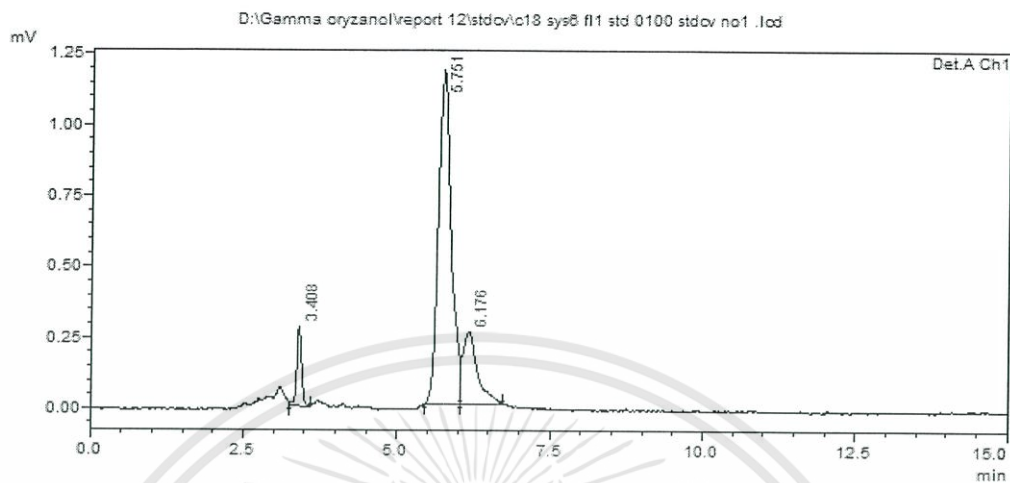


Peak	Ret. Time	Area	Height	Area%	Height%
1	2.923	1615	90	4.951	3.565
2	3.107	1744	181	5.346	7.152
3	3.412	2359	408	7.231	16.146
4	5.767	20683	1421	63.396	56.244
5	6.190	5190	350	15.908	13.850
6	6.558	1034	77	3.168	3.041
Total		32625	2526	100.000	100.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9.4 สารละลายมาตรฐาน  $\gamma$ -oryzanol ความเข้มข้น 1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

## &lt;Chromatogram&gt;

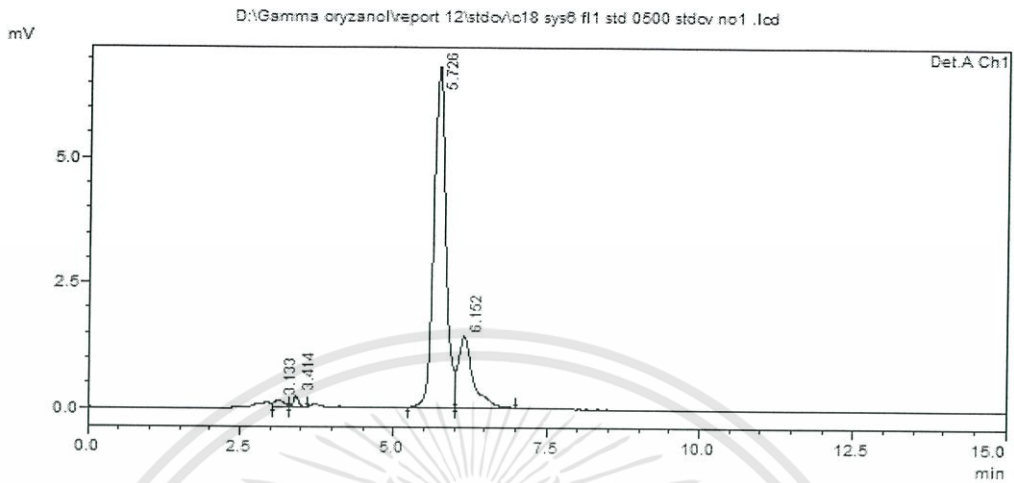


Peak	Ret. Time	Area	Height	Area%	Height%
1	3.408	1546	279	6.622	16.265
2	5.751	17498	1178	74.948	68.696
3	6.176	4303	258	18.430	15.039
Total		23347	1715	100.000	100.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 9.5 สารละลายมาตรฐาน $\gamma$ -oryzanol ความเข้มข้น 5.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

