



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการวิเคราะห์ปริมาณสารด้วยการสกัดเพียงบางส่วน
และใช้ค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งละลายเข้าช่วย

โดย ดร.สุภัทรา ลิลิตชาญ

กุมภาพันธ์ 2551

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการวิเคราะห์ปริมาณสารด้วยการสกัดเพียงบางส่วน และใช้ค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งละลายเข้าช่วย

คณะผู้วิจัย

สังกัด

1. ดร.สุภัทรา ลีลิตชาญ

มหาวิทยาลัยมหิดล

2. รศ.ดร.คณิต กฤษณังกูร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG4780016

ชื่อโครงการ : การวิเคราะห์ปริมาณสารด้วยการสกัดเพียงบางส่วนและใช้ค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งละลายเข้าช่วย

ชื่อนักวิจัย : ดร.สุภัทรา ลิลิตชาญ มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail Address : phsll@mahidol.ac.th, supathral@yahoo.com

ระยะเวลาโครงการ : 1 กันยายน 2547 ถึง 31 สิงหาคม 2549

การสกัดแยกสารออกจากตัวอย่างของแข็งหรือของเหลวอย่างสมบูรณ์เพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารด้วยวิธีดั้งเดิม นั้น พบว่าเป็นวิธีที่ต้องใช้เวลานานและจำเป็นต้องใช้เครื่องมืออุปกรณ์เฉพาะสำหรับการสกัดสาร ดังนั้นโครงการวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารด้วยวิธีการสกัดสารออกมาเพียงบางส่วนด้วยตัวทำละลาย สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณสารแกมมาโอโรซานอล โดยคำนวณค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับของสาร (adsorption coefficient; K_d) ได้จากการสกัดสารตัวอย่าง 2 ชุดในปริมาณเท่ากัน แต่ให้ปริมาตรของตัวทำละลายอินทรีย์ ในชุดที่ 2 เป็น 2 เท่าของตัวทำละลายในชุดที่ 1 ร่วมกับการแก้สมการทางคณิตศาสตร์

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณไขมันทั้งหมดและแกมมาโอโรซานอลในรำข้าวสาลีพันธุ์ กข 6 ด้วยวิธีการสกัดเพียงบางส่วนด้วยตัวทำละลายเฮกเซนมีร้อยละ 20.72 (น้ำหนักแห้ง) และ 3.43 มิลลิกรัม/รำข้าว 1 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการหาปริมาณไขมันทั้งหมดและแกมมาโอโรซานอลด้วยวิธี Soxhlet extraction ซึ่งมีค่าเท่ากับร้อยละ 21.25 และ 3.67 มิลลิกรัม/รำข้าว 1 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ โดยวิธีใหม่ที่น่าเสนอนี้สามารถลดปริมาตรของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด และช่วยลดเวลาในการวิเคราะห์ อีกทั้งไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือเฉพาะสำหรับการสกัดสาร นอกจากนี้ในงานวิจัยนี้ได้วิเคราะห์หาปริมาณไขมันทั้งหมดและแกมมาโอโรซานอลโดยวิธีการสกัดเพียงบางส่วนด้วยตัวทำละลายเฮกเซนในรำข้าวสาลีพันธุ์ต่าง ๆ 9 สายพันธุ์ พบว่ารำข้าวสาลีพันธุ์ดอคำ 5647 มีปริมาณไขมันทั้งหมดและแกมมาโอโรซานอลสูงสุด ในขณะที่รำข้าวสาลีพันธุ์ KD XBT 313-19-1-1 และ SP XBT 43-7 มีปริมาณไขมันทั้งหมดและแกมมาโอโรซานอลต่ำสุด ตามลำดับ ซึ่งค่า K_d ของไขมันและแกมมาโอโรซานอลที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีค่าอยู่ระหว่าง 1.16-2.00 และ 2.02-2.65 ตามลำดับ ความแตกต่างของค่า K_d ของไขมันและแกมมาโอโรซานอลในตัวอย่างรำข้าวสาลีพันธุ์ต่าง ๆ

น่าจะมาจากปริมาณความชื้นในรำข้าวที่แตกต่างกัน ในการทดลองนี้ได้ศึกษาถึงผลกระทบของตัวทำละลายต่อการสกัดแกมมาโอไรซานอลในรำข้าวด้วย จากผลการทดลองพบว่าไอโซโพรพานอลเป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการสกัดและการวิเคราะห์ปริมาณแกมมาโอไรซานอลในรำข้าว เนื่องจากเป็นตัวทำละลายที่ให้ค่าปริมาณแกมมาโอไรซานอลในรำข้าวใกล้เคียงจากที่หาได้ด้วยวิธีดั้งเดิมมากที่สุด

อีกทั้งวิธีใหม่ที่พัฒนานี้สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์แกมมาโอไรซานอลและกรดเฟอรูลิกในรำข้าวไปพร้อมๆกันด้วยวิธีการสกัดเพียงบางส่วนร่วมกับเทคนิค RP-HPLC จากผลการวิเคราะห์ปริมาณแกมมาโอไรซานอลในรำข้าวสายพันธุ์หอมนิลด้วยวิธีการสกัดเพียงบางส่วนร่วมกับเทคนิค RP-HPLC มีค่าเท่ากับ 2.64 มิลลิกรัม/รำข้าว 1 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ซึ่งปริมาณที่วิเคราะห์ได้ใกล้เคียงกับผลการวิเคราะห์ปริมาณแกมมาโอไรซานอลด้วยวิธีการสกัดเพียงบางส่วนวิเคราะห์ โดยตรวจวัดปริมาณสารด้วยเครื่อง UV-Spectrophotometer (ประมาณ 2.66 มิลลิกรัม/รำข้าว 1 กรัม (น้ำหนักแห้ง) สำหรับปริมาณกรดเฟอรูลิกวิเคราะห์ได้เท่ากับ 0.36 มิลลิกรัม/รำข้าว 1 กรัม (น้ำหนักแห้ง) โดยค่า K_d ของแกมมาโอไรซานอลและกรดเฟอรูลิกที่ทำการสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล มีค่าเท่ากับ 0.99 และ 0.60 ตามลำดับ

จากหลักการการวิเคราะห์หาปริมาณสารด้วยวิธีใหม่นี้จะสามารถขยายผลนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารในตัวอย่างอาหารอื่นๆ ต่อไปได้ด้วย หากทราบค่า K_d ของสาร การวิเคราะห์หาปริมาณสารด้วยวิธีใหม่นี้จะทำได้ง่ายโดยการสกัดเพียงครั้งเดียว ซึ่งเป็นวิธีวิเคราะห์ที่ทำได้ง่าย รวดเร็ว และประหยัดตัวทำละลายอย่างมาก

คำหลัก : ปริมาณไขมันทั้งหมด, แกมมาโอไรซานอล, กรดเฟอรูลิก, ค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับ, วิธีการสกัดเพียงบางส่วน

Abstract

Project Code : MRG4780016

Project Title : Quantitative Analysis by Partial Extraction with the Aid of Partition Coefficient

Investigator : Dr. Supathra Lilitchan, Mahidol University

E-mail Address : phsll@mahidol.ac.th, supathral@yahoo.com

Project Period : 1 September 2004 - 31 August 2006

A complete extraction of a solute from a solid or liquid sample has been routinely practice in the classical method of analysis. It is time consuming and requires a special apparatus. In this study, a partial extraction method is developed for quantitative analysis of γ -oryzanol. The adsorption coefficient (K_d) is determined by the accurate weight of two identical samples filled with organic solvent of different volumes and solved by two mathematic equations.

Total lipid and γ -oryzanol determined by using hexane partial extraction with UV-Spectrophotometer are 20.27% (dry weight basis) and 3.43 mg/g (dry weight basis), respectively. The obtained values are close to those determined by Soxhlet extraction method (21.25%) for total lipid and 3.67 mg/g γ -oryzanol in RD 6 rice variety. The proposed method consumes less hazardous organic solvents, takes shorter extraction time and no special extraction apparatus is required. Total lipids and γ -oryzanol in 9 rice bran varieties were analyzed by the developed technique. Daw Dum 5647 variety had the highest total lipid and γ -oryzanol while the lowest was found in KD XBT 313-19-1-1 and SP XBT 43-7, respectively. The K_d value of the lipids and γ -oryzanol between hexane and bran at 30°C are between 1.16 - 2.00 and 2.02-2.65, respectively (depending on the moisture content of the bran). The effect of solvents on the extraction of γ -oryzanol from rice bran was also studied. It was found that isopropanol was the most suitable solvent for extraction and determination of γ -oryzanol in rice bran. It showed better agreement with the total extraction method.

Furthermore, the partial extraction with RP-HPLC was developed for the simultaneous determination of γ -oryzanol and ferulic acid in RB. Gamma oryzanol determined by using partial extraction and RP-HPLC is 2.64 mg/g in Hom Nin rice variety, whereas γ -oryzanol determined by using partial extraction with UV-Spectrophotometer is 2.66 mg/g. Ferulic acid determined by using partial extraction with RP-HPLC is 0.36 mg/g. The K_d value of the γ -oryzanol and ferulic acid between methanol and bran are 0.99 and 0.60, respectively.

The proposed method may be able to extend to the determination of total lipids, γ -oryzanol and ferulic acid in different food formulas. If the K_d value of a solute is known, the amount of that solute can be determined in only one step of partial extraction under the same condition, i.e. temperature and moisture content. Thus, the analysis is very rapid and economical.

Keywords : Total lipids; γ -Oryzanol; Ferulic acid; Adsorption coefficient; Partial extraction method

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอแสดงความขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา เป็นอย่างสูงที่เป็นผู้สนับสนุนให้ทุนอุดหนุนการวิจัยเป็นระยะเวลา 2 ปี (นับตั้งแต่วันที่ 1 กันยายน 2547 ถึงวันที่ 31 สิงหาคม 2549) ทำให้งานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี ทั้งนี้ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.คณิต กฤษณังกูร ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำและให้ข้อคิดต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์ จนทำให้รายงานวิจัยฉบับนี้สมบูรณ์มากขึ้น และขอขอบพระคุณ รศ.ดร.อภิชาติ วรรณวิจิตร ศูนย์ความเป็นเลิศทางการปรับปรุงพันธุ์ข้าวแนวอนุวิธีและพัฒนาผลิตภัณฑ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (วิทยาเขตกำแพงแสน) ที่ให้การสนับสนุนตัวอย่างข้าว ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา และสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรีที่ให้การสนับสนุนการใช้อุปกรณ์ เครื่องมือ วิทยาศาสตร์ในการดำเนินงานวิจัยด้วยดีมาตลอด

ดร.สุภัทรา ลีลิขิต

หัวหน้าโครงการวิจัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	iii
ภาษาไทย	iii
ภาษาอังกฤษ	v
กิตติกรรมประกาศ	vii
สารบัญ	viii
สารบัญตาราง	ix
สารบัญรูป	x
หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
วัตถุประสงค์วิจัย	2
ขอบเขตของการวิจัย	2
ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	8
ผลการทดลองและวิจารณ์ผล	13
สรุปผลการทดลอง	30
เอกสารอ้างอิง	31
ภาคผนวก	35
ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ	36
การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ	38

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณไขมันทั้งหมดและแกมมาโอโรซานอลในรำข้าว (กข.6) โดยวิธีดั้งเดิมและวิธีการสกัดเพียงบางส่วนด้วยตัวทำละลายเฮกเซน	14
2. ปริมาณไขมันทั้งหมดและแกมมาโอโรซานอลในรำข้าวสายพันธุ์ต่างโดยวิธีการสกัดเพียงบางส่วนด้วยตัวทำละลายเฮกเซน	15
3. ค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับ (K_d) และร้อยละของการสกัดได้ของไขมันและแกมมาโอโรซานอลในรำข้าวสายพันธุ์ต่างโดยวิธีการสกัดเพียงบางส่วนด้วยตัวทำละลายเฮกเซน	16
4. กราฟสอบเทียบมาตรฐานของแกมมาโอโรซานอลและความยาวคลื่นที่ดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{Max})	19
5. เปรียบเทียบปริมาณแกมมาโอโรซานอลในรำข้าวสายพันธุ์ กข.6 ที่วิเคราะห์ได้จากวิธีดั้งเดิมกับวิธีการสกัดเพียงบางส่วนด้วยตัวทำละลายต่างๆ	21
6. แสดงค่าเวลาคงค้างของสารมาตรฐานแกมมาโอโรซานอลและกรดเฟอรูลิกที่วิเคราะห์ด้วย RP-HPLC เมื่อใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ชนิดต่างๆ	26
7. ปริมาณแกมมาโอโรซานอลและกรดเฟอรูลิกในรำข้าวโดยวิธีการสกัดเพียงบางส่วนด้วยตัวทำละลายเมทานอล	27
8. ค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับ (K_d) ของแกมมาโอโรซานอลและกรดเฟอรูลิกในรำข้าวโดยวิธีการสกัดเพียงบางส่วนด้วยตัวทำละลายเมทานอล	28
9. ค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับ (K_d) ของแกมมาโอโรซานอลและกรดเฟอรูลิกในรำข้าวโดยวิธีการสกัดเพียงบางส่วนด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ	28

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า K_d ของไขมัน (a) และแกมมาโอโรซานอล (b) กับปริมาณความชื้นในตัวอย่างรำข้าวสาลีพันธุ์ กข.6 โดยวิธีการสกัดเพียงบางส่วนด้วยเฮกเซน	17
2. แสดงร้อยละของการสกัดแกมมาโอโรซานอลในรำข้าวสาลีพันธุ์หอมสุพรรณ (ค่า K_d เท่ากับ 2.65) ที่อัตราส่วนระหว่างเฮกเซนต่อรำข้าว (ปริมาตร/น้ำหนัก) ต่างๆ	18
3. โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานและสารตัวอย่างวิเคราะห์ด้วย RP-HPLC คอลัมน์ μ Bondapak C18 125 $^{\circ}$ A 10 μ m 3.9 x 300 mm ระบบวัฏภาคเคลื่อนที่ประกอบด้วย acetic acid (เข้มข้น 1%):acetonitrile ที่อัตราส่วน 19:81 โดยปริมาตร และใช้อัตราการไหล 1 ml/min ตรวจวัดด้วยเครื่อง Photodiode Array Detector ที่ความยาวคลื่น 320 nm (ก) ตัวอย่างรำข้าว และ (ข) สารมาตรฐานกรดเฟอรูลิก	23
4. สเปกตรัมการดูดกลืนรังสีอัลตราไวโอเลต (UV Spectra) ก) สารมาตรฐานกรดเฟอรูลิก ข) ตัวอย่างรำข้าวจากโครมาโทแกรมรูปที่ 3 (พีคที่ 10)	24
5. แมสสเปกตรัมของตัวอย่างรำข้าว	25

หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)

ชื่อโครงการ การวิเคราะห์ปริมาณสารด้วยการสกัดเพียงบางส่วนและใช้ค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งละลายเข้าช่วย

Quantitative Analysis by Partial Extraction with the Aid of Partition Coefficient

1. ชื่อหัวหน้าโครงการ หน่วยงานที่สังกัด ที่อยู่ หมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail

ดร.สุภัทรา ลีลิตชาญ

ภาควิชาโภชนวิทยา คณะสาธารณสุขศาสตร์

มหาวิทยาลัยมหิดล 420/1 ถ.ราชวิถี เขตราชเทวี

กรุงเทพมหานคร 10400

โทรศัพท์ 0-2354-8543-9 ต่อ 1203

โทรสาร 0-2640-9839

E-mail : phsll@mahidol.ac.th, supathral@yahoo.com

2. สาขาที่ทำการวิจัย เคมีวิเคราะห์

4. ระยะเวลาดำเนินการ 2 ปี

5. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

การวิเคราะห์ปริมาณสารและการสกัดแยกสารด้วยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย (solvent extraction) จำเป็นต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เป็นจำนวนมากเพื่อสกัดสารออกจากตัวอย่างได้อย่างสมบูรณ์ นอกจากนี้ยังจะต้องทำการพิสูจน์ให้ได้ว่าการสกัดนั้นสกัดสารได้หมดจดซึ่งมักจะทำได้ไม่ถนัดนัก อีกทั้งการระเหยตัวทำละลายออก สารตัวอย่างที่ระเหยง่าย (volatile solute) จะระเหยออกมาพร้อมกับตัวทำละลาย ปริมาณสารอาจเปลี่ยนแปลงไปทำให้ผลการวิเคราะห์ผิดพลาดได้ การสกัดสารแบบดั้งเดิมต้องสิ้นเปลืองสารเคมีและต้องเสียทั้งเวลาและค่าใช้จ่ายในการกำจัดตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้แล้ว ดังนั้นการสกัดเพื่อวิเคราะห์สารบางชนิดจึงมีขั้นตอนการสกัดหลายขั้นตอนถึงจะสามารถสกัดสารออกจากตัวอย่างได้อย่างสมบูรณ์ ทำให้การวิเคราะห์ปริมาณสารทำได้ยาก และเสียเวลามาก อีกทั้งยังพบว่าเป็นเทคนิคที่ให้ประสิทธิภาพในการสกัดต่ำ และจำเป็นต้องใช้ปริมาณตัวอย่างเป็นจำนวนมาก

ดังนั้นโครงการวิจัยนี้ได้เสนอ แนวทางหนึ่งที่จะสามารถทำการวิเคราะห์ปริมาณสาร ด้วยวิธีการสกัดสารออกมาเพียงบางส่วนด้วยตัวทำละลาย และอาศัยค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับ ของสาร (adsorption coefficient; K_d) มาช่วยคำนวณหาปริมาณสารทั้งหมดในตัวอย่าง

งานวิจัยนี้จึงมุ่งพัฒนาหลักการเพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารในตัวอย่างด้วยวิธีการสกัดด้วย ตัวทำละลายจากค่า K_d และหาปริมาณสารด้วยการแก๊สโครมาโทกราฟีแบบง่าย ๆ โดยการตรวจวิเคราะห์สารสามารถทำได้ด้วยเครื่องมือต่าง ๆ ที่มีในห้องปฏิบัติการและมีความ เหมาะสมกับคุณสมบัติของสารแต่ละชนิดที่นำมาใช้เป็นสารตัวอย่างในการวิเคราะห์และหา ปริมาณของสาร ซึ่งในงานวิจัยนี้สนใจวิเคราะห์ปริมาณไขมันทั้งหมด (total lipids) และแกมมา โอไรซานอล (γ -oryzanol) ในรำข้าว และวิเคราะห์ปริมาณแกมมาโอไรซานอล (γ -oryzanol) และ กรดเฟอร์ูลิก (ferulic acid) ในรำข้าวไปพร้อมๆกัน ทั้งนี้เนื่องจากการวิเคราะห์ปริมาณไขมัน ทั้งหมดในรำข้าวด้วยวิธีดั้งเดิม (classical method) ซึ่งนิยมใช้เฮกเซนหรือปิโตรเลียมอีเทอร์ เป็นตัวทำละลายจะต้องทำการสกัดแบบต่อเนื่อง เพื่อให้ตัวทำละลายสัมผัสตัวอย่างที่ต้องการ สกัดหลายครั้งและต้องใช้ตัวทำละลายปริมาณมาก อีกทั้งยังใช้เวลาในการสกัดเป็นเวลานานและ มีค่าใช้จ่ายสูง และการวิเคราะห์ปริมาณแกมมาโอไรซานอลในรำข้าวที่ผ่านมา [1-7] ต้องทำการ สกัดน้ำมันออกจากรำข้าวก่อนแล้วนำน้ำมันที่สกัดได้มาวัดปริมาณแกมมาโอไรซานอลอีกครั้ง ทำให้เสียเวลา นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยพบกรดเฟอร์ูลิกในข้าว ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และมี คุณสมบัติที่สามารถป้องกันโรคต่าง ๆ ได้ แต่ยังไม่มีการศึกษาวิเคราะห์ปริมาณกรดเฟอร์ู ลิกในรำข้าว อีกทั้งการวิเคราะห์ปริมาณกรดเฟอร์ูลิกยังมีความยุ่งยาก ซับซ้อน และใช้เวลานาน

งานวิจัยนี้ได้เสนอแนวทางใหม่ในการวิเคราะห์ปริมาณสารต่าง ๆ โดยใช้ค่า K_d ซึ่งมี ทฤษฎีการคำนวณ ดังที่จะกล่าวในบทอุปกรณและวิธีการทดลอง

6. วัตถุประสงค์วิจัย

เพื่อพัฒนาหาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณของสารด้วยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายเพียง บางส่วนและนำค่า K_d มาช่วยในการวิเคราะห์หาปริมาณสารได้อย่างถูกต้อง สะดวกและรวดเร็ว

7. ขอบเขตของการวิจัย

7.1 ศึกษาความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์สารด้วยการสกัดเพียงบางส่วนโดยตรวจวัด ปริมาณสารด้วยเครื่อง UV-Spectrophotometer และเปรียบเทียบความถูกต้องกับวิธีดั้งเดิม (classical method)

7.2 ศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณไขมันทั้งหมดและแกมมาโอไรซานอลในรำข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ด้วยวิธีการสกัดเพียงบางส่วนโดยตรวจวัดปริมาณสารด้วยเครื่อง UV-Spectrophotometer

7.3 ศึกษาหาค่า K_d ของไขมันและแกมมาโอไรซานอลระหว่างชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์ ที่ใช้สกัดกับชั้นของรำข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ด้วยวิธีการสกัดเพียงบางส่วนโดยตรวจวัดปริมาณสารด้วย เครื่อง UV-Spectrophotometer รวมทั้งศึกษาปัจจัยที่ผลต่อค่า K_d เช่น ความชื้นในรำข้าว

- 7.4 ศึกษาหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณแกมมาโอโรซานอลในรำข้าว ด้วยวิธีการสกัดเพียงบางส่วนโดยตรวจวัดปริมาณสารด้วยเครื่อง UV-Spectrophotometer และใช้ค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับเข้าช่วยที่สามารถทำทวนซ้ำและให้ความถูกต้องสูงสุด
- 7.5 ศึกษาการวิเคราะห์เอกลักษณ์ของกรดเฟอรูลิกในรำข้าวด้วยเทคนิค RP-HPLC-MS
- 7.6 ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารแกมมาโอโรซานอล และ Ferulic acid ในรำข้าวด้วยวิธีการสกัดเพียงบางส่วนร่วมกับเทคนิค RP-HPLC
- 7.7 ศึกษาหาค่า K_d ของไขมันและแกมมาโอโรซานอลระหว่างชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้สกัดกับชั้นของรำข้าวพันธุ์ต่างๆด้วยวิธีการสกัดเพียงบางส่วนร่วมกับเทคนิค RP-HPLC
- 7.8 ศึกษาหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารแกมมาโอโรซานอล และ Ferulic acid ในรำข้าวด้วยวิธีการสกัดเพียงบางส่วนร่วมกับเทคนิค RP-HPLC

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

รำข้าวเป็นผลพลอยได้ของข้าวเปลือกโดยในข้าวเปลือกมีรำข้าวอยู่ประมาณร้อยละ 7 ของน้ำหนักจะเห็นว่าเป็นปริมาณที่ไม่มากนักแต่ถ้าพิจารณาถึงผลผลิตข้าวโดยรวมของประเทศ ไทยซึ่งเป็นประเทศที่ปลูกข้าวเป็นอันดับต้นๆของโลก จึงทำให้ปริมาณรำข้าวที่เป็นผลพลอยได้ มีจำนวนมากนับล้านตัน [8] รำข้าวประกอบด้วยสารอาหาร เช่น โปรตีน ไขมัน เส้นใยหยาบ แร่ธาตุที่จำเป็นและวิตามินหลายชนิดแล้ว อีกทั้งยังประกอบด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น แกมมา โอไรซานอล และวิตามินอี [9] ซึ่งมีคุณสมบัติช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดอุดตันได้ นอกจากนี้มีรายงานพบสารประกอบฟีนอล (phenolic compounds) อื่นๆในข้าว อีกด้วย เช่น กรดเฟอรูลิก [10-12] ซึ่งเป็นสารสำคัญที่เป็นตัวช่วยทำให้ระบบภูมิคุ้มกันใน ร่างกายมีประสิทธิภาพ และช่วยลดระดับน้ำตาลและไขมันในเลือด รวมทั้งลดโอกาสเสี่ยงในการ เป็นโรคมะเร็งต่างๆ ได้แก่ มะเร็งลำไส้ มะเร็งหลอดอาหาร มะเร็งต่อมลูกหมาก เป็นต้น [13-14]

ในปี ค.ศ. 1993 Roger และคณะ [15] ศึกษาเอกลักษณ์และวิเคราะห์ปริมาณแกมมา โอไรซานอลพร้อมกับวิตามินอีที่มีอยู่ในน้ำมันรำข้าว โดยใช้ RP-HPLC คอลัมน์ชนิด 5 nm ODS (C18) Hypersil Silica ขนาดคอลัมน์ 2.1 x 200 mm ซึ่งต่อกับเครื่องตรวจวัด 2 ชนิด คือ Photodiode array detector สำหรับวิเคราะห์แกมมาโอไรซานอลและ Fluorescence detector สำหรับวิเคราะห์วิตามินอี ทำการทดลองเพื่อเลือกระบบตัวทำละลายที่เหมาะสม ซึ่ง สามารถแยกองค์ประกอบแต่ละชนิดของวิตามินอีและแกมมาโอไรซานอลโดยศึกษาตัวทำละลาย ผสมระหว่าง acetonitrile / methanol / isopropanol / water พบว่า สัดส่วน 45 / 45 / 5 / 5 โดยปริมาตรเหมาะสมที่สุด ถ้ามีตัวทำละลายเพียง acetonitrile และ methanol จะทำให้ ประสิทธิภาพการแยกองค์ประกอบของแกมมาโอไรซานอลลดลงจึงต้องใช้ isopropanol เพื่อ เพิ่มประสิทธิภาพการแยกองค์ประกอบแต่ละชนิดของแกมมาโอไรซานอล นอกจากนั้นการใช้ น้ำในระบบตัวทำละลายผสมจะทำให้ประสิทธิภาพการแยกโทโคฟีรอลและโทโคไตรอีนอล เพิ่มขึ้น ผลการทดลองพบว่า น้ำมันรำข้าวที่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์แล้วจากแหล่งผลิต ต่างกัน จะมีองค์ประกอบของวิตามินอีและแกมมาโอไรซานอลคล้ายคลึงกัน แต่มีปริมาณสาร เหล่านี้ต่างกันมาก ทั้งนี้เนื่องจากความแตกต่างของกระบวนการผลิตน้ำมันรำข้าวของแต่ละ โรงงาน

ในปี ค.ศ. 1998 Das และคณะ [16] แยกแกมมาโอไรซานอลโดยใช้วิธีการ เหนียวนำด้วยแคลเซียมออกไซด์ทำให้เกิดการตกตะกอนของกลุ่ม micellar ที่มีประจุลบ วิธีการ เริ่มจากการนำ commercial acid oil ที่มีกรดไขมันอิสระอยู่สูงถึง 60 % มากลั่นภายใต้สภาวะ สุญญากาศที่ 250-260 องศาเซลเซียส เพื่อกำจัดกรดไขมันอิสระ และทำการกำจัดกรดไขมัน อิสระที่เหลืออยู่ซ้ำอีกครั้งหนึ่ง โดยเติมสารละลายต่างซึ่งมีผลทำให้แกมมาโอไรซานอลเกิดการ แตกตัวและเกิดเป็นกลุ่มของ micellar ที่มีประจุลบ และละลายได้ในน้ำ เมื่อเติมเกลือแคลเซียม จะเกิดการเหนียวนำให้กลุ่ม micellar ของเกลือแคลเซียมของกรดไขมันและแกมมาโอไรซานอล

เกิดการตกตะกอน จากนั้นแยกตะกอนออกและทำให้แห้ง สกัดแยกแอมมาโอไรซานอลจากตะกอนที่แห้งด้วยตัวทำละลาย ethyl acetate ทำการระเหย ethyl acetate ออกจะได้ของเหลือที่มีแอมมาโอไรซานอลอยู่ 19 % และมี % recovery เท่ากับ 100 ส่วนแอมมาโอไรซานอลจะถูกนำไปทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นด้วยการใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟีที่บรรจุด้วยซิลิกาเจลและมีตัวชะเป็นคลอโรฟอร์มบริสุทธิ์ 98 % เมื่อระเหยเอาตัวทำละลายออกไปจะได้ของแข็งที่มีสีเหลืองปน และมีปริมาณแอมมาโอไรซานอลอยู่ 67% และ % recovery เท่ากับ 84 ขั้นตอนสุดท้ายในการทำให้บริสุทธิ์จะใช้ charcoal treatment ทำให้ได้สารแอมมาโอไรซานอลที่มีความบริสุทธิ์สูงประมาณ 96 % และมี % recovery เท่ากับ 76

