โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การเตรียมเซรั่มบำรุงผิวหน้าที่มีสารสกัดจากข้าวสี
Preparation of facial serum containing color rice extracts

ชื่อนิสิต นางสาวอรณี คีรีทอง เลขประจำตัว 6033111123

ภาควิชา เคมี

ปีการศึกษา 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเตรียมเซรั่มบำรุงผิวหน้าที่มีสารสกัดจากข้าวสี

Preparation of facial serum containing color rice extracts

โดย

นางสาวอรณี คีรีทอง

รายงานนี้เป็นสวนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2563

โครงการ การเตรียมเซรั่มบำรุงผิวหน้าที่มีสารสกัดจากข้าวสี

โดย นางสาวอรณี คีรีทอง

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

1. รองศาสตราจารย์ ดร. วิวัฒน์ วชิรวงศ์กวิน ประธานกรรมการ
2. รองศาสตราจารย์ ดร. สุรชัย พรภคกุล กรรมการ
3. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรินทร ชวศิริ อาจารย์ที่ปรึกษา

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรินทร ชวศิริ)
อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร. วรวีร์ โฮเว่น)
หัวหน้าภาควิชาเคมี

วันที่ 30 เดือน เมษายน พ.ศ. 2564

ชื่อโครงการ การเตรียมเซรั่มบำรุงผิวหน้าที่มีสารสกัดจากข้าวสี
ชื่อนิสิตในโครงการ นางสาวอรณี คีรีทอง เลขประจำตัว 6033111123
ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรินทร ชวศิริ
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2563

บทคัดย่อ

ได้ศึกษาการใช้ประโยชน์ของสารสกัดจากข้าวสีเพื่อเป็นส่วนผสมในเซรั่มบำรุงผิว พบว่าภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเมล็ดข้าวไรซ์เบอร์รี่คือ รีฟลักซ์ด้วยเมทานอลนานสองชั่วโมง ได้ศึกษาตัวอย่างข้าวสีเพิ่มเติมทั้งหมดสิบห้าตัวอย่าง ได้แก่ เมล็ดข้าวไรซ์เบอร์รี่จากจังหวัดลพบุรี **(WRM2L)**, เมล็ดข้าวไรซ์เบอร์รี่จากจังหวัดนครราชสีมา **(WRM2N)**, เมล็ดข้าวไรซ์เบอร์รี่จากจังหวัดเพชรบุรี **(WRM2Ph)**, เมล็ดข้าวกล้องทับทิมชุมแพจากจังหวัดลพบุรี **(WTM2L)**, เมล็ดข้าวกล้องทับทิมชุมแพจากจังหวัดเพชรบุรี **(WTM2Ph)**, เมล็ดข้าวกล้อง กข 43จากจังหวัดลพบุรี **(WOM2L)**, เมล็ดข้าวกล้องสังข์หยดจากจังหวัดลพบุรี **(WSM2L)**, เมล็ดข้าวเหนียวลืมผัวจากจังหวัดลพบุรี **(WBM2L)**, ข้าวไรซ์เบอร์รี่เมล็ดหักจากจังหวัดลพบุรี **(BRM2L)**, ข้าวกล้องสังข์หยดเมล็ดหักจากจังหวัดลพบุรี **(BSM2L)**, รำข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่ไม่ระบุแหล่งที่มา **(GRM2X)**, รำข้าวไรซ์เบอร์รี่จากจังหวัดพัทลุง **(GRM2P)**, จมูกข้าวและรำข้าวสังข์หยดจากจังหวัดพัทลุง **(GSM2P-1)**, รำข้าวสังข์หยดจากจังหวัดพัทลุง **(GSM2P-2)** และข้าวกล้องงอกผสมจมูกข้าวสังข์หยดจากจังหวัดพัทลุง **(GOsM2P)** ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่าสารสกัดข้าวสีหกชนิด ได้แก่ **GRM2P**, **GRM2X**, **GSM2P-2**, **WBM2L**, **GOsM2P** และ **GSM2P-1** ให้ค่าร้อยละผลผลิตและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด เมื่อวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม เฟลโวนอยด์รวมและแอนโทไซยานินรวม พบว่า **WBM2L** ให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและเฟลโวนอยด์รวมสูงสุด (683.6±29.8 mg gallic acid equivalent (GAE)/g extract และ 10,159.7± 993.5 mg quercetin equivalent QE)/g extract) ได้เลือกสารสกัดข้าวสี **GRM2P** เป็นส่วนผสมในเซรั่มบำรุงผิวหน้า และทดสอบสมบัติทางกายภาพของเซรั่มที่เตรียมได้ภายใต้ภาวะดังต่อไปนี้ ที่อุณหภูมิห้อง (28°C) เป็นเวลา 1 เดือน, ภายใต้ภาวะเร่งอุณหภูมิต่ำสลับอุณหภูมิสูงเป็นเวลา 7 วัน, ตากแดดเช้าเป็นเวลา 7 วัน และภายใต้แสงยูวี (254 nm) เป็นเวลา 30 นาที พบว่าสีและลักษณะอื่นๆ ของเซรั่มยังคงเหมือนเดิม

คำสำคัญ: สารสกัดข้าวสี, เซรั่ม, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, สารประกอบฟีนอลิก, เฟลโวนอยด์, แอนโทไซยานิน

Project Title Preparation of facial serum containing color rice extracts
Student Name Miss Oranee Keereethong Student ID 6033111123
Advisor Name Assistant Professor Warinthorn Chavasiri, Ph.D.
Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic Year 2020

ABSTRACT

The utilization of color rice extracts as ingredient in nourishing serum has been investigated. Refluxing methanol for two hours was found to be appropriate conditions for riceberry rice extraction. Fifteen color rice samples including riceberry rice from Lop Buri **(WRM2L)**, riceberry rice from Nakhon Ratchasima **(WRM2N)**, riceberry rice from Phetchaburi **(WRM2Ph)**, tabtim chumphae rice from Lop Buri **(WTM2L)**, tabtim chumphae rice from Phetchaburi **(WTM2Ph),** RD43 brown rice from Lop Buri **(WOM2L)**, sangyod rice from Lop Buri **(WSM2L)**, black sticky rice from Lop Buri **(WBM2L)**, riceberry broken rice from Lop Buri **(BRM2L)**, sangyod broken rice from Lop Buri **(BSM2L)**, riceberry rice bran **(GRM2X)**, riceberry rice bran from Phatthalung **(GRM2P)**, sangyod rice germ and sangyod rice bran from Phatthalung **(GSM2P-1)**, sangyod rice bran from Phatthalung **(GSM2P-2)** and germinated brown rice and sangyod rice germ from Phatthalung **(GOsM2P)** were further examined. The antioxidant activity with DPPH of all samples was assayed. Based on the total yield and the highest antioxidant activity, six extracts namely **GRM2P, GRM2X**, **GSM2P-2, WBM2L, GOsM2P** and **GSM2P-1** were obtained. Total phenolic, flavonoid and anthocyanin contents were carried out. **WBM2L** revealed the highest total phenolic and total flavonoid contents (683.6±29.8 mg gallic acid equivalent (GAE)/g extract and 10,159.7± 993.5 mg quercetin equivalent QE)/g extract). **GRM2P** was finally selected to use as ingredient to apply in nourishing serum cosmetics. The finished serum was submitted to stability test under the following conditions: at room temperature (28°C) for 1 month, accelerated stability test for 7 days, sun exposure for 7 days and under UV lamp (254 nm) for 30 min. The color and other appearance of the manipulated serum remained the same.

Keywords: color rice extracts, serum, antioxidant, phenolic, flavonoid, anthocyanin

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรินทร ชวศิริ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ที่กรุณาให้ความสนับสนุน ความรู้ ความเมตตา คำแนะนำและแนวทางในการดำเนินงานวิจัย อีกทั้งสละเวลาเพื่อให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ เป็นอย่างดีมาโดยตลอด ทำให้การวิจัยและรายงานเล่มนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.วิวัฒน์ วชิรวงศ์กวิน และรองศาสตราจารย์ ดร.สุรชัย พรภคกุล ที่กรุณาสละเวลาอันมีค่าในการตรวจทานแก้ไขรายงาน ตลอดจนให้คำชี้แนะและให้เกียรติเป็นคณะกรรมการในการสอบงานวิจัยครั้งนี้

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่าน ที่ได้กรุณาถ่ายทอดความรู้ ประสบการณ์และเทคนิคปฏิบัติการอันเป็นพื้นฐานในการทำงานวิจัย ตลอดระยะเวลาที่ผ่านมา และขอขอบคุณพี่ๆ ในห้องปฏิบัติการ และเพื่อนๆ ที่คอยให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา รวมทั้งกำลังใจ และขอขอบพระคุณบิดามารดาที่คอยให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจเสมอมาจนสามารถดำเนินงานวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

อรณี คีรีทอง

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ซ
สารบัญรูป	ฌ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
1.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	2
1.5 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง	3
บทที่ 2 การทดลอง	6
2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์	6
2.2 สารเคมี	6
2.3 ตัวอย่างข้าวสี	6
2.4 วิธีการทดลอง	7
2.5 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น	8
2.6 การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ	10
2.7 การเตรียมและการทดสอบสมบัติทางกายภาพของเซรั่มที่มีสารสกัดรำข้าวไรซ์เบอร์รี่	12
บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง	13
3.1 การหาชนิดตัวทำละลายและอุณหภูมิที่เหมาะสมเพื่อใช้สกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ตัวอย่างจากจังหวัดลพบุรี	13
3.2 การสกัดเมล็ดข้าว จมูกข้าวและรำข้าวสีชนิดต่างๆ	14
3.3 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น	15
3.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม เฟลโวนอยด์รวมและแอนโทไซยานินรวม	18
3.5 การเลือกชนิดสารสกัดข้าวสีที่เหมาะสมที่สุดในการนำมาเป็นส่วนประกอบของเซรั่มบำรุงผิวหน้า	23
3.6 การเตรียมเซรั่มที่มีสารสกัดรำข้าวไรซ์เบอร์รี่	23

สารบัญ (ต่อ)

3.7 การทดสอบสมบัติทางกายภาพของเซรั่มที่มีสารสกัดรำข้าวไรซ์เบอร์รี่ 23
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง 27
เอกสารอ้างอิง 28
ประวัติผู้วิจัย 31

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ตัวอย่างข้าวสีที่ใช้ในการทดลอง	7
2.2	แบบจำลองสำหรับใช้ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใน 96-well plates	9
3.1	ผลของตัวทำละลายและอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดเมล็ดข้าวไรซ์เบอร์รี่เต็มเมล็ด (จังหวัดลพบุรี)	14
3.2	ผลการสกัดเมล็ดข้าว จมูกข้าวและรำข้าวสีชนิดต่างๆ	15
3.3	ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดที่ได้	16
3.4	ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านไทโรซิเนสของสารสกัดข้าวสี	18
3.5	ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ	19
3.6	การทดสอบสมบัติทางกายภาพของเซรั่มที่เตรียมขึ้นภายใต้สภาวะอุณหภูมิห้อง (28°C)	24
3.7	การทดสอบสมบัติทางกายภาพของเซรั่มที่เตรียมขึ้นภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร	24
3.8	การทดสอบสมบัติทางกายภาพของเซรั่มที่เตรียมขึ้นภายใต้สภาวะเร่งอุณหภูมิต่ำสลับอุณหภูมิสูง (4°/45° C)	25
3.9	การทดสอบสมบัติทางกายภาพของเซรั่มที่เตรียมขึ้นโดยตากแดดเช้า (07.00-11.00 น.)	26

