ปัจจัยที่มีผลต่อการต้านออกซิเดชันและแกมมาโอไรซานอลใน เม็ดรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 ที่พัฒนาขึ้น

Factors affecting antioxidation and γ-oryzanol in developed Hom Dok Mali 105 rice bran tablets

ผดุงขวัญ จิตโรภาส (Padungkwan Chitropas)[1]
อรุณศรี ปรีเปรม (Aroonsri Priprem)[2]
บุญมี ศิริ (Boonmee Siri)[3]
ชิดชนก คำเลิศ (Chidchanok Khamlert)[4]
บังอร ศรีพานิชกุลชัย (Bungorn Sripanidkulchai)[5]

บทคัดย่อ

การพัฒนาเม็ดรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 (RBT) เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการต้านออกซิเดชันและปริมาณแกมมาโอไรซานอลในสภาวะที่เก็บรักษา RBT มีส่วนประกอบหลักคือรำข้าวและ microcrystalline cellulose อย่างละ 42.9% และ polyvinyl pyrrolidone 12.9% เตรียมโดยวิธีแกรนูลเปียก ได้ RBT ที่มีน้ำหนักเฉลี่ยเม็ดละ 468.2 มิลลิกรัม มีการแตกตัวในเวลา 13.6 นาที และมีความกร่อน 0.13% เมื่อนำไปสกัดและทดสอบการต้านออกซิเดชันด้วย 2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl (DPPH) ให้ค่า EC50 เทียบเป็นรำข้าว 18.66 มิลลิกรัมซึ่งเทียบเท่าวิตามินซี 0.01 มิลลิกรัมหรือวิตามินอี 0.03 มิลลิกรัม การวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วย HPLC ทำให้แยกสารหลักที่สำคัญในกลุ่มแกมมาโอไรซานอลคือ cycloartarnyl ferulate และ 24-methylenecycloartarnyl ferulate ซึ่งมีค่าตั้งต้น 1.03 และ 2.14 มิลลิกรัมต่อกรัมของ RBT เมื่อเก็บ RBT ไว้ 2 และ 4 เดือนในซองสุญญากาศที่อุณหภูมิ -20, 4, 25 และ 45 ^{o}C พบว่าเมื่อเวลา 4 เดือน โดยทั่วไปคุณลักษณะทางกายภาพของ RBTไม่เปลี่ยนแปลง แต่จะมีความแข็งเพิ่มขึ้นและการแตกตัวช้าลง การต้านออกซิเดชันเริ่มลดลง และปริมาณสารทั้งสองตัวที่ทำการวิเคราะห์ลดลง ข้อมูลนี้ช่วยในการพัฒนาสูตรตำรับของเม็ดรำข้าวต่อไป

Abstract

A Hom Dok Mali 105 rice bran tablets (RBT) was developed and used for studying factors affecting on the antioxidant activities and g-oryzanol content under some storage conditions. The RBT was mainly composed of 42.9% rice bran and 42.9% of microcrystalline cellulose, and prepared by wet granulation method. An average weight of RBTs was 468.2 mg per tablet, the disintegration time of 13.6 min and friability of 0.13% were observed. Antioxidant activities of RBT extracts by using 2, 2-diphenyl-1-picryl hydrazyl (DPPH) gave EC50 of the freshly prepared RBT at 18.66 mg in equivalence to rice bran; whereas those of vitamin C being 0.01 mg and vitamin E 0.03 mg. HPLC analysis could separate 2 major peaks representing 2 major components of γ-oryzanols, namely cycloartarnyl ferulate and 24-methylenecyloartarnyl ferulate, their respective quantities were 1.03 and 2.14 mg per gram of RBT. The RBT was storage at -20, 4, 25, and 45 ^{o}C for 2 and 4 months in vacuum-sealed aluminium foil packaging. After 4 months of storage, most of the physical characteristics of RBTs were not altered, however, higher hardness and longer disintegration time when compared to the freshly prepared RBTs was observed. Also, the 4-month old RBT showed a decrease in the antioxidant activities and the contents of cycloartarnyl ferulate and 24-methylenecyloartarnyl ferulate. The formulation of the RBT could be further improved.

คำสำคัญ: การต้านออกซิเดชั่น แกมมาโอไรซานอล เม็ดรำข้าว

Keywords: antioxidation, γ-oryzanols, rice bran

[1]*ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
[2]*รองศาสตราจารย์ ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
[3]*รองศาสตราจารย์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
[4]*นักศึกษาบัณฑิตศึกษา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
[5]*รองศาสตราจารย์ ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*