ในปี ค.ศ. 2002 นพมาศ [17] ได้ทำการสำรวจปริมาณแอมมาโอไรซานอลและวิตามินอีในข้าวไทยสายพันธุ์ต่างๆ 18 สายพันธุ์ โดยวิเคราะห์หาปริมาณแอมมาโอไรซานอลและวิตามินอี ปริมาณไขมันทั้งหมด และองค์ประกอบของกรดไขมันในข้าวเจ้า 14 พันธุ์ ข้าวเหนียวดำ 2 พันธุ์ และข้าวเหนียวขาว 12 พันธุ์ พบว่าข้าวเหนียวดำมีปริมาณแอมมาโอไรซานอลสูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับข้าวเหนียวขาวและข้าวเจ้า แต่มีปริมาณวิตามินอีต่ำ ในกลุ่มของข้าวเจ้า พบว่าข้าวนาสวนพันธุ์ กข 13 ที่ปลูกในจังหวัดปราจีนบุรี มีปริมาณแอมมาโอไรซานอลสูงที่สุดและพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ที่ปลูกในจังหวัดสกลนคร มีปริมาณวิตามินอีสูงที่สุด ส่วนข้าวเจ้ากลุ่มข้าวขึ้นน้ำหรือข้าวน้ำลึก มีปริมาณแอมมาโอไรซานอลที่ต่ำ แสดงว่าปริมาณน้ำในนาอาจจะเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีอิทธิพลต่อการสร้างแอมมาโอไรซานอล จากการวิเคราะห์ปริมาณไขมัน พบว่าข้าวเหนียวดำและข้าวเหนียวขาวมีปริมาณไขมันที่สูงกว่าข้าวเจ้า ซึ่งองค์ประกอบของกรดไขมันที่พบมากในน้ำมันรำข้าวได้แก่ โอเลอิก ลิโนเลอิก และปาล์มมิติก โดยพันธุ์ตะกั่วป่า 161 ในกลุ่มข้าวขึ้นน้ำหรือข้าวน้ำลึกมีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยวสูงที่สุด ร้อยละ 48.38 และมีปริมาณกรดไขมันอิ่มตัวต่ำที่สุด ร้อยละ 21.77 ซึ่งอาจจัดเป็นน้ำมันสุขภาพได้

ในปี ค.ศ. 2003 Giuseppe และคณะ [18] ทำการศึกษาการเพิ่มมูลค่าของผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตข้าวสาร โดยใช้ซูเปอร์คริติคอลฟลูอิดในการสกัด ตัวอย่างที่ได้จากกระบวนการผลิต ได้แก่ เปลือกข้าว รำข้าว ปลายข้าว เป็นต้น โดยใช้ซูเปอร์คริติคอลฟลูอิดคาร์บอนไดออกไซด์สกัดที่สภาวะต่างๆดังนี้ คือ ที่อุณหภูมิ 40 , 60 และ 80 องศาเซลเซียส และที่ความดัน 5,000 , 7,500 และ 10,000 psi ตามลำดับ พบว่า ที่สภาวะสูงสุดทั้งอุณหภูมิและความดัน คือ ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส และที่ความดัน 10,000 psi รำข้าวจะให้ปริมาณของแอมมาโอไรซานอลสูงที่สุด อีกทั้งยังพบว่านอกจากที่สภาวะนี้จะให้เปอร์เซ็นต์ผลผลิตสูงที่สุดแล้ว น้ำมันที่สกัดได้ยังเหมาะสมต่อผู้บริโภคเพราะมีคุณค่าทางโภชนาการสูง เนื่องจากสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติที่มีอยู่ ได้แก่ สารพิกโนโกลิโนล โทโคไตรอีนอล และแอมมาโอไรซานอล

ในปี ค.ศ. 2005 Chokmoh และคณะ [19] ทำการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณแอมมาโอไรซานอลในรำข้าว โดยอาศัยค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับ (adsorption coefficient ;

K_d) รวมทั้งการศึกษาผลกระทบของปริมาณแกมมาโอไรซานอลต่อการเปลี่ยนแปลงค่ากรดของน้ำมันรำข้าว พบว่า ไดไฮโซโพรพิลอีเทอร์เป็นตัวทำละลายที่ให้ปริมาณแกมมาโอไรซานอล (3.48 mg/g น้ำมันรำข้าวแห้ง) ใกล้เคียงกับปริมาณที่วิเคราะห์ได้ด้วยวิธี Classical method (3.67 mg/g น้ำมันรำข้าวแห้ง) และมีค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับที่เหมาะสม (K_d เท่ากับ 8.48) ส่วนการสกัดด้วยเอทานอลและไอโซโพรพานอล จะให้ปริมาณแกมมาโอไรซานอลในรำข้าวสูงกว่าวิธี Classical method เล็กน้อย เนื่องจากทั้งเอทานอลและไอโซโพรพานอลมีสภาพขั้วสูง จึงสามารถสกัดเอาแกมมาโอไรซานอลที่อยู่ในส่วนต่างๆของรำข้าวออกมาได้ดีกว่า นอกจากนี้ การเลือกตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสม พบว่า ควรเลือกไดนอร์มอลบิวทิลอีเทอร์ เนื่องจากให้ค่าปริมาณแกมมาโอไรซานอลในรำข้าวที่ใกล้เคียงกับที่หาได้ด้วยวิธี Classical method มีค่า K_d สูงและมีจุดเดือดสูง เนื่องจากปริมาตรของตัวทำละลายที่ระเหยง่ายอาจมีผลทำให้ค่า K_d ที่ได้จากการแทนค่าสมการทางคณิตศาสตร์คลาดเคลื่อนไป

ในปี ค.ศ. 2005 Chen และ Bergman [1] ได้ทำการพัฒนานิ่ววิเคราะห์อย่างรวดเร็วสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณ tocopherols, tocotrienols และ γ -oryzanol ด้วยการสกัดในสถานะสมดุลเพียง 1 ครั้ง ร่วมกับการวิเคราะห์สารด้วย RP-HPLC พบว่าสามารถวิเคราะห์สาร phytochemicals ได้แก่ tocopherols, tocotrienols และ γ -oryzanol ในรำข้าวด้วยการสกัดในสถานะสมดุล โดยใช้อัตราส่วนระหว่างรำข้าวต่อเมทานอล เท่ากับ 1:60 (น้ำหนัก/ปริมาตร) เวลา 1 นาที ซึ่งมี % recovery เท่ากับ 92 ถึง 102 % เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี direct solvent extraction พบว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายไอโซโพรพานอลและเมทานอลเหมาะสมกว่าเฮกเซน วิธีนี้มีข้อได้เปรียบกว่าวิธีอื่นๆ คือ รวดเร็ว ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือขั้นสูง และตัวทำละลายที่ใช้สกัดสามารถวิเคราะห์เชิงปริมาณร่วมกับวิธี RP-HPLC ได้

ในปี ค.ศ. 2005 Iqbal และคณะ [20] ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของรำข้าวสายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ Rice bran-Super kernel (RB-kr), Rice bran-Super 2000 (RB-s2), Rice bran-Super Basmati (RB-bm), Rice bran-Super-386 (RB-86) และ Rice bran-Super fine (RB-sf) ซึ่งทำการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญในรำข้าวดังนี้ คือ tocopherols, tocotrienols และ γ -oryzanol ด้วย RP-HPLC พบว่าปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในรำข้าวของสายพันธุ์ RB-kr > RB-s2 > RB-bm > RB-86 > RB-sf จากงานวิจัยนี้ยังพบว่า ค่าการต้านอนุมูลอิสระขึ้นกับ 2 ปัจจัยที่สำคัญ คือ ช่วงระยะเวลาการเจริญเติบโต และปริมาณน้ำที่ใช้ในการเพาะปลูก ซึ่งรำข้าวสายพันธุ์ RB-kr ที่มีค่าการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดนั้น พบว่ามีช่วงระยะเวลาการเจริญเติบโตนานที่สุด แต่มีความต้องการปริมาณน้ำน้อยที่สุด

ในปี ค.ศ. 2005 Tian และคณะ [21] ได้พัฒนานิ่วการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกในรำข้าว โดยนำตัวอย่างข้าวมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล เข้มข้น 70% และทำการแยกสารประกอบฟีนอลิกเหล่านี้ด้วย HPLC คอลัมน์ C18 reversed-phase และวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่ใช้เป็น 0.025% trifluoroacetic acid (A) – acetonitrile (B) (0 นาที, 5% B; 5 นาที, 9% B; 15 นาที, 9% B; 22 นาที, 11% B; 38 นาที, 18% B) โดยควบคุมอัตราการไหล

ของวัฏภาคเคลื่อนที่เท่ากับ 0.8 ml/min นอกจากนี้ยังทำการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกในข้าวกล้องและข้าวกล้องงอก (germinated brown rice) ที่แช่ในน้ำที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส ด้วยระยะเวลาต่างๆ

ในปี ค.ศ. 2004 Zhou และคณะ [10] ได้ศึกษาวิธีวิเคราะห์ปริมาณกรดฟีนอลิกในข้าวพบว่า ข้าวกล้องมีปริมาณกรดเฟอรูลิก เท่ากับ 255-362 mg/kg grain และ *p-coumaric acid* เท่ากับ 70-152 mg/kg grain ในขณะที่ข้าวที่ผ่านการโม่แล้วมีปริมาณกรดฟีนอลต่ำกว่า (61-81 mg/kg grain) และพบว่าอายุการเก็บมีผลต่อการลดลงของปริมาณกรดฟีนอลิกทั้งในข้าวกล้องและข้าวสาร นอกจากนี้พบว่าการเก็บข้าวไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จะมีผลต่อการลดลงของปริมาณกรดฟีนอลิกมากกว่าการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสด้วย

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. วัตถุดิบและสารเคมี

- ข้าวพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ SP XBT 60-12, SP XBT 43-7, SP XBT 52-18, SP XBT 56-39, KD XBT 313-19-1-1, ข้าวเจ้าหอมนิล เบอร์ 3 , ดอกดำ 5647, ดอกดำ 5645, หอมสุพรรณ จากศูนย์ความเป็นเลิศทางการปรับปรุงพันธุ์ข้าวแนวอณูวิธีและพัฒนาผลิตภัณฑ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (วิทยาเขตกำแพงแสน) และ กข.6 จากจังหวัดอุบลราชธานี
- สารมาตรฐาน ได้แก่ แกมมาโอไรซานอล (98%) จากบริษัท Suno ประเทศญี่ปุ่น และเฟอรูลิก
- ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้เป็น analytical grade

2. อุปกรณ์

- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometers) ; DR-4000 ของบริษัท เอ็นวายชายน จำกัด
- เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) : HPLC pump รุ่น Waters 510 เครื่องตรวจวัดชนิด UV Spectrophotometer รุ่น Waters 2487 (ทั้งหมดจากบริษัท Waters ประเทศสหรัฐอเมริกา) ประมวลผลด้วย Clarity software (บริษัท Data Apex ประเทศสาธารณรัฐเช็ก)
- คอลัมน์ ชนิด C18 μ Bonapak 125 °A 10 μ m 3.9x300 mm (บริษัท Waters ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- Soxtec system HT 1043
- เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น Ab204 ของบริษัท Mettler Toledo ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
- ตู้อบความร้อน
- เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง รุ่น model 4040 Series (4000 series) ของบริษัท Centurion scientific LTD จาก West Sussex UK
- เครื่องปั่นผสม (Vortex Mixer) ; Lab – line Instruments ประเทศสหรัฐอเมริกา
- โถดูดความชื้น (Desiccator)
- ถ้วยหาความชื้น (Moisture can)
- เครื่องแก้วต่างๆ เช่น ปีกเกอร์ ขวดวัดปริมาตร หลอดทดลองฝาเกลียว ปิเปต (Pipete)

3. วิธีทำการทดลอง

3.1 การหาปริมาณความชื้น

หาปริมาณความชื้นตามวิธี AOAC

3.2 การหาปริมาณไขมันทั้งหมดและแกมมาโอโรซานอลในรำข้าวด้วยวิธีดั้งเดิม (classical method)

3.2.1 หาปริมาณไขมันทั้งหมดและแกมมาโอโรซานอลในรำข้าวด้วยวิธี Soxhlet extraction โดยใช้รำข้าว 1 กรัม ใส่ใน thimble และสกัดไขมันด้วยเฮกเซน ทำการวิเคราะห์หาปริมาณไขมันทั้งหมดโดยการนำน้ำมันหรือไขมันที่สกัดได้ด้วยเฮกเซนมาระเหยตัวทำละลายออกจนแห้ง จากนั้นนำมาเจือจางด้วยเฮกเซนให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 315 นาโนเมตร และคำนวณหาปริมาณของแกมมาโอโรซานอลต่อน้ำหนักแห้งของน้ำมันได้โดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

3.2.2 หาปริมาณไขมันทั้งหมดและแกมมาโอโรซานอลในรำข้าวด้วยเครื่อง Soxtec extraction apparatus โดยใช้รำข้าว 1 กรัม ใส่ใน thimble จากนั้นนำตัวอย่างใส่ในชุดสกัดไขมัน Soxtec System HT 1043 และทำการระเหยตัวทำละลายออกจนหมด ก็จะสามารถคำนวณหาปริมาณไขมันทั้งหมดในตัวอย่างได้ จากนั้นนำมาเจือจางด้วยเฮกเซนให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 315 นาโนเมตร และคำนวณหาปริมาณของแกมมาโอโรซานอลต่อน้ำหนักแห้งของน้ำมันได้โดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

3.3 การหาปริมาณสารด้วยการสกัดเพียงบางส่วนและใช้ค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับของสาร (adsorption coefficient; K_d) เข้าช่วย

Solid-liquid extraction เป็นเทคนิคการสกัดสารออกจากของแข็งโดยใช้ตัวสกัดเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่สามารถละลายสารที่สนใจให้แยกออกจากของแข็ง โดยค่าอัตราส่วนของความเข้มข้นของสารที่กระจายอยู่ในของแข็งและตัวทำละลายอินทรีย์แต่ละชนิดจะเป็นค่าคงที่ ที่อุณหภูมิหนึ่ง เรียกว่า ค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับ (adsorption coefficient; K_d) ในสภาวะสมดุล เขียนได้ ดังนี้

$$K_d = \frac{C_m}{A_s} \quad (1)$$

$$\text{หรือ} \quad K_d = \left(\frac{M_m}{V_m} \right) \bigg/ \left(\frac{M_s}{g_s} \right) \quad (2)$$

K_d = สัมประสิทธิ์การดูดซับ (adsorption coefficient)

C_m = ความเข้มข้นของสารในชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์

A_s	=	ปริมาณของสารที่กระจายอยู่ในชั้นของของแข็งต่อหน่วยน้ำหนัก
M_m	=	ปริมาณของตัวถูกละลายในชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์
M_s	=	ปริมาณของตัวถูกละลายในชั้นของของแข็ง
V_m	=	ปริมาตรของตัวทำละลายอินทรีย์
g_s	=	น้ำหนักของของแข็ง