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1.1 โครงสร้างทางเคมีของเฟลโวนอยด์	3
1.2 โครงสร้างทางเคมีของแอนโทไซยานิน	4
3.1 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของ DPPH	17
3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดข้าวสี	17
3.3 กราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก	18
3.4 กราฟมาตรฐานของ quercetin	19
3.5 สารสกัดข้าวสี ในสารละลาย Folin-Ciocalteu	20
3.6 สารสกัดข้าวสี ในสารละลาย Folin-Ciocalteu เมื่อทำปฏิกิริยากับ Na_2CO_3	20
3.7 ปฏิกิริยาของ $NaNO_2$-$AlCl_3$-NaOH assay ต่อเฟลโวนอยด์	20
3.8 สารสกัดข้าวสีที่ทำปฏิกิริยากับ $NaNO_2$-$AlCl_3$-NaOH	21
3.9 โครงสร้างทางเคมีของแอนโทไซยานินเมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลง pH	22
3.10 สารสกัดข้าวสีในสารละลายแอซิเทตบัฟเฟอร์ pH 1.0 และ 4.5	22
3.11 การเปลี่ยนแปลงของสเปกตรัมของแอนโทไซยานิน ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 1.0 และ 4.5	22

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ข้าวเป็นพืชจำพวกเดียวกับหญ้า สามารถขึ้นได้ดีทั้งในพื้นที่น้ำท่วมขังและพื้นที่ดอน เป็นพืชที่ปลูกมานานในภูมิภาคเอเชียรวมทั้งประเทศไทยและเป็นอาหารหลักของประชากรส่วนใหญ่ในทวีปเอเชียที่เป็นเหมือนแหล่งพลังงานอุดมไปด้วยประโยชน์มากมาย ทั้งคาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน วิตามินและสารอาหารอื่นๆ ที่จำเป็น ข้าวมีองค์ประกอบที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายมนุษย์หลายชนิด คือ สารต้านอนุมูลอิสระและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น[1] โดยเฉพาะข้าวที่มีสีดำ สีแดงและสีม่วง เช่น ข้าวไรซ์เบอร์รี่ ข้าวกล้อง กข ข้าวกล้องทับทิมชุมแพ ข้าวเหนียวลืมผัว ข้าวสังข์หยด เป็นต้น รงควัตถุสีดำ สีแดงและสีม่วงที่พบในข้าวส่วนใหญ่เป็นสารกลุ่มแอนโทไซยานิน[2] นอกจากนั้นในเมล็ดข้าวประกอบด้วยจมูกข้าวและรำข้าวที่มีความสำคัญและมีประโยชน์มาก จมูกข้าวมีคุณค่าทางอาหารสูง อุดมไปด้วยวิตามินบีรวม วิตามินอีและ γ-oryzanol ช่วยต้านอนุมูลอิสระและมีประสิทธิภาพในการเพิ่มระดับไขมันชนิดดี ช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลและไทรกลีเซอไรด์ มีผลโดยตรงในการป้องกันโรคหัวใจและโรคที่เป็นผลมาจากหลอดเลือดตีบตัน นอกจากนี้วิตามินบีและวิตามินอียังช่วยรักษาสมดุลฮอร์โมนและบำรุงผิวพรรณ รำข้าวคือ ส่วนของผิวหรือเยื่อหุ้มเมล็ดข้าวได้มาจากกระบวนการสีข้าว เป็นผลพลอยได้ที่มักนำไปเป็นอาหารสัตว์ รำข้าวมีวิตามินอีหลายชนิด ทำหน้าที่ต้านรังสี UV จากแสงแดด ช่วยเก็บน้ำไว้ใต้เซลล์ผิวหนัง ทำให้ยืดหยุ่นเรียบเนียน ลดริ้วรอย ลดคอเลสเตอรอล เพิ่มไขมันดีในกระแสเลือด มีเมลาโทนินช่วยในการนอนหลับและผ่อนคลาย[3-5]

ในปัจจุบันข้าวไทยมีหลายชนิด ได้แก่ ข้าวเจ้า ข้าวพื้นเมืองและข้าวสีต่างๆ เช่น ข้าวสีแดง ข้าวสีม่วง ซึ่งมีรงควัตถุประเภทเฟลโวนอยด์ ฟีนอลิกและแอนโทไซยานิน อยู่บริเวณเยื่อหุ้มเมล็ดหรือรำข้าว รงควัตถุสีดำหรือสีแดงเหล่านี้พบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ[6] การใช้ประโยชน์จากการสกัดพืชดังกล่าวมีหลายวิธี วิธีที่ได้รับความนิยมคือ ใช้ตัวทำละลายสกัด เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย ค่าใช้จ่ายค่อนข้างต่ำ ที่นิยมมีหลายชนิด เช่น น้ำ เมทานอล เอทานอล แอซิโทน เป็นต้น Sharma และคณะ[7] ได้สกัดสารต้านอนุมูลอิสระและสารประกอบฟีนอลิกในน้ำผลไม้โดยใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกัน พบว่า การใช้น้ำ เมทานอล เอทานอลและแอซิโทน ได้ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระและสารประกอบฟีนอลิกที่สูงใกล้เคียงกันในช่วง 21.3-26.0 GAE mg/100mL และร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ 63.4-84.0 ตามลำดับ

จากการศึกษาของ Laokuldilok *et al.* (2011) เพื่อหาปริมาณและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิก แอนโทไซยานิน α-tocopherol และ γ-oryzanol ในรำข้าวสีต่างๆ ที่สกัดด้วยเมทานอล พบว่าแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีกว่าสารสกัดรำข้าวสีขาว และมีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดกรดไขมัน linoleic peroxidation (60-85%) การวิเคราะห์ด้วย HPLC พบสารต้านอนุมูลอิสระในรำข้าวเป็น γ-oryzanol (39-63%) และสารประกอบฟีนอลิก (33-43%) ในรำข้าวสีดำพบแอนโทไซยานิน 18-26%

นอกจากนี้รำข้าวสีดำมีปริมาณกรดแกลลิก กรดไฮดรอกซีเบนโซอิกและกรดโปรโตคาทีชูอิกในปริมาณมากกว่าในรำข้าวสี[8]

ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะสกัดสารจากเมล็ดข้าว จมูกข้าวและรำข้าวสี วิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลิก เฟลโวนอยด์และแอนโทไซยานิน ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านไทโรซิเนสของสารสกัดชนิดต่างๆ เพื่อเป็นข้อมูลประกอบการตัดสินใจเลือกเป็นส่วนผสมในการผลิตเซรั่มบำรุงผิวหน้า

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 สกัดสารจากเมล็ดข้าว จมูกข้าวและรำข้าวสี และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

1.2.2 เตรียมเซรั่มที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากข้าวสี

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้เซรั่มบำรุงผิวหน้าที่มีสารสกัดจากข้าวสี

1.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการศึกษาของ Miller *et al.* ปี 2002 พบว่าการสกัดแอนโทไซยานินจากข้าวสีดำ ช่วยกำจัดอนุมูลอิสระและป้องกันไม่ให้สายดีเอ็นเอสายคู่ถูกทำลายโดย peroxyl และ hydroxyl radicals เนื่องจากแอนโทไซยานินสามารถรวมตัวกับโมเลกุลดีเอ็นเอได้ และป้องกันไม่ให้เกิดออกซิเดชัน แอนโทไซยานินมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ช่วยป้องกันการเกิดออกซิเดชันของไลโปโปตีนและทำหน้าที่คล้ายกับวิตามินซี มีฤทธิ์ป้องกันการสร้าง plaque บริเวณหลอดเลือดที่เป็นสาเหตุของโรคหลอดเลือดหัวใจ โรคเบาหวาน และสามารถยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง ช่วยลดการอักเสบ ช่วยต้านการเจริญของแบคทีเรียและช่วยทำให้เซลล์ประสาททำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ[9]

จากการศึกษาของ Chareetip *et al.* (2019) พบว่ารำข้าวหอมนิลมีรงควัตถุสีดำ มีปริมาณแอนโทไซยานินสูงทำให้มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ผู้วิจัยจึงสนใจนำสารสกัดจากรำข้าวหอมนิลไปใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง โดยทดลองศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรำข้าวหอมนิลในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน 4 ชนิด ได้แก่ 95% ethanol, 50% ethanol, 0.1 M citric acid ในน้ำ และ 0.1 M citric acid ใน 50% ethanol โดยใช้ วิธี ferric reducing antioxidant power (FRAP) และวิธี 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) พบว่าสารสกัดรำข้าวที่ใช้ 0.1 M citric acid ใน 50% ethanol (50BE) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดสำหรับการทดสอบโดยวิธี FRAP assay (IC_{50} 0.96±0.03 mM $FeSO_4$/g extract) และวิธี ABTS assay (IC_{50} 10.86±0.50 mg/mL) เมื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม เฟลโวนอยด์รวมและแอนโทไซยานินรวมโดย Folin-Ciocalteu assay, aluminium chloride colorimetric assay และ pH differential ตามลำดับ พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสาร

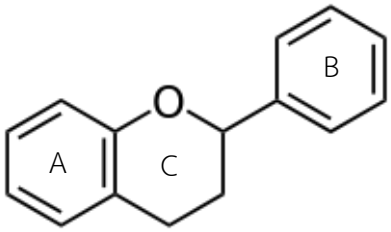
สกัด 50BE สูงสุดเท่ากับ 44.41 mg GAE/g ปริมาณเฟลโวนอยด์ 0.51 mg RE/g ใน 50BE และปริมาณแอนโทไซยานิน 258.81 mg CGE/g[10]

1.5 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

1.5.1 **สารต้านอนุมูลอิสระ** (antioxidant) หรือ**สารกำจัดอนุมูลอิสระ** (radical scarvengers) หมายถึง สารที่สามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระโดยตรง เพื่อหยุดยั้งและป้องกันไม่ให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ทำหน้าที่ให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ สามารถจับโลหะที่ส่งเสริมให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือลดการก่อตัวของ singlet oxygen ซึ่งเป็นออกซิเจนที่อยู่ในรูปที่พร้อมจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ทำให้อนุมูลอิสระไม่สามารถสร้างความเสียหายให้กับโมเลกุลอื่นๆ ได้อีก[11] สารต้านอนุมูลอิสระมีกลไกการทำงานด้วยกันหลายแบบ เช่น ดักจับอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น หยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ไม่ให้ดำเนินต่อ ยับยั้งการทำงานของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอนจับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน เสริมฤทธิ์และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระ เป็นต้น สิ่งมีชีวิตจะมีระบบการป้องกันการทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อจากอนุมูลอิสระ ประกอบด้วยสารต้านอนุมูลอิสระหลายชนิด ทั้งที่เป็นเอนไซม์เช่น superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX) และ glutathione peroxidase (GPX) เป็นต้น และไม่เป็นเอนไซม์ เช่น vitamin A (retinol), vitamin C (ascorbic acid), vitamin E (**α**-tocopherol), glutathione (GSH), แคโรทีนอยด์และสารประกอบฟีนอลิก สารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้มีแหล่งที่มาจาก 2 แหล่ง คือ สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์และสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ[12]

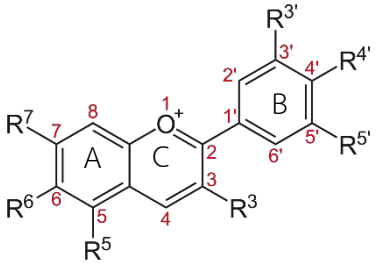
1.5.2 **สารประกอบฟีนอลิกหรือโพลีฟีนอลรวมถึงอนุพันธ์ของสารประกอบฟีนอล** ได้แก่ phenolic acid, tannins, lignin, abscisic acid, cinnamic acid, caffeic acid, chlorogenic acid, tyrosine, phenylalanine, dihydroxyphenylalanine (DOPA), coenzyme Q, quinines, coumarins, flavonoids และ anthocyanins[13] เป็นต้น

1.5.3 **เฟลโวนอยด์** (flavonoid) เป็นกลุ่มของสารประกอบที่มีโครงสร้างพื้นฐานเป็นฟีนิลเบนโซไพโรน มีโมเลกุลขนาดเล็กและมีโครงสร้างประกอบด้วยการจัดเรียงตัวของคาร์บอน 15 อะตอม เป็นวงแหวน 3 วง ได้แก่ วงแหวนเบนซีน 2 วง (A และ B) เชื่อมต่อกับวงแหวนไพแรนซึ่งอยู่ตรงกลางของโครงสร้าง (C) ดัง**รูปที่ 1.1** สามารถพบได้ในพืช เช่น ผัก ผลไม้ และเครื่องดื่มบางชนิด เช่น ไวน์ ชา[15] เป็นต้น