บทนำ

รำข้าวเป็นผลผลิตพลอยได้จากการสีข้าวเปลือกมีลักษณะเป็นผงละเอียดสีน้ำตาลอ่อนซึ่งเป็นเยื่อหุ้มผิวข้าวที่ถูกขัดออกระหว่างกระบวนการสีข้าวเปลือก รำข้าวส่วนใหญ่นำไปใช้เป็นอาหารเลี้ยงสัตว์และเป็นวัตถุดิบในการผลิตน้ำมันรำข้าวเพื่อใช้บริโภคในครัวเรือน ประเทศไทยผลิตรำข้าวไม่ต่ำกว่า 2 ล้านตันต่อปี (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2547) รำข้าวมีสารประกอบหลายชนิดได้แก่ โปรตีนประมาณ 15% ไขมันประมาณ 15-30% เส้นใย 6-20% และคาร์โบไฮเดรต ซึ่งอาจมีปริมาณสูงถึง 50% นอกจากนี้ยังมีสารอาหารที่มีผลต่อสุขภาพด้วยที่สำคัญที่สุดคือ แกมมาโอไรซานอล (γ-oryzanols) (Graf, 1992) นอกจากนี้ยังมีวิตามินอีทั้งในรูปโทโคเฟอรอล (tocopherols) และโทโคไทรอีนอล (tocotrienols) ปริมาณของแกมมาโอไรซานอลในรำข้าวมีสูงได้ถึง 3 มิลลิกรัมต่อกรัม และมีวิตามินอี 0.4 มิลลิกรัมต่อกรัม (Qureshi *et al*, 2002) แกมมาโอไรซานอลเป็นสารที่พบมากที่สุดในรำข้าว มีผลต่อสุขภาพโดยเฉพาะผลต่อโรคเรื้อรัง เช่น การลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด (Cheruvansky *et al*, 2000, Fukushima *et al*, 1999, Gerhardt and Gallo, 1998, Qureshi *et al*, 2001) การรวมตัวของเกล็ดเลือด (Seetharamaiah *et al*, 1990) การลดระดับน้ำตาลในเลือด (Qureshi *et al*, 2002) และผลต่อระบบทางเดินอาหารโดยพบว่ามีปริมาณกากใยพอเหมาะและช่วยให้ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ให้ประโยชน์ในทางเดินอาหารได้ด้วย (Fukushima *et al*, 1999) ดังนั้นจึงพบว่าในปัจจุบันมีบุคคลที่ให้ความสนใจในการบริโภครำข้าวในรูปแบบต่าง ๆ มากขึ้น โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์รำข้าวในรูปแบบรับประทาน

Lloyd *et al* (2000) แสดงให้เห็นว่ากระบวนการหรือกรรมวิธีที่ใช้เตรียมรำข้าวมีผลต่อฤทธิ์ต้านออกซิเดชันปัญหาสำคัญของการนำรำข้าวมาใช้ประโยชน์ขึ้นอยู่กับวิธีการทำให้สารคงสภาพและวิธีการเก็บรักษา สารสำคัญในรำข้าวสามารถสลายตัวอย่างรวดเร็วเนื่องจากเอนไซม์ไลเปส (lipase) ซึ่งทำงานเมื่อรำข้าวถูกขัดสีออกจากเปลือก ทำให้เกิดการสลายกรดไขมันไม่อิ่มตัว (Perretti *et al*, 2003) การทำให้รำข้าวคงสภาพจึงต้องทำลายเอนไซม์ไลเปสในรำข้าวที่สีเสร็จใหม่ ๆ โดยไม่ทำลายสารสำคัญ เทคโนโลยีที่ใช้ได้แก่ Stabilization Extrusion (Abidi, 2001, Dunford *et al*, 2003, Kim *et al*, 1999) Supercritical Fluid Extraction (SFE) หรือ Supercritical Carbon dioxide (SCC หรือ SC-CO_2) (Kim *et al*, 1999, Dunford *et al*, 2003, Perretti *et al*, 2003) การใช้ความร้อนในช่วงเวลาสั้น (Lehtinent *et al*, 2003) หรือใช้ความร้อนจากไฟฟ้าและคลื่นไมโครเวฟ (Lakkakula *et al*, 2004) ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวก ทำได้รวดเร็ว และอุปกรณ์ไม่ยุ่งยาก วิธีนี้นอกจากจะทำให้รำข้าวคงสภาพได้แล้วยังคงประสิทธิภาพในการสกัดไขมันที่ต้องการได้ แต่มีข้อกำหนดว่าอุณหภูมิต้องสูงเกินกว่า 100 °C ในช่วงเวลาสั้น ๆ องค์ประกอบของรำข้าวจะแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของข้าวเปลือก ข้าวเปลือกของข้าวชนิดเดียวกันก็อาจให้รำข้าวแตกต่างกันตามกระบวนการสีข้าว ดังนั้นการทำให้คงสภาพ (stabilization) และวิธีการเก็บรักษาจึงมีผลต่อส่วนประกอบและคุณค่าของรำข้าว การศึกษานี้มุ่งที่จะนำรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 ของรุ่นเก็บเกี่ยวปี 2546 มาพัฒนาเป็นเม็ด โดยเริ่มต้นจากการออกแบบสูตรตำรับและวิธีการเตรียมที่ให้ได้เม็ดรำข้าวที่มีขนาดพอเหมาะสำหรับการกิน พร้อมกับศึกษาผลการต้านออกซิเดชันเทียบกับสารมาตรฐานได้แก่วิตามินซีและวิตามินอี รวมทั้งพัฒนาวิธีการหาปริมาณสารสำคัญในกลุ่มแกมมาโอไรซานอลโดยใช้ HPLC โดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่าง ๆ และติดตามประเมินเม็ดรำข้าวที่พัฒนาขึ้น ผลการศึกษาจะเป็นแนวทางสำคัญของการพัฒนาผลิตภัณฑ์สำหรับสุขภาพจากรำข้าวที่สะดวกและปลอดภัย ซึ่งอาจจะมีการนำมาใช้เสริมสุขภาพโดยเฉพาะป้องกันโรคเรื้อรังต่อไป

สารเคมี อุปกรณ์และวิธีการ

γ-oryzanol (Oryza Oil & Fat Chemical Co., Ltd., Japan), Acetonitrile (Lab Scan, Thailand),

methanol (Fisher Scientific, U.K.), dichloromethane (Merck, Germany), glacial acetic acid (J.T.Baker, U.S,A.), microcrystalline cellulose (Asahi Kasei Co., Japan), vitamin C (BDH, England), vitamin E (Fluka Biochemica, Switzerland), 2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl (DPPH from Sigma, Germany) เครื่องสีข้าวรุ่นลูกหินนอน (ร้านแสนยนต์, อุดรธานี) เครื่องปั่นเหวี่ยง (Heraeus Sepatech, Germany) high performance liquide chromatography (HPLC from KYA Tech Corporation, Japan) เครื่องบรรจุซองสุญญากาศ (Vacuum Packaging Machine, Germany) ตู้อบ (Termaks, Japan) เครื่องตอกอัดเม็ด (เหยี่ยวเฮง, กรุงเทพมหานคร) เครื่องวัดการแตกตัวของเม็ด (Hanson Research, USA) เครื่องวัดความแข็งของเม็ด (Benchsaver, USA) เครื่องวัดความกร่อนของเม็ด (Pharma test, Germany) เครื่องเวอร์เนีย (Mitutoyo, Japan)