การทราบค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับ จะทำให้นำมาใช้ในการทำนายปริมาณสารที่จะสกัดได้ในแต่ละครั้ง การศึกษาหาค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับทำได้โดยการศึกษาหาความเข้มข้นของตัวถูกละลายในชั้นของสารละลายอินทรีย์และในชั้นของของแข็ง แต่กรณีนี้ศึกษาขึ้นนั้นไม่ทราบค่าความเข้มข้นของตัวถูกละลายและค่า K_d ดังนั้น จึงได้นำวิธีการแก้สมการทางคณิตศาสตร์มาประยุกต์ใช้ในลักษณะต่าง ๆ

การวิเคราะห์ปริมาณและการหาค่า K_d ตามทฤษฎีที่กล่าวมาข้างต้นทำโดยสกัดสารตัวอย่าง 2 ชุดด้วยปริมาณเท่ากัน โดยให้ปริมาตรของตัวทำละลายในชุดที่ 2 เป็น 2 เท่าของตัวทำละลายในชุดที่ 1 และทำการสกัดอย่างละ 1 ครั้ง

กำหนดให้

y	ปริมาณสารทั้งหมดในตัวอย่าง
x_1	ปริมาณตัวถูกละลายในวัฏภาคของตัวทำละลายที่สกัดได้ในชุดที่ 1
x_2	ปริมาณตัวถูกละลายในวัฏภาคของตัวทำละลายที่สกัดได้จากการใช้ปริมาตรของตัวทำละลายเป็น 2 เท่าในการสกัดชุดที่ 2

จากสมการที่ (2) การสกัดในชุดที่ 1

$$K_1 = \left(\frac{x_1}{V_1} \right) \left(\frac{w}{y - x_1} \right) \quad (3)$$

การสกัดในชุดที่ 2

$$K_2 = \left(\frac{x_2}{V_2} \right) \left(\frac{w}{y - x_2} \right) \quad (4)$$

แต่ $K_1 = K_2$ และ $V_2 = 2V_1$

$$\left(\frac{x_1}{V_1(y - x_1)} \right) = \left(\frac{x_2}{V_2(y - x_2)} \right) \quad (5)$$

จะได้

$$y = \frac{x_1 x_2}{2x_1 - x_2} \quad (6)$$

ดังนั้นจะสามารถหาปริมาณสารทั้งหมดในตัวอย่าง (y) จากสมการ (6) ได้ และเมื่อแทนค่า y ลงในสมการ (3) หรือ (4) จะได้ค่า K_d

3.3.1 การหาปริมาณไขมันทั้งหมดและแกมมาโอโรซานอลในรำข้าวด้วยวิธีการสกัดเพียงบางส่วนโดยตรวจวัดด้วยเครื่อง UV-Spectrophotometer

โดยชั่งรำข้าว 1.0 กรัม ใส่ในหลอดทดลองฝาเกลียว 2 หลอด โดยในหลอดที่ 1 เติมตัวทำละลายลงไป 5 มล. ส่วนหลอดที่ 2 เติมตัวทำละลายลงไป 10 มล. ปิดฝาเขย่าอย่างแรงโดยใช้เครื่อง vortex เป็นเวลา 1 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อตกตะกอนสารแขวนลอยต่างๆ แล้วนำสารละลายใส่ไปวิเคราะห์หาปริมาณไขมันทั้งหมดและแกมมาโอโรซานอล โดยนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดโดยใช้ตัวทำละลายเป็น blank และวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UV-Spectrophotometer ตัวทำละลายที่ใช้ได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท ไดไอโซโพรพิลอีเทอร์ เอทานอล ไอโซโพรพานอล และบิวทานอล แล้วทำการวิเคราะห์หาปริมาณไขมันทั้งหมดและแกมมาโอโรซานอลโดยใช้การเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำมันรำข้าวและสารมาตรฐานแกมมาโอโรซานอล (ตามลำดับ) ที่ละลายในตัวทำละลายต่างๆ

3.3.2 การหาปริมาณแกมมาโอโรซานอลและกรดเฟอรูลิกในรำข้าวด้วยวิธีการสกัดเพียงบางส่วนร่วมกับเทคนิค RP-HPLC

ก) การวิเคราะห์เอกลักษณ์และปริมาณแกมมาโอโรซานอลและกรดเฟอรูลิกด้วย RP-HPLC

เตรียมสารมาตรฐานแกมมาโอโรซานอลและกรดเฟอรูลิกที่ความเข้มข้น 1-30 $\mu\text{g/ml}$ ละลายในตัวทำละลายชนิดเดียวกับที่ใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ เพื่อใช้สำหรับวิเคราะห์เอกลักษณ์ โดยการใช้ค่าเวลาคงค้าง (retention time; t_R) ของสารมาตรฐานแต่ละชนิดในระบบวัฏภาคเคลื่อนที่ซึ่งประกอบด้วยตัวทำละลายชนิด methanol (M) isopropanol (I) และ acetic acid (A) ที่มีอัตราส่วนต่างๆ โดยควบคุมอัตราการไหลให้เท่ากันที่ 1 ml/min ตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัดชนิด UV detector ที่ความยาวคลื่น 320 nm สำหรับวิเคราะห์แกมมาโอโรซานอล และที่ความยาวคลื่น 295 nm สำหรับวิเคราะห์กรดเฟอรูลิก ส่วนการวิเคราะห์หาปริมาณแกมมาโอโรซานอลและกรดเฟอรูลิกทำได้โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานแกมมาโอโรซานอลและกรดเฟอรูลิก (ตามลำดับ) ที่ละลายในตัวทำละลายต่างๆ ที่ใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่

ข) การวิเคราะห์เอกลักษณ์และปริมาณแกมมาโอโรซานอลและกรดเฟอรูลิกจากตัวอย่างรำข้าวด้วย RP-HPLC

โดยชั่งตัวอย่างต่างๆ ประมาณ 1.0 กรัม ใส่ในหลอดทดลองฝาเกลียว 2 หลอด โดยในหลอดที่ 1 เติมตัวทำละลายลงไป 5 มล. ส่วนหลอดที่ 2 เติมตัวทำละลายลงไป 10 มล. ปิดฝาเขย่าอย่างแรงโดยใช้เครื่อง Vortex เป็นเวลา 1 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่

30 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อตกตะกอนสารแขวนลอยต่างๆ หลังจากนั้นจึงกรองผ่านกระดาษกรอง นำส่วนสารละลายใสที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วย HPLC ซึ่งมีระบบวิทยาศาสตร์เคลื่อนที่เดียวกับข้อ ก)

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

1. การวิเคราะห์ปริมาณไขมันทั้งหมดและแกมมาโอโรซานอลด้วยวิธีการสกัดเพียงบางส่วนโดยตรวจวัดด้วยเครื่อง UV-Spectrophotometer

1.1 ศึกษาความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์สารด้วยการสกัดเพียงบางส่วน

ในการหาปริมาณไขมันทั้งหมดและแกมมาโอโรซานอลในรำข้าวนั้น โดยทั่วไปเริ่มจากการสกัดน้ำมันออกมาจากรำข้าวให้หมดเสียก่อน ก็จะได้เป็นค่าปริมาณไขมันทั้งหมด จากนั้นนำมาทำการวัดหาปริมาณแกมมาโอโรซานอลที่มีอยู่ในน้ำมันที่สกัดได้อีกที ทำให้เสียเวลาในการวิเคราะห์ เนื่องจากในขั้นตอนสกัดน้ำมันออกจากรำข้าวเพื่อให้มั่นใจว่าสามารถสกัดน้ำมันออกมาได้หมดจำเป็นต้องใช้ตัวทำละลายปริมาณมากและใช้เวลาในการสกัดนาน ดังนั้นการใช้หลักการ solid-liquid extraction จึงน่าจะเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว และประหยัดกว่าวิธีดั้งเดิม โดยทำการสกัดสารตัวอย่าง 2 ชุดด้วยปริมาณเท่ากัน และให้ปริมาตรของตัวทำละลายอินทรีย์ในชุดที่ 2 เป็น 2 เท่าของตัวทำละลายในชุดที่ 1 และทำการสกัดอย่างละ 1 ครั้ง ร่วมกับการแก้สมการทางคณิตศาสตร์ และคำนวณหาปริมาณสารที่มีอยู่ในรำข้าว โดยวิธีการวิเคราะห์ใหม่ที่เสนอนี้ เรียกว่า วิธีการสกัดเพียงบางส่วน

รำข้าวที่ใช้ในการทดลอง (กข.6) มีปริมาณความชื้นอยู่ร้อยละ 8.42 ± 0.05 ซึ่งในการวิเคราะห์ปริมาณไขมันทั้งหมดและแกมมาโอโรซานอลในรำข้าวด้วยวิธีการสกัดเพียงบางส่วน โดยใช้เครื่องตรวจวัดแบบ UV Spectrophotometer นั้น เลือกใช้ตัวทำละลายเฮกเซน ทั้งนี้เนื่องจากเฮกเซนเป็นตัวทำละลายที่มีค่า UV cut-off น้อยกว่าความยาวคลื่น (wavelength) ที่เลือกใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่าง กล่าวคือ เฮกเซนมีค่า UV cut-off อยู่ในช่วง 190-195 nm ในขณะที่การวิเคราะห์ปริมาณไขมันทั้งหมดและแกมมาโอโรซานอลด้วย UV spectrophotometer ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 210 และ 314 nm ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า งานวิจัยต่างๆ ที่ผ่านมานิยมใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลายในการสกัดไขมันจากรำข้าว [22-26] สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณไขมันทั้งหมดและแกมมาโอโรซานอลในรำข้าวทำได้โดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำมันรำข้าวและแกมมาโอโรซานอลด้วยตัวทำละลายเฮกเซนที่ความเข้มข้น 40-280 และ 3-20 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ซึ่งกราฟมาตรฐานระหว่าง ABS กับความเข้มข้นของสารละลายทั้งสองนี้แสดงความสัมพันธ์อย่างเป็นเส้นตรง (ค่า regression coefficient มากกว่า 0.999)

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณไขมันทั้งหมดและแกมมาโอโรซานอลในรำข้าว (กข.6) โดยวิธีดั้งเดิมและวิธีการสกัดเพียงบางส่วนด้วยตัวทำละลายเฮกเซน

วิธีการสกัด	ไขมัน (total lipids) % (dry weight basis)	แกมมาโอโรซานอล (mg/g)
1.วิธีดั้งเดิม (Classical Method)		
▪ Soxhlet extraction	21.25 ± 0.38	3.67 ± 0.07
▪ Soxtec apparatus	20.76 ± 0.51	-
2.วิธีการสกัดเพียงบางส่วน (เฮกเซน)	20.72 ± 0.87	3.43 ± 0.14

ข้อมูลที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากการทำ 3 ซ้ำ ± SD (n=3)

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณไขมันทั้งหมดและแกมมาโอโรซานอลด้วยวิธีดั้งเดิม (classical method) และวิธีการสกัดเพียงบางส่วน (partial extraction) ซึ่งแสดงไว้ในตารางที่ 1 พบว่า การวิเคราะห์ปริมาณไขมันทั้งหมดในรำข้าวโดยวิธีการสกัดเพียงบางส่วนด้วยตัวทำละลายเฮกเซนมีร้อยละ 20.72 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการหาปริมาณไขมันทั้งหมดโดยใช้ Soxhlet extraction (ร้อยละ 21.25) และวิธี Soxtec apparatus (ร้อยละ 20.76) และการวิเคราะห์ปริมาณแกมมาโอโรซานอลในรำข้าวโดยวิธีการสกัดเพียงบางส่วนด้วยตัวทำละลายเฮกเซนมีค่าเท่ากับ 3.43 มิลลิกรัม/รำข้าว 1 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการหาปริมาณแกมมาโอโรซานอลโดยใช้ Soxhlet extraction (3.67 มิลลิกรัม/รำข้าว 1 กรัม) เช่นเดียวกัน ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าการวิเคราะห์หาปริมาณสารด้วยวิธีการสกัดสารเพียงบางส่วนร่วมกับการแก๊สโครมาโทกราฟีเป็นวิธีที่มีความถูกต้อง สะดวกและรวดเร็ว โดยวิธีใหม่นี้มีข้อดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีดั้งเดิม คือ สามารถลดปริมาตรของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด (ใช้เพียง 10-15 มิลลิลิตร) ลดปริมาณตัวอย่างที่ต้องใช้ในการวิเคราะห์ (ประมาณ 1 กรัมหรือน้อยกว่า) และช่วยลดเวลาในการวิเคราะห์ (น้อยกว่า 15 นาที) จากหลักการการวิเคราะห์หาปริมาณสารด้วยวิธีใหม่นี้จะสามารถขยายผลนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารในตัวอย่างอาหารอื่นๆ ต่อไปได้ด้วย

1.2 ศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณไขมันทั้งหมดและแกมมาโอโรซานอลด้วยวิธีการสกัดเพียงบางส่วนในรำข้าวสายพันธุ์ต่าง ๆ

ในงานวิจัยนี้ได้ขยายผลการวิเคราะห์หาปริมาณไขมันทั้งหมดและแกมมาโอโรซานอลโดยวิธีการสกัดเพียงบางส่วนด้วยตัวทำละลายเฮกเซนในรำข้าวสายพันธุ์ต่าง ๆ จำนวน 9 สายพันธุ์ ดังแสดงผลการทดลองไว้ในตารางที่ 2

ตัวอย่างรำข้าวสายพันธุ์ต่าง ๆ มีปริมาณความชื้นอยู่ในช่วงร้อยละ 8-11 ปริมาณไขมันทั้งหมดอยู่ในช่วงร้อยละ 18.16-21.18 โดยน้ำหนักแห้ง ซึ่งปริมาณไขมันทั้งหมดที่วิเคราะห์ได้

