



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การวิเคราะห์สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ในข้าวสีพันธุ์ไทย

โดย รองศาสตราจารย์ ดร. สุกัญญา วงศ์พรชัย

มกราคม 2552

สัญญาเลขที่ RMU4880005

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การวิเคราะห์สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ในข้าวสีพันธุ์ไทย

Analysis of Flavonoids in Thai Pigmented Rice

ผู้วิจัย

รศ.ดร. สุกัญญา วงศ์พรชัย ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา
และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ของ “การวิเคราะห์สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ในข้าวสีพันธุ์ไทย” นี้ สามารถดำเนินการจนสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความร่วมมืออย่างดีจากคณะผู้มีส่วนร่วมวิจัยและช่วยเหลือสนับสนุนในด้านต่างๆ ทั้งคณาจารย์และนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาที่สนใจในหัวข้อวิจัยดังกล่าว รวมถึงคณาจารย์ นักวิจัย และนักวิชาการทางการเกษตร ที่ทำวิจัยเกี่ยวข้องกับข้าวและข้าวสี จึงขอขอบพระคุณอย่างสูงแก่ รองศาสตราจารย์ ดร. อภิชาติ วรรณวิจิตร รองศาสตราจารย์ ดร. ศักดิ์ดา จงแก้ววัฒนา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สาวิตร์ มีจ้อย และทีมวิจัย ที่ได้ให้ความช่วยเหลือสนับสนุนเมล็ดพันธุ์และต้นข้าวที่ใช้เป็นตัวอย่างในโครงการวิจัยนี้ รวมถึงการให้คำปรึกษาและแลกเปลี่ยนประสบการณ์ความรู้แก่กันด้วยดีมาโดยตลอด

งานวิจัยนี้คงไม่สามารถดำเนินการสำเร็จลงได้ โดยปราศจากการสนับสนุนของศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี (Center of Excellence for Innovation in Chemistry: PERCH-CIC) ที่ได้สนับสนุนเครื่องมือวิเคราะห์ที่สำคัญ คือ High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry และภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่สนับสนุนในด้านห้องปฏิบัติการและเครื่องมือวิเคราะห์อื่นๆ ความช่วยเหลือของเจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้อง และนักศึกษาทุกท่านทั้งที่ศึกษาในภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และภาควิชาพืชไร่ ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ท้ายนี้ผู้วิจัยขอแสดงความขอบคุณอย่างสูงแก่ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา (สกอ) ที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยอย่างต่อเนื่อง รวมทั้งการประสานงานดูแลเอาใจใส่ด้วยดีมาโดยตลอด ทำให้งานวิจัยสามารถดำเนินการไปได้อย่างราบรื่น

สุกัญญา วงศ์พรชัย

บทสรุปผู้บริหาร

รหัสโครงการ : RMU4880005
 ชื่อโครงการ : การวิเคราะห์สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ในข้าวสีพันธุ์ไทย
 ชื่อหัวหน้าโครงการ : รศ.ดร.สุกัญญา วงศ์พรชัย
 Email address : scismhth@chiangmai.ac.th
 ระยะเวลาโครงการ : 1 มิถุนายน 2548 – 31 มกราคม 2552

ปัจจุบันการศึกษาวิจัยในด้าน “อาหารเพื่อสุขภาพ” (functional food) มีแนวโน้มสูงขึ้นทั้งในและต่างประเทศ ทั้งนี้เนื่องมาจากผลการประเมินทางสาธารณสุขของประเทศต่างๆ ในทศวรรษที่ผ่านมา พบว่าประชากรยังขาดความเอาใจใส่ในการรับประทานอาหารที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ ซึ่งเชื่อต่อมาว่าเป็นวิธีที่สามารถป้องกันโรคบางชนิด เช่น โรคที่เกี่ยวข้องกับหัวใจ มะเร็ง และความดันได้

ธัญพืชซึ่งได้แก่พืชที่ให้เมล็ดสำหรับใช้เป็นอาหาร เช่น ข้าว ข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าวไรน์ และข้าวโอ๊ต เป็นอาหารกลุ่มที่ได้รับความนิยมอย่างมากในการบริโภคหรือแปรรูปเป็นอาหารเพื่อสุขภาพ โดยเฉพาะข้าวซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย การเป็นผู้นำในการผลิตและส่งออกข้าวมาเป็นเวลาช้านานนั้น ก่อให้เกิดการสนับสนุนการวิจัยจากภาครัฐ ที่มุ่งเน้นการจัดการการเพาะปลูกข้าวและการปรับปรุงพันธุ์เพื่อเพิ่มผลผลิต จนเกิดความหลากหลายของข้าวพันธุ์ใหม่ที่ได้คุณภาพผลผลิตสูงตรงตามความต้องการของตลาด

ข้าวสี (pigmented or colored rice) เช่น ข้าวสีแดง ข้าวสีดำ และข้าวสีม่วง (ข้าวดำ) มีองค์ประกอบที่เป็นสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญเพิ่มเติมจากข้าวขาวสารให้สี โดยเฉพาะสารกลุ่ม flavonoids และ polyphenols ซึ่งสารกลุ่มนี้โดยทั่วไปพบว่ามีคุณสมบัติที่สำคัญโดยเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและมีความสามารถในการจับไอออนของโลหะ รำของข้าวสีพันธุ์ต่างๆ จึงนับว่าเป็นแหล่งอาหารที่มีศักยภาพมากในการพัฒนาเป็นอาหารเพื่อสุขภาพ อย่างไรก็ตามองค์ความรู้ทางเคมีเกี่ยวกับชนิด โครงสร้างทางเคมี และปริมาณ รวมถึงประเภทและฤทธิ์ของฤทธิ์ทางชีวภาพของสารองค์ประกอบดังกล่าวในข้าว ควรได้รับการศึกษาวิจัยเพื่อหาข้อมูลเบื้องต้นให้ชัดเจนก่อนเป็นอันดับแรก

โครงการวิจัยนี้จึงได้วางแนวทางการวิจัยที่เน้นการศึกษาเพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานองค์ความรู้ทางเคมีของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยเฉพาะสารกลุ่ม flavonoids ซึ่งเป็นกลุ่มสารที่ให้สี และมีรายงานพบฤทธิ์ทางชีวภาพที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพโดยเฉพาะการป้องกันโรคร้ายแรง เช่น มะเร็งและโรคหัวใจ โดยวิธีการศึกษาวิจัยที่คาดว่าจะให้ผลสัมฤทธิ์ที่ดีนั้น ควรเน้นการประยุกต์เครื่องมือวิจัยระดับสูง เช่น High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (HPLC-MS/MS) ซึ่งจะช่วยในการวิเคราะห์แบบลดขั้นตอน เนื่องจากเทคนิคดังกล่าวสามารถวิเคราะห์องค์ประกอบที่สนใจในสารสกัดหยาบ ที่มีความหลากหลายขององค์ประกอบได้โดยไม่ต้องมีขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ก่อน เป็นผลดีกับการวิเคราะห์สารที่มีปริมาณน้อยและสลายตัวง่ายกว่าปกติ อย่างไรก็ตามเทคนิคดังกล่าวต้องการผู้มีความชำนาญในการใช้และควบคุม

เครื่องมือ รวมทั้งมีพื้นฐานความรู้เกี่ยวกับการประมวลผลและแปรผลข้อมูลที่ได้เป็นอย่างดี โดยสรุปการวิจัยในด้านการวิเคราะห์สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ในข้าวสีดํา ให้ข้อมูลที่เป็นองค์ความรู้ใหม่สามารถนำมาตีพิมพ์เผยแพร่ในระดับนานาชาติได้ดังนี้

1. การพิสูจน์โครงสร้างและหาปริมาณองค์ประกอบแคโรทีนอยด์ และฟลาโวนอยด์บางตัวในรำข้าวดำด้วยเทคนิค Supercritical Fluid Extraction (SFE) และ High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry ให้ผลงานตีพิมพ์เรื่อง “Quantification of Carotenoid and Flavonoid Components in Brans of Some Thai Black Rice Cultivars Using Supercritical Fluid Extraction and High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry”
2. การหาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากรำข้าวสีดําและความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ดังกล่าวกับปริมาณสารสีกลุ่มแอนโทไซยานิน (Anthocyanin Pigments) ซึ่งพบว่าฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของรำสีดํานั้นไม่ได้เป็นผลมาจากสารกลุ่มแอนโทไซยานิน ดังที่ได้มีรายงานมาก่อนหน้านี้ งานวิจัยส่วนนี้ให้ผลงานที่จะตีพิมพ์เรื่อง “Antioxidant Activities and the Major Bioactive Components of Bran Extracts from Some Thai Black Rice Cultivars”
3. การวิเคราะห์โครงสร้างของสาร flavonoid ได้แก่ กลุ่ม flavanone, flavones, flavonol และ isoflavone โดยการสร้างฐานข้อมูลกลไกการแตกตัวในเทคนิค mass spectrometry จากการศึกษาพฤติกรรมการแตกตัว (Fragmentation Behaviors) ของสารฟลาโวนอยด์แต่ละกลุ่ม และนำมาเป็นข้อมูลในการหาลักษณะเฉพาะของสารฟลาโวนอยด์ในตัวอย่างสารสกัดจากพืชได้ งานวิจัยส่วนนี้ให้ผลงานที่จะตีพิมพ์เรื่อง “Variation of Fragmentation Behaviors of 17 Selected Flavonoids Upon Energy of Collision Induced Dissociation in Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry”
4. การพิสูจน์โครงสร้างของสารแอนโทไซยานินในใบและเมล็ดข้าวสีดําด้วยเทคนิค HPLC-MS/MS นำไปสู่การพบแอนโทไซยานินที่ไม่เคยมีรายงานพบในข้าวสีดําก่อน 6 โครงสร้างจากทั้งหมด 12 สารที่พบในใบข้าว ปริมาณของสารดังกล่าวพบว่าแตกต่างกันไปทั้งในส่วน of ใบและเมล็ด พันธุ์ข้าว และระยะการเจริญเติบโต งานวิจัยส่วนนี้ให้ผลงานที่จะตีพิมพ์เรื่อง “Quantification of Anthocyanins in Leaves and Seed of Some Black Rice Plants Following Growth Stages”

นอกจากผลสัมฤทธิ์ของโครงการวิจัยด้านองค์ความรู้ทางเคมีที่เน้นในแง่ของเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (Chemistry of Natural Products) แล้ว วิธีการวิจัยที่ใช้เทคนิคและเครื่องมือระดับสูงดังที่กล่าวมา สามารถนำมาสร้างพื้นฐานองค์ความรู้ให้แก่การศึกษาในระดับบัณฑิตศึกษาได้ ส่งผลให้มีนักศึกษาที่ทำการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์เกี่ยวข้องกับโครงการวิจัยนี้ จบการศึกษาแล้วในระดับปริญญาโท 1 คน และปริญญาเอก 1 คน และกำลังจะจบการศึกษาในระดับปริญญาเอกอีก 1 คน รวมนักศึกษาปริญญาโทและเอกที่สำเร็จการศึกษาโดยได้รับการสนับสนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์จำนวน 3 คน ซึ่งต่อไปจะเป็นกำลังสำคัญในการพัฒนาองค์ความรู้ทางด้านเคมีของข้าวสาลี เพื่อเป็นพื้นฐานให้กับการวิจัยเพื่อพัฒนาผลผลิตและผลิตภัณฑ์ข้าวคุณภาพสูงต่อไป