วิธีการ

1. การเตรียมเม็ดรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 (rice bran tablet เรียกย่อว่า RBT)

1.1 การเตรียมรำข้าว (RB) รำข้าวที่ได้จากการสีข้าวหอมดอกมะลิ 105 ที่หน่วยเมล็ดพันธุ์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ทันทีที่สีข้าวเสร็จ นำมาผ่านแร่งเบอร์ 20 เพื่อแยกแกลบ ข้าวสาร และสิ่งปนเปื้อนอื่นออกจากรำข้าว นำรำข้าวที่ได้ไปผ่านการทำให้คงสภาพโดยการใช้ตามวิธีของ Lakkakula *et al* (2004)

1.2 ส่วนประกอบ วิธีการเตรียมและบรรจุ RBT

จากการทดลองเบื้องต้นเพื่อกำหนดส่วนประกอบที่ใช้ในการเตรียมเม็ดรำข้าว (RBT) ได้สูตรซึ่งประกอบด้วย RB 42.9% microcrystalline cellulose (MCC) 42.9% polyvinyl pyrrolidone K90 (PVP) 12.9% สารช่วยไหลและสารช่วยลื่นอย่างละ 0.64% w/w

เม็ดรำข้าวเตรียมโดยวิธีการทำแกรนูลเปียกโดยผสม RB กับ MCC แล้วเติมสารละลาย PVP ในอัลกอฮอล์ นำไปผ่านแร่งและอบจนได้แกรนูล ผสมแกรนูลกับส่วนที่เหลือให้เข้ากันแล้วนำไปตอกอัดเป็นเม็ดด้วยเครื่องตอกโดยใช้หัวตอกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 12 มิลลิเมตร นำ RBT ที่เตรียมได้ไปบรรจุซองอลูมิเนียมพร้อมกับทำให้ภายในซองเป็นสุญญากาศ

1.3 การประเมินคุณลักษณะทางกายภาพของ RBT

ทำการสุ่มตัวอย่าง RBT จากที่เตรียมได้แบบไม่เจาะจง (random) และนำไปใช้ทดสอบความแปรปรวนของน้ำหนัก (weight variation) ตามวิธีการของเภสัชตำรับ (USPXX) ทดสอบเวลาที่ใช้ในการแตกตัวด้วยเครื่องวัดการแตกตัวและความกร่อนด้วยเครื่องวัดความกร่อน การทดสอบทั้งสองนี้อ้างอิงตามวิธีของเภสัชตำรับ (USP26) ทดสอบความแข็งของเม็ดรำข้าวด้วยเครื่องวัดความแข็ง นอกจากนี้ทำการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางและความหนาของเม็ดโดยใช้ Vernia Caliper หาค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดสอบและสรุปผลในตาราง

2. การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญในเม็ดรำข้าว

2.1 การเตรียมตัวอย่าง RBT

บดตัวอย่าง RBT ชั่งผงที่บดได้ 2.00 กรัม ไปสกัดด้วยเมทานอล 20 มิลลิลิตรแล้วปั่นเหวี่ยงด้วยอัตราเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเอาแต่ส่วนของสารละลายที่สกัดได้ใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป การทดลองนี้เลือกใช้เมทานอลเป็นสารละลายในการสกัดเนื่องจากใช้เป็นสารสกัดที่วิเคราะห์ได้ทั้ง HPLC และ DPPH แม้ว่าจะมีการศึกษาก่อนหน้านี้ (Hu *et al*, 1996) กล่าวถึงการใช้ isopropanol และ hexane แต่มีรายงานต่อมาโดย Chen and Bergman (2005) สรุปว่าเมทานอลก็เป็นสารละลายที่นำมาใช้สกัดได้เช่นเดียวกัน

2.2 การวิเคราะห์หา γ-oryzanol โดย High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Xu and Godber, 1999)

นำสารละลายที่สกัดได้จาก RBT มาเจือจาง 1 ต่อ 10 ด้วย mobile phase แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC

2.2.1 สารมาตรฐานที่ใช้คือ γ-oryzanol

2.2.2 ระบบที่ใช้ในการวิเคราะห์ โดยคอลัมน์ที่ใช้คือ HiQ Sil C18V ขนาด 4.6 mm x 250 mm mobile phase ที่ใช้ประกอบด้วย methanol: dichloromethane : acetonitrile : glacial acetic acid อัตราส่วน 55 : 35 : 9.5 : 0.5 กำจัดอากาศด้วยการกรองก่อนใช้งาน อัตราเร็วของการไหลของ mobile phase คือ 1.2 ml/min

2.2.3 การ validate วิธีการวิเคราะห์ โดย inter-day และ intra-day พบว่ามีความเที่ยงตรงและแม่นยำ

3. การศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของเม็ดรำข้าวโดยใช้วิธีการ diphenylpicrylhydrazine (DPPH)

นำสารละลายสกัด RBT ที่ได้มาทำการเจือจางเป็นชุดด้วยเมทานอล ในแต่ละชุดให้มีช่วงความเข้มข้นของสารละลายที่สกัด RBT ระหว่าง 0-20% เติมสารละลายทดสอบ DPPH 1 mM 0.3 ml DPPH ในเมทานอล เก็บในที่มืดเป็นเวลา 15 นาทีแล้วอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุด 515 นาโนเมตร ดังสมการที่ ①