รูปที่ 1.1 โครงสร้างทางเคมีของเฟลโวนอยด์[15]

1.5.4 **แอนโทไซยานิน** (anthocyanin) เป็นกลุ่มของสารประกอบที่มีโครงสร้างพื้นฐานประกอบด้วยแอนโทไซยานิดิน น้ำตาลและกรด มีโมเลกุลขนาดเล็กและมีโครงสร้างประกอบด้วยการจัดเรียงตัวของคาร์บอน 15 อะตอม เป็นวงแหวน 3 วง ได้แก่ วงแหวนแอโรมาติก (A และ B) ต่อกับวงแหวนเฮเทอโรไซคลิก (C) ซึ่งอยู่กลางโครงสร้าง ดัง**รูปที่ 1.2** แอนโทไซยานินที่พบมากในปัจจุบันมี 6 ชนิด ได้แก่ เพลาโกนิดิน (pelargonidin) ไซยานิดิน (cyanidin) เดลฟินิดิน (delphinidin) พีโอนิดิน (peonidin) เพทุนิดิน (petunidin) และมอลวิดิน (malvidin)[16]



รูปที่ 1.2 โครงสร้างทางเคมีของแอนโทไซยานิน[17]

แอนโทไซยานินพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ลดการอักเสบ ลดไขมันในเลือด ลดความเสี่ยงต่อโรคมะเร็ง ต้านไวรัส มีประสิทธิภาพต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าวิตามินซีและวิตามินอีถึง 2 เท่า การสะสมแอนโทไซยานินขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม โดยเฉพาะความเข้มแสง ในสภาพความเข้มแสงมากพืชจะสะสมแอนโทไซยานินได้มาก อุณหภูมิต่ำในช่วงฤดูใบไม้ร่วงช่วยให้มีการสังเคราะห์และสะสมแอนโทไซยานินมากขึ้น สภาพความเครียดต่างๆ ทั้งการขาดธาตุอาหาร การขาดน้ำ สภาพที่มีแสงอัลตราไวโอเลตมาก การเกิดบาดแผล กระตุ้นให้เกิดการสร้างและการสะสมแอนโทไซยานินได้มาก[18]

1.5.5 **เอนไซม์ไทโรซิเนส** (tyrosinase) เป็นเอนไซม์โมโนออกซิจิเนส ที่มีทองแดงเป็นองค์ประกอบในโมเลกุล เอนไซม์นี้พบได้ทั่วไปในธรรมชาติทั้งในพืช เชื้อรา แมลงและสัตว์ ในคนพบเอนไซม์ไทโรซิเนสในเมลาโนโซม (malanosome) ซึ่งเป็นโครงสร้างสีน้ำตาลที่ถูกสร้างขึ้นโดยเซลล์เมลาโนไซต์ (melanocyte) บริเวณชั้นล่างสุดของหนังกำพร้า เอนไซม์ไทโรซิเนสมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการสร้างเม็ดสีเมลานินของผิวหนัง เมลานินที่ถูกสร้างขึ้นที่ผิวหนังมี 2 ชนิดคือ ชนิดสีดำหรือสีน้ำตาล เรียกว่ายูเมลานิน (eumelanin) เป็นกลุ่มเม็ดสีที่ไม่ละลายน้ำและมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ มีโครงสร้างหลักเป็น 5,6-ไดไฮดรอกซีอินโดล ส่วนเมลานินอีกชนิดมีสีเหลืองหรือสีส้มเรียกว่า ฟีโอเมลานิน (phaeomelanin) สัดส่วนของ eumelanin และ phaeomelanin จะแตกต่างกันไปในแต่ละบุคคล ขึ้นอยู่กับเชื้อชาติและสายพันธุ์[19]

สารมาตรฐานที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ

1. **กรดแอสคอร์บิก** (ascorbic acid) สารต้านอนุมูลอิสระที่ละลายน้ำได้ดี พบมากในผลไม้ที่มีรสเปรี้ยว เป็นสารอาหารที่ร่างกายต้องได้รับในปริมาณที่เพียงพอต่อวัน เป็นสารต้านอนุมูลอิสระในธรรมชาติที่มีกลไกต่อต้านอนุมูลอิสระโดยให้อิเล็กตรอนอิสระบนโครงสร้างไปยังโมเลกุลของอนุมูลอิสระเพื่อทำลาย และลดความ

เป็นพิษของอนุมูลอิสระที่จะไปทำลายองค์ประกอบของเซลล์ วิตามินซีเป็นสารตัวหนึ่งที่นิยมใช้เป็นสารมาตรฐานในการวัดปริมาณอนุมูลอิสระ[20]

2. **กรดแกลลิก** (gallic acid) จัดอยู่ในกลุ่มพอลิฟีนอล โครงสร้างเคมีประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล ภายในโมเลกุลสามารถให้อิเล็กตรอนกับโมเลกุลอื่นได้ดี ใช้เป็นสารมาตรฐานสำหรับคำนวณหาปริมาณรวมของสารพอลิฟีนอล รายงานค่าเป็นน้ำหนักสมมูลมิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักแห้งของสารทดสอบ (mg gallic equivalent per g dry matter, มีหน่วยเป็น mg GAE g^{-1} DM)[21]

3. **Quercetin** เป็นสารในกลุ่มเฟลโวนอยด์ พบมากในผัก ผลไม้ เป็นอนุพันธ์ของเฟลโวนอยด์ ละลายน้ำได้ดี จึงเหมาะสำหรับใช้เป็นสารมาตรฐานในการหาปริมาณรวมของเฟลโวนอยด์ในตัวอย่างทดสอบ[22]

บทที่ 2
การทดลอง

2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องชั่งดิจิตอลทศนิยม 4 ตำแหน่ง, heating mantle, rotatory evaporator, microplate reader, vortex-genie2, micropipette, pipette tip และ 96 well plate

2.2 สารเคมี

2.2.1 ตัวทำละลาย ได้แก่ acetone, dichloromethane, dimethyl sulfoxide (DMSO), ethanol, ethyl acetate, hexane และ methanol

2.2.2 สารที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

สารที่ใช้ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ กรดแอสคอร์บิก และ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

สารที่ใช้ทดสอบฤทธิ์ต้านไทโรซิเนส ได้แก่ กรดโคจิก (kojic acid), L-tyrosine และ tyrosinase enzyme จากเห็ด (250 U/mL)

2.2.3 สารที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ

สารที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ 7% Na_2CO_3 และ Folin-Ciocultev reagent

สารที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณเฟลโวนอยด์รวม ได้แก่ 7% $AlCl_3$ (W/V), 35% $NaNO_2$ (W/V) และ 1.8 M NaOH

สารที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินรวม ได้แก่ 0.1 M acetate buffer (pH = 1) และ 0.1 M acetate buffer (pH = 4.5)

2.2.4 สารที่ใช้เตรียมเซรั่ม

ได้แก่ butylene glycol, caprylic capric triglyceride, disodium EDTA, DI water, glycerin, PCA dimethicone, squalene และ xanthan gum

2.3 ตัวอย่างข้าวสี

ได้รวบรวมตัวอย่างข้าวสี 15 ชนิด ได้แก่ เมล็ดข้าว จมูกข้าวและรำข้าวสี เพื่อใช้เป็นตัวอย่างในการทดลอง ดังแสดงใน**ตารางที่ 2.1**

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างข้าวสีที่ใช้ในการทดลอง

ลำดับ	ข้าวสี	ส่วนของข้าวสี	บริษัท	แหล่งที่มา
1	ข้าวไรซ์เบอร์รี่	เมล็ดข้าว	กสิกรรมไร้สารพิษละโว้ธานี จำกัด	ลพบุรี
2			ตงฮั้วบัวใหญ่ (1994) จำกัด	นครราชสีมา
3			วิสาหกิจชุมชนเกษตรอินทรีย์ตำบลบางเค็ม จำกัด	เพชรบุรี
4	ข้าวไรซ์เบอร์รี่	เมล็ดแบบหัก	กสิกรรมไร้สารพิษละโว้ธานี จำกัด	ลพบุรี
5	ข้าวไรซ์เบอร์รี่	รำข้าว	ร้านฝึกฝนบุญนิยม จนดี	ไม่ระบุแหล่งที่มา (ซื้อผ่านออนไลน์)
6			ริชชี่ ไรซ์ โปรดักส์ จำกัด	พัทลุง
7	ข้าวกล้องทับทิมชุมแพ	เมล็ดข้าว	กสิกรรมไร้สารพิษละโว้ธานี จำกัด	ลพบุรี
8			วิสาหกิจชุมชนกลุ่มสงเสริมอาชีกเกษตรกร บ้านหนองประดู่	เพชรบุรี
9	ข้าวกล้อง กข43	เมล็ดข้าว	กสิกรรมไร้สารพิษละโว้ธานี จำกัด	ลพบุรี
10	ข้าวกล้องสังข์หยด	เมล็ดข้าว	กสิกรรมไร้สารพิษละโว้ธานี จำกัด	ลพบุรี
11		เมล็ดแบบหัก	กสิกรรมไร้สารพิษละโว้ธานี จำกัด	ลพบุรี
12		จมูกข้าวและรำข้าว	กลุ่มสตรีสหกรณ์จักสานบ้านท่าบัวแก้ว	พัทลุง
13		รำข้าว	ริชชี่ ไรซ์ โปรดักส์ จำกัด	พัทลุง
14	ข้าวกล้องงอกผสมข้าวกล้องสังข์หยด	จมูกข้าว	วิสาหกิจชุมชนบ้านบัวแก้ว	พัทลุง
15	ข้าวเหนียวลืมผัว	เมล็ดข้าว	กสิกรรมไร้สารพิษละโว้ธานี จำกัด	ลพบุรี

2.4 วิธีการทดลอง

2.4.1 การศึกษาตัวแปรที่มีผลต่อการสกัดสารจากเมล็ดข้าวไรซ์เบอร์รี่

ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดสารจากเมล็ดข้าวสองปัจจัย ได้แก่ ชนิดของตัวทำละลายห้าชนิด (acetone, dichloromethane, ethanol, ethyl acetate และ methanol) และอุณหภูมิ โดยทดลองเปรียบเทียบระหว่างการสกัดที่อุณหภูมิห้อง (28 °C) และที่อุณหภูมิรีฟลักซ์

ชั่งเมล็ดข้าวไรซ์เบอร์รี่ 5 กรัม ลงในขวดก้นกลมขนาด 100 mL เติมตัวทำละลายที่สนใจ ได้แก่ acetone, dichloromethane, ethanol, ethyl acetate หรือ methanol 50 mL คนด้วย magnetic stirrer เป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง ระเหยตัวทำละลายโดยใช้เครื่อง rotatory evaporator ชั่งสารสกัดที่แห้งและคำนวณ % yield

ทำการทดลองเช่นเดียวกับการศึกษาข้างต้นแต่รีฟลักซ์สารผสมนาน 2 ชั่วโมงแทนการสกัดที่อุณหภูมิห้อง

2.4.2 การสกัดสารจากรำข้าวและจมูกข้าวสีชนิดต่างๆ

ในกรณีของรำข้าวและจมูกข้าวสี นำไปแช่ในเฮกเซนจนท่วมเป็นเวลา 1 วัน เพื่อสกัดน้ำมัน ก่อนนำมาสกัดสาร ผึ่งรำข้าวหรือจมูกข้าวที่สกัดด้วยเฮกเซนแล้วให้แห้ง จากนั้นทำการทดลองเช่นเดียวกับการสกัดเมล็ดข้าว บันทึกน้ำหนักของสารสกัดที่แห้งและคำนวณ % yield

2.5 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น

2.5.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

เลือกใช้วิธีการทดสอบกับ DPPH radical scavenging assay[23]