บทคัดย่อ

รำข้าวเจ้าดำสามพันธุ์คือ พันธุ์ KHNBT, KHNBT No. 3, and 1000-11-2-26 และรำข้าวเหนียวดำหนึ่งพันธุ์คือ พันธุ์ KHNBD ได้ถูกนำมาหาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยวิธีโดยวิธีไทโอไซยานเนต ระบบดักจับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ด้วยการเรืองแสง (XYZ system) วิธีคอปเปอร์ทูโอออนต่อบาโรคลูโพรอิน คัลเลอร์มิเตอร์ (PAO) ประสิทธิภาพในการจับประจุของไอออนโลหะและการเกิดปฏิกิริยาการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่อ DPPH พบว่าเปอร์เซ็นต์การออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของลิปิดโดยวิธีไทโอไซยานเนต อยู่ระหว่าง 71-83 จำนวนโฟตอนของการเปล่งแสงอยู่ในช่วง 882-957 และมีปริมาณรวมทั้งหมดของสารต้านออกซิเดชันอยู่ระหว่าง 3240.44-4077.77 มิลลิโมลต่อลิตร ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตรมีเปอร์เซ็นต์ความสามารถต้านออกซิเดชันอยู่ระหว่าง 39.68-60.85 และเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการจับกับไอออนของเหล็กได้ 20.80-39.56 โดยสรุปวิธีการหาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันทุกวิธีให้ลำดับค่าของฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากรำข้าวทั้งสี่พันธุ์สอดคล้องกัน คือ พันธุ์ 1000-11-2-26 > KHNBT No. 3 > KHNBD > KHNBT อย่างไรก็ตามปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากรำข้าวทั้งสี่พันธุ์ให้ลำดับค่าแตกต่างไปดังนี้ พันธุ์ 1000-11-2-26 > KHNBD > KHNBT No. 3 > KHNBT เมื่อหาปริมาณสารสีกลุ่มแอนโทโรไซยานิน 2 สาร คือ cyanindin-3-O-glucoside และ peonidin-3-O-glucoside ในสารสกัดจากตัวอย่างรำข้าวสีดำพันธุ์ พันธุ์ 1000-11-2-26, KHNBD, KHNBT No. 3 และ KHNBT ด้วยเทคนิค HPLC-ESI-MS พบว่ามีความเข้มข้น 24.72 ± 1.54 , 16.01 ± 0.97 , 23.43 ± 2.50 , 34.40 ± 2.22 และ 2.43 ± 1.11 , 2.67 ± 0.23 , 3.31 ± 0.53 , 7.36 ± 1.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ โดยลำดับความมากน้อยของปริมาณของสารดังกล่าวแต่ละสาร ให้ค่าไม่สอดคล้องกับค่าของฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัด แสดงว่าฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากรำข้าวดำไม่ได้ขึ้นตรงกับปริมาณสารสีแอนโทโรไซยานินดังกล่าว

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารฟลาโวนอยด์ที่สะสมในใบ เมล็ด และรำข้าวสีดำทำโดยการสกัดตัวอย่างข้าวด้วยสารละลายของกรดฟอร์มิกเข้มข้น 0.5 % ในเมทานอล และระเหยตัวทำละลายออกจนได้สารสกัดหยาบ จากนั้นแยกองค์ประกอบในสารสกัดหยาบด้วยไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีที่มีโพโตไดโอดแอเรย์เป็นตัวตรวจวัด และเทคนิคคู่ควบระหว่างไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีและแมสสเปกโตรเมตรีที่มีการแตกตัวเป็นไอออนด้วยไฟฟ้า (HPLC-ESI-MS) และสุดท้ายหาโครงสร้างทางเคมีของสารฟลาโวนอยด์แต่ละตัวในสารสกัดจากการวิเคราะห์แมสสเปกตรัมที่ได้จากเทคนิคแมสสเปกโตรเมตรีแบบต่อเรียงกัน (MS/MS) ตำแหน่งของสารฟลาโวน

นอยด์บนโครมาโทแกรมของการแยกสารสกัดหยาบด้วย HPLC ทำโดยการสร้างโครมาโทแกรมของไอออนที่มีมวลเท่ากับมวลต่อประจุของไอออนโมเลกุลและเป็นลักษณะเฉพาะของสารฟลาโวนอยด์ ร่วมกับการยืนยันตำแหน่งดังกล่าวด้วย ยูวี-วิซิเบิล สเปกตรัม ที่ได้จากตัวตรวจวัดแบบไดโอดแอเรย์ การวิเคราะห์แมสสเปกตรัมปกติ และแมสสเปกตรัมของไอออนผลผลิตที่ตำแหน่งเวลารีเทนชัน ดังกล่าวในขั้นต่อมา ซึ่งสามารถนำไปสู่การวินิจฉัยลักษณะเฉพาะของสารฟลาโวนอยด์ในข้าวสีดำได้

การวิเคราะห์สารฟลาโวนอยด์กลุ่ม flavanone, flavone และ flavonol ในสารสกัดจากรำข้าวพันธุ์ KHNBT No.3, rice berry, 16815, 1000-11-2-26, 49-6-6-6-10, 132-1-1-3-3-1-4-4, 132-1-1-4-1-1-1-3 และ KDML 105 พบ 5,3',4',5'-tetrahydroxyflavone-7-*O*-glucoside, 5,3',4',5'-tetrahydroxyflavanone-7-*O*-glucoside, 5,6,3',4',5'-pentahydroxyflavone-7-*O*-glucoside, taxifolin-3-*O*-glucoside, taxifolin, quertagetin-7-*O*-glucoside, myricetin-7-*O*-glucoside, quercetin-3-*O*-glucoside, rutin, isorhamnetin-3-*O*-glucoside, isorhamnetin-3-*O*-rutinoside, quercetin, isorhamnetin-3-*O*-acetylglucoside, 3,5,3'-trihydroxy-4'-methoxyflavone, 3,5,7,3'-tetrahydroxy-4'-methoxyflavone และ isorhamnetin โดยราชของข้าวพันธุ์ 1000-11-2-26 มีปริมาณรวมของฟลาโวนอยด์สูงที่สุดในพันธุ์ 1000-11-2-26 และรองลงไปก็คือ 16815 > rice berry > 132-1-1-3-3-1-4-4 > 49-6-6-6-10 > KHNBT No.3 > 132-1-1-4-1-1-3 ตามลำดับ ส่วนข้าวขาวพันธุ์ KDML 105 ตรวจไม่พบสารฟลาโวนอยด์เหล่านี้

การพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารฟลาโวนอยด์ในกลุ่มแอนโทราไซยานิน ที่สะสมในใบและเมล็ดข้าวเหนียวดำพันธุ์เก่าดอยสะเก็ดและบีจีเอ็มเอสเอ็ม 11 พบทั้งสิ้น 12 สาร ได้แก่ cyanidin-3-*O*-glucoside, cyanidin-3-*O*-glucoside-5-*O*-rhamnoside, peonidin-3-*O*-glucoside, cyanidin-3-*O*-diglucoside, cyanidin-3-*O*-diglucoside-5-*O*-glucoside, cyanidin-3-*O*-(*p*-coumaroyl)glucoside-5-*O*-glucoside, cyanidin-3-*O*-(feruloyl)glucoside-5-*O*-glucoside, peonidin-3-*O*-diglucoside, malvidin-3-*O*-(*p*-coumaroyl)glucoside-5-*O*-glucoside, และ peonidin-3-*O*-(*p*-coumaroyl)glucoside-5-*O*-xyloside, cyanidin-3-*O*-xyloside glucoside และไอโซเมอร์ของ cyanidin-3-*O*-xyloside-glucoside โดยมีสารแอนโทราไซยานิน 6 สารที่พบในใบและเมล็ดของข้าวสีดำเป็นครั้งแรกในการศึกษานี้ คือ cyanidin-3-*O*-diglucoside-5-*O*-glucoside, cyanidin-3-*O*-(*p*-coumaroyl)glucoside-5-*O*-glucoside, cyanidin-3-*O*-(feruloyl)glucoside-5-*O*-glucoside, peonidin-3-*O*-diglucoside, peonidin-3-*O*-(*p*-coumaroyl)glucoside-5-*O*-xyloside, และ malvidin-3-*O*-(*p*-coumaroyl)glucoside-5-*O*-glucoside

นอกจากนี้การวิเคราะห์ปริมาณสัมพัทธ์ของสารแอนโทราไซยานินแต่ละตัวในสารสกัดของใบและเมล็ดข้าวสีดำทั้งสองพันธุ์ ที่เจริญระยะการเจริญเติบโต ได้แก่ ระยะที่เป็นต้นกล้า ระยะ

แตกกอ ระยะตั้งท้อง ระยะน้ำนม ระยะแป้งอ่อน ระยะแก่ของเมล็ด และระยะหลังการเก็บเกี่ยวด้วย HPLC-ESI-MS พบการสะสมของสารแอนโทโรไซยานินในแต่ละส่วนของใบและเมล็ดของข้าวขึ้นอยู่กับลักษณะโครงสร้างทางเคมีกับจำนวนโมเลกุลของน้ำตาลและหมู่อัลคิลเลต โดยแอนโทโรไซยานินที่มีน้ำตาลโมเลกุลเดียว ได้แก่ cyanidin-3-*O*-glucoside และ peonidin-3-*O*-glucoside พบเฉพาะในส่วนของเมล็ดของข้าวพันธุ์บีจีเอ็มเอสเอ็น 11 ซึ่งมีใบสีเขียว แต่พบทั้งในใบและเมล็ดของข้าวพันธุ์กำดอยสะเก็ดซึ่งมีใบสีม่วงดำ ส่วนแอนโทโรไซยานินที่มีน้ำตาลสองหรือสามโมเลกุลหรือหมู่อัลคิลเลต ส่วนใหญ่พบเฉพาะในใบข้าว โดยเฉพาะแล้วมีปริมาณสูงที่ระยะตั้งท้อง ยกเว้น peonidin-3-*O*-diglucoside และ peonidin-3-*O*-(*p*-coumaroyl)glucoside-5-*O*-xyloside ที่พบทั้งในส่วนของใบและเมล็ดข้าว โดยรวมแล้วไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของแอนโทโรไซยานินปริมาณสัมพันธ์และระยะการเจริญเติบโตของข้าวสีดำทั้งสองพันธุ์