### <Chromatogram>

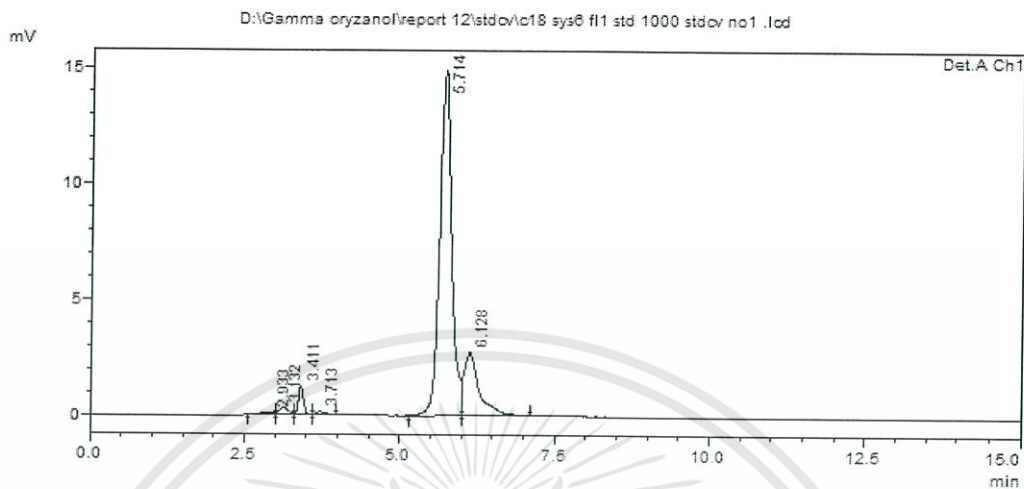


Peak	Ret. Time	Area	Height	Area%	Height%
1	3.133	1613	148	1.339	1.726
2	3.414	1389	218	1.154	2.533
3	5.726	93123	6795	77.344	79.211
4	5.152	24277	1418	20.163	16.525
Total		120402	8578	100.000	100.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9.6 สารละลายมาตรฐาน  $\gamma$ -oryzanol ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

## &lt;Chromatogram&gt;

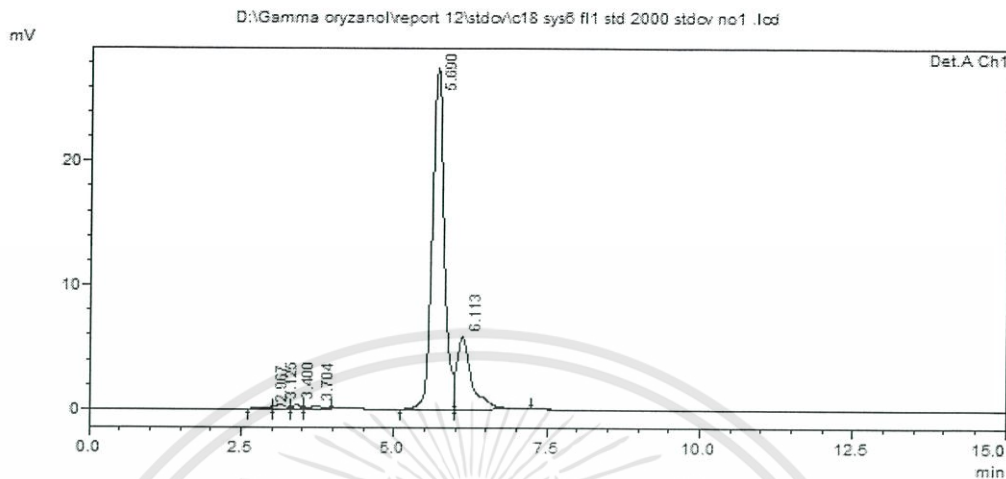


Peak	Ret. Time	Area	Height	Area%	Height%
1	2.933	1805	114	0.690	0.588
2	3.132	3475	338	1.328	1.736
3	3.411	7075	1260	2.704	6.474
4	3.713	1620	151	0.619	0.778
5	5.714	201524	14879	77.029	76.475
6	6.128	46122	2714	17.629	13.949
Total		261620	19456	100.000	100.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9.7 สารละลายมาตรฐาน  $\gamma$ -oryzanol ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