<u>วิธีการทดลองทั่วไป</u>

1. เตรียมสารสกัดข้าวสีที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1 mg/mL ในตัวทำละลายผสมเมทานอลและ DMSO (9:1)
2. ปิเปตสารตัวอย่าง 50 ไมโครลิตรลงใน 96 well plate ช่อง BP, BS และ SD ตาม**ตารางที่ 2.2**
3. เตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.05 mg/mL ในเมทานอล 40 mL
4. ปิเปตสารละลาย DPPH 100 ไมโครลิตรลงใน 96 well plate ช่อง NC, PC และ SD ตาม**ตารางที่ 2.2**
5. จากข้อ 2-4 ทำการทดลองซ้ำ 3 ซ้ำ
6. ตั้งในที่มืดประมาณ 30 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยใช้เครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ใช้กรดแอสคอร์บิกเป็น positive control
7. คำนวณ % inhibition

$$\% SA_{DPPH^{\cdot}} = [(A_{control} - A_{sample})/ A_{control}] \times 100\%$$

SA_{DPPH} = Scavenging effect of DPPH

$A_{control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม (methanol และ DPPH)

A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของผสมสารสกัดข้าวสีตัวอย่างและ DPPH

ตารางที่ 2.2 แบบจำลองสำหรับใช้ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใน 96-well plates

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	PC	BK
B	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	PC	BK
C	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	PC	BK
D	BS	BS	BS	BS	BS	BS	BS	BS	BS	BS	BP	BK
E	BS	BS	BS	BS	BS	BS	BS	BS	BS	BS	BP	NC
F	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	PC	NC
G	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	PC	NC
H	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	PC	NC

Notes: BK: Blank (150 µL MeOH)

NC: Negative Control (100 µL of 0.05 mg/mL DPPH + 50 µL MeOH)

PC: Positive Control (50 µL of ascorbic acid + 100 µL of 0.05 mg/mL DPPH)

BP: Blank Positive Control (50 µL of sample + 100 µL MeOH)

BS: Blank Sample (50 µL of sample + 100 µL MeOH)

SD: Sample DPPH (50 µL of sample + 100 µL of 0.05 mg/mL DPPH)

2.5.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านไทโรซิเนส[24]

<u>วิธีการทดสอบทั่วไป</u> ใช้ 96 well plate

1. ชั่งโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 2.4 g เติมน้ำ DI 400 mL และชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 2.8 g เติมน้ำ DI 400 mL
2. เตรียมบัฟเฟอร์ โดยผสมสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 120 mL กับสารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 280 mL
3. ปิเปต DMSO 100 ไมโครลิตรและบัฟเฟอร์ 900 ไมโครลิตร ลงในสารสกัดข้าวสีตัวอย่างที่ชั่งไว้ 1.5 และ 3 mg
4. เตรียมสารละลาย L-tyrosine โดยชั่งสาร 22.65 mg และเติมบัฟเฟอร์ 50 mL
5. ปิเปตสารละลายสารสกัดข้าวสีตัวอย่าง 50 ไมโครลิตร ใส่ใน 96 well plate เติมสารละลาย L-tyrosine 50 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากันด้วยเครื่อง incubator 30 นาที
6. จากข้อ 3-5 ทำการทดลองซ้ำ 3 ซ้ำ
7. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader
8. คำนวณ % tyrosinase inhibition

$$\% \text{ Tyrosinase inhibition} = \frac{\Delta Acontrol - \Delta Asample}{\Delta Acontrol} \times 100$$

ΔAcontrol คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ blank ที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร

ΔAsample คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารผสมตัวอย่าง

2.6 การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ

วิธีการเตรียมสารสกัดข้าวสีตัวอย่างที่ความเข้มข้น 0.1, 1.0 และ 10 mg/mL

1. เตรียม stock solution สารสกัดข้าวสีตัวอย่าง โดยชั่งสารสกัดข้าวสีตัวอย่าง 15 mg เติม DMSO 1,000 ไมโครลิตร
2. เตรียมสารสกัดข้าวสีตัวอย่างความเข้มข้น 10 mg/mL โดยนำ stock solution สารสกัดข้าวสีตัวอย่างจากข้อ 1 667 ไมโครลิตร เติม DMSO 333 ไมโครลิตร
3. เตรียมสารสกัดข้าวสีตัวอย่างความเข้มข้น 0.1 และ 1 mg/mL ด้วยวิธีการเดียวกับข้อ 2 โดยปิเปต stock solution สารสกัดข้าวสีตัวอย่างจากข้อ 1 มา 10 และ 100 ไมโครลิตร เติม DMSO ให้มีปริมาตรรวม 1,000 ไมโครลิตร จะได้สารละลายสารสกัดข้าวสีตัวอย่างที่ความเข้มข้น 0.1 และ 1.0 mg/mL ตามลำดับ

2.6.1 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม[25]

<u>วิธีการทดลองทั่วไป</u>

1. ผสมสารละลายสารสกัดข้าวสีตัวอย่างที่ความเข้มข้น 0.1, 1.0 และ 10 mg/mL 10 ไมโครลิตร กับ Folin-Ciocalteu reagent ที่เจือจางในน้ำกลั่น (1:10) 50 ไมโครลิตร ลงใน 96 well plate ผสมสารให้เข้ากันด้วยเครื่อง incubator 6 นาที
2. เติม 10% Na_2CO_3 100 ไมโครลิตร ลงใน 96 well plate ผสมสารให้เข้ากันด้วยเครื่อง incubator 90 นาที
3. จากข้อ 1-2 ทำการทดลองซ้ำ 3 ซ้ำ
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตรด้วยเครื่อง microplate reader

รายงานปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในหน่วยมิลลิกรัมของ gallic acid equivalent (GAE) ต่อมิลลิลิตรของสารสกัด ซึ่งคำนวณได้จากกราฟมาตรฐานของ gallic acid

2.6.2 การวิเคราะห์ปริมาณเฟลโวนอยด์รวม[26]

<u>วิธีการทดลองทั่วไป</u>

1. ผสมสารละลายสารสกัดข้าวสีตัวอย่างที่ความเข้มข้น 0.1, 1.0 และ 10 mg/mL 20 ไมโครลิตรกับน้ำกลั่น 50 ไมโครลิตรและ 35% $NaNO_2$ (W/V) 20 ไมโครลิตร ลงใน 96 well plate ผสมสารให้เข้ากันด้วยเครื่อง incubator 5 นาที

2. เติม 7% $AlCl_3$ (W/V) 20 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากันด้วยเครื่อง incubator 6 นาที

3. เติม 1.8 M NaOH 20 ไมโครลิตรและน้ำกลั่น 50 ไมโครลิตร

4. จากข้อ 1-3 ทำการทดลองซ้ำ 3 ซ้ำ

5. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตรด้วยเครื่อง microplate reader

รายงานปริมาณเฟลโวนอยด์รวมในหน่วยมิลลิกรัมของ quercetin equivalent (QE) ต่อมิลลิลิตรของสารสกัด ซึ่งคำนวณได้จากกราฟมาตรฐานของ quercetin

2.6.3 การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินรวม[27]

<u>วิธีการทดลองทั่วไป</u>

1. เตรียมแอซิเทตบัฟเฟอร์ pH 4.5 โดยชั่งโซเดียมแอซิเทต 476 mg และ 1 M กรดแอซิติก 6.5 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI เป็น 100 mL
2. เตรียมแอซิเทตบัฟเฟอร์ pH 1.0 โดยนำแอซิเทตบัฟเฟอร์ pH 4.5 ที่เตรียมได้จากข้อที่ 1 มาปรับ pH ด้วย HCl
3. ผสมสารละลายสารสกัดข้าวสีตัวอย่างที่ความเข้มข้น 0.1, 1.0 และ 10 mg/mL 50 ไมโครลิตรกับแอซิเทตบัฟเฟอร์ pH 1.0 100 ไมโครลิตร ลงใน 96 well plate
4. ทำเช่นเดียวกับข้อที่ 3 แต่เปลี่ยนจากแอซิเทตบัฟเฟอร์ pH 1.0 เป็น แอซิเทตบัฟเฟอร์ pH 4.5
5. จากข้อ 3-4 ทำการทดลองซ้ำ 3 ซ้ำ
6. ผสมสารให้เข้ากันด้วยเครื่อง incubator 10 นาที
7. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 และ 750 นาโนเมตรด้วยเครื่อง microplate reader

ปริมาณแอนโทไซยานินรวม คำนวณได้จากสูตร

$$\text{ปริมาณแอนโทไซยานินรวม (mg/L)} = \frac{A \times MW \times DF \times 1000}{\Sigma \times 1}$$

MW คือ มวลโมเลกุลของ cyaniding-3-glucoside (C3G) = 449.2 g/mol

DF = dilute factor

Σ คือ Molar absorptivity = 26,900 L /mol.cm

A คือ ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance)= $(A_{520} - A_{750})$ pH 1.0 - $(A_{520} - A_{750})$ pH 4.5

2.7 การเตรียมและการทดสอบสมบัติทางกายภาพของเซรั่มที่มีสารสกัดรำข้าวไรซ์เบอร์รี่

2.7.1 การเตรียมเซรั่มที่มีสารสกัดรำข้าวไรซ์เบอร์รี่

<u>การเตรียมส่วนประกอบสำคัญในการผลิตเซรั่ม</u>

1. เตรียมวัฏภาคในรูปน้ำมีส่วนประกอบ ได้แก่ น้ำ deionized (DI), 0.1% disodium EDTA, 1% glycerin, 0.1% xanthan gum และ 2% butylene glycol
2. เตรียมวัฏภาคในรูปน้ำมันมีส่วนประกอบ ได้แก่ 2% caprylic capric triglyceride, 0.5% squalene, 0.5% PCA dimethicone และ อิมัลซิไฟเออร์ 2% ที่ประกอบด้วย cetearyl alcohol (and)ceteth-20 phosphate (and) dicetyl phosphate
3. เตรียมสารละลายสารสกัดรำข้าวไรซ์เบอร์รี่ โดยละลายสารสกัดรำข้าวไรซ์เบอร์รี่ 500 mg ด้วย 10% เอทานอล แล้วเติมน้ำ DI จนครบ 20 กรัม

<u>การเตรียมเซรั่ม</u>

1. ผสมวัฏภาคในรูปน้ำมัน 5 กรัม กับวัฏภาคในรูปน้ำ 92.2 กรัม ที่อุณหภูมิ 75-80°C
2. ทำให้ของผสมในข้อ 1 เย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 40°C
3. ปั่นของผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องโฮโมจีไนเซอร์เป็นเวลา 3 นาที
4. ปรับ pH ของผสมให้อยู่ในช่วง 5.3-5.7 ด้วยกรดซิตริก (citric acid)
5. เติมสารกันเสีย 0.8 กรัม ของสารผสม phenoxyethanol และ ethylhexylglycerin (W/W)
6. รอให้เย็นแล้วผสมสารละลายสารสกัดรำข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่เตรียมไว้ข้างต้น 2 กรัม

2.7.2 การทดสอบสมบัติทางกายภาพของเซรั่มที่มีสารสกัดรำข้าวไรซ์เบอร์รี่

ทดสอบสมบัติทางกายภาพของเซรั่มที่มีสารสกัดรำข้าวไรซ์เบอร์รี่ในขวดพร้อมฝาปิดปริมาณ 10-30 mL ภายใต้ภาวะต่างๆ ต่อไปนี้

1. ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 เดือน
2. ภายใต้ภาวะเร่งอุณหภูมิต่ำสลับอุณหภูมิสูง (4°/45° C) นาน 7 วัน
   ทำโดยนำเซรั่มไปอบด้วยตู้อบที่อุณหภูมิ 45°C 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเซรั่มไปแช่ตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C 24 ชั่วโมง ทำสลับกันเป็นเวลา 7 วัน
3. ตากแดดเช้า (07.00-11.00 น.) 4 ชั่วโมง นาน 7 วัน
4. ภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตรนาน 30 นาที

ในแต่ละการทดลองทำการทดลอง 3 ซ้ำ พิจารณาสีและการแยกชั้นของเนื้อเซรั่ม บันทึกผล

บทที่ 3
ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ศึกษาหาชนิดตัวทำละลายและอุณหภูมิที่เหมาะสมเพื่อใช้สกัดเมล็ดข้าว จมูกข้าวและรำข้าวสีชนิดต่างๆ นอกจากนี้ยังวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก เฟลโวนอยด์และแอนโทไซยานิน ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านไทโรซิเนสของสารสกัดข้าวสีที่ได้ เพื่อเป็นข้อมูลประกอบการตัดสินใจเลือกเป็นส่วนผสมในการผลิตเซรั่มบำรุงผิวหน้า