สอดคล้องกับการวิเคราะห์หาปริมาณสารด้วยวิธีดั้งเดิมจากการศึกษาของ Tanaka และคณะ, 1973 (ประมาณ 18 - 22%) [26] Amissah และคณะ, 2003 (13.3 - 19.8%) [27] และ Chokmoh และคณะ, 2005 (18.89%) [19] นอกจากนี้ พบว่ารำข้าวสายพันธุ์ดอคำ 5647 มีปริมาณไขมันทั้งหมดสูงสุด (21.18%) ในขณะที่รำข้าวสายพันธุ์ KD XBT 313-19-1-1 มีปริมาณไขมันทั้งหมดต่ำสุด (18.16%) ซึ่งปริมาณไขมันทั้งหมดในรำข้าวที่แตกต่างกันนั้นน่าจะมาจากความแตกต่างกันของสายพันธุ์รำข้าว สำหรับปริมาณแกมมาโอไรซานอลอยู่ในช่วง 1.95-3.07 มิลลิกรัม/รำข้าว 1 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ซึ่งมีปริมาณแกมมาโอไรซานอลต่ำกว่างานวิจัยที่ผ่านมา เช่น จากการศึกษานี้ของ Chen & Berman, 2005 [1] พบว่าสายพันธุ์ CPRS และ BNGL มีแกมมาโอไรซานอลเท่ากับ 3.4-3.9 และ 3.8-4.2 มิลลิกรัม/รำข้าว 1 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ และจากการศึกษาของ Lloyd, Siebenmorgen, & Beers, 2000 [28] พบว่าสายพันธุ์ US long grain และ Bengal มีแกมมาโอไรซานอลเท่ากับ 4.74 และ 4.0 มิลลิกรัม/รำข้าว 1 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากความแตกต่างของสายพันธุ์ ช่วงอายุการเจริญเติบโต กระบวนการที่ใช้ในการสีข้าว เป็นต้น [20, 29-30] อย่างไรก็ตามพบว่ารำข้าวสายพันธุ์ต่างๆ มีปริมาณแกมมาโอไรซานอลที่น่าจะสามารถนำไปใช้เป็นสารเสริมในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อเป็น Nutraceuticals หรือ Functional foods ได้

ตารางที่ 2 ปริมาณไขมันทั้งหมดและแกมมาโอไรซานอลในรำข้าวสายพันธุ์ต่างโดยวิธีการสกัดเพียงบางส่วนด้วยตัวทำละลายเฮกเซน

ตัวอย่าง	ปริมาณความชื้น (% w/w)	ปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้	
		ไขมันทั้งหมด (%)	แกมมาโอไรซานอล (mg/g)
1. SP XBT 60-12	10.16	19.54	2.03
2. SP XBT 43-7	10.31	20.09	1.95
3. SP XBT 52-18	9.67	19.62	1.97
4. SP XBT 56-39	8.93	19.72	2.04
5. ข้าวเจ้าหอมนิล	8.31	19.89	2.66
6. ดอคำ 5647	8.49	21.18	3.07
7. ดอคำ 5645	8.39	18.78	2.35
8. KD XBT 313-19-1-1	9.62	18.16	2.62
9. หอมสุพรรณ	9.88	19.05	2.12

1.3 ศึกษาหาค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับของไขมันทั้งหมดและแกมมาโอโรซานอลในรำข้าวสาลีพันธุ์ต่าง ๆ

ตารางที่ 3 ค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับ (K_d) และร้อยละของการสกัดได้ ของไขมันและแกมมาโอโรซานอลในรำข้าวสาลีพันธุ์ต่าง ๆ โดยวิธีการสกัดเพียงบางส่วนด้วยตัวทำละลายเฮกเซน

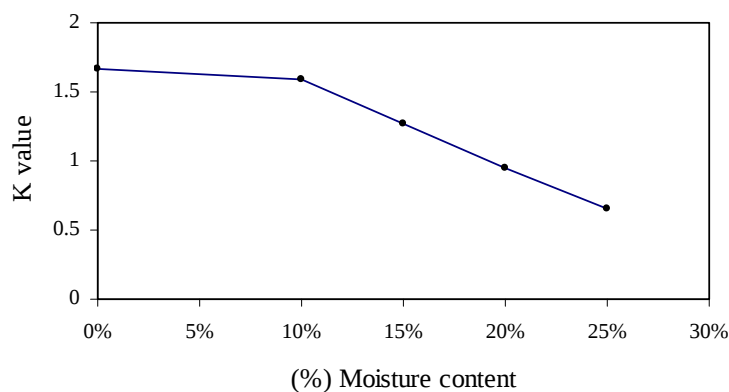
ตัวอย่าง	ไขมัน		แกมมาโอโรซานอล	
	K_d	% Extraction	K_d	% Extraction
1. SP XBT 60-12	1.58	94	2.32	96
2. SP XBT 43-7	1.65	94	2.40	96
3. SP XBT 52-18	1.49	94	2.22	96
4. SP XBT 56-39	1.51	94	2.29	96
5. ข้าวเจ้าหอมนิล	1.81	95	2.45	96
6. ดอกดำ 5647	1.29	93	2.14	96
7. ดอกดำ 5645	1.16	92	2.02	95
8. KD XBT 313-19-1-1	1.89	95	2.48	96
9. หอมสุพรรณ	2.00	95	2.65	96

* ร้อยละของการสกัดได้คำนวณจากค่า K_d โดยใช้สมการที่ 2

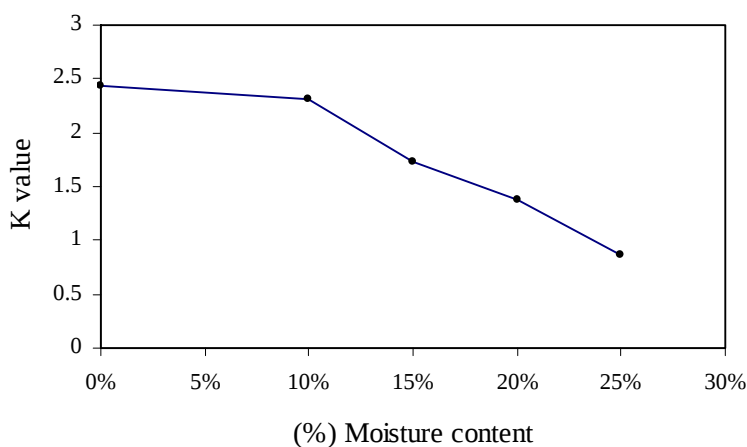
ในงานวิจัยนี้นอกจากจะได้วิธีการวิเคราะห์ใหม่ที่เกิดขึ้นแล้วนั้น ยังพบว่าวิธีการนี้สามารถนำมาประยุกต์หาค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับ (K_d) ของสารต่าง ๆ ได้ด้วย ซึ่งโดยทั่วไปค่า K_d ของสารจะเป็นค่าคงที่ แต่จะไม่ทราบค่า ในงานวิจัยนี้พบว่าสามารถใช้วิธีการสกัดเพียงบางส่วนร่วมกับการแก้สมการทางคณิตศาสตร์ช่วยคำนวณหาค่า K_d ตามรายละเอียดที่อธิบายไว้ในวิธีทำการทดลอง ดังแสดงผลการทดลองไว้ในตารางที่ 3 พบว่าค่า K_d ของไขมันและแกมมาโอโรซานอลในตัวอย่างรำข้าวจำนวน 9 สายพันธุ์ โดยการสกัดเพียงบางส่วนด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีค่าแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งค่า K_d ของไขมัน อยู่ระหว่าง 1.16-2.00 โดยรำข้าวสายพันธุ์ดอกดำ 5645 มีค่าต่ำที่สุด คือ 1.16 และรำข้าวหอมสุพรรณ มีค่าสูงที่สุด คือ 2.00 ส่วนค่า K_d ของแกมมาโอโรซานอล มีค่าอยู่ระหว่าง 2.02-2.65 โดยรำข้าวสายพันธุ์ดอกดำ 5645 มีค่าต่ำที่สุด คือ 2.02 และรำข้าวสายพันธุ์ KD XBT 313-19-1-1 มีค่าสูงที่สุด คือ 2.65 ความแตกต่างของค่า K_d ของไขมันและแกมมาโอโรซานอลในตัวอย่างรำข้าวสายพันธุ์ต่าง ๆ น่าจะมาจากปริมาณความชื้นในรำข้าวที่แตกต่างกัน ทั้งนี้เนื่องจากเฮกเซนเป็นตัวทำละลายชนิดไม่มีขั้ว เมื่อนำไปใช้สกัดตัวอย่างรำข้าวที่มีความชื้นปนอยู่ทำให้ความสามารถในการเข้าไปสกัดสารลดลง เนื่องจากน้ำหรือความชื้นในรำข้าวจะไปกีดขวางการเข้าไปสัมผัสของตัวทำละลายกับสารที่ต้องการสกัดทำให้ไม่สามารถนำพาสารออกมา

ได้ดี ซึ่งจากผลการทดลอง พบว่าเมื่อตัวอย่างรำข้าวมีปริมาณความชื้นเพิ่มขึ้นค่า K_d ของทั้งไขมันและแกมมาโอโรซานอลในรำข้าว ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จะมีค่าลดลง ดังแสดงในรูปที่ 1

(a)



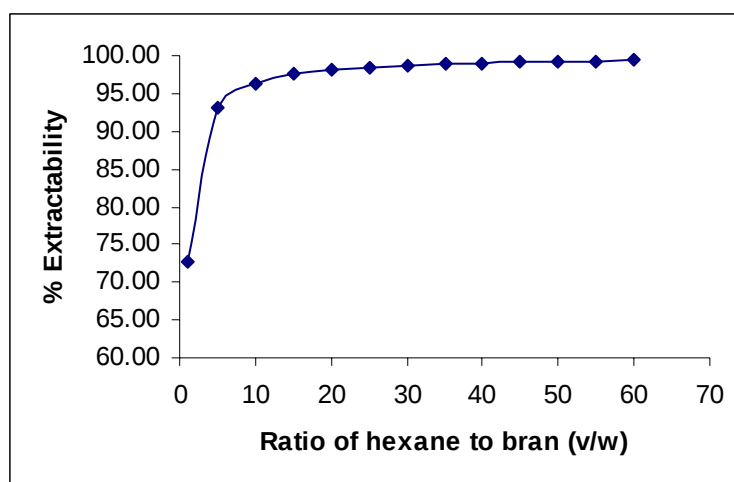
(b)



รูปที่ 1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า K_d ของไขมัน (a) และแกมมาโอโรซานอล (b) กับปริมาณความชื้นในตัวอย่างรำข้าวสายพันธุ์ กข.6 โดยวิธีการสกัดเพียงบางส่วนด้วยเฮกเซน

ดังนั้นถ้าทราบค่า K_d ของสารตัวอย่าง ที่สภาวะอุณหภูมิและความชื้นที่กำหนด ก็จะสามารถทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารได้ด้วยวิธีการสกัดเพียงบางส่วนโดยทำการสกัดสารตัวอย่างเพียงชุดเดียวได้ ซึ่งจะช่วยให้การวิเคราะห์ตัวอย่างทำได้ง่าย สะดวกและรวดเร็วยิ่งขึ้น

นอกจากนี้ยังพบว่า ค่า K_d จากใช้สมการที่ 2 สามารถนำมาใช้คำนวณหาค่าร้อยละของการสกัดได้ ดังตัวอย่างเช่น จากค่า K_d ของไขมันในตารางที่ 3 สมมติให้ปริมาตรของตัวทำละลายเฮกเซนที่ใช้ในการสกัด เท่ากับ 10 มิลลิลิตร สกัดตัวอย่างรำข้าว น้ำหนัก 1 กรัม จะสามารถสกัดไขมันทั้งหมดในรำข้าวสายพันธุ์ต่าง ๆ อยู่ในช่วงร้อยละ 92-95 ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Proctor และคณะ, 1994 [22] ที่สามารถสกัดไขมันทั้งหมดในรำข้าวได้เท่ากับร้อยละ 90 และจากการศึกษาของ Proctor และ Bowen, 1996 [31] สามารถสกัดไขมันทั้งหมดในรำข้าวได้ประมาณ ร้อยละ 89 ที่สภาวะอุณหภูมิห้อง (22 องศาเซลเซียส) และอัตราส่วนระหว่างเฮกเซนต่อรำข้าว (ปริมาตร/น้ำหนัก) เท่ากับ 10:1 หรืออาจกล่าวได้ว่าสามารถคำนวณหาปริมาตรของตัวทำละลายที่ต้องการใช้สกัดสารให้สมบูรณ์จากค่า K_d ได้ ดังแสดงผลการทดลองในรูปที่ 2 พบว่าหากต้องการสกัดแกมมาโอโรซานอลจากรำข้าวให้ได้มากกว่าร้อยละ 99 จะต้องใช้อัตราส่วนระหว่างเฮกเซนต่อรำข้าว (ปริมาตร/น้ำหนัก) มากกว่าหรือเท่ากับ 40:1 ซึ่งจากผลการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่าหากต้องการวิเคราะห์หาปริมาณแกมมาโอโรซานอลในรำข้าวสามารถทำการสกัดเพียงครั้งเดียวได้ โดยใช้ปริมาตรของตัวทำละลายเฮกเซนมากกว่า 40 มิลลิลิตรต่อตัวอย่างรำข้าว 1 กรัม



รูปที่ 2 แสดงร้อยละของการสกัดแกมมาโอโรซานอลในรำข้าวสายพันธุ์หอมสุพรรณ (ค่า K_d เท่ากับ 2.65) ที่อัตราส่วนระหว่างเฮกเซนต่อรำข้าว (ปริมาตร/น้ำหนัก) ต่างๆ

1.4 ศึกษาผลของตัวทำละลายต่อการวิเคราะห์ปริมาณแกมมาโอโรซานอลในรำข้าว

จากผลการทดลองในตารางที่ 1 พบว่าการวิเคราะห์ปริมาณแกมมาโอโรซานอลโดยวิธีสกัดเพียงบางส่วนด้วยตัวทำละลายเฮกเซนจะมีค่าต่ำกว่าวิธีดั้งเดิม ซึ่งค่าที่แตกต่างกันนี้น่าจะมาจากผลของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดและความถูกต้องของค่า K_d ที่คำนวณได้ ทั้งนี้เนื่องจากตัวทำละลายที่ระเหยง่ายอาจมีผลทำให้ปริมาตรที่วัดได้คลาดเคลื่อนไป และเมื่อนำไปคำนวณหาปริมาณโอโรซานอล โดยการแทนค่าลงในสมการทางคณิตศาสตร์แล้วจะทำให้ค่าที่คำนวณได้คลาดเคลื่อนไปด้วย ดังนั้นตัวทำละลายที่ระเหยได้ยากหรือปานกลางที่อุณหภูมิห้อง เช่น ไอโซโพรพานอล หรือ ไดโนรมัลบิวทิลอีเทอร์ น่าจะเป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารด้วยวิธีการสกัดเพียงบางส่วน นอกจากนี้ยังพบว่างานวิจัยที่ผ่านมาของ Lusas และคณะ, 1994 [32] ได้เสนอให้ใช้ตัวทำละลายไอโซโพรพานอลในการสกัดน้ำมันจากพืช ทั้งนี้เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาเรื่องการติดไฟไหม้เมื่อเปรียบเทียบกับตัวทำละลายเฮกเซน ดังนั้นในการทดลองนี้ได้ศึกษาหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณแกมมาโอโรซานอลในรำข้าว โดยตัวทำละลายที่ใช้ในการศึกษานี้ ได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท ไดไอโซโพรพิลอีเทอร์ ไดโนรมัลบิวทิลอีเทอร์ เอทานอล ไอโซโพรพานอลและบิวทานอล และในการทดลองนี้เป็นการวิเคราะห์ปริมาณแกมมาโอโรซานอลในรำข้าวโดยการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆ เพื่อให้การศึกษามีความถูกต้องและแม่นยำขึ้นจึงได้ทำการศึกษาถึงความยาวคลื่นที่ดูดกลืนแสงสูงสุดของสารมาตรฐานแกมมาโอโรซานอลในตัวทำละลายต่างๆ และความสัมพันธ์เชิงเส้นของกราฟสอบเทียบมาตรฐาน ดังแสดงผลไว้ในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 กราฟสอบเทียบมาตรฐานของแกมมาโอโรซานอลและความยาวคลื่นที่ดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{Max})