Abstract

Bran samples of three non-glutinous Thai black rice cultivars, namely, KHNBT, KHNBT No. 3, and 1000-11-2-26 and a glutinous cultivar, KHNBD, were studied for their antioxidative activities by the following methods; the thiocyanate method, an H_2O_2 -scavenging activity chemiluminescence system (XYZ system), Cu^{2+} /bathocuproine colorimetry (PAO) assay, metal ion chelating activity, and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical-scavenging activity assay. The inhibition of peroxidation by thiocyanate method was between 71-83%, the photon counts of light emission were in the range of 882-957, and the total antioxidant power is 3240-4077 $\mu\text{mol/L}$. At the antioxidant concentration of 5 mg/mL, the radical-scavenging activity is between 39.7-60.8%, and metal chelating is 20.8-39.5 %. Overall, all of the rice brans possessed antioxidant properties in the following order: 1000-11-2-26 > KHNBT No. 3 > KHNBD > KHNBT. However, this order was not completely agreed with that of the total phenolic contents of the black rice extracts, which was 1000-11-2-26 > KHNBD > KHNBT No. 3 > KHNBT. The relative contents of two anthocyanin pigments; cyanindin-3-*O*-glucoside and peonidin-3-*O*-glucoside, in bran extracts of the rice cultivars; 1000-11-2-26, KHNBT No. 3, KHNBD and KHNBT, determined using HPLC-ESI-MS were 24.72 ± 1.54 , 16.01 ± 0.97 , 23.43 ± 2.50 , 34.40 ± 2.22 and 2.43 ± 1.11 , 2.67 ± 0.23 , 3.31 ± 0.53 , 7.36 ± 1.25 , respectively. The orders of anthocyanin contents in extracts of the four black rice cultivars were not correlated with that of the antioxidant activities of the extracts, indicating that antioxidant activities of the black rice bran extracts were independent of their anthocyanin pigments' contents.

Structural identification of flavonoid compounds accumulated in leaves, seed and bran of the black rice cultivar Kumdoisakhet and BGMSN 11, was performed firstly by extraction of the rice brans using 0.5 % formic acid in methanol, which upon solvent evaporation yielded the crude extracts. These extracts were subjected to separation of the components by the use of high performance liquid chromatography (HPLC) having photodiode array as detector together with those techniques employing HPLC combined with an electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-ESI-MS) and a tandem mass spectrometry (MS/MS). Positions of flavonoid components in each HPLC profile of the crude rice sample extracts were determined by the use of data processing in reconstructed ion chromatogram mode monitoring at specific ion masses corresponding to the characteristic or molecular ions of the flavonoids of interest. The present of these flavonoids in the extracts were confirmed by their UV-Vis spectra obtained by DAD. Structural identification and characterization of these black rice flavonoids was then performed by analyzing their ESI-MS and ESI-MS/MS spectra.

Analysis of the black rice flavonoids in groups of flavanone, flavone and flavonol in the bran extracts of black rice cultivars; KHNBT No.3, rice berry, 16815, 1000-11-2-26, 49-6-6-6-10, 132-1-1-3-3-1-4-4, 132-1-1-4-1-1-1-3 and KDML 105, revealed the presence of 5,3',4',5'-tetrahydroxyflavone-7-*O*-glucoside, 5,3',4',5'-tetrahydroxyflavanone-7-*O*-glucoside, 5,6,3',4',5'-pentahydroxyflavone-7-*O*-glucoside, taxifolin-3-*O*-glucoside, taxifolin, quertagetin-7-*O*-glucoside, myricetin-7-*O*-glucoside, quercetin-3-*O*-glucoside, rutin, isorhamnetin-3-*O*-glucoside, isorhamnetin-3-*O*-rutinoside, quercetin, isorhamnetin-3-*O*-acetylglucoside, 3,5,3'-trihydroxy-4'-methoxyflavone, 3,5,7,3'-tetrahydroxy-4'-methoxyflavone and isorhamnetin. Bran of the rice cultivar 1000-11-2-26 was found to contain the highest amount of total flavonoids, the rest were in the following order; 16815 > rice berry > 132-1-1-3-3-1-4-4 > 49-6-6-6-10 > KHNBT No.3 > 132-1-1-4-1-1-1-3. None of these flavonoids were detected in bran of the white rice cultivar KDML 105.

Structural identification of flavonoids in a group of anthocyanins accumulated in leaves and seed of the black rice cultivar Kumdoisakhet and BGMSN 11 revealed the presence of 12 anthocyanins; cyanidin-3-*O*-glucoside, cyanidin-3-*O*-glucoside-5-*O*-rhamnoside, peonidin-3-*O*-glucoside, cyanidin-3-*O*-diglucoside, cyanidin-3-*O*-diglucoside-5-*O*-glucoside, cyanidin-3-*O*-(*p*-coumaroyl)glucoside-5-*O*-glucoside, cyanidin-3-*O*-(feruloyl)glucoside-5-*O*-glucoside, peonidin-3-*O*-diglucoside, malvidin-3-*O*-(*p*-coumaroyl)glucoside-5-*O*-glucoside, and peonidin-3-*O*-(*p*-coumaroyl)glucoside-5-*O*-xyloside, cyanidin-3-*O*-xyloside glucoside, and isomer of cyanidin-3-*O*-xyloside glucoside. Among these identified anthocyanins, cyanidin-3-*O*-diglucoside-5-*O*-glucoside, cyanidin-3-*O*-(*p*-coumaroyl)glucoside-5-*O*-glucoside, cyanidin-3-*O*-(feruloyl)glucoside-5-*O*-glucoside, peonidin-3-*O*-diglucoside, peonidin-3-*O*-(*p*-coumaroyl)glucoside-5-*O*-xyloside, and malvidin-3-*O*-(*p*-coumaroyl)glucoside-5-*O*-glucoside, were found in leaves or seed of black rices for the first time by this study.

The relative contents of each anthocyanin in the extracts of leaves and seed of the two black rice cultivars at seven growth stages; seeding, tillering, booting, milk grain, dough grain, maturation, and post harvest, were determined by the use of LC-ESI-MS. Results revealed that the accumulation of anthocyanins in each part of the rice plant, leaf or seed, was dependent of their chemical structures with a number of sugar and acylate groups. Monoglycosidic anthocyanins such as cyanidin-3-*O*-glucoside and peonidin-3-*O*-glucoside were only found in seed of the black rice cultivar BGMSN 11 that has green leaves, but found in both leaves and seed of the cultivar Kumdoisakhet, of which its leaves are purple-black. Anthocyanins with two or three sugars or acylate groups tended to stay in the leaf part, generally their contents were highest in leaves at booting stage, except for peonidin-3-*O*-diglucoside and peonidin-3-*O*-(*p*-coumaroyl)glucoside-5-*O*-xyloside that were found in both leaves and seed. Overall, there was no correlation among the structures of anthocyanins, their relative contents, and growth stages of both black rice cultivars.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทสรุปผู้บริหาร	ii
บทคัดย่อภาษาไทย	v
Abstract	viii
สารบัญ	x
สารบัญรูป	xiii
สารบัญตาราง	xviii
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	3
1.3 ระเบียบวิธีและขอบเขตของการวิจัย	4
1.4 การเชื่อมโยงกับนักวิจัยที่เป็นผู้เชี่ยวชาญในสาขาวิชาที่ทำการวิจัย	4
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	5
บทที่ 2 ทฤษฎีและผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
2.1 ข้าว (Oryza sativa L.)	6
2.2 ข้าวสี (Pigmented Rice)	10
2.1.1 ข้าวเหนียวดำ	11
2.1.2 ข้าวเจ้าหอมนิล	12
2.3 ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)	14
2.4 แอนโทไซยานิน (Anthocyanins)	16
2.5 เทคนิคคลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปคโตรเมตรี (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: LC-MS)	22
2.6 เทคนิคแมสสเปคโตรเมตรีแบบต่อเรียงกัน (Tandem Mass Spectrometry: MS/MS)	35
2.7 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	40
บทที่ 3 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากใบและรำข้าวสีดำบางพันธุ์	46
3.1 พันธุ์ข้าวที่ใช้ทดลอง	46
3.2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่อ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) และปริมาณ total phenolics ของสารสกัดจากใบข้าวเหนียวดำ	47
3.3 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากรำข้าวเจ้าหอมนิลและข้าวเหนียวดำหา ด้วยวิธี thiocyanate	51

	หน้า
3.4 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากรำข้าวเจ้าหอมนิลและข้าวเหนียวดำ หาด้วยวิธี XYZ System	52
3.5 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากรำข้าวเจ้าหอมนิลและข้าวเหนียวดำ หาด้วยวิธี PAO assay	54
3.6 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากรำข้าวเจ้าหอมนิลและข้าวเหนียวดำ หาด้วยวิธี DPPH assay	55
3.7 การจับไอออนโลหะ (metal chelating capacity) ของสารสกัดจากรำข้าวสีดํา	57
3.8 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolics) ในสารสกัดจากรำข้าวดำ	58
บทที่ 4 การหาโครงสร้าง ลักษณะเฉพาะ และปริมาณของฟลาโวนอยด์กลุ่มฟลาโวน ฟลาโวนอล ฟลาวาโนน และไอโซฟลาโวนในสารสกัดจากรำข้าวสีดํา	60
4.1 การศึกษาการแยก การดูดกลืนรังสี UV-Vis ของฟลาโวนอยด์ ด้วยเทคนิค HPLC-DAD	60
4.2 การศึกษาอิทธิพลของ collision energy ในขบวนการ collision induce dissociation (CID) ในการวิเคราะห์ flavonoid ด้วยเทคนิค ESI-MS/MS ทั้ง positive และ negative ion mode	69
4.3 การบ่งชี้ ระบุเอกลักษณ์และการเปรียบเทียบปริมาณของสารกลุ่ม flavonoid จากการวิเคราะห์สารสกัดจากรำข้าวดำพันธุ์ไทยด้วยเทคนิค HPLC-ESI-MS/MS ด้วย negative ion mode	115
บทที่ 5 การหาโครงสร้าง ลักษณะเฉพาะ และปริมาณของฟลาโวนอยด์กลุ่ม แอนโธไซยานินในสารสกัดจากรำ ไบ และเมล็ดข้าวสีดํา	127
5.1 การวิเคราะห์ปริมาณ anthocyanin pigments ในรำข้าว	127
5.1.1 ตัวอย่างข้าวที่ใช้ทดลอง	127
5.1.2 การสกัด anthocyanins pigments จากรำข้าว	127
5.1.3 การแยกและวิเคราะห์ anthocyanins pigments ในสารสกัดจากรำข้าว ด้วยเทคนิค HPLC-DAD และ HPLC-MS	127
5.1.4 การระบุโครงสร้างของ anthocyanin pigments ในสารสกัดจากรำข้าวดำ ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS	130
5.1.5 ปริมาณ cyanindin-3-O-glucoside และ peonidin-3-O-glucoside ในสารสกัดรำข้าว	132