## &lt;Chromatogram&gt;

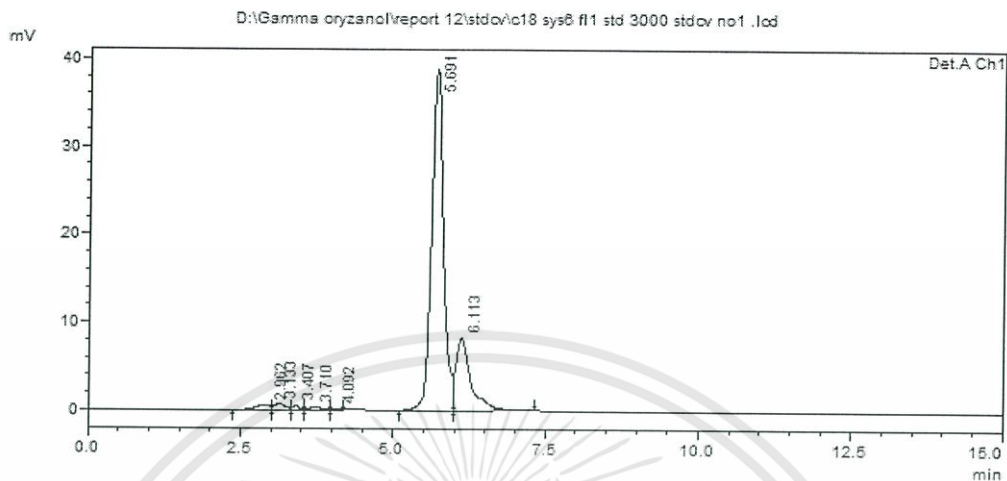


Peak	Ret. Time	Area	Height	Area%	Height%
1	2.967	2506	155	0.516	0.449
2	3.125	4264	377	0.878	1.092
3	3.400	2609	412	0.537	1.191
4	3.704	3481	271	0.716	0.784
5	5.690	373818	27494	76.942	79.562
6	6.113	99166	5847	20.411	16.921
Total		485843	34557	100.000	100.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9.8 สารละลายมาตรฐาน  $\gamma$ -oryzanol ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

## &lt;Chromatogram&gt;

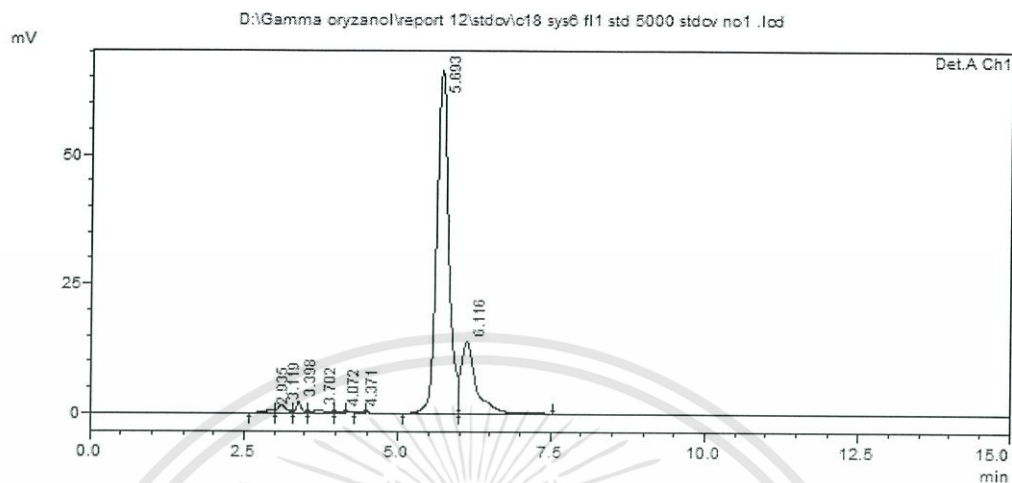


Peak	Ret. Time	Area	Height	Area%	Height%
1	2.962	9971	510	1.432	1.033
2	3.133	9006	722	1.294	1.461
3	3.407	4012	554	0.578	1.122
4	3.710	1169	396	0.748	0.802
5	4.092	5210	106	76.942	0.215
6	6.113	525794	38815	75.521	78.611
7	6.113	141052	8273	20.260	16.756
Total		696222	49376	100.000	100.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9.9 สารละลายมาตรฐาน  $\gamma$ -oryzanol ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

## &lt;Chromatogram&gt;



Peak	Ret. Time	Area	Height	Area%	Height%
1	2.935	7694	635	0.640	0.729
2	3.119	15229	1684	1.267	1.964
3	3.398	12898	2157	1.073	2.516
4	3.702	8944	708	0.744	0.825
5	4.072	2069	187	0.172	0.218
6	4.371	1647	186	0.137	0.216
7	5.693	915203	66281	76.158	77.285
8	6.116	238040	13934	19.808	16.247
Total		1201723	85762	100.000	100.000