ในการศึกษานี้ใช้ code 5 ตำแหน่งเป็นรหัสประจำสารสกัด ตำแหน่งที่ 1 คือ ส่วนของข้าวสี ได้แก่ ข้าวสีเต็มเมล็ดแทนด้วย W, ข้าวสีเมล็ดหักแทนด้วย B, จมูกข้าวหรือรำข้าวสีแทนด้วย G, ตำแหน่งที่ 2 คือชนิดข้าวสี ได้แก่ R คือข้าวไรซ์เบอร์รี่, T คือข้าวกล้องทับทิมชุมแพ, O คือข้าวกล้อง กข 43, S คือข้าวกล้องสังข์หยด, B คือข้าวเหนียวลืมผัว, Os คือข้าวกล้องงอกผสมจมูกข้าวสังข์หยด, ตำแหน่งที่ 3 คือตัวทำละลายที่ใช้ ได้แก่ A คือ acetone, D คือ dichloromethane, E คือ ethanol, M คือ methanol และ T คือ ethyl acetate, ตำแหน่งที่ 4 คืออุณหภูมิที่ใช้ หมายเลข 1 คือ อุณหภูมิห้อง (28° C) หมายเลข 2 คือ อุณหภูมิรีฟลักซ์, ตำแหน่งที่ 5 คือแหล่งที่มาของข้าว ได้แก่ L คือ ลพบุรี, N คือ นครราชสีมา, P คือ พัทลุง, Ph คือ เพชรบุรี, X คือ ไม่สามารถระบุแหล่งที่มา

ตัวอย่างเช่น **WRM2L** หมายถึง ข้าวไรซ์เบอร์รี่เต็มเมล็ดจากจังหวัดลพบุรีที่สกัดด้วยเมทานอลแบบรีฟลักซ์

3.1 การหาชนิดตัวทำละลายและอุณหภูมิที่เหมาะสมเพื่อใช้สกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ตัวอย่างจากจังหวัดลพบุรี

ได้สกัดเมล็ดข้าวไรซ์เบอร์รี่ 5 กรัม ด้วยตัวทำละลายที่สนใจ ได้แก่ acetone, dichloromethane, ethanol, ethyl acetate หรือ methanol 50 mL ที่อุณหภูมิห้องหรือรีฟลักซ์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ชั่งสารสกัดที่แห้งและคำนวณ % yield เพื่อหาชนิดตัวทำละลายและอุณหภูมิที่เหมาะสมเพื่อนำไปใช้สกัดตัวอย่างเมล็ดข้าว จมูกข้าวและรำข้าวสีชนิดต่างๆ ต่อไป ผลการทดลองแสดงไว้ใน**ตารางที่ 3.1**

ตารางที่ 3.1 ผลของตัวทำละลายและอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่เต็มเมล็ด (จังหวัดลพบุรี)

ลำดับ	code	ตัวทำละลาย	อุณหภูมิที่ใช้	ปริมาณตัวอย่าง (g)	น้ำหนักสารสกัดที่ได้ (g)	% yield
1	**WRM1L**	methanol	อุณหภูมิห้อง	5.02	0.089	1.77
2	**WRM2L**	methanol	รีฟลักซ์	5.05	0.162	3.21
3	**WRA1L**	acetone	อุณหูมิห้อง	5.02	0.086	1.71
4	**WRA2L**	acetone	รีฟลักซ์	5.02	0.149	2.97
5	**WRE2L**	ethanol		5.03	0.067	1.33
6	**WRT2L**	ethyl acetate		5.01	0.065	1.30
7	**WRD2L**	dichloromethane		5.02	0.112	2.23

จาก**ตารางที่ 3.1** เมื่อพิจารณาปริมาณสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายต่างชนิด ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน พบว่าตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่เต็มเมล็ดคือ เมทานอล ให้ปริมาณสารสกัด 0.162 กรัม (3.21% yield) โดยการสกัดแบบรีฟลักซ์

3.2 การสกัดเมล็ดข้าว จมูกข้าวและรำข้าวสีชนิดต่างๆ

ได้สกัดเมล็ดข้าว จมูกข้าวหรือรำข้าวสีชนิดต่างๆ สิบห้าชนิดด้วย methanol โดยรีฟลักซ์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อหาว่าข้าวสีจากแหล่งใดให้ปริมาณสารสกัดมากที่สุดสามอันดับแรก ผลการทดลองแสดงไว้ใน**ตารางที่ 3.2**

ตารางที่ 3.2 ผลการสกัดเมล็ดข้าว จมูกข้าวและรำข้าวสีชนิดต่างๆ

ลำดับ	code	ปริมาณตัวอย่าง (g)	น้ำหนักสารสกัดที่ได้ (g)	% yield
1	WRM2L	5.05	0.162	3.21
2	WRM2N	5.02	0.143	2.85
3	WRM2Ph	5.00	0.146	2.92
4	WTM2L	5.01	0.070	1.40
5	WTM2Ph	5.02	0.096	1.91
6	WOM2L	5.03	0.080	1.59
7	WSM2L	5.02	0.103	2.05
8	WBM2L	5.01	0.125	2.50
9	BRM2L	5.01	0.197	3.93
10	BSM2L	5.01	0.103	2.06
11	GRM2X	5.01	0.993	19.8
12	GRM2P	5.02	0.996	19.8
13	GSM2P-1	5.03	0.674	13.4
14	GSM2P-2	5.03	0.754	15.0
15	GOsM2P	5.02	0.343	6.83

จากการทดลองพบว่า รำข้าวไรซ์เบอร์รี่จากจังหวัดพัทลุง **(GRM2P)** และรำข้าวไรซ์เบอร์รี่ **(GRM2X)** ให้ % yield สูงสุดเท่ากันคือ 19.8% รองลงมาคือ รำข้าวสังข์หยดจากจังหวัดพัทลุง **(GSM2P-2)** ให้ % yield 15.0%

3.3 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น

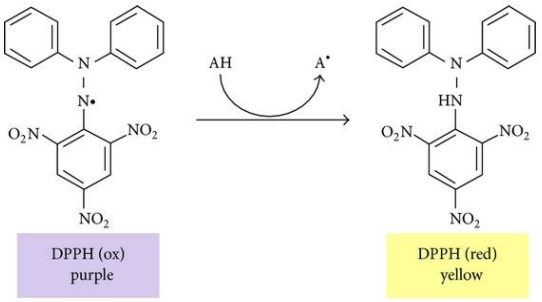
3.3.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ได้ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดข้าวสีกับ DPPH radical scavenging assay เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก เพื่อหาว่าข้าวสีจากแหล่งใดแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดสามอันดับแรก ผลการทดลองแสดงไว้ใน**ตารางที่ 3.3**

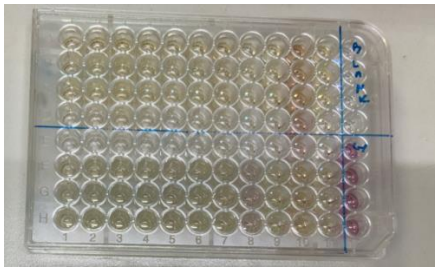
ตารางที่ 3.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดที่ได้

ลำดับ	code	% Inhibition	
		Concentration (mg/mL)	
		0.50	1.00
1	**WRM2L**	87.04±0.00	90.55±0.00
2	**WRM2N**	87.72±0.47	90.96±2.47
3	**WRM2Ph**	86.82±2.24	92.26±1.08
4	**WTM2L**	88.66±2.80	94.20±1.02
5	**WTM2Ph**	88.26±1.40	93.12±0.70
6	**WOM2L**	68.83±0.40	83.00±1.21
7	**WSM2L**	89.61±0.93	93.79±0.93
8	**WBM2L**	96.76±1.21	97.57±2.25
9	**BRM2L**	87.58±0.47	87.72±1.17
10	**BSM2L**	89.74±0.47	92.04±0.84
11	**GRM2X**	87.05±1.46	90.55±1.83
12	**GRM2P**	92.25±2.12	92.39±2.05
13	**GSM2P-1**	88.66±1.76	93.52±0.00
14	**GSM2P-2**	87.77±2.04	91.30±0.94
15	**GOsM2P**	90.15±0.62	95.01±0.93
16	**กรดแอสคอร์บิก**	89.34±0.00	96.69±0.00

DPPH เป็นอนุมูลอิสระที่มีความเสถียร นิยมใช้เป็นตัวชี้วัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารที่สนใจ DPPH ในเมทานอลมีสีม่วงเข้มและดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร เมื่อมีการสูญเสียอิเล็กตรอนให้กับสารที่มีตัวรับอิเล็กตรอนคือ สารต้านอนุมูลอิสระ จะเกิดการเปลี่ยนแปลงอยู่ในรูปออกซิไดซ์ สามารถสังเกตได้จากการจางลงของสีม่วงในสารละลายดัง**รูปที่ 3.1** และ **3.2**[28]



รูปที่ 3.1 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของ DPPH



รูปที่ 3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดข้าวสี

จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดข้าวสีทุกชนิดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ที่ดีมากคือ ที่ความเข้มข้น 0.5 mg/mL ให้ค่าการยับยั้งมากกว่า 80% และที่ความเข้มข้น 1.0 mg/mL ให้ค่าการยับยั้งมากกว่า 90% สารสกัดข้าวสีที่ให้ค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระมากที่สุดสามอันดับแรกคือ เมล็ดข้าวเหนียวลืมผัวจากจังหวัดลพบุรี **(WBM2L)**, ข้าวกล้องงอกผสมจมูกข้าวสังข์หยดจากจังหวัดพัทลุง **(GOsM2P)** และจมูกข้าวสังข์หยดและรำข้าวสังข์หยดจากจังหวัดพัทลุง **(GSM2P-1)** ตามลำดับ

3.3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านไทโรซิเนส

ได้เลือกสารสกัดข้าวสีหกชนิด สามชนิดแรกพิจารณาจากข้าวสีที่ให้ % yield ของสารสกัดสูงสุด ได้แก่ รำข้าวไรซ์เบอร์รี่จากจังหวัดพัทลุง **(GRM2P)** รำข้าวไรซ์เบอร์รี่ **(GRM2X)** และรำข้าวสังข์หยดจากจังหวัดพัทลุง **(GSM2P-2)** และอีกสามชนิดพิจารณาจากสารสกัดข้าวสีที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด ได้แก่ ข้าวเหนียวลืมผัวจากจังหวัดลพบุรี **(WBM2L)** ข้าวกล้องงอกผสมจมูกข้าวสังข์หยดจากจังหวัดพัทลุง **(GOsM2P)** และจมูกข้าวสังข์หยดและรำข้าวสังข์หยดจากจังหวัดพัทลุง **(GSM2P-1)** นำสารสกัดข้าวสีทั้งหกอันดับมาทดสอบฤทธิ์ต้านไทโรซิเนส ผลการทดลองแสดงดัง**ตารางที่ 3.4**

ตารางที่ 3.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านไทโรซิเนสของสารสกัดข้าวสี

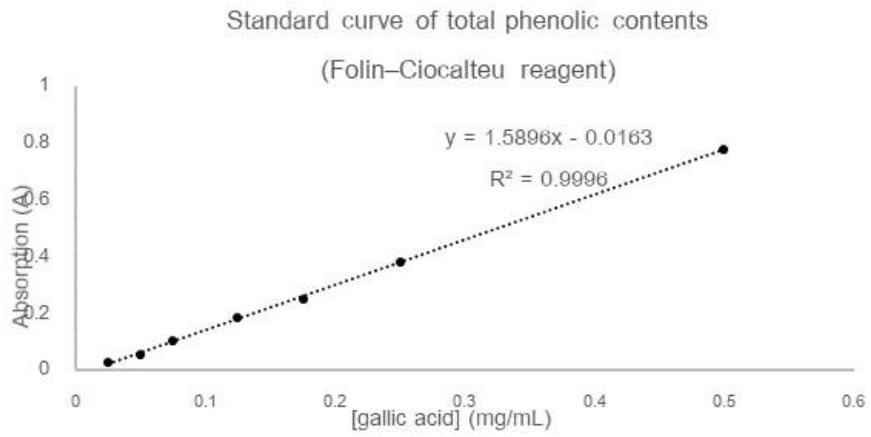
ตัวอย่างสารสกัด	% inhibition	
	concentration (mg/mL)	
	0.50	1
GRM2X	14.0±5.32	21.4±12.5
GRM2P	15.6± 0.61	24.7±4.51
GSM2P-1	0.00±0.00	15.7±1.23
GSM2P-2	12.8±0.77	22.8±3.89
WBM2L	10.4±6.76	20.9±5.32
GOsM2P	29.1±1.23	33.8±4.30
กรดโคจิก	97.9±7.33	99.1±0.54