	หน้า
5.2 การหาโครงสร้าง ลักษณะเฉพาะ และปริมาณ anthocyanins ในสารสกัดจากใบและเมล็ดข้าวสีดำ	135
5.1.1 ตัวอย่างข้าวที่ใช้ทดลอง	135
5.1.2 การสกัด anthocyanins จากใบและเมล็ดข้าว	135
5.1.3 การแยกและวิเคราะห์ anthocyanins ในสารสกัดจากใบและเมล็ดข้าวดำด้วยเทคนิค HPLC-DAD และ HPLC-MS	135
5.1.4 การระบุโครงสร้างของ anthocyanins ในสารสกัดจากใบและเมล็ดข้าวดำด้วยเทคนิค HPLC-DAD	137
5.1.5 การระบุโครงสร้างของ anthocyanins ในสารสกัดจากใบและเมล็ดข้าวดำด้วยเทคนิค HPLC-ESI-MS	139
5.1.6 การระบุโครงสร้างของ anthocyanins ในสารสกัดจากใบและเมล็ดข้าวดำด้วยเทคนิค HPLC-ESI-MS/MS	141
5.1.7 ปริมาณสัมพัทธ์ของ anthocyanins ในสารสกัดจากใบและเมล็ดข้าวดำ	165
บทที่ 6 บทสรุป	172
เอกสารอ้างอิง	175
ผลสัมฤทธิ์ที่ได้จากโครงการวิจัย	178

สารบัญรูป

		หน้า
รูป 2.1	A) ระยะเริ่มงอก B) ระยะกล้า C) ระยะแตกกอ D) ระยะย้ายปล้อง	8
รูป 2.2	A) ระยะการสร้างช่อดอก B) ระยะการพัฒนาการช่อดอก และ C) ระยะออกดอก– ดอกบาน	9
รูป 2.3	A) ระยะน้ำนม B) ระยะรวงกึ่ง และ C) ระยะเมล็ดแก่	10
รูป 2.4	แสดงโครงสร้างหลักทางเคมีของสารประกอบ anthocyanins	16
รูป 2.5	แสดงโครงสร้างทางเคมีของ anthocyanins ที่พบโดยทั่วไปในอาหาร	18
รูป 2.6	โครงสร้างทางเคมีโมเลกุลของน้ำตาลแต่ละชนิด	19
รูป 2.7	โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบหมู่อัลคิลเลต	20
รูป 2.8	การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของแอนโทโรไซยานิน	21
รูป 2.9	แผนภาพแสดงส่วนประกอบของเครื่อง HPLC	22
รูป 2.10	แสดงการต่อควบ LC และ MS โดยมีตัวกลางเป็น ESI	27
รูป 2.11	แผนภาพส่วนประกอบภายในของ ESI-MS แบบที่มีทิศทางการเคลื่อนที่ ของ spray ตั้งฉากกับทิศทางการเคลื่อนที่ของไอออน (Orthogonal electrospray system)	28
รูป 2.12	กลไกการเกิด ionization ใน ESI ก) Nebulization และ Charging ข) Desolvation ค) Ion evaporation 2 แบบ	30
รูป 2.13	ESI mass spectrum ของ Phenylbutazone	31
รูป 2.14	ESI mass spectrum ของ Phage λ lysozyme แสดง multiply charged ions และ สามารถคำนวณ MW ได้เท่ากับ $17,828 \pm 2$ Da	31
รูป 2.15	TIC และ ESI mass spectrum ของยาระงับประสาทบางตัว	32
รูป 2.16	ตำแหน่งของการเกิด fragmentation แบบ CID	34
รูป 2.17	ESI mass spectrum ของ triglyceride แสดง fragment ions ที่มีความสมบูรณ์สัมพัทธ์สูงขึ้น เมื่อใช้ fragmentor voltage ที่สูงขึ้น	35
รูป 2.18	แผนภาพแสดงข้อมูล mass spectrum ที่ได้จากเทคนิค MS/MS	36
รูป 2.19	แผนภาพแสดงการเปรียบเทียบเทคนิค MS/MS และ GC-MS	37
รูป 2.20	แผนภาพแสดงการเปรียบเทียบเทคนิค MS/MS และ GC-MS	37
รูป 2.21	MS/MS spectra ของ 5- และ 6-bromotubercidin	38
รูป 2.22	MS/MS spectra ของ ก) 5-alpha- และ ข) 5-beta-androsterone glucoronide	39

	หน้า
รูป 2.23 ก) ESI-MS spectrum ขององค์ประกอบในสารสกัดจากข้าว ข) MS/MS spectra ของสารสกัดที่ m/z 317 และ ค) ของ standard myricetin	40
รูป 3.1 ก) ลักษณะเมล็ดข้าวเจ้าหอมนิล ข) ข้าวที่แยกมาใช้ทดลอง	46
รูป 3.2 ต้นกล้าพันธุ์ข้าวเหนียวก่ำพื้นเมืองในเขตภาคเหนือบางพันธุ์มีใบเป็นสีแดงเข้ม – ดำ ในขณะที่บางพันธุ์มีใบเขียวปกติเหมือนพันธุ์ข้าวขาวทั่วไป	47
รูป 3.3 ข้าวเหนียวก่ำทั้ง 10 พันธุ์ในแปลงปลูกพืชทดลอง ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ บางพันธุ์รวงที่เก็บเกี่ยวได้มีลักษณะและสีของเมล็ดต่างกัน	47
รูป 3.4 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่อ DPPH ของสารสกัดด้วย methanol ของใบข้าวเหนียวก่ำ 10 พันธุ์ ที่ 6 ระยะการเติบโตจากแปลงทดลองที่ปลูกเมื่อวันที่ 12 กรกฎาคม 2549	48
รูป 3.5 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่อ DPPH ของสารสกัดด้วย methanol ของใบข้าวเหนียวก่ำ 10 พันธุ์ ที่ 6 ระยะการเติบโตจากแปลงทดลองที่ปลูกเมื่อวันที่ 11 สิงหาคม 2549	49
รูป 3.6 ปริมาณ total phenolics ของสารสกัดด้วย methanol ของใบข้าวเหนียวก่ำ 10 พันธุ์ ที่ 6 ระยะการเติบโตจากแปลงทดลองที่ปลูกเมื่อวันที่ 12 กรกฎาคม 2549	50
รูป 3.7 ปริมาณ total phenolics ของสารสกัดด้วย methanol ของใบข้าวเหนียวก่ำ 10 พันธุ์ ที่ 6 ระยะการเติบโตจากแปลงทดลองที่ปลูกเมื่อวันที่ 11 สิงหาคม 2549	50
รูป 3.8 แสดงเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยค่า % lipid peroxidation ของสารสกัดจากรำข้าวแต่ละพันธุ์ และสารมาตรฐาน BHA และ Vitamin E (α -tocopherols)	52
รูป 3.9 ภาพถ่ายแสดงความเข้มข้นของ chemiluminescence ที่เกิดจากปฏิกิริยาใน XYZ system ของสารสกัดจากรำข้าวทั้ง 4 พันธุ์ : 1. KHNBD 2. KHNBT; 3. KHNBT No. 3; และ 4. 1000-11-2-26	53
รูป 3.10 แสดงเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่วัดโดยวิธี XYZ ของสารสกัดจากรำข้าวแต่ละพันธุ์ด้วย photon count values คำนวณจาก CCD sensor control software (Andor MCD software version 2.61)	54
รูป 3.11 กราฟมาตรฐานของสารละลายของ uric acid ใช้เทียบหาค่า antioxidant power ให้ regression coefficient 0.9998 ในช่วงความเข้มข้น 0-2.0 mM uric acid	54

	หน้า
รูป 3.12 แสดงเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันรวม (total antioxidant capacity) ที่หาโดยวิธี PAO assay ของสารสกัดจากรำข้าวแต่ละพันธุ์	55
รูป 3.13 แสดงเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยค่า % DPPH scavenging ของสารสกัดจากรำข้าวแต่ละพันธุ์ และ Vitamin E ที่ความเข้มข้นของสารสกัดในช่วง 5-40 mg/mL	56
รูป 3.14 แสดงเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยค่า EC ₅₀ ของสารสกัดจากรำข้าว แต่ละพันธุ์ และ Vitamin E	56
รูป 3.15 แสดงเปรียบเทียบ % metal chelating ของสารสกัดจากรำข้าวแต่ละพันธุ์และสารมาตรฐาน EDTA ที่ความเข้มข้นของสารสกัดและสารมาตรฐานในช่วง 5-25 mg/mL	57
รูป 3.16 แสดงเปรียบเทียบปริมาณ total phenolics (GAE/g ของรำข้าว) ของสารสกัดจากรำข้าวแต่ละพันธุ์	58
รูป 4.1 เปรียบเทียบลำดับการแยกของ flavonoids 17 ชนิดเมื่อใช้ตัวทำละลายอินทรีย์คือ methanol, acetonitrile และ isopropanol ในการแยกด้วยระบบ HPLC แบบ reversed phase	68
รูป 4.2 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญของ flavonoid จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ESI-MSMS แบบ positive ion mode ซึ่งประกอบด้วย neutral and radical losses และ C-ring cleavages	72
รูป 4.3 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญของ flavonoid จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ESI-MSMS แบบ negative ion mode ซึ่งประกอบด้วย neutral and radical losses และ C-ring cleavages	73
รูป 4.4 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ [1] eriodictyol; 5,7,3',4'-tetrahydroxyflavanone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ positive ion mode	75
รูป 4.5 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ [2] taxifolin; 3,5,7, 3',4'-pentahydroxyflavanone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ positive ion mode	75

	หน้า
รูป 4.6 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ [3] 5,7,3'-trihydroxy-4'-methoxyflavanone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ positive ion mode	76
รูป 4.7 ค่า relative ion signal intensity ของไอออนที่พบใน MS/MS spectra จากการวิเคราะห์ด้วย collision energy 20, 25 และ 30 eV ของ [1] eriodictyol; 5,7,3',4'-tetrahydroxyflavanone, [2] taxifolin; 3,5,7, 3',4'-pentahydroxyflavanone และ [3] 5,7,3'-trihydroxy-4'-methoxyflavanone ด้วยเทคนิค ESI-MS/MS แบบ positive ion mode	77
รูป 4.8 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ [4] apigenin; 5,7,4'-trihydroxyflavone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ positive ion mode	79
รูป 4.9 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ [5] luteolin; 5,7,3',4'-tetrahydroxyflavone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ positive ion mode	79
รูป 4.10 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ [6] 5,7, 3',4',5'-pentahydroxyflavone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ positive ion mode	80
รูป 4.11 ค่า relative ion signal intensity ของไอออนที่พบใน MS/MS spectra จากการวิเคราะห์ด้วย collision energy 20, 25 และ 30 eV ของ [4] apigenin; 5,7,4'-trihydroxyflavone, [5] luteolin; 5,7,3',4'-tetrahydroxyflavone และ [6] 5,7, 3',4',5'-pentahydroxyflavone ด้วยเทคนิค ESI-MS/MS แบบ positive ion mode	81
รูป 4.12 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ [7] acacetin; 5,7-dihydroxy- 4'-methoxyflavone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ positive ion mode	82
รูป 4.13 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ [8] diosmetin; 5,7, 3'-trihydroxy-4'-methoxyflavone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ positive ion mode	83