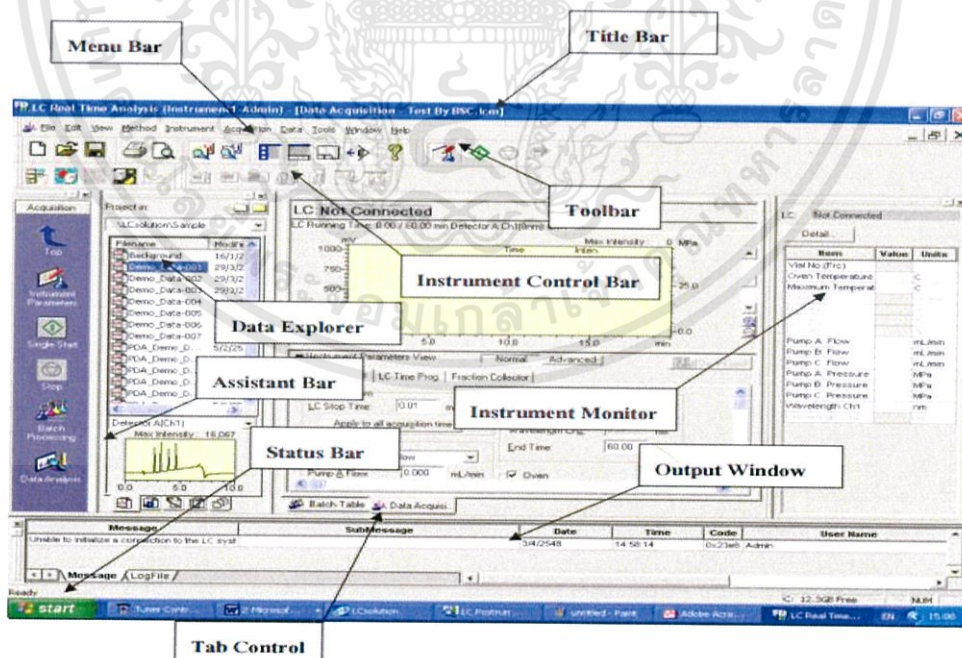
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ข

### 1. รายละเอียดอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลองและวิธีการใช้

#### เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

- 1) เปิดเครื่อง HPLC และ เครื่องคอมพิวเตอร์ จากนั้นเปิดโปรแกรม LC solution
- 2) รัน Clean และ Keep ที่เตรียมมาเพื่อให้ไล่สารเก่าที่อยู่ในระบบออกและฟีด Mobile phase โดยการปรับอัตราการไหลจาก 0 เป็น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 ml/min ตามลำดับ แล้วรอให้กราฟคงที่ จากนั้นอุ่นเครื่องเป็นเวลา 30 นาที
- 3) ล้างเข็ม injector ด้วยการดูด Mobile phase เข้าและฉีดออก 3-5 ครั้ง
- 4) ทำการล้างเครื่องครั้งแรกโดยฉีดสารตัวอย่าง เข้าไป 1 ครั้ง ปริมาตร 20-40  $\mu$ l รอ 1 นาที และฉีดสาร Mobile phase เข้า 5-10 ครั้ง ครั้งละ 20-40  $\mu$ l รอจนครบ 15 นาที ทำการฉีดสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์เข้าสู่ระบบ
- 5) เครื่องจะแสดงโครมาโตแกรมของสารตัวอย่างนำค่าที่ต้องการไปวิเคราะห์
- 6) ก่อนปิดเครื่องต้องรัน Mobile phase ลงมาที่ 0 ml/min แล้วทำการล้างระบบด้วย Keep และ Clean เพื่อปรับหัวภายในคอลัมน์และทำให้ระบบสะอาดไม่มีตะกอนหรือสิ่งปนเปื้อน โดยทำวิธีการเดียวกับข้อ 2.