จาก**ตารางที่ 3.4** พบว่าเมื่อเทียบกับสารมาตรฐานกรดโคจิก สารสกัดข้าวสีหกตัวอย่างที่เลือกมามีฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสน้อยมาก มีค่าไม่เกิน 50% inhibition สามารถสรุปได้ว่าสารสกัดข้าวสีไม่มีฤทธิ์ต้านไทโรซิเนส

3.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม เฟลโวนอยด์รวมและแอนโทไซยานินรวม

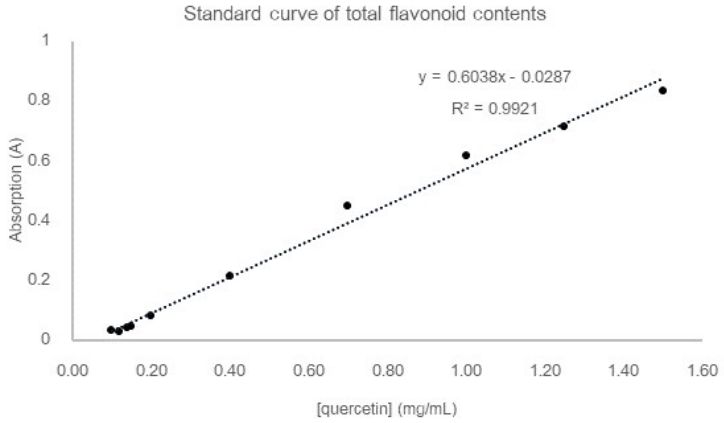
นำสารสกัดข้าวสีหกตัวอย่าง ได้แก่ **GRM2P**, **GRM2X**, **WBM2L**, **GOsM2P**, **GSM2P-1** และ **GSM2P-2** ไปวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม เฟลโวนอยด์รวมและแอนโทไซยานินรวม

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ทดสอบโดยใช้สารละลาย Folin-Ciocalteu รายงานในหน่วยมิลลิกรัมของ gallic acid equivalent (GAE) ต่อกรัมของสารสกัด ซึ่งคำนวณได้จากกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก ดัง**รูปที่ 3.3**



รูปที่ 3.3 กราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก

การวิเคราะห์สารประกอบเฟลโวนอยด์รวมใช้ quercetin เป็นสารมาตรฐาน รายงานในหน่วยมิลลิกรัมของ quercetin equivalent (QE) ต่อกรัมของสารสกัด คำนวณได้จากกราฟมาตรฐานของ quercetin ดัง**รูปที่ 3.4**



รูปที่ 3.4 กราฟมาตรฐานของ quercetin

การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินรวม ทดสอบโดยใช้ 0.1 M แอซิเทตบัฟเฟอร์ pH 1.0 และ 0.1 M แอซิเทตบัฟเฟอร์ pH 4.5 รายงานผลในหน่วย mg/L

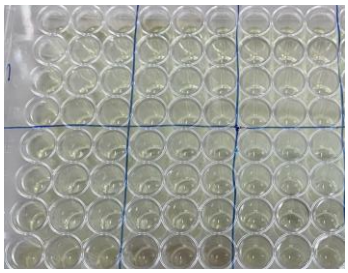
ผลการทดลองการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม เฟลโวนอยด์รวมและแอนโทไซยานินรวม แสดงดัง**ตารางที่ 3.5**

ตารางที่ 3.5 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ

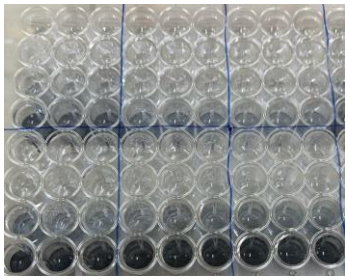
ปริมาณสารสำคัญ	ตัวอย่างสารสกัด					
	GRM2X	GRM2P	GSM2P-1	GSM2P-2	WBM2L	GOsM2P
Phenolic contents (mg[G]/g extract)	63.41 ±1.15	34.55 ±1.37	70.07 ±4.57	71.25 ±4.68	683.59 ±29.84	63.78 ±2.49
Flavonoid content (mg[Q]/g extract)	77.21 ±5.96	101.6 ±9.93	125.55 ±9.36	82.01 ±5.22	10159.67 ± 993.50	9747.16 ±1070.72
Anthocyanins (mg/L)	0.00 ±0.002	0.005 ±0.002	0.000 ±0.001	0.005 ±0.002	0.008 ±0.000	0.013 ±0.003

ในการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดข้าวสีหกตัวอย่างด้วยสารละลาย Folin-Ciocalteu อาศัยหลักการปฏิกิริยารีดอกซ์ของโมลิบโดทังสเทตไอออน (molybdotungstate ion) โดยรีเอเจนต์ประกอบด้วยโซเดียมทังสเทต โซเดียมโมลิบเดต กรดฟอสฟอริกและโซเดียมคาร์บอเนต สังเกตการเปลี่ยนสีเหลืองของ Mo(VI) (**รูปที่ 3.5**) เมื่อได้รับอิเล็กตรอนจากสารสกัดข้าวสีที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เป็น Mo(V) สีน้ำเงิน (**รูปที่ 3.6**) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร และรายงานค่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในรูปของมิลลิกรัมของ

กรดแกลลิก[29] ผลการวิเคราะห์พบว่า สารสกัดข้าวเหนียวลืมผัวจากจังหวัดลพบุรี **(WBM2L)** ให้ปริมาณฟีนอลิกรวมสูงสุด คือ 683.59 mg GAE/g

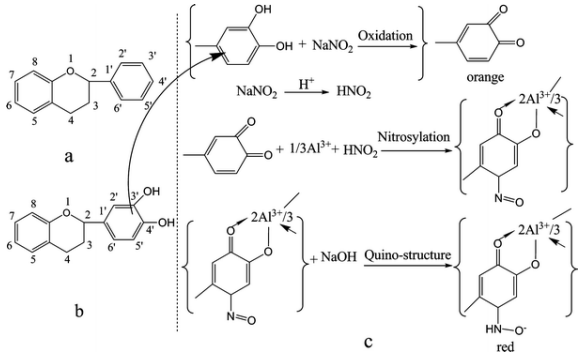


รูปที่ 3.5 สารสกัดข้าวสี ในสารละลาย Folin-Ciocalteu

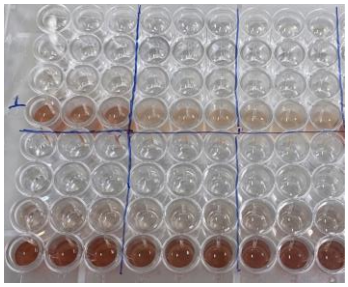


รูปที่ 3.6 สารสกัดข้าวสี ในสารละลาย Folin-Ciocalteu เมื่อทำปฏิกิริยากับ Na_2CO_3

ได้วิเคราะห์ปริมาณเฟลโวนอยด์รวมโดยวิธี aluminum chloride colorimetric assay ($NaNO_2$-$AlCl_3$-NaOH assay) เมื่อ $NaNO_2$ ทำปฏิกิริยากับหมู่ไฮดรอกซิลบนวงฟีนอลเกิดเป็นหมู่คีโท จากนั้น aluminum ion จะจับกับหมู่คีโทบนวงฟีนอลของเฟลโวนอยด์ที่ตำแหน่ง 3′ และ 4′ เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน เมื่ออยู่ในภาวะที่เป็นเบสจะเกิดเป็นสารสีส้มแดง[30] (**รูปที่ 3.7** และ **รูปที่ 3.8**) สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร และรายงานค่าปริมาณเฟลโวนอยด์รวมในหน่วยมิลลิกรัมของ quercetin equivalent (QE) ต่อกรัมของสารสกัด



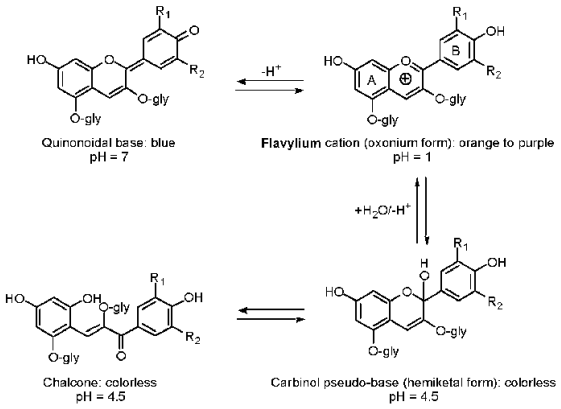
รูปที่ 3.7 ปฏิกิริยาของ $NaNO_2$-$AlCl_3$-NaOH assay ต่อเฟลโวนอยด์[30]



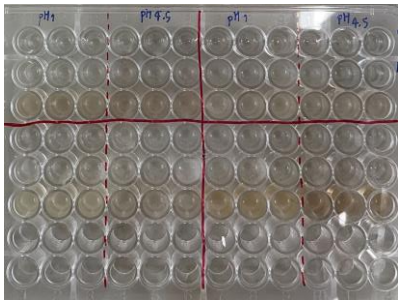
รูปที่ 3.8 สารสกัดข้าวสีที่ทำปฏิกิริยากับ $NaNO_2$-$AlCl_3$-NaOH

จากการทดลองพบว่า สารสกัดข้าวเหนียวลืมผัวจากจังหวัดลพบุรี **(WBM2L)** ให้ปริมาณเฟลโวนอยด์รวมสูงสุด คือ 10,159.67 mg QE/g