	หน้า
รูป 4.14 ค่า relative ion signal intensity ของไอออนที่พบใน MS/MS spectra จากการวิเคราะห์ด้วย collision energy 20, 25 และ 30 eV ของ [7] acacetin; 4'-methoxy-5,7-dihydroxyflavone และ [8] 4'-methoxy-5,7,3'-trihydroxyflavone ด้วยเทคนิค ESI-MS/MS แบบ positive ion mode	83
รูป 4.15 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ [9] galengin; 3,5,7-trihydroxyflavone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ positive ion mode	84
รูป 4.16 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ [10] fisetin; 3,7,3',4'-tetrahydroxyflavone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ positive ion mode	85
รูป 4.17 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ [11] kaempferol; 3,5,7,4'-tetrahydroxyflavone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ positive ion mode	85
รูป 4.18 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ [12] quercetin; 3,5,7, 3',4'-pentahydroxyflavone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ positive ion mode	86
รูป 4.19 ค่า relative ion signal intensity ของไอออนที่พบใน MS/MS spectra จากการวิเคราะห์ด้วย collision energy 20, 25 และ 30 eV ของ [9] galengin; 3,5,7-trihydroxyflavone, [10] fisetin; 3,7,3',4'-tetrahydroxyflavone, [11] kaempferol; 3,5,7,4'-tetrahydroxyflavone และ [12] quercetin; 3,5,7, 3',4'-pentahydroxyflavone เทคนิค ESI-MS/MS แบบ positive ion mode	87
รูป 4.20 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ [13] myricetin; 3,5,7, 3',4',5'-hexahydroxyflavone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ positive ion mode	89
รูป 4.21 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ [14] kaempferid; 3,5,7,-trihydroxy-4'-methoxyflavone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ positive ion mode	89
รูป 4.22 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ [15] isorhamnetin; 3,5,7, 4'-tetrahydroxy-3'-methoxyflavone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ positive ion mode	90

	หน้า
รูป 4.23 ค่า relative ion signal intensity ของไอออนที่พบใน MS/MS spectra จากการวิเคราะห์ด้วย collision energy 20, 25 และ 30 eV ของ [13] myricetin; 3,5,7, 3',4',5'-hexahydroxyflavone, [14] kaempferid; 3,5,7,-trihydroxy-4'-methoxyflavone และ[15] isorhamnetin; 3,5,7, 4'-tetrahydroxy-3'-methoxyflavone ด้วยเทคนิค ESI-MS/MS แบบ positive ion mode	91
รูป 4.24 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ [16] genistein; 5,7,4'-trihydroxyisoflavone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ positive ion mode	93
รูป 4.25 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ [17] 5,7-dihydroxy-4'-methoxyisoflavone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ positive ion mode	93
รูป 4.26 ค่า relative ion signal intensity ของไอออนที่พบใน MS/MS spectra จากการวิเคราะห์ด้วย collision energy 20, 25 และ 30 eV ของ [16] genistein; 5,7,4'-trihydroxyisoflavone และ [17] 5,7-dihydroxy-4'-methoxyisoflavone ด้วยเทคนิค ESI-MS/MS แบบ positive ion mode	94
รูป 4.27 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ [1] eriodictyol; 5,7,3',4'-tetrahydroxyflavanone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ negative ion mode	95
รูป 4.28 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ 3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavanone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ negative ion mode	95
รูป 4.29 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ 4'-methoxy-5,7,3'-trihydroxyflavanone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ negative ion mode	96
รูป 4.30 ค่า relative ion signal intensity ของไอออนที่พบใน MS/MS spectra จากการวิเคราะห์ด้วย collision energy 20, 25 และ 30 eV ของ [1] eriodictyol; 5,7,3',4'-tetrahydroxyflavanone, [2] taxifolin; 3,5,7, 3',4'-pentahydroxyflavanoneและ [3] 5,7,3'-trihydroxy-4'-methoxyflavanone ด้วยเทคนิค ESI-MS/MS แบบ negative ion mode	97

	หน้า
รูป 4.31 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ 5,7,4'-trihydroxyflavone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ negative ion mode	98
รูป 4.32 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ 5,7,3',4'-tetrahydroxyflavone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ negative ion mode	99
รูป 4.33 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ 5,7,3',4',5'-pentahydroxyflavone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ negative ion mode	99
รูป 4.34 ค่า relative ion signal intensity ของไอออนที่พบใน MS/MS spectra จากการวิเคราะห์ด้วย collision energy 20, 25 และ 30 eV ของ [4] apigenin; 5,7,4'-trihydroxyflavone, [5] luteolin; 5,7,3',4'-tetrahydroxyflavone และ [6] 5,7, 3',4',5'-pentahydroxyflavone ด้วยเทคนิค ESI-MS/MS แบบ negative ion mode	100
รูป 4.35 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ [7] 4'-methoxy-5,7-dihydroxyflavone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ negative ion mode	101
รูป 4.36 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ [8] 4'-methoxy-5,7,3'-trihydroxyflavone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ negative ion mode	102
รูป 4.37 ค่า relative ion signal intensity ของไอออนที่พบใน MS/MS spectra จากการวิเคราะห์ด้วย collision energy 20, 25 และ 30 eV ของ [7] acacetin; 4'-methoxy-5,7-dihydroxyflavone และ [8] 4'-methoxy-5,7,3'-trihydroxyflavone ด้วยเทคนิค ESI-MS/MS แบบ negative ion mode	102
รูป 4.38 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ [9] 3,5,7-trihydroxyflavone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ negative ion mode	103
รูป 4.39 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ [10] 3,5,7,4'-tetrahydroxyflavone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ negative ion mode	104
รูป 4.40 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ [11] 3,7,3',4'-tetrahydroxyflavone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ negative ion mode	104

รูป 4.41	รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ [12] 3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ negative ion mode	105
รูป 4.42	ค่า relative ion signal intensity ของไอออนที่พบใน MS/MS spectra จากการวิเคราะห์ด้วย collision energy 20, 25 และ 30 eV ของ [9] galengin; 3,5,7-trihydroxyflavone, [10] fisetin; 3,7,3',4'-tetrahydroxyflavone, [11] kaempferol; 3,5,7,4'-tetrahydroxyflavone และ [12] quercetin; 3,5,7, 3',4'-pentahydroxyflavone เทคนิค ESI-MS/MS แบบ negative ion mode	106
รูป 4.43	รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ [13] 3,5,7,3',4',5'-pentahydroxyflavone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ negative ion mode	108
รูป 4.44	รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ [14] 4'-methoxy-3,5,7-trihydroxyflavone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ negative ion mode	108
รูป 4.45	รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ [15] 3'-methoxy-3,5,7,4'-tetrahydroxyflavone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ negative ion mode	109
รูป 4.46	ค่า relative ion signal intensity ของไอออนที่พบใน MS/MS spectra จากการวิเคราะห์ด้วย collision energy 20, 25 และ 30 eV ของ [13] myricetin; 3,5,7, 3',4',5'-hexahydroxyflavone, [14] kaempferid; 3,5,7,-trihydroxy-4'-methoxyflavone และ [15] isorhamnetin; 3,5,7, 4'-tetrahydroxy-3'-methoxyflavone ด้วยเทคนิค ESI-MS/MS แบบ negative ion mode	110
รูป 4.47	รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ [16] 5,7,4'-trihydroxy isoflavone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ negative ion mode	112
รูป 4.48	รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ [17] 4'-methoxy-5,7-dihydroxyisoflavone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ positive ion mode	112
รูป 4.49	ค่า relative ion signal intensity ของไอออนที่พบใน MS/MS spectra จากการวิเคราะห์ด้วย collision energy 20, 25 และ 30 eV ของ [16] genistein; 5,7,4'-trihydroxyisoflavone และ [17] 5,7-dihydroxy-4'-methoxyisoflavone ด้วยเทคนิค ESI-MS/MS แบบ negative ion mode	113

	หน้า
รูป 4.50 อัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของฟลาโวนอยด์ที่ตรวจพบต่อพีคพื้นที่ใต้พีคของ internal standard ที่ได้จากการวิเคราะห์สารสกัดจากรำข้าวพันธุ์ไทย จำนวน 8 พันธุ์	117
รูป 4.51 Chromatograms จากการวิเคราะห์สารสกัดข้าวดำพันธุ์ไทยด้วยเทคนิค HPLC-DAD-ESI-MS/MS	118
รูป 4.52 รูปแบบการแตกตัวของไอออนที่สำคัญและ MSMS spectrum ของ 5,3',4',5'-tetrahydroxyflavone-7-O-glucoside (F1) ที่ได้จากการวิเคราะห์สารสกัดจากรำข้าวดำพันธุ์ไทย ของพีคที่เวลารีเทนชัน 19.3 นาที ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ negative ion mode	118
รูป 4.53 การแตกตัวของไอออนที่สำคัญและ MSMS spectrum ของ 5, 3',4',5'-tetrahydroxyflavanone-7-O-glucoside (F2) ที่ได้จากการวิเคราะห์สารสกัดจากรำข้าวดำพันธุ์ไทย ของพีคที่เวลารีเทนชัน 34.6 นาที ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ negative ion mode	119
รูป 4.54 การแตกตัวของไอออนที่สำคัญและ MSMS spectrum ของ 5,6, 3',4',5'-pentahydroxyflavone-7-O-glucoside (F3) ที่ได้จากการวิเคราะห์สารสกัดจากรำข้าวดำพันธุ์ไทย ของพีคที่เวลารีเทนชัน 43.1 นาที ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ negative ion mode	119
รูป 4.55 การแตกตัวของไอออนที่สำคัญและ MSMS spectrum ของ Taxifolin-3-O-glucoside (F4) ที่ได้จากการวิเคราะห์สารสกัดจากรำข้าวดำพันธุ์ไทย ของพีคที่เวลารีเทนชัน 41.76 นาที ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ negative ion mode	120
รูป 4.56 การแตกตัวของไอออนที่สำคัญและ MSMS spectrum ของ Taxifolin (F5) ที่ได้จากการวิเคราะห์สารสกัดจากรำข้าวดำพันธุ์ไทย ของพีคที่เวลารีเทนชัน 41.76 นาที ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ negative ion mode	120
รูป 4.57 การแตกตัวของไอออนที่สำคัญและ MSMS spectrum ของ quertagetin-7-O-glucoside (F6) ที่ได้จากการวิเคราะห์สารสกัดจากรำข้าวดำพันธุ์ไทย ของพีคที่เวลารีเทนชัน 51.9 นาที ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ negative ion mode	121