DPPH● ⟶ DPPH..... ①
สีม่วง สีเหลือง

เมื่อ DPPH● ย่อมาจาก α,α-diphenyl -β-picrylhydrazyl radical และ DPPH ย่อมาจาก Diphenylpicrylhydrazine

คำนวณหา % inhibition จากค่าการดูดกลืนแสงที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในชุดหนึ่ง ๆ ดังสมการที่ ②

$$\%\text{Inhibition} = [(OD_{control} - OD_{sample})/OD_{control}] \times 100 \ldots ②$$

เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่าง %Inhibition กับปริมาณตั้งต้นของรำข้าว แล้วใช้ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงที่ได้หาค่าความเข้มข้นที่ให้ผลต้านออกซิเดชันครึ่งหนึ่งเรียกย่อว่า EC_{50} โดยคำนวณจากเส้นกราฟที่ได้จาก linear regression analysis โดยเทียบให้ % inhibition หรือค่าในแกน y เป็น 50% โดยใช้วิตามินซีและวิตามินอีเป็นสารมาตรฐานในการเปรียบเทียบผล

4. การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อความคงตัวของสารสำคัญและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของเม็ดรำข้าว

เก็บซองที่บรรจุ RBT ไว้ที่อุณหภูมิ -20, 4, 25 และ 45 °C เก็บตัวอย่างด้วยการสุ่มแบบไม่จำเพาะเจาะจงมาทำการวิเคราะห์ตามข้อ 1.3, 2 และ 3 ที่เวลา 2 และ 4 เดือน

ผลการทดลอง

รำข้าวสามารถนำมาพัฒนาเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์ในรูปแบบเม็ดด้วยกระบวนการและขั้นตอนที่ไม่ยุ่งยาก ขนาดของเม็ดพอเหมาะสำหรับการกลืน มีคุณลักษณะทางกายภาพดี กล่าวคือมีความแข็งพอเหมาะ ความกร่อนต่ำ อีกทั้งแตกตัวได้ดีตามเวลาที่เหมาะสมทั้งที่ยังไม่ได้เติมสารช่วยเร่งการแตกตัว ตารางที่ 1 แสดงคุณลักษณะทางกายภาพของเม็ดรำข้าวที่เตรียมโดยใช้สูตรตำรับที่พัฒนาขึ้น เม็ดรำข้าวมีน้ำหนักสุทธิเฉลี่ย 468.2 มิลลิกรัมต่อเม็ด โดยมีปริมาณรำข้าว 42.9% หรือคิดเป็นน้ำหนักรำข้าวเฉลี่ย 201 มิลลิกรัมต่อเม็ด ลักษณะเม็ดกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยเม็ดละ 12.1 มิลลิเมตร ความหนาเฉลี่ยเม็ดละ 3.5 มิลลิเมตร ความแข็งเฉลี่ย 6.38 kP และความกร่อนคิดเป็น 0.13% ของน้ำหนักตั้งต้น เม็ดรำข้าวใช้เวลาในการแตกตัวเฉลี่ย 13.56 นาที เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิระหว่าง -20 ถึง 45 °C เป็นเวลา 2 และ 4 เดือนในซองปิดผนึกสุญญากาศพบว่าขนาดของเม็ดรำข้าว (น้ำหนักต่อเม็ด เส้นผ่าศูนย์กลางและความหนา) ยังคงสภาพเดิม แต่มีคุณลักษณะทางกายภาพบางประการเปลี่ยนแปลงไปเป็นผลจากเวลาและ/หรืออุณหภูมิ โดยรวมพบว่าเมื่อเก็บไว้นานขึ้นเม็ดรำข้าวมีความแข็ง (hardness) เพิ่มขึ้นและใช้เวลาในการแตกตัว (disintegration time) มากขึ้น แต่ความกร่อน (friability) เปลี่ยนแปลงไปบ้างเล็กน้อยดังแสดงในตารางที่ 1 คาดว่าเป็นผลมาจากสาร

ช่วยที่ใช้โดยเฉพาะ PVP ซึ่งอาจเกิดขึ้นจากความชื้นในรำข้าวที่ยังคงอยู่ในเม็ดทำให้สายพอลิเมอร์ชนิดนี้เกิดจัดโครงสร้างและเปลี่ยนสภาพอย่างช้า ๆ หลังจากเก็บไว้เป็นเดือนจึงปรากฏการเปลี่ยนคุณลักษณะทางกายภาพของเม็ด ซึ่งผลนี้เป็นไปในทำนองเดียวกันกับที่ Fitzpatrick *et al* (2002) รายงานไว้ นอกจากนี้ Kiekens *et al* (2000) ทำการศึกษาเพื่ออธิบายผลของ 1.5%polyvinyl pyrrolidone K90 (PVP) เมื่อเก็บไว้ที่ความชื้นสูงหรือเก็บไว้เป็นเวลานานจะมีการจัดโครงสร้างทางกายภาพที่ทำให้ค่า tensile strength และ glass transition temperature ของพอลิเมอร์เปลี่ยนไป จากงานวิจัยทั้งสองอาจช่วยให้คำอธิบายคุณลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปซึ่งประเมินได้จากในการศึกษานี้ ทำให้คาดว่าน่าจะเกิดจาก PVP อย่างไรก็ตามความกร่อนของเม็ดรำข้าวที่เก็บรักษาไว้เป็นเวลานานถึง 4 เดือนก็ยังอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของเภสัชตำรับทำให้เป็นที่ยอมรับได้ แต่เวลาที่ใช้ในการแตกตัวนานเกินกว่าเกณฑ์ซึ่งกรณีนี้สามารถปรับได้ด้วยการใช้สารช่วยแตกตัวหรือเปลี่ยนชนิดของสารช่วยในตำรับ