ตัวทำละลาย	กราฟสอบเทียบมาตรฐาน		λ_{Max} (nm)
	สมการเส้นตรง ^a	R^2	
เฮกเซน	$y = 36.372x$	0.9999	314
เอทิลอะซิเตท	$y = 35.850x$	0.9999	320
ไดไอโซโพรพิลอีเทอร์	$y = 36.819x$	0.9999	320
ไดโนรมัลบิวทิลอีเทอร์	$y = 32.268x$	0.9999	320
เอทานอล	$y = 33.273x$	0.9996	326
ไอโซโพรพานอล	$y = 33.281x$	0.9999	326
บิวทานอล	$y = 36.861x$	0.9994	326

^a y = ค่าการดูดกลืนแสง, x = ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

จากผลการทดลอง พบว่ากราฟสอบเทียบมาตรฐานแกมมาโอไรซานอลในตัวทำละลายต่าง ๆ มีความสัมพันธ์อย่างเป็นเส้นตรง ซึ่งมีค่า correlation coefficient (R^2) มากกว่า 0.999 โดยความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานแกมมาโอไรซานอลในตัวทำละลายต่าง ๆ อยู่ในช่วง 3-20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ในการศึกษาถึงผลของตัวทำละลายต่อการวิเคราะห์ปริมาณของแกมมาโอไรซานอลด้วยการสกัดเพียงบางส่วนจากการสกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับปริมาณแกมมาโอไรซานอลที่หาได้จากวิธีดั้งเดิม ได้ผลดังตารางที่ 5 พบว่าปริมาณของแกมมาโอไรซานอลที่วิเคราะห์ได้โดยวิธีการสกัดเพียงบางส่วนด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ ยกเว้น เอทานอลและไอโซโพรพานอล จะมีค่ามากกว่าเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณแกมมาโอไรซานอลที่หาได้จากวิธีดั้งเดิม เนื่องจากเมื่อพิจารณาสภาพความเป็นขั้วของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด สารทั้ง 2 มีสภาพความมีขั้วสูงทำให้สามารถละลายเป็นเนื้อเดียวกับน้ำได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว ดังนั้นน้ำหรือความชื้นจึงไม่ใช่อุปสรรคต่อการสกัดสารด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วสูง อีกทั้งเนื่องจากสภาพขั้วที่สูงกว่า จึงสามารถสกัดเอาโอไรซานอลที่อยู่ในส่วนของไขมันต่าง ๆ ในรำข้าวออกมาได้หมด ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Chen และ Bergman, 2005 [1] ที่พบว่าตัวทำละลายเมทานอลและไอโซโพรพานอลสามารถสกัด tocopherols, tocotrienols และ γ -oryzanol ในรำข้าวได้สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ตัวทำละลายเฮกเซนในการสกัด สารทั้ง 3 ชนิดจากรำข้าว ส่วนในกรณีของบิวทานอล แม้จะมีสภาพขั้วสูงแต่เนื่องจากบิวทานอลไม่ละลายน้ำจึงทำให้มีอุปสรรคในการที่ตัวทำละลายจะเข้าไปสัมผัสสารในเนื้อเยื่อเนื่องจากในตัวอย่างรำข้าวมีความชื้นอยู่นั่นเอง จากการทดลองนี้ควรเลือกใช้ไอโซโพรพานอลเป็นตัวทำละลายเนื่องจากให้ค่าปริมาณแกมมาโอไรซานอลในรำข้าวที่ใกล้เคียงจากที่หาด้วยวิธีดั้งเดิม

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบปริมาณแก๊สไอโรซานอลในรำข้าวสาลีพันธุ์ กข.6 ที่วิเคราะห์ได้จากวิธีดั้งเดิมกับวิธีการสกัดเพียงบางส่วนด้วยตัวทำละลายต่างๆ

วิธี/ตัวทำละลาย	ปริมาณแก๊สไอโรซานอล (มก./กรัมรำแห้ง)	K_d	จุดเดือดของตัวทำละลาย (°ซ)
1.วิธีดั้งเดิม (ปิโตรเลียมอีเทอร์)	3.67 ± 0.07	-	40-60
2.วิธีการสกัดเพียงบางส่วน			
เฮกเซน	3.43 ± 0.14	1.76	69
เอทิลอะซีเตท	3.45 ± 0.39	1.77	77
ไดไอโซโพรพิลอีเทอร์	3.48 ± 0.17	2.06	68-69
ไดนอมัลบิวทิลอีเทอร์	3.41 ± 0.35	1.87	142
เอทานอล	3.79 ± 0.45	2.28	78
ไอโซโพรพานอล	3.74 ± 0.30	1.83	82
บิวทานอล	3.29 ± 0.14	1.14	118

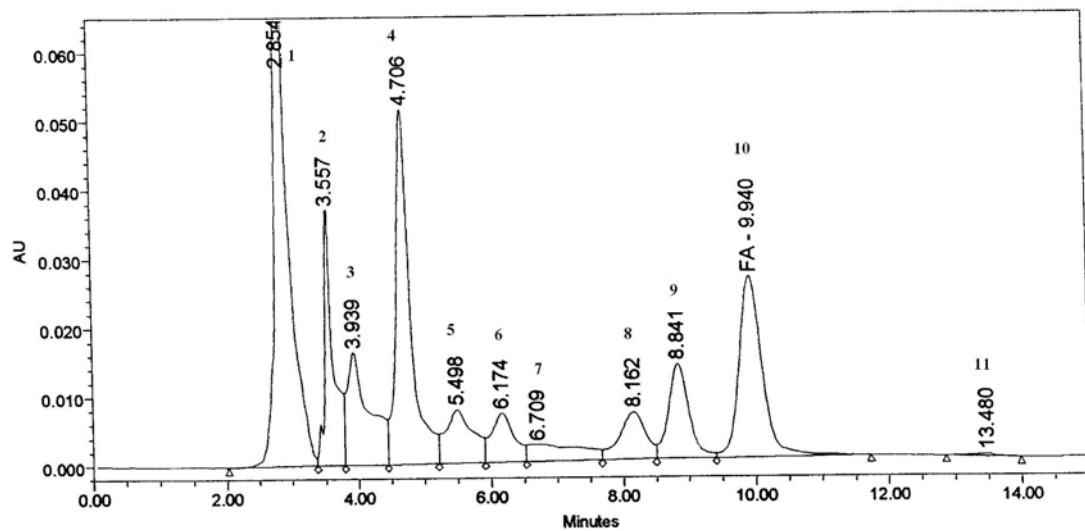
2 การวิเคราะห์ปริมาณแกมมาโอโรซานอลและกรดเฟอรูลิกในตัวอย่างรำข้าวด้วยวิธีการสกัดเพียงบางส่วนร่วมกับเทคนิค RP-HPLC

จากงานวิจัยที่ผ่านมา พบว่าในรำข้าวเป็นแหล่งของสารอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง คือ มีวิตามินและสารอาหารธรรมชาติที่สำคัญต่อร่างกายหลายชนิด เช่น โทโคฟีรอล โทโคไตรอีนอล และแกมมาโอโรซานอล โดยเฉพาะแกมมาโอโรซานอลจะพบในน้ำมันจากรำข้าวเท่านั้นไม่พบในน้ำมันพืชชนิดอื่น จึงได้รับความสนใจและมีการศึกษาถึงวิธีการวิเคราะห์เอกลักษณ์และปริมาณแกมมาโอโรซานอลในรำข้าวเป็นจำนวนมาก [1, 15, 17, 19-20] นอกจากสารเหล่านี้แล้ว ยังพบว่าในรำข้าวประกอบด้วยสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญอีกตัวหนึ่ง คือ กรดเฟอรูลิก [10,12] ซึ่งมีคุณสมบัติที่สามารถป้องกันโรคต่างๆ ได้มาก เช่น โรคหัวใจ โรคเบาหวาน และโรคมะเร็งเต้านม แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาถึงวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณกรดเฟอรูลิกในรำข้าวยังมีการศึกษาอยู่เพียงเล็กน้อยเท่านั้น และจากผลการทดลองตอนที่ 1 พบว่าการนำวิธีการสกัดสารเพียงบางส่วนมาช่วยวิเคราะห์หาปริมาณสารในรำข้าวซึ่งเป็นวิธีที่มีความถูกต้อง สะดวกและรวดเร็ว ดังนั้นงานวิจัยในส่วนต่อไปจึงสนใจที่จะขยายวิธีการวิเคราะห์สารด้วยการสกัดเพียงบางส่วนไปใช้ในการวิเคราะห์แกมมาโอโรซานอลและกรดเฟอรูลิกในรำข้าวไปพร้อมๆ กันด้วยวิธีการสกัดเพียงบางส่วนร่วมกับเทคนิค RP-HPLC ต่อไป

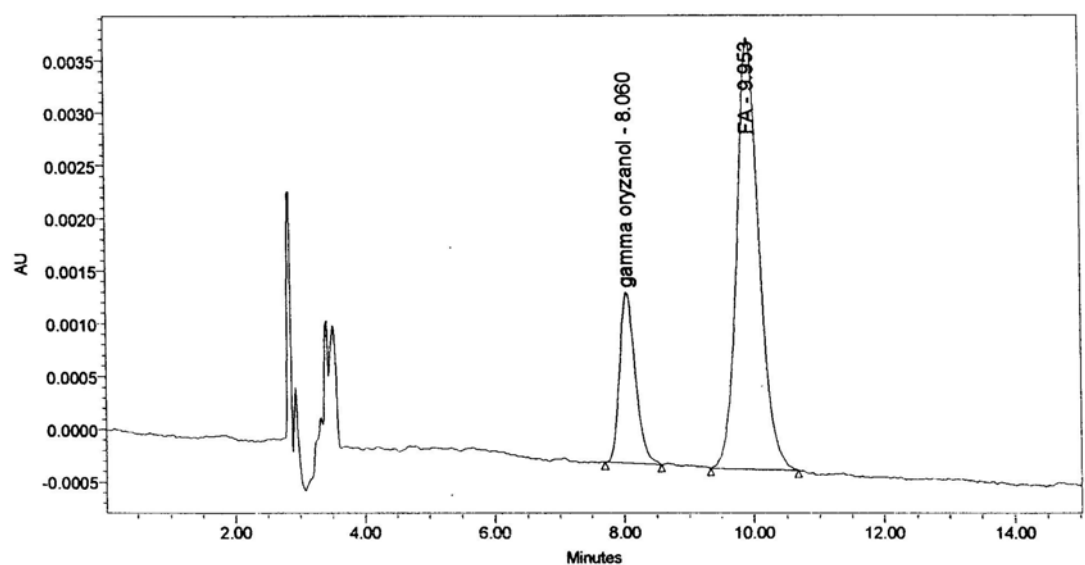
2.1 ศึกษาการวิเคราะห์เอกลักษณ์ของกรดเฟอรูลิก

เนื่องจากการวิเคราะห์กรดเฟอรูลิกในรำข้าวยังมีการศึกษาค่อนข้างน้อย ก่อนที่จะทำการศึกษาการวิเคราะห์แกมมาโอโรซานอลและกรดเฟอรูลิกในรำข้าวไปพร้อมๆ กันด้วยวิธีการสกัดเพียงบางส่วนร่วมกับเทคนิค RP-HPLC ได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์เอกลักษณ์กรดเฟอรูลิกในรำข้าวตามวิธีการของ Lu และคณะ, 2005 [33] โดยใช้ระบบวัฏภาคเคลื่อนที่ประกอบด้วยตัวทำละลาย acetic acid (เข้มข้น 1%):acetonitrile ที่อัตราส่วน 19:81 โดยปริมาตร ดังโครมาโทแกรมที่แสดงไว้ในรูปที่ 3 ด้วยวิธีการเทียบกับค่าเวลาคงค้าง (t_R) กับสารมาตรฐานกรดเฟอรูลิก

พบว่าพีคที่ 10 ในรูปที่ 3(ก) ซึ่งมีค่า t_R เท่ากับ 9.940 นาที มีค่าใกล้เคียงกับพีคที่ 2 ในรูปที่ 3 (ข) ซึ่งเป็นพีคของสารมาตรฐานของกรดเฟอรูลิกซึ่งมีค่า t_R เท่ากับ 9.953 นาที ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าพบแกมมาโอโรซานอลและกรดเฟอรูลิกเป็นองค์ประกอบของรำข้าว



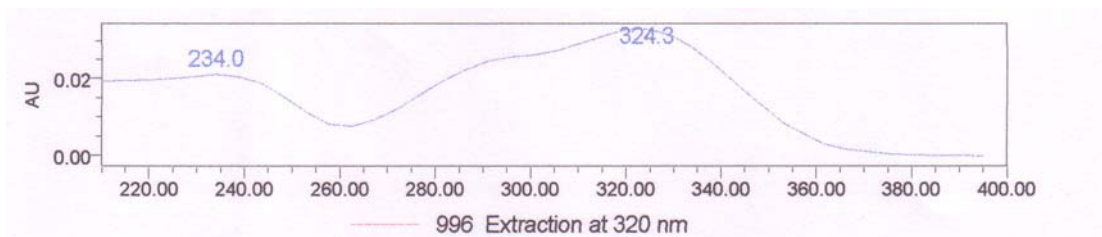
(ก)