รูปที่ ข.1 แสดงตัวอย่างและรายละเอียดโปรแกรม LC solution ในคอมพิวเตอร์

## ภาคผนวก ข (ต่อ)

เครื่อง Ultrasonicator (Ultrasonic probe)



รูปที่ ข.2 แสดงลักษณะของเครื่อง Ultrasonic probe (CSIR, Japan)  
(ที่มา : P&CM Lab Aligarh Muslim University, Aligarh)

- 1) กดสวิทช์เปิดเครื่องที่ด้านล่างของตัวเครื่องสามารถปรับค่าความถี่คลื่น (แอมพิจูด) ได้ตั้งแต่ 21% ถึง 100% โดยการหมุนที่ปุ่มด้านล่างของเครื่อง
- 2) ตั้งค่าอุณหภูมิที่ต้องการโดยกดปุ่ม Temp 1 ครั้ง จากนั้นกดเลข 0-9 เพื่อกำหนดค่าอุณหภูมิที่ต้องการแล้วกดปุ่ม Enter/Review
- 3) ตั้งค่าเวลาที่ต้องการโดยกดปุ่ม Timer 1 ครั้ง จากนั้นกดเลข 0-9 เพื่อกำหนดค่าเวลาที่ต้องการแล้วกดปุ่ม Enter/Review
- 4) เมื่อได้สภาวะที่ต้องการแล้ว กดปุ่ม Start/Stop เครื่องจะเริ่มทำงาน จนกระทั่งถึงเวลาที่กำหนดก็จะหยุดเองอัตโนมัติ หรือสามารถกดหยุดได้เองหากต้องการโดยกดปุ่ม Start/Stop



รูปที่ ข.3 คอนโทรลเลอร์ของเครื่องอัลตราโซนิคแบบโพรบ

## ภาคผนวก ข (ต่อ)

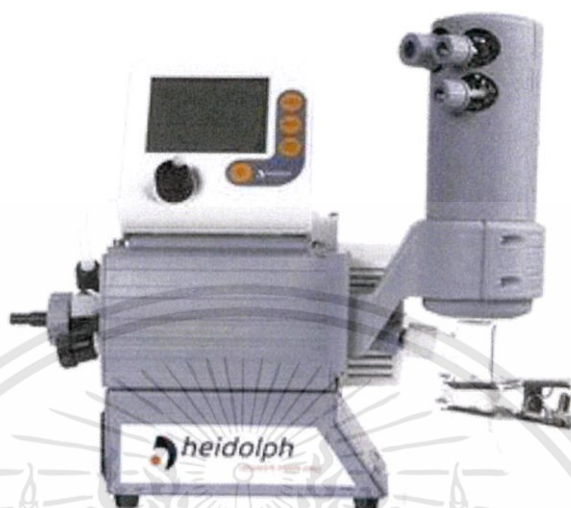
### เครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary evaporators)



รูปที่ ข.4 เครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary evaporators)

- 1) ตรวจสอบระดับน้ำในอ่างน้ำให้ได้ระดับมาตรฐาน
- 2) กดสวิทช์เปิดเครื่องที่ด้านข้างของตัวเครื่อง
- 3) กดเลือกว่าจะใช้โหมด H<sub>2</sub>O หรือ Oil โดยการหมุนแล้วกดตรงกลางของปุ่ม
- 4) ตั้งค่าอุณหภูมิที่ต้องการโดยการหมุนปุ่มไปที่ Bath Temp จากนั้นกดตรงกลางของปุ่ม กำหนดค่าอุณหภูมิที่ต้องการโดยการหมุนขึ้นลงแล้วกดตรงกลางของปุ่มเพื่อตกลง
- 5) กดปุ่มรูปไอ้หนูให้ขึ้นไฟสีเหลืองเพื่อเปิดการทำงานของ bath
- 6) ตั้งค่าความเร็วรอบต่อนาทีที่ต้องการโดยการหมุนปุ่มไปที่ Rotation จากนั้นกดตรงกลางของปุ่ม เพื่อกำหนดค่าที่ต้องการโดยการหมุนขึ้นลงแล้วกดตรงกลางของปุ่มเพื่อตกลง
- 7) ประกอบเครื่องแก้ว (Reservoir) เข้ากับตัวเครื่อง
- 8) เลื่อนตัวเครื่องลงให้เครื่องแก้วลงสู่อ่างตามความลึกที่ต้องการ โดยกดปุ่มลง
- 9) เมื่อได้สภาวะที่ต้องการแล้ว กดปุ่มหมุนเครื่องจะเริ่มทำงาน และเวลาจะเริ่มเดินเองอัตโนมัติ
- 10) กดหยุดได้โดยกดปุ่มหมุนเครื่องจะหยุดทำงาน เวลาจะหยุดและรีเซตอัตโนมัติ
- 11) เมื่อต้องการเลิกใช้ให้เลื่อนตัวเครื่องขึ้นให้สุด โดยกดปุ่มขึ้น
- 12) กดสวิทช์ปิดเครื่องที่ด้านข้างของตัวเครื่อง