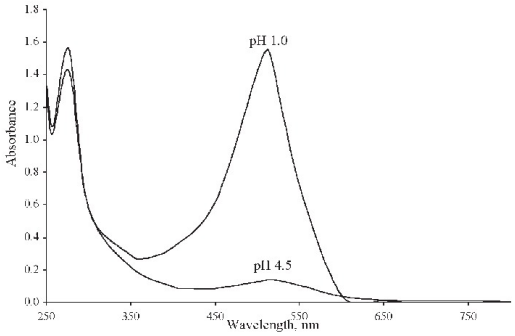
แอนโทไซยานินเป็นสารที่ละลายน้ำและให้สีตามสภาวะกรด-เบส ในสภาวะกรดจะเป็นสีแดงถึงส้ม โดยทั่วไปไอออนของแอนโทไซยานินสามารถเปลี่ยนโครงสร้างโมเลกุลได้ตาม pH ซึ่งส่งผลต่อการเปลี่ยนสี เมื่อ pH แตกต่างกัน ที่สมดุลสารละลายแอนโทไซยานินมีโครงสร้างโมเลกุลอยู่ 4 รูปแบบ คือ flavylium cation, quinonoidal base, carbinol pseudo-base และ chalcone สัดส่วนรูปแบบโครงสร้างโมเลกุลจะก่อให้เกิดสีของแอนโทไซยานินแตกต่างกันไปตาม pH ในสารละลายนั้นๆ ในสภาพที่เป็นกรด (pH น้อยกว่า 2) แอนโทไซยานินจะอยู่ในรูป flavylium cation ทำให้สารละลายมีสีส้มแดง เมื่อ pH สูงขึ้นจนอยู่ในสภาวะที่เป็นกรดอ่อน (pH 4.5) ปริมาณ flavylium cation เริ่มลดลง เนื่องจากเกิด hydration โดยดึงโปรตอนออกจากหมู่ -OH ที่ตำแหน่ง 4, 5 และ 7 ไปเป็น carbinol pseudo-base และค่อยๆ เปลี่ยนเป็น chalcone ซึ่งไม่มีสี[31] (**รูปที่ 3.9**) งานวิจัยนี้ใช้วิธี pH differential method เป็นวิธีที่พัฒนามาจากโครงสร้างของแอนโทไซยานินที่เปลี่ยนแปลงไปตามการเปลี่ยนแปลงค่า pH ทำให้การดูดกลืนแสงของแอนโทไซยานินเปลี่ยนไป (**รูปที่ 3.9**) ที่ pH 1 โครงสร้างของแอนโทไซยานินอยู่ในรูปออกโซเนียม (oxonium form) มีสีส้ม (**รูปที่ 3.10**) ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร เมื่อปรับ pH เป็น 4.5 ไม่มีการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นดังกล่าว เนื่องจากที่ pH 4.5 โครงสร้างแอนโทไซยานินจะอยู่ในรูปเฮมิคีทอล (hemiketal form) ซึ่งไม่มีสี (**รูปที่ 3.9**) ถ้าในตัวอย่างที่ทดสอบมีสารอื่นๆ ที่ดูดกลืนแสงช่วงเดียวกับแอนโทไซยานิน เมื่อเปลี่ยน pH เป็น 4.5 ค่าการดูดกลืนแสงของสารอื่นๆ จะเท่าเดิมในขณะที่ค่าการดูดกลืนแสงของแอนโทไซยานินจะหายไป (**รูปที่ 3.11**) การวัดด้วยวิธีนี้จะวัดค่าการดูดกลืนแสงของแอนโทไซยานินที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ที่ pH 1.0 และ 4.5 นำมาหักลบกันเพื่อกำจัดการดูดกลืนแสงจากสารอื่นๆ ที่ไม่ใช่แอนโทไซยานิน และการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เพื่อหักลบความขุ่นที่อาจเกิดขึ้น เพื่อให้ได้ผลที่มีความถูกต้องและแม่นยำมากขึ้น[18]



รูปที่ 3.9 โครงสร้างทางเคมีของแอนโทไซยานินเมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลง pH[18]



รูปที่ 3.10 สารสกัดข้าวสีในสารละลายแอซิเทตบัฟเฟอร์ pH 1.0 และ 4.5



รูปที่ 3.11 การเปลี่ยนแปลงของสเปกตรัมของแอนโทไซยานิน ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 1.0 และ 4.5[18]

จากผลการทดลองพบว่า ข้าวสีแต่ละชนิดให้ปริมาณแอนโทไซยานินน้อยมาก ข้าวกล้องงอกผสมจมูกข้าวสังข์หยดจากจังหวัดพัทลุง **(GOsM2P)** ให้ปริมาณแอนโทไซยานินรวมมากที่สุด คือ 0.013 mg/L

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม เฟลโวนอยด์รวมและแอนโทไซยานินรวม พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและเฟลโวนอยด์รวมของข้าวเหนียวลืมผัวมีค่ามากกว่ารำข้าวไรซ์เบอร์รี่ รำข้าวสังข์หยดและข้าวกล้องงอกผสมจมูกข้าวสังข์หยด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของวรัมพร วงศ์สุดิน และคณะ (2555) ที่รายงานว่า ข้าวเหนียวดำมีปริมาณฟีนอลิกสูงสุด รองลงมาคือ ข้าวขาวดอกมะลิ 105 และข้าวหอมนิล นอกจากนี้ยังพบว่าข้าวเหนียวดำมีปริมาณกรดแกมมา-แอมิโนบิวทิริก (GABA) สูงสุด รองลงมาคือ ข้าวขาวดอกมะลิ 105 และข้าวหอมนิล

ตามลำดับ การที่ข้าวเหนียวลืมผัวมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและเฟลโวนอยด์สูงกว่าข้าวสีชนิดอื่นเนื่องมาจากปริมาณของสารอาหารต่างๆ ที่สำคัญในข้าว เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน วิตามิน เส้นใยอาหารและสารต้านอนุมูลอิสระต่างๆ เช่น GABA และสารกลุ่มฟีนอลิกซึ่งขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของข้าวและการขัดสีข้าว[32] นอกจากนี้การที่ข้าวเหนียวลืมผัวมีปริมาณเฟลโวนอยด์สูงกว่าข้าวสีชนิดอื่น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kang *et al.* (2013) ที่รายงานว่า pericarp ของเมล็ดข้าวที่มีสีเข้ม เช่น สีม่วงหรือดำและสีแดง จะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและเฟลโวนอยด์สูงกว่าเมล็ดข้าวที่มี pericarp สีอ่อน เช่น สีน้ำตาลและสีเขียว [33]

3.5 การเลือกชนิดสารสกัดข้าวสีที่เหมาะสมที่สุดในการนำมาเป็นส่วนประกอบของเซรั่มบำรุงผิวหน้า

เมื่อพิจารณาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม เฟลโวนอยด์รวมและแอนโทไซยานินรวม รวมถึงการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เปรียบเทียบสารสกัดชนิดต่างๆ เพื่อเป็นข้อมูลประกอบการตัดสินใจเลือกเป็นส่วนผสมในการผลิตเซรั่มบำรุงผิวหน้า สารสกัดที่เลือกได้แก่ รำข้าวไรซ์เบอร์รี่จากจังหวัดพัทลุง **(GRM2P)** เนื่องจากให้ % yield ของสารสกัดสูงสุดและมี % antioxidant inhibition มากกว่า 90 % นอกจากนี้จะเป็นการเพิ่มมูลค่าของรำข้าว เนื่องจากเป็นผลิตผลพลอยได้จากกระบวนการสีข้าวซึ่งมีราคาถูก

3.6 การเตรียมเซรั่มที่มีสารสกัดรำข้าวไรซ์เบอร์รี่

เตรียมเซรั่ม 100 กรัม โดยผสมสารผสมในวัฏภาคน้ำ 90.2 กรัม และสารผสมในวัฏภาคน้ำมัน 5 กรัม เข้าด้วยกัน เติมอิมัลซิไฟเออร์ 2 กรัม เพื่อป้องกันการแยกชั้นของน้ำและน้ำมัน นำไปปั่นโดยใช้เครื่องโฮโมจีไนเซอร์เป็นเวลา 3 นาทีเพื่อให้เนื้อของเซรั่มเข้ากัน ปรับ pH ของผสมให้อยู่ในช่วง 5.3-5.7 ด้วยกรดซิตริก ซึ่งจะมีสภาวะเป็นกรดอ่อนๆ คล้ายกับธรรมชาติของผิวหนังมนุษย์ ทำให้เซรั่มมีประสิทธิภาพในการบำรุงผิวหน้าที่ดี เนื่องจากผิวหนังที่ปกคลุมทั่วร่างกายถูกเคลือบด้วยสารธรรมชาติหลายชนิด เช่น กรดแอมิโน กรดแลคติก แอมโมเนีย เซราไมด์ คอเลสเทอรอล เอนไซม์ โปรตีน ไขมัน และเหงื่อ สารเหล่านี้รวมตัวกันเป็นชั้นฟิลม์บางๆ โดยมีทั้งน้ำและน้ำมันเป็นส่วนประกอบสำคัญ เรียกว่า “hydrolipid film” ซึ่งจะมีสภาวะเป็นกรดอ่อนๆ เรียกว่า “skin’s acid mantle” มีค่า pH เฉลี่ย 5.5

จากนั้นเติมสารกันเสีย 0.8 กรัม ของสารผสม phenoxyethanol และ ethylhexylglycerin เพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ ราและแบคทีเรียที่อาจเกิดขึ้นบนเนื้อเซรั่ม ผสมสารละลายสารสกัดรำข้าวไรซ์เบอร์รี่ 2 กรัม จะได้ผลิตภัณฑ์เซรั่มบำรุงผิวหน้าเนื้อเดียวสีขาว 100 กรัม

3.7 การทดสอบสมบัติทางกายภาพของเซรั่มที่มีสารสกัดรำข้าวไรซ์เบอร์รี่

ทดสอบสมบัติทางกายภาพของเซรั่มที่มีสารสกัดรำข้าวไรซ์เบอร์รี่ในขวดพร้อมฝาปิดปริมาณ 10-30 mL ภายใต้ภาวะต่างๆ ผลการทดลองแสดงไว้ใน**ตารางที่ 3.6-3.9**

ตารางที่ 3.6 การทดสอบสมบัติทางกายภาพของเซรั่มที่เตรียมขึ้นภายใต้สภาวะอุณหภูมิห้อง (28°C)

	วันที่ 1	ผ่านไป 1 เดือน
อุณหภูมิห้อง (28°C) นาน 1 เดือน	เซรั่มมีสีขาว เนื้อเซรั่มสม่ำเสมอไม่เกิดการแยกชั้น	เซรั่มมีสีขาว เนื้อเซรั่มสม่ำเสมอไม่เกิดการแยกชั้น

ตารางที่ 3.7 การทดสอบสมบัติทางกายภาพของเซรั่มที่เตรียมขึ้นภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

	ก่อนนำไปส่อง UV	หลังส่อง UV
ภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตรนาน 30 นาที	เซรั่มสีขาว เนื้อเซรั่มสม่ำเสมอไม่เกิดการแยกชั้น	เซรั่มสีขาว เนื้อเซรั่มไม่เกิดการแยกชั้น

ตารางที่ 3.8 การทดสอบสมบัติทางกายภาพของเซรั่มที่เตรียมขึ้นภายใต้สภาวะเร่งอุณหภูมิต่ำสลับอุณหภูมิสูง (4°/45° C)

	ก่อนนำไปอบ	วันที่ 1 (อบ 24 ชั่วโมง)	วันที่ 2 (แช่เย็น 24 ชั่วโมง)	วันที่ 3 (อบ 24 ชั่วโมง)
ภายใต้สภาวะเร่งอุณหภูมิต่ำสลับอุณหภูมิสูง (4°/45° C) นาน 7 วัน	เซรั่มมีสีขาว ไม่เกิดการแยกชั้น	เซรั่มมีสีขาว ไม่เกิดการแยกชั้น	เซรั่มมีสีขาว ไม่เกิดการแยกชั้น	เซรั่มมีสีขาว ไม่เกิดการแยกชั้น
	วันที่ 4 (แช่เย็น 24 ชั่วโมง)	วันที่ 5 (อบ 24 ชั่วโมง)	วันที่ 6 (แช่เย็น 24 ชั่วโมง)	วันที่ 7 (อบ 24 ชั่วโมง)
	เซรั่มมีสีขาว ไม่เกิดการแยกชั้น	เซรั่มมีสีขาว ไม่เกิดการแยกชั้น	เซรั่มมีสีขาว ไม่เกิดการแยกชั้น	เซรั่มมีสีขาว ไม่เกิดการแยกชั้น

ตารางที่ 3.9 การทดสอบสมบัติทางกายภาพของเซรั่มที่เตรียมขึ้นโดยตากแดดเช้า (07.00-11.00 น.)