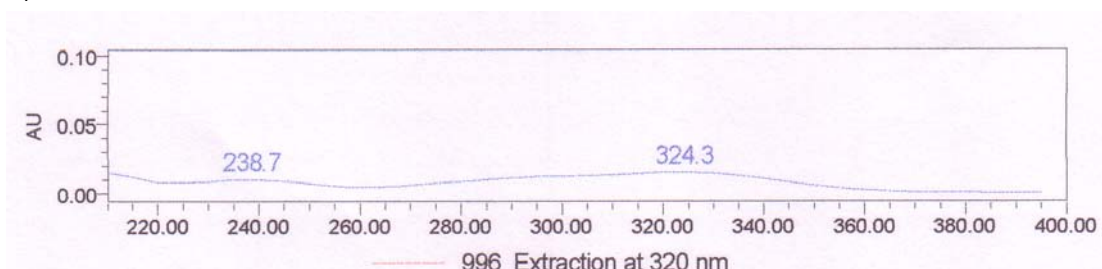
(ข)

รูปที่ 3 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานและสารตัวอย่างวิเคราะห์ด้วย RP-HPLC คอลัมน์ μ Bondapak C18 125 $^{\circ}$ A 10 μ m 3.9 x 300 mm ระบบวัฏภาคเคลื่อนที่ ประกอบด้วย acetic acid (เข้มข้น 1%):acetonitrile ที่อัตราส่วน 19:81 โดยปริมาตร และใช้อัตราการไหล 1 ml/min ตรวจวัดด้วยเครื่อง Photodiode Array Detector ที่ความยาวคลื่น 320 nm (ก) ตัวอย่างรำข้าว และ (ข) สารมาตรฐานกรดเฟอรูลิก

ก)



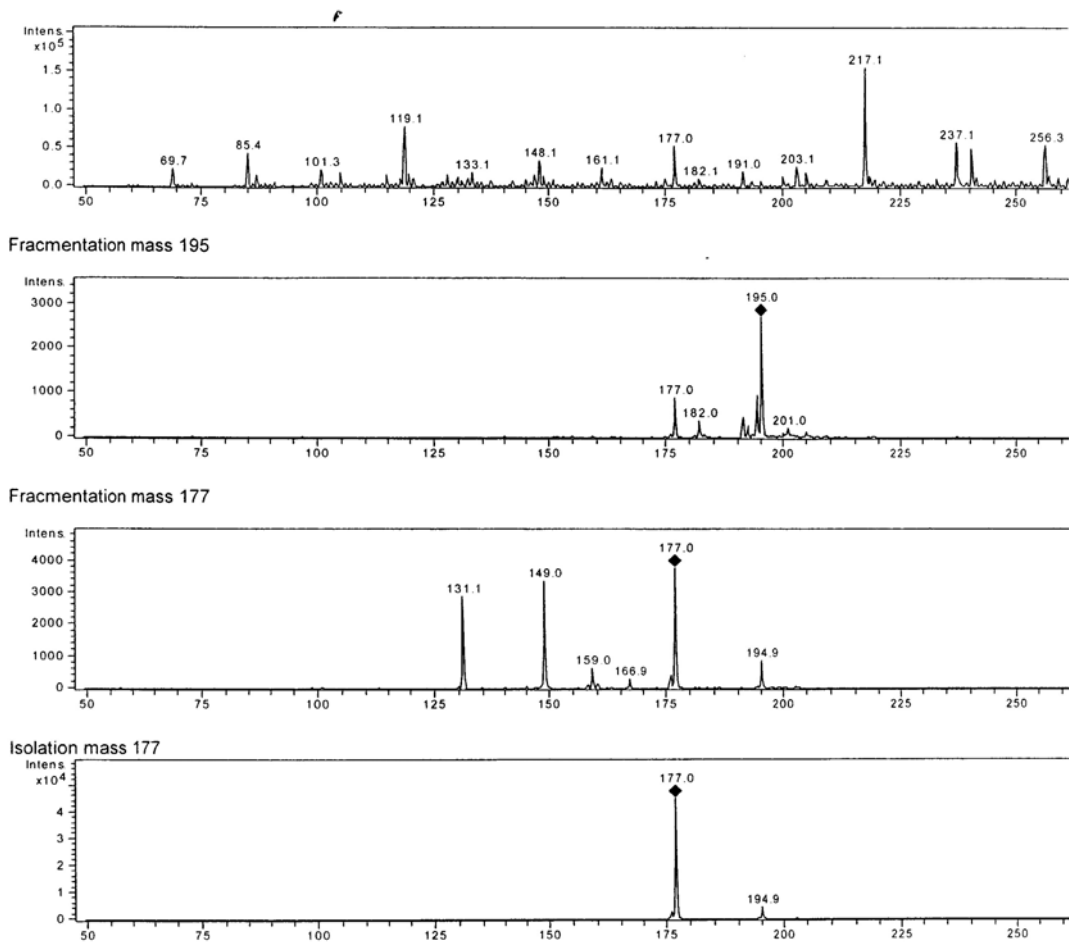
ข)



รูปที่ 4 สเปกตรัมการดูดกลืนรังสีอัลตราไวโอเลต (UV Spectra) ก) สารมาตรฐานกรดเฟอรูลิก
ข) ตัวอย่างรำข้าวจากโครมาโทแกรมรูปที่ 3 (พีคที่ 10)

วัดการดูดกลืนรังสีอัลตราไวโอเลตของตัวอย่างรำข้าว จากโครมาโทแกรมรูปที่ 3 (พีคที่ 10) พบว่ามีการดูดกลืนที่ 238.7 และ 324.3 นาโนเมตร ดังรูปที่ 4 (ข) ซึ่งมีสเปกตรัมที่คล้ายคลึงกับสารมาตรฐานกรดเฟอรูลิกในรูปที่ 4 (ก)

และทำการพิสูจน์การวิเคราะห์กรดเฟอรูลิกด้วยแมสสเปกโตรมิเตอร์ที่ต่อควบเข้ากับ RP-HPLC (RP-HPLC-MS) ดังแสดงในรูปที่ 5



รูปที่ 5 แมสสเปกตรัมของตัวอย่างรำข้าว

จากผลการทดลอง พบว่าแมสสเปกตรัมของสารมาตรฐานกรดเฟอรูลิกปรากฏในรูป protonated molecular ion ที่ m/z 195 ($[M+H]^+$) และพบ daughter ion อีกตัวที่สำคัญ ที่ m/z 177 ($[M+H-H_2O]^+$) ซึ่งพบว่าในตัวอย่างรำข้าวมี molecular-ion เช่นเดียวกัน ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าพบกรดเฟอรูลิกเป็นองค์ประกอบในตัวอย่างรำข้าว

2.2 ศึกษาวิฤภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์แกมมาโอไรซานอลและกรดเฟอรูลิกในตัวอย่างรำข้าวด้วย RP-HPLC

ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างรำข้าวด้วย RP-HPLC พบว่านอกจากจะพบแกมมาโอไรซานอลในรำข้าวแล้ว ยังพบกรดเฟอรูลิกในตัวอย่างรำข้าวด้วย ถึงแม้ว่างานวิจัยที่ผ่านมาจะมีการศึกษาการวิเคราะห์แกมมาโอไรซานอลหรือกรดเฟอรูลิกในตัวอย่างข้าว แต่ยังไม่มียานวิจัยที่ศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณทั้งแกมมาโอไรซานอลและกรดเฟอรูลิกพร้อมๆ กันด้วย RP-HPLC ดังนั้นในการทดลองนี้จึงต้องศึกษาหาวิฤภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์แกมมาโอไรซานอลและกรดเฟอรูลิกในตัวอย่างรำข้าวด้วย RP-HPLC ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงค่าเวลาคงค้างของสารมาตรฐานแกมมาโอโรซานอลและกรดเฟอรูลิก ที่วิเคราะห์ด้วย RP-HPLC เมื่อใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ชนิดต่างๆ

สารมาตรฐาน	เวลาคงค้าง (นาที)	
	วัฏภาคเคลื่อนที่ ชนิดที่ 1 [*]	วัฏภาคเคลื่อนที่ ชนิดที่ 2 [*]
1. แกมมาโอโรซานอล	-	3.003
2. กรดเฟอรูลิก	9.940	6.487

* 0.5 % Acetic acid:Acetonitrile อัตราส่วน 19:81 ดัดแปลงมาจาก Lu และคณะ, 2005 [33]

** 0.5% Acetic acid ใน Methanol [34]

ผลการทดลองในตารางที่ 6 พบว่า วัฏภาคเคลื่อนที่ชนิดที่ 1 สามารถใช้วิเคราะห์กรดเฟอรูลิกได้ แต่วัฏภาคเคลื่อนที่นี้ไม่มีประสิทธิภาพในการชะแกมมาโอโรซานอลออกจากวัฏภาคนิ่งได้ จึงทำให้เกิดปัญหาแกมมาโอโรซานอลสะสมในคอลัมน์ ซึ่งมีผลทำให้ประสิทธิภาพการแยกสารของคอลัมน์ลดลง วัฏภาคเคลื่อนที่ชนิดที่ 2 ซึ่งเป็น methanol และเติม acetic acid ปริมาณเล็กน้อยเพื่อปรับสภาวะให้หมู่ฟีนอลของแกมมาโอโรซานอลและกรดเฟอรูลิกอยู่ในรูป -OH พบว่าสามารถแยกแกมมาโอโรซานอลและกรดเฟอรูลิกออกจากกันได้ดี และพีคของแกมมาโอโรซานอลรวมกันเป็นพีคเดียว โดยใช้เวลาในการวิเคราะห์เพียง 6.5 นาทีเท่านั้น ดังนั้นในงานวิจัยนี้จะทำการวิเคราะห์แกมมาโอโรซานอลและกรดเฟอรูลิกในรำข้าวไปพร้อมๆ กันด้วยวิธีการสกัดเพียงบางส่วนร่วมกับเทคนิค RP-HPLC โดยเลือกใช้ระบบวัฏภาคเคลื่อนที่ประกอบด้วยตัวทำละลาย 0.5% Acetic acid ใน Methanol

2.3 ศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณแกมมาโอโรซานอลและกรดเฟอรูลิกในรำข้าวด้วยวิธีการสกัดเพียงบางส่วนร่วมกับเทคนิค RP-HPLC

รำข้าวสายพันธุ์หอมนิลที่ใช้ในการทดลองมีปริมาณความชื้นอยู่ร้อยละ 8.42 ± 0.05 ซึ่งทำการวิเคราะห์แกมมาโอโรซานอลและกรดเฟอรูลิกในรำข้าวไปพร้อมๆ กันด้วยวิธีการสกัดเพียงบางส่วนร่วมกับเทคนิค RP-HPLC และเลือกใช้ระบบวัฏภาคเคลื่อนที่ ประกอบด้วยตัวทำละลาย 0.5% Acetic acid ใน Methanol สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณแกมมาโอโรซานอลและกรดเฟอรูลิกในรำข้าวทำได้โดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำมันรำข้าวและแกมมาโอโรซานอลด้วยตัวทำละลายเมทานอลที่ความเข้มข้น 40-280 และ 3-20 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ซึ่งกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายทั้งสองกับพื้นที่ใต้พีคนี้แสดงความสัมพันธ์อย่างเป็นเส้นตรง (ค่า regression coefficient มากกว่า 0.999)

ตารางที่ 7 ปริมาณแกมมาโอโรซานอลและกรดเฟอรูลิกในรำข้าวโดยวิธีการสกัดเพียงบางส่วนด้วยตัวทำละลายเมทานอล

สารประกอบ	ปริมาณ (มก./กรัมรำแห้ง) ^a	กราฟสอบเทียบมาตรฐาน	
		สมการเส้นตรง ^b	R ²
1. แกมมาโอโรซานอล	2.64	$Y = 6.86 \times 10^7 X$	0.9992
2. กรดเฟอรูลิก	0.36	$Y = 3.82 \times 10^7 X$	0.9994

^a ข้อมูลที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากการทำ 3 ซ้ำ $\pm$ SD (n=3)

^b y = พื้นที่, x = ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

จากการทดลอง พบว่าปริมาณแกมมาโอโรซานอล เท่ากับ 2.64 มิลลิกรัม/รำข้าว 1 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ซึ่งปริมาณที่วิเคราะห์ได้ใกล้เคียงกับผลการวิเคราะห์ปริมาณแกมมาโอโรซานอลด้วยวิธีการสกัดเพียงบางส่วนวิเคราะห์โดยตรวจวัดด้วย UV-Spectrophotometer (ประมาณ 2.65 มิลลิกรัม/รำข้าว 1 กรัม (น้ำหนักแห้ง) สำหรับปริมาณกรดเฟอรูลิกวิเคราะห์ได้เท่ากับ 0.36 มิลลิกรัม/รำข้าว 1 กรัม (น้ำหนักแห้ง)

2.4 ศึกษาหาค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับของแกมมาโอโรซานอลและกรดเฟอรูลิกในรำข้าวด้วยวิธีการสกัดเพียงบางส่วนร่วมกับเทคนิค RP-HPLC

จากผลการทดลองที่ 1.3 พบว่าวิธีการสกัดเพียงบางส่วนนี้สามารถนำมาประยุกต์หาค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับ (adsorption coefficient, K_d) ของสารต่างๆ ได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้ทำการหาค่า K_d ของแกมมาโอโรซานอลและกรดเฟอรูลิกในตัวอย่างรำข้าวด้วยวิธีการสกัดเพียงบางส่วนร่วมกับเทคนิค RP-HPLC และเลือกใช้ระบบวัฏภาคเคลื่อนที่ ประกอบด้วยตัวทำละลาย 0.5% Acetic acid ใน Methanol ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 8 ค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับ (K_d) ของแกมมาไฮโรซานอลและกรดเฟอรูลิกในรำข้าวโดยวิธีการสกัดเพียงบางส่วนด้วยตัวทำละลายเมทานอล

การทดลองที่	ค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับ (K_d)	
	แกมมาไฮโรซานอล	กรดเฟอรูลิก
1	0.79	0.46
2	0.64	0.45
3	1.52	0.89
ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD	0.99 ± 0.47	0.60 ± 0.25