จากผลการศึกษาการต้านออกซิเดชันของเม็ดรำข้าวด้วย DPPH ซึ่งทำการทดลองตัวอย่างละ 6 ครั้ง และหาค่าเฉลี่ยมาใช้ในการหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงแล้วคำนวณกลับคิดเป็นน้ำหนักของวัตถุดิบคือรำข้าวตั้งต้นที่ใช้เตรียม RBT โดยนำมาคิดเทียบหาค่าความเข้มข้น(ในที่นี้คือน้ำหนัก)ของวัตถุดิบรำข้าวที่มีการต้านออกซิเดชัน 50% หรือค่า EC_{50} รูปที่ 1 เป็นตัวอย่างการคำนวณจากเม็ดรำข้าวเริ่มต้น ได้ค่า EC_{50} 21.45 มิลลิกรัม เปรียบเทียบด้วยวิธีการทดลองเดียวกันโดยสารมาตรฐาน 2 ตัวคือวิตามินซีและวิตามินอี มีค่า EC_{50} คงที่ที่ 0.01 และ 0.03 มิลลิกรัม ตามลำดับ หลังจากเก็บไว้ 2 เดือนที่อุณหภูมิต่าง ๆ พบว่ามีค่า EC_{50} ของ RBT ที่เก็บที่ -20, 4, 25 และ 45 °C มีค่า 17.67, 20.59, 29.73 และ 26.68 มิลลิกรัมต่อกรัมของรำข้าวตามลำดับ หลังจากเก็บไว้ 4 เดือนที่อุณหภูมิ-20, 4, 25 และ 45 °C มีค่า EC_{50} ของ RBT ที่เก็บที่ มีค่า 33.86, 30.06, 30.13 และ 25.29 มิลลิกรัมต่อกรัมของรำข้าว จะเห็นได้ว่าเฉพาะที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 25 °C เป็นเวลา 2 เดือนขึ้นไปมีค่า EC_{50} เพิ่มขึ้นจากเมื่อตั้งต้น จากการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติพบว่า %inhibition ที่นำมาหาค่า EC_{50} เปรียบเทียบความแปรปรวนของตัวอย่างที่สุ่มมาอย่างไม่จำเพาะเจาะจงระหว่างเก็บไว้ 2 และ 4 เดือนที่อุณหภูมิเดียวกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เนื่องจากค่า EC_{50} เป็นค่าที่ได้จากการคำนวณโดยอาศัยความสัมพันธ์ที่ได้จากข้อมูลเฉลี่ยดังรูปที่ 1 ข้อมูลที่ได้มีการกระจายจากการสุ่มตัวอย่างแบบปกติ จึงแสดงให้เห็นแนวโน้มของการลดความสามารถในการต้านออกซิเดชันเมื่อเก็บรักษา RBT ไว้นาน 2 เดือนขึ้นไปและ/หรืออุณหภูมิสูงกว่า 25ฐC แม้ว่าจะเก็บไว้ในซองสุญญากาศ

ก่อนที่จะทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของแกมมาโอไรซานอลด้วย HPLC ได้ทำการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ตามวิธีการที่ Xu and Godber (1999) รายงานไว้ และมีโครมาโทรแกรมของแกมมาโอไรซานอลมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 6 mg/ml จากรูปที่ 2 แสดงให้เห็นถึง peaks ของสารผสมของแกมมาโอไรซานอลที่วิเคราะห์ได้ด้วย HPLC โดยมี retention time เฉลี่ยและเทียบชื่อสารตาม Xu and Godber (1999) ได้ดังนี้ peak ที่ 1 ปรากฏที่เวลาเฉลี่ย 14.5 นาที (n = 20) โดยมี RSD 0.07% เทียบได้กับ cycloartenol ferulate ส่วน peak ที่ 2 ปรากฏที่เวลาเฉลี่ย 15.6 นาที (n = 20) โดยมี RSD 0.06% เทียบได้กับ 24-methylene cycloartenol ferulate ในส่วนของ peaks ที่ 4 และ 5 ที่แสดงในรูปที่ 1 เทียบได้กับสาร campesterol ferulate 17.3 นาทีและ sitosterol ferulate 19.0 นาที ผลการ validation สารมาตรฐานที่ทำการวิเคราะห์ด้วย HPLC ให้ค่า %RSD ของ peak area ของ cycloartenol ferulate 12.8% และสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้ peak (r^2) 0.9971 สมการเชิงเส้นตรงของ cycloartenol ferulate คือ $y = 10.717 x - 3.47$ ส่วนค่า %RSD ของ 24-methylenecycloartenol ferulate peak คือ 9.4% และสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้น

กับพื้นที่ใต้ peak (r^2) 0.9979 สมการเชิงเส้นตรงของ cycloartenol ferulate คือ y = 13.168 x – 4.745 ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากระบวนการวิเคราะห์พบว่าเที่ยงตรงและแม่นยำในช่วงความเข้มข้นของแกมมาโอไรซานอลระหว่าง 0–10 mg/ml การศึกษานี้ใช้ข้อมูลจาก peaks ของ cycloartenol ferulate และ 24–methylene cycloartenol ferulate เนื่องจากอ่านผลได้ในทุกภาวะที่ทำการศึกษาและไม่ปรากฏ peak รบกวนเมื่อวิเคราะห์ในสภาวะเก็บไว้นาน 2 – 4 เดือน การสกัดสารสำคัญด้วยวิธีการที่ใช้ทำให้ recovery ประมาณ 97% การวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วย HPLC ทำให้แยกสารหลักที่สำคัญในกลุ่มแกมมาโอไรซานอลในเม็ดรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 ได้ดังนี้คือ cycloartarnyl ferulate และ 24–methylenecycloartarnyl ferulate ตั้งต้น 1.03 และ 2.14 มิลลิกรัมต่อกรัมของ RBT