	หน้า
รูป 4.58 การแตกตัวของไอออนที่สำคัญและ MSMS spectrum ของ myricetin-7-O-glucoside (F7) ที่ได้จากการวิเคราะห์สารสกัดจากรำข้าวดำพันธุ์ไทย ของพืชที่เวลาริเทนชัน 53.1 นาที ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ negative ion mode	121
รูป 4.59 การแตกตัวของไอออนที่สำคัญและ MSMS spectrum ของ Quercetin-3-O-glucoside (F8) ที่ได้จากการวิเคราะห์สารสกัดจากรำข้าวดำพันธุ์ไทย ของพืชที่เวลาริเทนชัน 66.7 นาที ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ negative ion mode	122
รูป 4.60 การแตกตัวของไอออนที่สำคัญและ MSMS spectrum rutin; Quercetin-3-O-rutinoside (F9) ที่ได้จากการวิเคราะห์สารสกัดจากรำข้าวดำพันธุ์ไทย ของพืชที่เวลาริเทนชัน 67.2 นาที ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ negative ion mode	122
รูป 4.61 การแตกตัวของไอออนที่สำคัญและ MSMS spectrum ของ isorhamnetin-3-O-glucoside (F10) ได้จากการวิเคราะห์สารสกัดจากรำข้าวดำพันธุ์ไทย ของพืชที่เวลาริเทนชัน 77.5 นาที ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ negative ion mode	123
รูป 4.62 การแตกตัวของไอออนที่สำคัญและ MSMS spectrum ของ isorhamnetin-3-O-rutinoside (F11) ที่ได้จากการวิเคราะห์สารสกัดจากรำข้าวดำพันธุ์ไทย ของพืชที่เวลาริเทนชัน 79.6 นาที ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ negative ion mode	123
รูป 4.63 การแตกตัวของไอออนที่สำคัญและ MSMS spectrum ของ quercetin (F12) ที่ได้จากการวิเคราะห์สารสกัดจากรำข้าวดำพันธุ์ไทย ของพืชที่เวลาริเทนชัน 68.9 นาที ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ negative ion mode	124
รูป 4.64 การแตกตัวของไอออนที่สำคัญและ MSMS spectrum ของ isorhamnetin-3-O-acetylglucoside (F13) ที่ได้จากการวิเคราะห์สารสกัดจากรำข้าวดำพันธุ์ไทย ของพืชที่เวลาริเทนชัน 87.9 นาที ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ negative ion mode	124
รูป 4.65 การแตกตัวของไอออนที่สำคัญและ MSMS spectrum ของ 3,5, 3'-trihydroxy-4'-methoxyflavone (F14) ที่ได้จากการวิเคราะห์สารสกัดจากรำข้าวดำพันธุ์ไทย ของพืชที่เวลาริเทนชัน 91.9 นาที ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ negative ion mode	125

	หน้า
รูป 4.66 การแตกตัวของไอออนที่สำคัญและ MSMS spectrum ของ 3,5,7, 3'-tetrahydroxy-4'-methoxyflavone (F15) ที่ได้จากการวิเคราะห์สารสกัดจากรำข้าวดำพันธุ์ไทย ของพืชที่เวลาริเทนชัน 100.3 นาที ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ negative ion mode	125
รูป 4.67 การแตกตัวของไอออนที่สำคัญและ MSMS spectrum ของ isorhamnetin (F16) ที่ได้จากการวิเคราะห์สารสกัดจากรำข้าวดำพันธุ์ไทย ของพืชที่เวลาริเทนชัน 111.1 นาที ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ negative ion mode	126
รูป 5.1 (A) HPLC-DAD chromatograms สามมิติของสารสกัดจากรำข้าวหอมนิลพันธุ์ BD ที่ scan ในช่วง 260-600 nm (B) HPLC-DAD chromatogram ที่ 520 nm และ (C) LC-MS total ion chromatogram (TIC) ของสารสกัดเดียวกัน	128
รูป 5.2 Mass spectra ของ peak 1 (A) และ peak 2 (B) บน HPLC-MS total ion chromatogram ของสารสกัดจากรำข้าวหอมนิลพันธุ์ BD	129
รูป 5.3 Product ion mass spectra of anthocyanin aglycones ของ parent ions ที่ m/z 287 (A) และ 301 (B) วิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS (Q-TOF) โดยใช้ collision energy 35 eV	131
รูป 5.4 แสดงเปรียบเทียบปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside และ peonidin-3-O-glucoside ในสารสกัดจากรำข้าวสีดำ 4 พันธุ์	134
รูป 5.5 ลักษณะสีของใบ กาบใบ และรวงข้าวพันธุ์ (A) BGMSN 11 และ (B) ก่ำดอยสะเก็ด	135
รูป 5.6 HPLC-MS chromatogram ของสารสกัดจากใบข้าวสีดำพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ด วิเคราะห์โดยใช้สภาวะที่เหมาะสม	136
รูป 5.7 HPLC-DAD chromatogram ที่ความยาวคลื่น 520 nm ของสารสกัดจากเมล็ดข้าวสีดำพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ด	137
รูป 5.8 UV-Vis spectra ขององค์ประกอบใน peak 1 (A) และ peak 2 (B) บน HPLC-DAD chromatogram ที่ความยาวคลื่น 520 nm ของสารสกัดจากเมล็ดข้าวสีดำพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ด	138
รูป 5.9 HPLC-ESI-MS chromatogram ของสารสกัดจากเมล็ดข้าวสีดำพันธุ์ (A) BGMSN 11 และ (B) ก่ำดอยสะเก็ด (Cy = cyanidin-3-O-glucoside; Pe = peonidin-3-O-glucoside)	139

	หน้า
รูป 5.10 HPLC-ESI-MS chromatogram ของสารสกัดจากใบข้าวสาลีดำพันธุ์ BGMSN 11 และ (B) ก่ำดอยสะเก็ด (Cy = cyanidin-3-O-glucoside; Pe = peonidin-3-O-glucoside)	140
รูป 5.11 Product ion mass spectra ของ cyanidin-3-O-xyloside glucoside ได้จาก ESI-MS/MS (Q-TOF) ของไอออนที่ m/z 581 ใช้ collision energy: (A) 25 V, (B) 22 V, (C) 20 V, (D) 17 V และ (E) 15 V	141
รูป 5.12 Product ion mass spectra ของ cyanidin-3-O-(p-coumaroyl)glucoside-5-O-glucoside ได้จาก ESI-MS/MS (Q-TOF) ของไอออนที่ m/z 757 ใช้ collision energy: (A) 25 V, (B) 22 V, (C) 20 V, (D) 17 V และ (E) 15 V	142
รูป 5.13 HPLC-ESI-MS chromatogram ของสารสกัดจากใบข้าวสาลีดำพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ด (A) mass chromatogram; m/z 595 แสดงตำแหน่งของ peak ที่ 38.83 min (B) Total ion chromatogram	143
รูป 5.14 ESI-MS (A) และ ESI-MS/MS (B) mass spectra ของ peak ที่ 38.83 min บน chromatogram ของสารสกัดจากใบข้าวสาลีดำพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ด	144
รูป 5.15 HPLC-ESI-MS chromatogram ของสารสกัดจากใบข้าวสาลีดำพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ด (A) mass chromatogram; m/z 773 แสดงตำแหน่งของ peak ที่ 65.93 min (B) Total ion chromatogram	145
รูป 5.16 ESI-MS (A) และ ESI-MS/MS (B) mass spectra ของ peak ที่ 65.93 min บน chromatogram ของสารสกัดจากใบข้าวสาลีดำพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ด	146
รูป 5.17 HPLC-ESI-MS chromatogram ของสารสกัดจากใบข้าวสาลีดำพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ด mass chromatogram; m/z 581 แสดงตำแหน่งของ peak ที่ 50.25 และ 53.26 min (B) Total ion chromatogram	147
รูป 5.18 ESI-MS (A) และ ESI-MS/MS mass spectra ของ peak ที่ 50.25 และ 53.26 (C) min บน chromatogram ของสารสกัดจากใบข้าวสาลีดำพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ด	148
รูป 5.19 HPLC-ESI-MS chromatogram ของสารสกัดจากใบข้าวสาลีดำพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ด (A) mass chromatogram; m/z 611 แสดงตำแหน่งของ peak ที่ 56.92 min (B) Total ion chromatogram	149
รูป 5.20 ESI-MS (A) และ ESI-MS/MS (B) mass spectra ของ peak ที่ 56.92 min บน chromatogram ของสารสกัดจากใบข้าวสาลีดำพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ด	150
รูป 5.21 HPLC-ESI-MS chromatogram ของสารสกัดจากใบข้าวสาลีดำพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ด (A) mass chromatogram; m/z 757 แสดงตำแหน่งของ peak ที่ 72.00 min (B) Total ion chromatogram	151

	หน้า
รูป 5.22 ESI-MS (A) และ ESI-MS/MS (B) mass spectra ของ peak ที่ 72.00 min บน chromatogram ของสารสกัดจากใบข้าวสีดำพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ด	152
รูป 5.23 HPLC-ESI-MS chromatogram ของสารสกัดจากใบข้าวสีดำพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ด (A) mass chromatogram; m/z 787 แสดงตำแหน่งของ peak ที่ 72.20 min (B) Total ion chromatogram	153
รูป 5.24 ESI-MS (A) และ ESI-MS/MS (B) mass spectra ของ peak ที่ 72.20 min บน chromatogram ของสารสกัดจากใบข้าวสีดำพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ด	154
รูป 5.25 HPLC-ESI-MS chromatogram ของสารสกัดจากใบข้าวสีดำพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ด (A) mass chromatogram; m/z 625 แสดงตำแหน่งของ peak ที่ 75.02 min (B) Total ion chromatogram	155
รูป 5.26 ESI-MS (A) และ ESI-MS/MS (B) mass spectra ของ peak ที่ 75.02 min บน chromatogram ของสารสกัดจากใบข้าวสีดำพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ด	156
รูป 5.27 HPLC-ESI-MS chromatogram ของสารสกัดจากใบข้าวสีดำพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ด (A) mass chromatogram; m/z 741 แสดงตำแหน่งของ peak ที่ 88.91 min (B) Total ion chromatogram	157
รูป 5.28 ESI-MS (A) และ ESI-MS/MS (B) mass spectra ของ peak ที่ 88.91 min บน chromatogram ของสารสกัดจากใบข้าวสีดำพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ด	158
รูป 5.29 HPLC-ESI-MS chromatogram ของสารสกัดจากใบข้าวสีดำพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ด (A) mass chromatogram; m/z 801 แสดงตำแหน่งของ peak ที่ 89.42 min (B) Total ion chromatogram	159
รูป 5.30 ESI-MS/MS spectrum ของ parent ion ที่ m/z 331 ของ peak ที่ 89.42 min บน chromatogram ของสารสกัดจากใบข้าวสีดำพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ด	160
รูป 5.31 ESI-MS/MS spectrum ของ parent ion ที่ m/z 801 ของ peak ที่ 89.42 min บน chromatogram ของสารสกัดจากใบข้าวสีดำพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ด	160
รูป 5.32 ตำแหน่งของ anthocyanins ที่พบบน HPLC profiles ของสารสกัดจากใบของ ข้าวก่ำพันธุ์ BGMSN 11 และก่ำดอยสะเก็ด	163
รูป 5.33 ตำแหน่งของ anthocyanins ที่พบบน HPLC profiles ของสารสกัดจากเมล็ดของ ข้าวก่ำพันธุ์ BGMSN 11 และก่ำดอยสะเก็ด	164
รูป 5.34 Relative contents ของ anthocyanins ในสารสกัดจากใบและเมล็ดข้าวพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ดและ BGMSN 11 ที่แต่ละระยะการเจริญเติบโต วิเคราะห์โดย HPLC-ESI-MS	166

สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 2.1 แสดง anthocyanins ที่มีอยู่ในธรรมชาติ	17
ตาราง 4.1 flavonoids ที่ใช้ในการศึกษา	61
ตาราง 4.2 การดูดกลืนคลื่นแสงที่ระดับความยาวคลื่น 200-400 nm ของ flavonoid	62
ตาราง 4.3 ลำดับการแยกของ flavonoids 17 ชนิดเมื่อใช้ตัวทำละลายอินทรีย์คือ methanol, acetonitrile และ isopropanol ในการแยกด้วยระบบ HPLC แบบ reversed phase	65
ตาราง 4.4 สภาวะของเครื่อง ESI-MS/MS ของการวิเคราะห์แบบ positive ion mode ในการศึกษาอิทธิพลของ collision energy ต่อรูปแบบการแตกตัวของ flavonoid	70
ตาราง 4.5 สภาวะของเครื่อง ESI-MS/MS ของการวิเคราะห์แบบ negative ion mode ในการศึกษาอิทธิพลของ collision energy ต่อรูปแบบการแตกตัวของ flavonoid	71
ตาราง 4.6 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญของ flavonoid จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ESI-MSMS แบบ positive และ negative ion mode ซึ่งประกอบด้วย neutral and radical losses และ C-ring cleavages	74
ตาราง 4.7 สภาวะของเครื่อง HPLC-ESI-MS/MS ของการวิเคราะห์แบบ negative ion mode ในการวิเคราะห์สารสกัดจากรำข้าวดำพันธุ์ไทย	115
ตาราง 4.8 ปริมาณสัมพัทธ์คำนวณจากอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของ flavonoids ที่ตรวจพบต่อพีคพื้นที่ใต้พีคของ internal standard ที่ได้จากการวิเคราะห์สารสกัดจากรำข้าวดำพันธุ์ไทยจำนวน 8 พันธุ์	117
ตาราง 5.1 สภาวะที่เหมาะสมของการแยกสารกลุ่ม anthocyanins ในสารสกัดจากรำข้าวดำด้วยเทคนิค HPLC-DAD และ HPLC-MS	127
ตาราง 5.2 สภาวะที่เหมาะสมของการแยกสารกลุ่ม anthocyanins ในสารสกัดจากรำข้าวดำด้วยเทคนิค HPLC-DAD และ HPLC-MS	132
ตาราง 5.3 ความเข้มข้นของ anthocyanin pigments ในสารสกัดจากรำข้าว	134
ตาราง 5.4 สภาวะที่เหมาะสมของการแยกสารกลุ่ม anthocyanins ในสารสกัดจากใบและเมล็ดข้าวดำด้วยเทคนิค HPLC-DAD และ HPLC-MS	136
ตาราง 5.5 พีคของสารที่เป็นองค์ประกอบของสารสกัดจากใบข้าวดำที่มีค่า m/z เท่ากับ molecular ion ของ anthocyanins	140
ตาราง 5.6 ค่า collision energy ที่เหมาะสมของ anthocyanins แต่ละกลุ่มโครงสร้าง	142

	หน้า
ตาราง 5.7 Anthocyanins ที่พบในสารสกัดจากใบของข้าวกล้าพันธุ์ BGMSN 11 และกล้าดอย สะเก็ด	161
ตาราง 5.8 Anthocyanins ที่พบในสารสกัดจากเมล็ดของข้าวกล้าพันธุ์ BGMSN 11 และกล้า ดอยสะเก็ด	162

บทที่ 1

บทนำ

โครงการการวิเคราะห์สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ในข้าวสีพันธุ์ไทย เป็นโครงการวิจัยที่ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ร่วมกับสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) ได้ดำเนินโครงการโดยใช้ระยะเวลาทั้งสิ้น 3 ปี 8 เดือน 1 มิถุนายน 2548 – 31 มกราคม 2552 ได้รับงบประมาณทั้งสิ้นจำนวน 1,200,000.00 บาท โดยนอกจากหัวหน้าโครงการวิจัยซึ่งเป็นผู้วิจัยหลักแล้ว ยังมีนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาเป็นผู้ช่วยวิจัยโดยมีหัวข้อวิทยานิพนธ์เกี่ยวข้องกับส่วนของงานวิจัยในโครงการนี้ ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงประกอบด้วย

- | | |
|---|---------------------------------------|
| 1. รองศาสตราจารย์ ดร. สุกัญญา วงศ์พรชัย | หัวหน้าโครงการ |
| 2. นายทินกร สีเสียดคำ | ผู้ช่วยวิจัย (นักศึกษาระดับปริญญาเอก) |
| 3. นางมณฑนา นครเรียบ | ผู้ช่วยวิจัย (นักศึกษาระดับปริญญาเอก) |
| 4. นายกฤษดา ปิติจะ | ผู้ช่วยวิจัย (นักศึกษาระดับปริญญาโท) |

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ปัจจุบันความต้องการอาหารที่มีคุณสมบัติเป็น “อาหารเพื่อสุขภาพ” (functional food) มีแนวโน้มสูงขึ้นทั้งในและต่างประเทศ โดยเฉพาะประเทศผู้นำทางเศรษฐกิจ เช่น สหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น และประเทศในแถบตะวันตก ทั้งนี้เนื่องมาจากผลการวิเคราะห์ทางสาธารณสุขของประเทศเหล่านี้ในทศวรรษที่ผ่านมา พบว่าประชากรยังขาดความเอาใจใส่ในการรับประทานอาหารที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพซึ่งเชื่อต่อมาว่าเป็นวิธีที่สามารถป้องกันโรคบางชนิดได้ เช่น โรคที่เกี่ยวกับหัวใจ มะเร็ง และความดัน ในขณะที่เดียวกันรัฐบาลของหลายประเทศต้องเผชิญกับปัญหาการสูญเสียงบประมาณปีละมากมายในการรักษาโรคและให้บริการด้านสาธารณสุขแก่ประชาชน หลายประเทศจึงได้เริ่มตระหนักถึงความสำคัญของการป้องกันการเกิดโรค โดยรณรงค์ให้ประชาชนบริโภคอาหารที่ไม่เสี่ยงต่อการเกิดโรค พร้อมกับสนับสนุนให้มีการศึกษาวิจัยในด้านอาหารเพื่อสุขภาพ ซึ่งจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในการดูแลสุขภาพด้วยตนเองของประชาชน

แม้จะเป็นประเทศที่อยู่ในเขตที่มีความอุดมสมบูรณ์ของพืชสมุนไพรและธัญพืช ประเทศไทยเราไม่ได้เป็นหนึ่งในผู้นำในด้านการตลาดของอาหารเพื่อสุขภาพและอาหารเสริมแต่อย่างใด ในทางตรงกันข้ามประเทศไทยในขณะนี้ ยังต้องสูญเสียรายได้ส่วนหนึ่งไปกับการนำเข้าอาหารเพื่อสุขภาพ และอาหารเสริมที่สั่งเข้ามาจากต่างประเทศและคาดว่าจะทวีมูลค่าขึ้นในอนาคต ที่เป็นเช่นนี้น่าจะเป็นผลมาจากการไม่ตื่นตัวของภาครัฐในการสนับสนุนการวิจัยเพื่อให้เกิดการจัดการทรัพยากร และนำไปสู่การได้มาซึ่งผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพที่ดีและมีประสิทธิภาพอย่างเป็นระบบ สาเหตุอีกประการอาจเนื่องมาจากการขาดแคลนทรัพยากรบุคคล เทคโนโลยี และห้องปฏิบัติการวิจัยที่สมบูรณ์แบบ ในขณะที่หลายประเทศได้มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับคุณภาพและฤทธิ์ของอาหารเสริมและอาหารเพื่อสุขภาพก้าวไกลไปถึงระดับโมเลกุลและพิษวิทยาแล้ว ซึ่งข้อมูล

ทางการวิจัยเหล่านี้สามารถสร้างความเชื่อมั่นให้ผู้บริโภคได้ดีกว่าอาหารเพื่อสุขภาพระดับท้องถิ่นที่มีขายกันทั่วไปในตลาดบ้านเรา แม้สินค้าเพื่อสุขภาพเหล่านี้จะมีประโยชน์ต่อสุขภาพอย่างแท้จริงก็ตาม

การวิจัยพื้นฐานในระดับโมเลกุลทางด้านอาหารเพื่อสุขภาพในประเทศไทย จึงนับว่ายังอยู่ในระยะเริ่มต้น โดยเฉพาะเมื่อเทียบกับการวิจัยด้านเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติโดยเฉพาะเคมีทางยา ที่ได้นำพืชสมุนไพรมาศึกษาหาโครงสร้างทางเคมีของสารออกฤทธิ์ และสังเคราะห์ขึ้นเลียนแบบผลิตเป็นยารักษาโรค ในแง่ของอาหารเพื่อสุขภาพหรือ “functional food” นั้น เน้นการบริโภคอาหารเพื่อสุขภาพหรือบริโภคส่วนสกัดของอาหารควบคู่ไปกับมื้ออาหารปกติเพื่อประโยชน์ต่อสุขภาพของร่างกายและก่อให้เกิดภูมิคุ้มกันโรค โดยไม่ได้เน้นที่การรักษาหรือการเติมเต็มในส่วนที่ขาดไป อย่างเช่นในกรณีของยาและอาหารเสริมตามลำดับ อาหารประเภทที่สามารถจัดเป็นกลุ่มอาหารเพื่อสุขภาพได้นั้น จึงต้องมีส่วนประกอบของสารออกฤทธิ์ที่ให้ประโยชน์ต่อร่างกายในปริมาณที่ก่อให้เกิดประโยชน์จริง ในกรณีของสารสกัดต้องแน่ใจว่าสารออกฤทธิ์ไม่สูญเสีย หรือเปลี่ยนรูปไปในระหว่างขั้นตอนของการสกัด คำตอบของปัญหาเหล่านี้จึงต้องอาศัยกระบวนการศึกษาการวิจัยเพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานในระดับ โมเลกุล โดยเฉพาะโครงสร้างทางเคมี และปริมาณหรือความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์แต่ละตัวในอาหารนั้น ๆ เป็นอันดับแรก ต่อจากนั้นจึงศึกษาการแปรรูปเป็นส่วนสกัด อายุการเก็บรักษา ตลอดจนความเป็นพิษต่อร่างกายในระยะยาว ซึ่งการวิจัยแบบครบวงจรจำเป็นต้องอาศัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีหลายแขนงเข้าร่วมกัน