ผลการทดลองในตารางที่ 8 พบว่าค่า K_d ของทั้งแกมมาไฮโรซานอลและกรดเฟอรูลิก มีค่าแตกต่างกันในแต่ละครั้งที่ทำการทดลอง ความแตกต่างของค่า K_d ของแกมมาไฮโรซานอลและกรดเฟอรูลิกในตัวอย่างรำข้าว น่าจะมาจากตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดแกมมาไฮโรซานอลและกรดเฟอรูลิกในรำข้าว ทั้งนี้เนื่องเมทานอลเป็นตัวทำละลายที่ระเหยง่ายอาจมีผลทำให้ปริมาตรที่วัดได้คลาดเคลื่อนไป และเมื่อนำไปคำนวณหาปริมาณไฮโรซานอลและกรดเฟอรูลิกโดยการแทนค่าลงในสมการทางคณิตศาสตร์แล้วจะทำให้ค่าที่คำนวณได้คลาดเคลื่อนไปด้วย อีกทั้งยังพบว่าเมทานอลเป็นตัวทำละลายที่มีขี้และมีประสิทธิภาพในการสกัดสารทั้งสองได้ดี (superior extraction solvent) ทำให้ไฮโรซานอลและกรดเฟอรูลิกถูกสกัดออกมาได้เกือบหมดในการสกัดครั้งแรก เมื่อสกัดครั้งที่สองจึงได้ค่าที่ไม่แตกต่างหรือใกล้เคียงกับครั้งแรก และเมื่อแทนค่าลงในสมการทางคณิตศาสตร์แล้วจะทำให้ค่าที่คำนวณได้มีความแปรปรวน ดังนั้นในงานวิจัยต่อไปได้ทำการศึกษาค้นหาตัวทำละลายที่เหมาะสมเพื่อการสกัดตัวอย่างจากรำข้าว โดยตัวทำละลายที่ใช้ในการศึกษานี้ ได้แก่ เมทานอล:น้ำ (100:0) เมทานอล:น้ำ (70:30) และเมทานอล:น้ำ (50:50) ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับ (K_d) ของแกมมาไฮโรซานอลและกรดเฟอรูลิกในรำข้าวโดยวิธีการสกัดเพียงบางส่วนด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ

สารประกอบ	ค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับ (K_d)		
	เมทานอล:น้ำ (100:0)	เมทานอล:น้ำ (70:30)	เมทานอล:น้ำ (50:50)
1. แกมมาไฮโรซานอล	0.99 ± 0.47	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.01
2. กรดเฟอรูลิก	0.60 ± 0.25	0.03 ± 0.00	0.04 ± 0.01

พบว่า ค่า K_d ของทั้งแกมมาโอไรซานอลและกรดเฟอรูลิกจะมีความแปรปรวนน้อยลง เมื่อตัวทำละลายมีปริมาณน้ำเพิ่มขึ้น โดยค่า K_d ของแกมมาโอไรซานอลและกรดเฟอรูลิกที่ทำการสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล มีค่าเท่ากับ 0.99 ± 0.47 และ 0.60 ± 0.25 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ การสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล:น้ำ (70:30) และเมทานอล:น้ำ (50:50) นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล:น้ำ (50:50) ค่า K_d ของทั้งแกมมาโอไรซานอลและกรดเฟอรูลิกจะมีความแปรปรวนน้อยที่สุด ดังนั้นการนำค่า K_d นี้ไปใช้คำนวณหาปริมาณสารด้วยวิธีการสกัดเพียงบางส่วนด้วยการสกัดเพียงครั้งเดียวจะสามารถทำได้อย่างถูกต้องและแม่นยำด้วย

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาพบว่าวิธีการสกัดสารเพียงบางส่วนสามารถนำมาใช้วิเคราะห์ปริมาณไขมันทั้งหมด แกมมาโอโรซานอล และกรดเฟอรูลิกในรำข้าวได้อย่างถูกต้อง ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการหาปริมาณสารด้วยวิธีดั้งเดิม โดยวิธีใหม่ที่น่าเสนอนี้มีข้อดีกว่า คือ เป็นวิธีที่รวดเร็วและประหยัด อีกทั้งยังสามารถนำวิธีใหม่นี้มาประยุกต์ใช้หาค่า K_d ของไขมัน แกมมาโอโรซานอล และกรดเฟอรูลิกในรำข้าว ซึ่งพบว่าค่า K_d มีความสำคัญและเป็นประโยชน์อย่างมาก สามารถนำมาใช้ทำนายหาปริมาณของตัวทำละลายเพื่อใช้ในการสกัดสารจากตัวอย่างตามที่ต้องการ จากผลการทดลองพบว่าความชื้นในรำข้าวมากขึ้นทำให้ค่า K_d ของไขมันและแกมมาโอโรซานอลลดลง หรือกล่าวได้ว่าความชื้นในรำข้าวทำให้ความสามารถในการเข้าไปสกัดสารลดลง และจากการศึกษาผลของตัวทำละลายต่อการวิเคราะห์ปริมาณแกมมาโอโรซานอล พบว่าไอโซโพรพานอลเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสม นอกจากนี้พบว่าวิธีใหม่ที่น่าเสนอนี้ร่วมกับเทคนิค RP-HPLC สามารถนำมาใช้วิเคราะห์หาปริมาณแกมมาโอโรซานอล และกรดเฟอรูลิกในรำข้าวไปพร้อม ๆ กันได้อย่างถูกต้อง ซึ่งวิธีนี้ช่วยประหยัดตัวทำละลายและเวลาในการวิเคราะห์เป็นอย่างมาก

เอกสารอ้างอิง

1. Chen, M. -H., & Bergman, C. J. (2005). A rapid procedure for analyzing rice bran tocopherol, tocotrienol and γ -oryzanol contents. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18, 319-331.
2. Hu, W., Wells, J. H., Shin, T. -S., & Godber, J. S. (1996). Comparison of isopropanol and hexane for extraction of vitamin E and oryzanols from stabilized rice bran. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73, 1653-1656.
3. Krishna, A. G. G., Khatoon, S., Shiela, P. M., Sarmandal, C. V., Indira, T. N., & Mishra, A. (2001). Effect of refining of crude rice bran oil on the retention of oryzanol in the refined oil. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 78, 127-131.
4. Saska, M. & Rossiter, G. J. (1998). Recovery of γ -oryzanol from rice bran oil with silica based continuous chromatography. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 75, 1421-1427.
5. Seetharamaiah, G. S. & Prabhakar, J. V. (1986). Oryzanol content of Indian rice bran oil and its extraction from soap stock. *Journal of Food Science and Technology*, 23, 270-273.
6. Shin, T. -S., Godber, J. S., Martin, D. E., & Wells, J. H. (1997). Hydrolytic stability and changes in E vitamers and oryzanol of extruded rice bran during storage. *Journal of Food Science*, 62, 704-708.
7. Xu, Z. & Godber, J. S. (2000). Comparison of supercritical fluid and solvent extraction methods in extracting γ -oryzanol from rice bran. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77, 547-551.
8. รายงานสถานการณ์การผลิตและค้าข้าวปี พ.ศ. 2544 และแนวโน้มปี พ.ศ. 2545, กรมการค้าภายใน, กระทรวงพาณิชย์.
9. Orthoefer, F. T. (1996). Rice bran oil: Healthy lipid source, *Food Technology*, 50, 62-64.
10. Zhou, Z., Robards, K., Helliwell, S., & Blanchard, C. (2004). The distribution of phenolic acids in rice. *Food Chemistry*, 87, 401-406.
11. Sosulski, F. Krygier, K. Hogge, L. (1982). Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 3. Composition of phenolic acids in cereal and potato flours. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30, 337-340.

12. Tian, S., Nakamura, K., Cui, T., & Kayahara, H. (2005). High-performance liquid chromatographic determination of phenolic compounds in rice. *Journal of Chromatography A*, 1063, 121–128.
13. Williams, G. M., Williams, C. L., & Weisburger, J. H. (1999). Diet and cancer prevent: The fiber first diet. *Toxicological Sciences*, 52, 72-86.
14. Hudson, E. A., Dinh, P. A., Kokubun, T., Simmonds, M. S. J., & Gescher, A. (2000). Characterization of potentially chemopreventive phenols in extracts of brown rice that inhibit the growth of human breast and colon cancer cells. *Cancer Epidemiology, Biomarkers, and Prevention*, 9, 1163–1170.
15. Rogers, E. J., Rice, S. M., Nicolosi, R. J., Carpenter, D. R., McClelland, C. A., & Romanczyk, L. J. (1993). Identification and quantitation of γ -oryzanol components and simultaneous assessment of tocopherols in rice bran oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 70, 301-307.
16. Das, P. K., Chaudhuri, A., Kaimal, T. N. B., & Bhalerao, U. T. (1998). Isolation of γ -oryzanol through calcium ion induced precipitation of anionic micellar aggregates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3073-3080.
17. นพมาศ มนัสวานกุล . การสำรวจปริมาณแกมมาโอไรซานอลและวิตามินอีในข้าวไทยสายพันธุ์ต่างๆ . วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวเคมี . มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. 2545.
18. Giuseppe, P., Enrico, M., Luigi, M., & Paplo, F. (2003). Improving the value of rice by-products by SFE. *Journal of Supercritical fluids*, 26, 63-71.
19. Chokmoh, S., Krisnangkura, K., Lomsugarit, S., & Krisnangkura, S. (2005). Determination of γ -oryzanols in rice bran. *KMUTT Research and Development Journal*, 28, 199-207.
20. Iqbal, S., Bhanger, M. I., & Anwar, F. (2005). Antioxidant properties and components of some commercially available varieties of rice bran in Pakistan. *Food Chemistry*, 93, 265-272.
21. Tian, S., Nakamura, K., Cui, T., & Kayahara, H. (2005). High-performance liquid chromatographic determination of phenolic compounds in rice. *Journal of Chromatography A*, 1063, 121–128.
22. Proctor, A., Jackson, V. M., Scott, M., & Clark, P. K. (1994). Rapid equilibrium extraction of rice bran oil at ambient temperature. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 71, 1295-1296.

23. McCaskill, D. R., & Zhang, F. (1999). Use of rice bran oil in foods. *Food Technology*, 53, 50-53.
24. Fornari, T., Bottini, S., & Brignole, E. (1994). Application of UNIFAC to vegetable oil alkane mixtures. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 71, 391-395.
25. González, C., Resa, J. M., Ruiz, A., & Gutiérrez, J. I. (1996). Densities of mixtures containing *n*-alkanes with sunflower seed oil at different temperatures. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 41, 796-798.
26. Tanaka, K., Yoshida, T., Asada, K., & Kasai, Z. (1973). Subcellular particles isolated from aleurone layer of rice seeds. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 155, 136-143.
27. Amisshah, J. G. N., Ellis, W. O., Oduro, I., & Manful, J. T. (2003). Nutrient composition of bran from new rice varieties under study in Ghana. *Food Control*, 14, 21-24.
28. Lloyd, B. J., Siebenmorgen, T. J., & Beers, K. W. (2000). Effects of commercial processing on antioxidants in rice bran. *Cereal Chemistry*, 77, 551-555.
29. Malekian, F., Rao, R. M., Prinyawiwatkul, W., Marshall, W. E., Windhauser, M., & Ahmedna, M. (2000). Lipase and lipoxxygenase activity, functionality, and nutrient losses in rice bran during storage (pp.1-68). Bullentin No.870. Baton Rouge: LSU Agricultural Center, Louisiana Agricultural Experiment Station.
30. Rohrer, C. A., & Siebenmorgen, T. J. (2004). Nutraceutical concentrations within the bran of various rice kernal thickness fractions. *Biosystems Engineering*, 88, 453-460.
31. Proctor, A., & Bowen, D. J. (1996). Ambient-temperature extraction of rice bran oil with hexane and isopropanol. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73, 811-813.
32. Lusas, E. W., Watkins, L. R., Koseoglu, S. S., Rhee, K. C., Hernandez, E., Riaz, M. N., Johnson, W. H., & Doty, S. C. (1994). New isopropanol system shows promise. *INFORM*, 5, 1245-1253.
33. Lu, G. -H., Chan, K., Leung, K., Chan, C. -L., Zhao, Z. -Z, & Jiang, Z. -H. (2005). Assay of free ferulic acid and total ferulic acid for quality assessment of *Angelica sinensis*. *Journal of Chromatography A*, 1068, 209-219.

34. วราพร พงศ์วรกุลพานิช. การวิเคราะห์เอกลักษณ์ปริมาณโทโคฟีรอลและโอไรซานอลในกระบวนการผลิตน้ำมันรำข้าว. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. 2543.
35. Diack, M., & Saska, M. (1994). Separation of vitamin E and γ -oryzanol from rice bran oil by normal-phase chromatography. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 71, 1211-1217.
36. Norton, R. A. (1995). Quantitation of steryl ferulate and p-coumarate esters from corn and rice bran. *Lipids*, 30, 269-274.

ภาคผนวก

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ
 - 1.1 ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์แล้ว
 - 1.2 ผลงานวิจัยที่กำลังอยู่ในช่วงดำเนินการ
2. การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ
 - 2.1 การนำเสนอผลงานแบบโปสเตอร์
 - 2.2 การนำเสนอผลงานแบบบรรยาย

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

1.1 ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์แล้ว

ชื่อผู้แต่ง : Supathra Lilitchan, Cholticha Tangprawat, Kornkanok Ayusuk, Sumalee Krisnangkura, Salisa Chokmoh, Kanit Krisnangkura

ชื่อเรื่อง : Partail extraction method for the rapid analysis of total lipids and γ -oryzanol contents in rice bran

ชื่อวารสาร : Food Chemistry, 16, 752-759.

ปีที่ตีพิมพ์ : 2008

Impact Factor: 2.433

1.2 ผลงานวิจัยที่กำลังอยู่ในช่วงดำเนินการ

ชื่อผู้แต่ง : Supathra Lilitchan, Kornkanok Ayusuk, Kanit Krisnangkura

ชื่อเรื่อง : Simultaneous determination of γ -oryzanol and ferulic acid contents in rice bran by partial extraction method with HPLC

ชื่อวารสารที่คาดว่าจะตีพิมพ์ : Food Chemistry, Journal of Agricultural and Food Chemistry

2. การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ

2.1 การนำเสนอผลงานแบบโปสเตอร์

- การประชุมเพื่อเสนอผลงานวิจัยของนักวิจัยรุ่นใหม่ และพบกับเมธีวิจัยอาวุโส สกว. ระหว่างวันที่ 13-15 ตุลาคม 2548 ณ โรงแรมรีเจนท์ ชะอำ จังหวัดเพชรบุรี
- การประชุมสัมมนาวิชาการอุตสาหกรรมเกษตร: นวัตกรรมทางอาหาร ครั้งที่ 8 เมื่อวันที่ 15-16 มิถุนายน 2549 ณ ศูนย์ประชุมนานาชาติไบเทค บางนา จัดโดย ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ร่วมกับ สมาคมสภาวิชาการอุตสาหกรรมเกษตร สมาคมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีทางอาหารแห่งประเทศไทย (FoSTAT)

2.2 การนำเสนอผลงานแบบบรรยาย

- การประชุมประจำปี “นักวิจัยรุ่นใหม่...พบ...เมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 3 ระหว่างวันที่ 12-14 ตุลาคม 2549 ณ โรงแรมริเจนท์ ซะอ่า จังหวัดเพชรบุรี