รูปที่ 3 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณคงเหลือของสารในกลุ่มแกมมาโอไรซานอลที่สำคัญ 2 ตัวคือ cycloartarnyl ferulate และ 24–methylene cycloartarnyl ferulate ซึ่งลดลงเมื่อเก็บนานขึ้นจาก 2 เดือนเป็น 4 เดือน กล่าวคือภายหลังจากเก็บไว้ 4 เดือน มีสารสำคัญทั้ง 2 ตัวคงเหลือน้อยกว่า 50% ทั้งนี้ข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ได้ทดลองนำมาหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณคงเหลือกับอุณหภูมิที่ใช้เก็บรักษาในซองสุญญากาศ แสดงให้เห็นแนวโน้มเกี่ยวกับอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษา โดยจะเห็นได้ว่าเมื่อเก็บไว้นานเกินกว่า 2 เดือนความชันของเส้นกราฟจะเปลี่ยนไปจากลบเป็นบวก งานวิจัยของ Lloyd *et al* (2000) แสดงให้เห็นว่ารำข้าวที่ผ่านกระบวนการทำให้คงสภาพโดยใช้ความร้อนร่วมด้วยนั้นจะไม่ลดปริมาณของแกมมาโอไรซานอลเมื่อเก็บไว้ระหว่างอุณหภูมิ 4 ถึง -20 $^{\circ}$C ซึ่งทำให้เชื่อได้ว่าการเก็บรักษาเม็ดรำข้าวมีปัจจัยอื่นร่วมด้วย

เมื่อประมวลข้อมูลที่ได้จากการศึกษาผลการต้านออกซิเดชันและปริมาณคงเหลือของสารสำคัญ 2 ตัวในเม็ดรำข้าวที่พัฒนา คือ cycloartarnyl ferulate และ 24–methylenecycloartarnyl ferulate ซึ่งเมื่อเก็บไว้ทำให้ปริมาณสาร 2 ตัวนี้ ลดลง แต่ยังคงเหลือฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ซึ่งฤทธิ์ต้านออกซิเดชันนี้อาจเป็นผลรวมของแกมมาโอไรซานอล วิตามินอี และสารอื่นที่มีในรำข้าวร่วมด้วย แต่งานวิจัยนี้มีข้อจำกัดที่ทำการศึกษาด้วยการวิเคราะห์เพียงแกมมาโอไรซานอล 2 ตัวดังกล่าว แม้ว่ามีความประสงค์จะวิเคราะห์ให้ครบทุกตัว แต่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเก็บรักษาไว้แล้วมี peak รบกวน ตั้งแต่ peak ที่ 3 เป็นต้นไป สำหรับการเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะทางกายภาพของเม็ดรำข้าวที่ได้ผลการศึกษาในครั้งนี้ทำให้ได้ข้อมูลที่จะใช้เพื่อการพัฒนาสูตรตำรับต่อไปให้โดยคาดว่าการเพิ่มสารช่วยบางประเภทหรือเปลี่ยนชนิดของสารยึดเกาะที่จะช่วยจัดโครงสร้างทางกายภาพจะทำให้เม็ดรำข้าวที่ได้จากการพัฒนามีความแข็ง ความกร่อนและการแตกตัวที่ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่าง ๆ ในซองบรรจุซึ่งคงสภาพความชื้นสัมพัทธ์ไว้

สรุปผลการทดลอง

เม็ดรำข้าวหอมดอกมะลิที่เตรียมได้จากสูตรที่พัฒนาขึ้นมีปริมาณของรำข้าว 42.8% ของน้ำหนักของเม็ดทั้งหมด มีคุณลักษณะทางกายภาพผ่านเกณฑ์ทดสอบตามเภสัชตำรับ สารสำคัญในรำข้าว 2 ตัว คือ cycloartarnyl ferulate และ 24–methylene cycloartarnyl ferulate ตั้งต้น 1.03 และ 2.14 มิลลิกรัมต่อกรัมของเม็ดรำข้าว ภายหลังเก็บ 2 เดือนที่อุณหภูมิ 25ฐC เริ่มสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะทางกายภาพและมีปริมาณสารสำคัญ 2 ตัวคงเหลือประมาณ 70% และเมื่อเก็บไว้ 4 เดือนที่อุณหภูมิ 45ฐC เม็ดรำข้าวมีการเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะทางกายภาพ มีสารสำคัญ 2 ตัวนี้ลดลงเหลือน้อยกว่า 50% แต่ยังคงแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันประมาณ 70% ของเม็ดรำข้าวตั้งต้น สรุปได้ว่าสูตรตำรับของเม็ดรำข้าวยังมีจุดที่ต้องปรับปรุงเพื่อให้เก็บรักษาแกมมาโอไรซานอลได้นานขึ้นโดยใช้การพัฒนาสูตรตำรับ และควรประเมินสารสำคัญทั้งหมดประกอบกับการตรวจฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยจึงจะสามารถกำหนดวันหมดอายุได้ในลำดับต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพจากสมุนไพร มหาวิทยาลัยขอนแก่นที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย คณะเภสัชศาสตร์และคณะเกษตรศาสตร์ที่ให้ใช้สถานที่และอุปกรณ์ ขอบคุณอาจารย์ปิลันธนา สัจจวาที มหาวิทยาลัยมหาสารคาม รวมทั้งผู้ที่ได้มีส่วนช่วยงานวิจัยทุกท่านจนทำให้งานสำเร็จด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (ม.ป.ป.). ผลพยากรณ์ข้าวนาปีและนาปรังปี 2547. [อ้างเมื่อ 29 ธันวาคม 2547] เข้าถึงได้จาก http://www.oae.go.th/mis/predict/forcast/rice1_47.htm.