## บีมล (อุปกรณ์ต่อพ่วงเข้าเครื่องระเหยสุญญากาศ)



รูปที่ ข.5 บีมลของเครื่องระเหยสุญญากาศ

- 1) กดสวิทช์เปิดเครื่องที่ด้านข้างของตัวเครื่อง
- 2) กดปุ่มเปิด/ปิด เพื่อเปิดเครื่อง
- 3) กดตรงกลางของปุ่มหมุนเพื่อกำหนดความดันที่ต้องการ
- 4) กดปุ่ม Start/Stop เพื่อให้เครื่องเริ่มทำงาน
  - 4.1 โดยจะตั้งเริ่มต้นที่ 500 mbar ลดลงเหลือ 400 mbar เมื่อเวลาผ่านไป 3 นาทีและเมื่อเวลาผ่านไปอีก 3 นาทีก็จะลดลงเหลือ 300 mbar
  - 4.2 เมื่อเวลาผ่านไปอีก 3-5 นาทีก็จะลดลงเหลือ 250, 200, 150, 100 mbar ตามลำดับ
  - 4.3 เมื่อสารหยุดระเหยหรือเวลาประมาณ 5 นาที แล้วลดความดันลงเหลือ 50 mbar เพื่อให้เกิดการควบแน่นขั้นสุดท้ายประมาณ 5 นาทีแล้วจึงสิ้นสุดกระบวนการ
- 5) กดปุ่ม Vent เพื่อปล่อยลมออกมาให้ความดันเพิ่มขึ้นหากเกิดการ Bump
- 6) กดปุ่ม Start/Stop เพื่อให้หยุดทำงาน จากนั้นกดปุ่ม Vent เพื่อปล่อยลมออกมาให้ความดันเพิ่มขึ้นจนเป็นความดันบรรยากาศ (1000 mbar)
- 7) กดสวิทช์ปิดเครื่องที่ด้านข้างของตัวเครื่อง

## เครื่อง Microplate reader



รูปที่ ข.6 เครื่อง microplate reader ยี่ห้อ Biochrom Anthos รุ่น Multiread 4000  
(ที่มา : AZoQuantum.com)

- 1) เปิดคอมพิวเตอร์
- 2) เปิดโปรแกรม
- 3) ใส่ filter ที่เครื่อง Microplate Reader
- 4) เปิดเครื่อง Microplate Reader
- 5) เปิดโปรแกรม Ascent software
- 6) การ set โปรแกรม
  - 6.1 เริ่มต้นจะมี general ขึ้นอยู่ทางด้านแถบด้านซ้าย
  - 6.2 กดที่ shake ตั้งรอบ 1020 rpm และเวลาเขย่า 10 วินาที
  - 6.3 กดที่ measure ตั้งความยาวคลื่นที่ 492 นาโนเมตร
  - 6.4 กดที่ general จากนั้นกด Area definition เพื่อกำหนดให้เครื่องตรวจอ่านค่าในบริเวณที่เราต้องการบน 96-well plate (สีเขียว = อ่าน, สีแดง = ไม่อ่าน)
  - 6.5 กด plate out – plate in 1 ครั้งเพื่อเช็คเครื่องพร้อมใช้งาน
  - 6.6 กด plate out จากนั้นใส่ 96-well plat (96-well plate นี้จะต้องใส่ลงในถาดของเครื่อง Microplate Reader ก่อนใส่เข้าเครื่องโดยตรง) ทำการกด start เครื่องจะอ่านค่าตามบริเวณที่เรากำหนดไว้ที่ Area definition
  - 6.7 เมื่อวัด 96-well plat ต่อไป กด procedure เพื่อทำ plate ต่อไป จากนั้น กด start และ กด continue
- 7) การปิดเครื่อง โดยกด plate in ก่อน แล้วจึงกดปิดเครื่อง Microplate Reader และปิดคอมพิวเตอร์

## ภาคผนวก ข (ต่อ)

การนำข้อมูลออกจากโปรแกรม LC solution

- 1) เปิดโปรแกรม LC solution แล้วเลือกไฟล์ที่ต้องการดึงข้อมูล
- 2) กด file จากนั้นกด export data จะขึ้น Export data as ASCII conversion ให้กดเลือก