ตากแดดเช้า (07.00-11.00 น.) 4 ชั่วโมง นาน 7 วัน	ก่อนนำไปตากแดด	หลังตากแดดวันที่ 1	หลังตากแดดวันที่ 2	หลังตากแดดวันที่ 3
	เซรั่มมีสีขาว ไม่เกิดการแยกชั้น	เซรั่มมีสีขาว ไม่เกิดการแยกชั้น	เซรั่มมีสีขาว ไม่เกิดการแยกชั้น	เซรั่มมีสีขาว ไม่เกิดการแยกชั้น
	หลังตากแดดวันที่ 4	หลังตากแดดวันที่ 5	หลังตากแดดวันที่ 6	หลังตากแดดวันที่ 7
	เซรั่มมีสีขาว ไม่เกิดการแยกชั้น	เซรั่มมีสีขาว ไม่เกิดการแยกชั้น	เซรั่มมีสีขาว ไม่เกิดการแยกชั้น	เซรั่มมีสีขาว ไม่เกิดการแยกชั้น

จากผลการทดสอบสมบัติทางกายภาพภายใต้ภาวะต่างๆ พบว่าเนื้อเซรั่มยังคงเหมือนเดิมคือ มีลักษณะสีขาว ไม่เกิดการแยกชั้น แสดงว่าเซรั่มที่เตรียมขึ้นไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงกายภาพภายใต้ภาวะต่างๆ ที่ทดสอบ

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้พบว่า เมทานอลที่อุณหภูมิรีฟลักซ์นานสองชั่วโมงเป็นภาวะที่เหมาะสมในการสกัดข้าวไรซ์เบอรี่เมล็ดเต็ม ได้สกัดเมล็ดข้าว จมูกข้าวและรำข้าวสีทั้งหมดสิบห้าตัวอย่างพบว่า รำข้าวไรซ์เบอร์รี่จากจังหวัดพัทลุง **(GRM2P)** และรำข้าวไรซ์เบอร์รี่ code **GRM2X** ให้ % yield สูงสุดเท่ากันคือ 19.8 % รองลงมาคือรำข้าวสังข์หยดจากจังหวัดพัทลุง **(GSM2P-2)** สารสกัดข้าวสีทุกชนิดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระ สารสกัดข้าวเหนียวลืมผัวจากจังหวัดลพบุรี **(WBM2L)** ข้าวกล้องงอกผสมจมูกข้าวสังข์หยดจากจังหวัดพัทลุง **(GOsM2P)** และจมูกข้าวสังข์หยดและรำข้าวสังข์หยดจากจังหวัดพัทลุง **(GSM2P-1)** ให้ค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระมากที่สุด ให้ % inhibition เท่ากับ 97.57±2.25, 95.01±0.93 และ 93.52±0.00 ตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 1 mg/mL สารสกัดข้าวสีมีฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสที่น้อยมาก เมื่อนำสารสกัดข้าวสีหกตัวอย่างไปวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวม เฟลโวนอยด์รวมและแอนโทไซยานินรวม พบว่าข้าวเหนียวลืมผัวจากจังหวัดลพบุรี **(WBM2L)** ให้ปริมาณฟีนอลิกรวมและเฟลโวนอยด์รวมสูงสุด ได้เลือกสารสกัดรำข้าวไรซ์เบอร์รี่จากจังหวัดพัทลุง **(GRM2P)** มาใช้เป็นส่วนผสมในเซรั่มบำรุงผิวหน้า เมื่อทดสอบสมบัติทางกายภาพของเซรั่มที่มีสารสกัดรำข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่เตรียมได้ภายใต้ภาวะต่างๆ พบว่าเซรั่มยังคงมีสีขาวเหมือนเดิมและเนื้อเซรั่มสม่ำเสมอไม่เกิดการแยกชั้น

ข้อเสนอแนะสำหรับการทำงานวิจัยในอนาคตคืองานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับข้าวเหนียวลืมผัว เนื่องจากให้ผลการทดลองเบื้องต้นที่น่าสนใจมาก ให้ % antioxidant inhibition, ปริมาณฟีนอลิกรวมและปริมาณเฟลโวนอยด์รวมที่สูงมาก อย่างไรก็ดี % yield ที่น้อยของสารสกัดข้าวเหนียวลืมผัวและราคาข้าวเหนียวลืมผัวค่อนข้างแพง จึงควรศึกษาในส่วนรำข้าวของข้าวเหนียวลืมผัวและพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์เซรั่มบำรุงผิวหน้าต่อไป

เอกสารอ้างอิง

[1] Min, B.; Mcclung, A.M.; Chen, M.H. Phytochemicals and Antioxidant Capacities in Rice Brans of Different Color *J. Food. Sci.,* **2011***, 76*, 117–126.

[2] Yawadio, R.; Tanimori, S.; Morita, N. Identification of Phenolic Compounds Isolated from Pigmented Rices and Their Aldose Reductase Inhibitory Activities *Food Chem.,* **2007***, 101*, 1616-1625.

[3] Kukamoo, A.; Noenplab, A.; Immark, S.; Chankasem, L. Evaluation of Nutritional Values in Colored Rice *Agric. Sci. J.*, **2009**, *40*, 345-348.

[4] Wang, Q.; Han, P.; Zhang, M.; Xia, M.; Zhu, H.; Ma, J. Supplementation of Black Rice Pigment Fraction Improves Antioxidant and Anti-inflammatory Status in Patients with Coronary Heart Disease *Asia Pac. J. Clin. Nutr.*, **2007**, *16*, 295-301

[5] Suttajit, M.; Immark, S.; Teerajan, S.; Suttajit, S.; Chiyasut, C. Antioxidative Activity and Polyphenol Content in Different Varieties of Thai Rice Grains *Asia Pac. J. Clin*. *Nutr*, **2006**, *15*, 78-85.

[6] Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.; Berset, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. Lebens-Wiss: *Technol*, **1995**, *28*, 25-30.

[7] Sharma, S.; Kori, S.; Parmar, A. 2015, Surfactant Mediated Extraction of Total Phenolic Contents (TPC) and Antioxidants from Fruits Juices *Food Chem.*, **2015**, *185*, 284-288.

[8] Laokuldilok, T.; Charles, F.; Shoemaker, Jongkaewwattana, S.; Tulyathan, V. Antioxidants and Antioxidant Activity of Several Pigmented Rice Brans *J. Agric. Food Chem.,* **2011**, *59*, 193–199.

[9] Miller, C.K.; Edwards, L.; Kissling, G.; Sanville, L. Nutrition Education Improves Metabolic Outcomes Among Older Adults with Diabetes Mellitus: Results from a Randomized Controlled Trial *Preventive Medicine*, **2002**, *34*, 252-265.

[10] Chareetip, R.; Pimporn, L.; Jakkapan, S.; Kanokwan, K. Antioxidant activities of Hom Nil Rice (*Oryza sativa* L.) Bran Extract for Cosmetic Application Proceeding of Cosmetic and Beauty International Conference 2019.

[11] Halliwell, B. The Wanderings of a Free Radical *Free Radic Biol Med*. **2009**, *46*, 531-542.

[12] Pokorny, J.; Yanishlieva, N.; Gordon, M. Antioxidants in Food: Practical Applications: *CRC Press, New York*, **2001**, 380 p.

[13] Ryan, D.; Antolovitch, M.; Prenzler, P.; Robards, K.; Lavee, S. Biotransformations of Phenolics Compounds in *Olea europaea* L. *Sci. Hortic.*, **2002**, *92*, 147-176.

[14] Hopkins, W. G.; Hüner, N. P. A. Introduction to Plant Physiology. 4th edition: *John Wiley and Sons, USA*, **2009**, 503 p.

[15] วิภพ สุทธนะ. ฤทธิ์ต้านมะเร็งของฟลาโวนอยด์: กลไกการออกฤทธิ์. *ศรีนครินทร์เวชสาร*. **2556**, *28*, 567-582.

[16] Li, Q.; Wang, J.; Sun, H. Y.; Shang, X. Flower Color Patterning in Pansy (Viola x Wittrockiana Gams.) is Caused by The Differential Expression of Three Genes from the Anthocyanin Pathway in Acyanic and Cyanic Flower Areas *Plant Physiol Biochem*, **2014**, *84*, 134-141.

[17] Zhang, Y.; Butelli, E.; Martin, C. Engineering Anthocyanin Biosynthesis in Plants *Curr. Opin. Plant Biol.*, **2014**, *19*, 81–90.

[18] Lee, J.; Durst, R. W.; Wrolstad, R. E. Determination of Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants and Wines by the pH Differential Method: Collaborative Study *J. AOAC Int*, **2005**, *88*, 1269-1278.

[19] Masuda, T.; Odaka, Y.; Ogawa, N.; Nakamoto, K.; Kuninaga, H. Identification of Geranic Acid, a Tyrosinase Inhibitor in lemongrass (*Cymbopogon citrates*) *J. Agric. Food Chem.*, **2008**, *56*, 597-601

[20] Yehye, W.A.; Rahman, N.A.; Ariffin, A.; Abd, H.S.B.; Alhadi, A.A.; Kadir, F.A. Understanding the Chemistry behind the Antioxidant Activities of Butylated Hydroxytoluene (BHT): a Review *Eur. J. Med. Chem.,* **2015**, *101*, 295-312.

[21] Rice-Evans, C.; Miller, N.; Paganga, G. Antioxidant Properties of Phenolic Compounds *Trends Plant Sci.,* **1997**, *2*, 152-159.

[22] Zhishen, J.; Mengcheng, T.; Jianming, W. The Determination of Flavonoid Contents in Mulberry and Their Scavenging Effects on Superoxide Radicals *Food Chem,* **1999**, *64*, 555-559.

[23] Rankovic, B.; Kosanic, M.; Stanojkovic, T.; Vasiljevic, P.; Manojlovic, N. Biological Activities of *Toninia candida* and *Usnea barbata* Together with Their Norstictic Acid and Usnic Acid Constituents *Int. J. Mol. Sci.*, **2012**, *13*, 14707-14722.

[24] Larik, F. A.; Saeed, A.; Channar, P. A.; Muqadar, U. Design, Synthesis, Kinetic Mechanism and Molecular Docking Studies of Novel 1-Pentanoyl-3-arylthioureas as Inhibitors of Mushroom Tyrosinase and Free Radical Scavengers *Eur. J. Med. Chem.*, **2017**, *141*, 273-281.

[25] Lee, Y.H.; Choo, C.; Watawana, M.I.; Jayawardena, N.; Waisundara, V.Y. An Appraisal of Eighteen Commonly Consumed Edible Plants as Functional Food Based on Their

Antioxidant and Starch Hydrolase Inhibitory Activities *J. Sci. Food Agric.*, **2015**, *95*, 2956–2964.

[26] Arvouet-Grand, A.; Vennat, B.; Pourrat, A.; Legret, P. Standardization of Propolis Extract and Identification of Principal Constituents *J. Pharm. Belg.*, **1994**, *49*, 462-468.

[27] Fuleki, T.; Francis, F.J. Quantitative methods for anthocyanins. Extraction and Determination of Total Anthocyanin in Cranberries *J. Food Sci.*, **1968**, *33*, 72-77.

[28] Teixeira, J.; Gaspar, A.; Garrido, EM.; Garrido, J.; Borges, F. Hydroxycinnamic Acid Antioxidants: An Electrochemical Overview *Bio. Res. Int.*, **2013**, *2013*, 1-11.

[29] Tsai, T. H.; Tsai, P. J.; Ho, S. C. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Several Commonly Species *J. Food Sci.*, **2005**, *70*, 93 – 97.

[30] Zhu, H., Wang, Y., Liu, Y., Xia, Y. and Tang, T. Analysis of Flavonoids in *Portulaca oleracea* L. by UV–Vis Spectrophotometry with Comparative Study on Different Extraction Technologies *Food Anal.*, **2010**, *3*, 90–97.

[31] Cavalcanti, R. N.; Diego, T. S.; Maria, A. A. Non-thermal Stabilization Mechanisms of Anthocyanins in Model and Food Systems *Food Res. Int.*, **2011**, *44*, 499-509.

[32] วรัมพร วงศ์สุดิน, พัชราภรณ์ รัตนธรรม, ณัฏฐา เลาหกุลจิตต์, อรพิน เกิดชูชื่น.การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารสำคัญในข้าวกล้องงอก: *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร*, **2555**, *43*, 553-556.

[33] Kang, M.Y.; Rico, C.W.; Bae, H.J.; Lee, S.C. Antioxidant Capacity of Newly Developed Pigmented Rice Cultivars in Korea *Cereal Chem.*, **2013**, *90*, 497–501.

ประวัติผู้วิจัย

นางสาวอรณี คีรีทอง เกิดเมื่อวันที่ 22 เดือนตุลาคม พ.ศ. 2541 ที่จังหวัดนครศรีธรรมราช สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนกัลยาณีศรีธรรมราช จังหวัดนครศรีธรรมราช เมื่อปีการศึกษา 2559 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2560 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ บ้านเลขที่ 179/8 ตำบลท่าศาลา อำเภอท่าศาลา จังหวัดนครศรีธรรมราช รหัสไปรษณีย์ 80160 อีเมล oranee_keereethong-kad@hotmail.com