Chen, MH. ; Bergman, CJ. 2005. A rapid procedure for analyzing rice bran tocopherol, tocotrienol and γ-oryzanol contents. **J. Food Compos. Anal.** 18: 319-331.

Cheruvanky, R.; McPeak, P. ; Cherukuri, RS. ; Lynch, I. 2000. Method for treating hypercholesterolemia, hyperlipidemia and atherosclerosis. **US Patent 6,126,943** B1.

Fitzpatrick, S. ; McCabe, JF. ; Petts, CR. ; Booth, SW. 2002. Effect of moisture on polyvinylpyrrolidone in accelerated stability testing. **Int. J. Pharm**. 246: 143-151.

Fukushima, M. ; Fujii, S. ; Yoshimura, Y. ; Endo, T. ; Nakano, M. 1999. Effect of rice bran on intraintestinal fermentation and cholesterol metabolism in cecectomized rats. **Nutr. Res**. 19(2): 235-245.

Gerhardt, A. ; Gallo, N. 1998. Full-fat rice bran and oat bran similarly reduce hypercholesterolemia in humans. **J. Nutr**. 128(5): 865-869.

Graf, E. 1992. Antioxidant potential of ferulic acid. **J. Free Radic. Biol. Med.** 13(4): 435-448.

Hu, W. ; Wells, JH. ; Shin, TS. ; Godber, JS. 1996. Comparison of isopropanol and hexane for extraction of vitamin E and oryzanols from stabilized rice bran. **J. Am. Oil Chem. Soc**. 73(12): 1653-1656.

Kiekens F. ; Zelko R. ; Remon JP. 2000. Effect of the storage conditions on the tensile strength of tablets in relation to the enthalpy relaxation of the binder. **Pharm. Res.** 17(4): 490-493.

Lakkakula, NR. ; Lima, M. ; Walker, T. 2004. Rice bran stabilization and rice bran oil extraction using ohmic heating. **Bioresour. Technol**. 92: 157-161.

Lehtinent, P. ; Kiiliainent, K. ; Lehtomaki, l. ; Laaksot, S. 2003. Effect of heat treatment on lipid stability in processed oats. **J.Cereal Sci**. 37: 215-221.

Lloyd, BJ. ; Siebenmorgen TJ. ; Beers KW. 2000. Effects of commercial processing on antioxidants in rice bran. **Cereal Chem.** 77(5) 551-555.

Perretti, G. ; Miniati, E. ; Montanari, L. ; Fantozzi, P. 2003. Improving the value of rice byproducts by SFE. J. **Supercri. Fluids.** 26: 63-71.

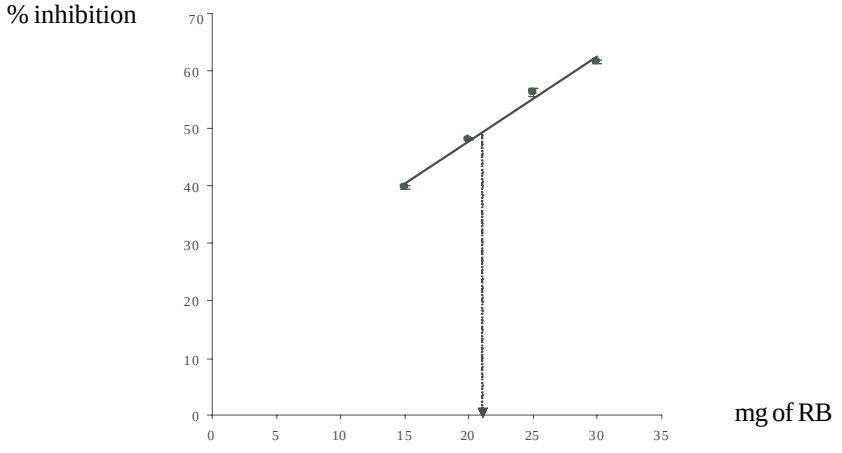
Qureshi, A. ; Sami, S. ; Salser, W. ; Khan, F. 2001. Synergistic effect of tocotrienol-rich fraction (TRE_{25}) of rice bran and lovastatin on lipid parameters in hypercholesterolemic humans. **J. Nutr. Biochem.** 12: 318-329.

Qureshi, A. ; Samai, S. ; Khan, F. 2002. Effects of stabilized rice bran, its soluble and fiber fractions on blood glucose levels and

serum lipid parameters in humans with diabetes mellitus Types I and II. **J. Nutr. Biochem.** 13: 175-187.

Seetharamaiah, S. ; Krishnakantha, P. ; Chandrasekhara, N. 1990. Influence of oryzanol on platelet aggregation n rats. **J. Nutr. Sci. Vitaminol.** 36(3): 291-297.

Xu, Z. ; Godber, S. 1999. Purification and identification of components of gamma-oryzanol in rice bran oil. **J. Agric. Food Chem.** 47(7): 2724-2728.



รูปที่ 1 ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงจากการวิเคราะห์การต้านออกซิเดชันด้วย DPPH ระหว่างน้ำหนักตั้งต้นของรำข้าวที่ใช้เตรียม RBT กับ % inhibition กราฟเส้นตรง นี้เป็นผลของ RBT ที่เริ่มต้นหา EC_{50} ได้ค่า 21.45 มิลลิกรัม

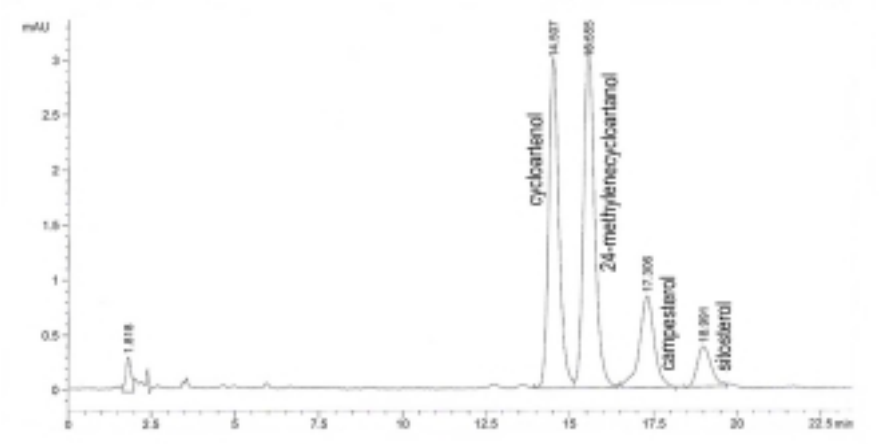
ตารางที่ 1 คุณลักษณะทางกายภาพของ RBT ที่เตรียมขึ้นใหม่และภายหลังเก็บรักษาไว้ 2 และ 4 เดือน

Physical characteristics	t = 0	t = 2 months				t = 4 months			
		-20°C	*4°C*	*25°C*	*45°C*	*-20°C*	*4°C*	*25°C*	*45°C*
Weight variation (mg) *n =20*	468.2 ± 1.82	465.33 ± 1.84	465.3 ± 1.84	466.35 ± 1.96	467.6 ± 1.28	467.6 ± 1.37	465.9 ± 2.37	464.8 ± 1.48	465.1 ± 1.96
Diameter (mm) *n =5*	12.1 ± 0.01	12.2 ± 0.02	12.2 ± 0.02	12.3 ± 0.06	12.2 ± 0.04	12.2 ± 0.05	12.2 ± 0.03	12.3 ± 0.03	12.3 ± 0.04
Thickness (mm) *n=5*	3.5 ± 0.06	3.6 ± 0.09	3.6 ± 0.09	3.7 ± 0.03	3.6 ± 0.03	3.5 ± 0.01	3.7 ± 0.04	3.6 ± 0.06	3.7 ± 0.05
Hardness (kP*) *n = 5*	6.38 ± 0.31	6.56 ± 0.27	6.56 ± 0.27	7.8 ± 0.35	8.96 ± 1.00	9.12 ± 0.91	6.24 ± 0.61	8.14 ± 0.85	9.56 ± 0.79
%Friability	0.13	0.32	0.32	0.18	0.23	0.09	0.21	0.15	0.12
Disintegration time (min) *n=6*	13.6 ± 1.46	20.0 ± 0.53	20.0 ± 0.53	19.0 ± 0.78	18.5 ± 0.41	32.0 ± 6.67	32.3 ± 3.73	36.8 ± 6.32	33.05 ±4.76

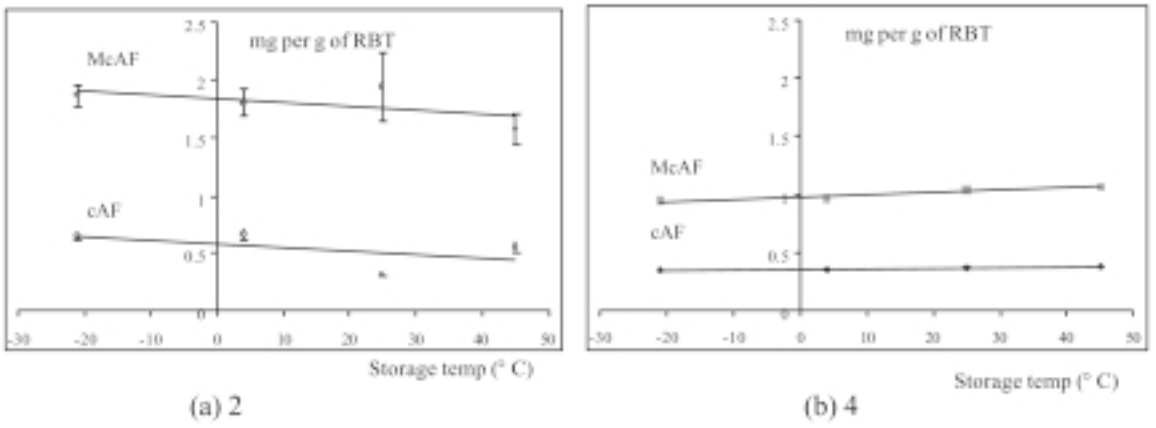
* 1kP = 9.81 N

ตารางที่ 2 ค่า EC_{50} ของเม็ดรำข้าวจากการวิเคราะห์ด้วย DPPH ที่เวลาเริ่มต้นและภายหลังเก็บเป็นเวลา 2 และ 4 เดือนที่อุณหภูมิต่าง ๆ โดยเทียบเป็นน้ำหนัก (หน่วย: มิลลิกรัม) ของรำข้าวตั้งต้น

	t = 0	t = 2 months				t = 4 months			
		-20 ℃	4 ℃	25 ℃	45 ℃	-20 ℃	4 ℃	25 ℃	45 ℃
ค่าเฉลี่ย	21.45	17.67	20.59	29.73	26.68	33.86	30.06	30.13	25.29



รูปที่ 2 โครมาโทรแกรมของแกมมาโอไรซานอล 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรจากการวิเคราะห์ด้วย HPLC (HiQ Sil C18V 4.6mm x 250 mm; mobile phase : methanol : dichloromethane : acetonitrile : glacial acetic acid = 55:35:9.5:0.5; flow rate 1.2 ml/min)



รูปที่ 3 ปริมาณ cycloartarnyl ferulate (cAF) และ 24-methylenecycloartarnyl ferulate (McAF) ที่คงเหลือในเม็ดรำข้าวเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20, 4, 25 และ 45ฐC วิเคราะห์โดย HPLC หลังจากเก็บไว้ (a) 2 เดือน และ (b) 4 เดือน