ธัญพืชซึ่งได้แก่พืชที่ให้เมล็ดสำหรับใช้เป็นอาหาร เช่น ข้าว ข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าวไรน์ และข้าวโอ๊ต เป็นอาหารกลุ่มที่ได้รับความนิยมอย่างมากในการบริโภคหรือแปรรูปเป็นอาหารเพื่อสุขภาพ โดยเฉพาะข้าวซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย การเป็นผู้นำในการผลิตและส่งออกข้าวมาเป็นเวลาช้านานนั้น ก่อให้เกิดการสนับสนุนการวิจัยจากภาครัฐ ที่มุ่งเน้นการจัดการการเพาะปลูกข้าวและการปรับปรุงพันธุ์เพื่อเพิ่มผลผลิต จนเกิดความหลากหลายของข้าวพันธุ์ใหม่ที่ได้คุณภาพผลผลิตสูงตรงตามความต้องการของตลาด นอกจากนี้งานวิจัยบางส่วนยังได้เน้นไปที่การแปรรูปผลผลิตข้าวในเชิงพาณิชย์ เช่น ผลิตเป็นแป้ง และเส้น อย่างไรก็ตามงานวิจัยที่เกี่ยวกับการศึกษาคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์ข้าวเพื่อแปรรูปในลักษณะของอาหารเพื่อสุขภาพนั้นยังไม่มีแพร่หลายนัก แม้จะมีผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพที่ผลิตจากข้าววางขายแล้วในท้องตลาดก็ตาม

การวิจัยเกี่ยวกับองค์ความรู้พื้นฐานทางเคมีของสารออกฤทธิ์ที่มีบทบาทในเชิงอาหารเพื่อสุขภาพของข้าว นั้น นับเป็นกลไกสำคัญที่จะให้ข้อมูลเชิงวิทยาศาสตร์ที่เป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวหรือจากผลิตผลพลอยได้จากข้าวให้เป็นอาหารเพื่อสุขภาพได้เป็นอย่างดี และข้อมูลเหล่านี้จะสามารถสร้างความมั่นใจให้แก่ผู้บริโภค อีกทั้งทำให้ผลิตภัณฑ์เป็นที่ยอมรับในตลาดต่างประเทศที่มักเน้นคุณภาพและความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ โดยมีข้อมูลจากการศึกษาและวิจัยในห้องปฏิบัติการเป็นหลักฐาน

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้มีรายงานแล้วของพืชตระกูลข้าวที่สำคัญคือ สารกลุ่ม vitamin E และ γ -oryzanol ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ที่สำคัญ และคาด

ว่ามีฤทธิ์ในเชิงต้านมะเร็ง (anti-cancer effect) โดยสารกลุ่มดังกล่าวพบมากในส่วนของรำข้าว ซึ่งเป็นผลผลิตพลอยได้ (by product) จากกระบวนการสีข้าว น้ำมันจากรำข้าวจึงเป็นผลิตภัณฑ์ที่ปัจจุบันได้รับความสนใจอย่างมากจากอุตสาหกรรมเครื่องสำอางและอาหารเสริมโดยเฉพาะในต่างประเทศ

รำของพันธุ์ข้าวที่มีสี (pigmented or colored rice) เช่น ข้าวสีแดง ข้าวสีดำ และข้าวสีม่วง (ข้าวเก่า) มีองค์ประกอบที่เป็นสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญเพิ่มเติมขึ้นมาอีกคือกลุ่ม flavonoids และ polyphenols ซึ่งสารกลุ่มนี้โดยทั่วไปพบว่ามีคุณสมบัติที่สำคัญโดยเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและมีความสามารถในการจับไอออนของโลหะ รำของข้าวสีพันธุ์ต่าง ๆ จึงนับว่าเป็นแหล่งอาหารที่มีศักยภาพมากในการพัฒนาเป็นอาหารเพื่อสุขภาพ นอกจากนี้ผลผลิตพลอยได้อื่น ๆ ของพันธุ์ข้าวสีบางพันธุ์ เช่น แกลบและใบแห้ง ซึ่งมีสีเข้มคาดว่าน่าจะเกิดจากสารกลุ่มเดียวกัน ก็น่าจะสามารถนำมาเพิ่มมูลค่าได้โดยนำมาทำเป็นวัตถุดิบในการสกัดสารออกฤทธิ์ อย่างไรก็ตามองค์ความรู้ทางเคมีเกี่ยวกับชนิด โครงสร้างทางเคมี และปริมาณ รวมถึงประเภทและดีกรีของฤทธิ์ทางชีวภาพของสารองค์ประกอบดังกล่าวในข้าว ควรได้รับการศึกษาวิจัยเพื่อหาข้อมูลเบื้องต้นให้ชัดเจนก่อนเป็นอันดับแรก

โครงการวิจัยนี้จึงได้วางแนวทางการวิจัยที่เน้นการศึกษาเพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานทางเคมีของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยเฉพาะสารกลุ่ม flavonoids ในข้าวสีพันธุ์ที่เพาะปลูกในประเทศไทย เพื่อการพัฒนาในเชิงอาหารเพื่อสุขภาพ โดยประยุกต์วิธีการวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือ (instrumental analysis) ในการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารออกฤทธิ์ดังกล่าว รวมถึงการพัฒนาวิธีการทางเคมีที่มีประสิทธิภาพในการหาปริมาณสารออกฤทธิ์แต่ละตัว เนื่องจากสารที่สนใจดังกล่าวมักเป็นกลุ่มสารที่มีโครงสร้างทางเคมีค่อนข้างซับซ้อน และมีหลายสารที่มีโครงสร้างสัมพันธ์กันแบบไอโซเมอร์ วิธีการวินิจฉัยเอกลักษณ์ของโครงสร้างจึงต้องอาศัยเทคนิคทางเคมีวิเคราะห์ที่มีสมรรถภาพสูงเพื่อให้สามารถวินิจฉัยโครงสร้างทางเคมีได้อย่างถูกต้องชัดเจน นอกจากนี้การวิจัยยังรวมถึงการประยุกต์วิธีการดังกล่าวเพื่อบอกชนิดและปริมาณของสารออกฤทธิ์ในข้าวสีแต่ละพันธุ์ควบคู่ไปกับการหาดีกรีของฤทธิ์เชิงชีวภาพ โดยเน้นฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จากนั้นทำการประเมินศักยภาพของพันธุ์ข้าวสีที่เหมาะสมที่สุดในการนำมาเป็นวัตถุดิบของผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 1.2.1 ประยุกต์เทคนิคควบ chromatography-mass spectrometry ในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพของสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพโดยเฉพาะสารกลุ่ม flavonoids ในข้าวสีพันธุ์ไทย โดยศึกษาทั้งในส่วนของเมล็ดและต้นข้าว
- 1.2.2 พัฒนารูปแบบของเทคนิคการสกัด และเทคนิคควบ chromatography-mass spectrometry ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณของสาร flavonoids ในตัวอย่างข้าวแต่ละประเภท

- 1.2.3 การหาปริมาณสารออกฤทธิ์ดังกล่าวในข้าวสีพันธุ์ต่างๆ เพื่อประเมินศักยภาพของพันธุ์ข้าวสีที่เหมาะสมที่สุดในการนำมาเป็นวัตถุดิบของผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพ

1.3 ระเบียบวิธีและขอบเขตของการวิจัย

- 1.3.1 คัดเลือกพันธุ์ข้าวสี และเตรียมตัวอย่างเมล็ดและต้นข้าว
- 1.3.2 การพัฒนาและประเมินวิธีการสกัด ทั้งแบบเดิมโดยใช้ตัวทำละลายและการสกัดด้วย supercritical fluid extraction (SFE) สำหรับสกัด flavonoids จากตัวอย่างเมล็ดและต้นข้าว พร้อมกับหาดีกรีของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
- 1.3.3 สืบหาปริมาณ total flavonoid ในตัวอย่างข้าวสีพันธุ์ต่างๆ และคัดเลือกพันธุ์ข้าวเพื่อเป็นตัวอย่างในการศึกษาทางด้านเทคนิคการวิเคราะห์
- 1.3.4 การประยุกต์และพัฒนาเทคนิคการแยกองค์ประกอบของสารสกัดโดยการวิเคราะห์แบบ “total analysis” ด้วยเทคนิค HPLC เน้นการแยกองค์ประกอบสารกลุ่ม flavonoids
- 1.3.5 การศึกษาโครงสร้างทางเคมีของ flavonoids ในสารสกัดจากตัวอย่างข้าวสี ด้วยเทคนิค HPLC-DAD-MS หรือ HPLC-MS/MS ควบคู่ไปกับเทคนิคทาง spectroscopy อื่น ๆ
- 1.3.6 การพัฒนาวิธีการหาปริมาณสาร flavonoids ในตัวอย่างข้าวสีแบบ simultaneous analysis และวิธีเทียบจากกราฟมาตรฐาน
- 1.3.7 การหาปริมาณ flavonoids ในข้าวตัวอย่างพันธุ์ต่างๆ ด้วยเทคนิคที่ได้พัฒนาแล้วข้างต้น และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและปริมาณของ flavonoids ในสารสกัดกับดีกรีของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
- 1.3.8 สรุปและประเมินศักยภาพของพันธุ์ข้าวสีที่เหมาะสมที่สุดในการนำมาเป็นวัตถุดิบของผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพ

1.4 การเชื่อมโยงกับนักวิจัยที่เป็นผู้เชี่ยวชาญในสาขาวิชาที่ทำการวิจัย

โครงการวิจัยนี้จะเป็นโครงการที่ได้รับความร่วมมือทางวิชาการระหว่างคณะผู้วิจัยกับศูนย์วิจัยเพื่อเพิ่มผลผลิตทางเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่เป็นแหล่งเก็บรวบรวมพันธุ์ข้าวสีพื้นเมืองจากหลายแหล่งเพาะปลูกในเขตภาคเหนือและภาคอีสาน หน่วยปฏิบัติการค้นหาและใช้ประโยชน์ยีนข้าว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ. กำแพงแสน จ. นครปฐม ซึ่งเป็นหน่วยงานที่สามารถให้ความรู้เกี่ยวกับข้าวสีพันธุ์ต่างๆ ตลอดจนสามารถให้เมล็ดพันธุ์เพื่อการวิจัย ส่วนความร่วมมือกับหน่วยงานในต่างประเทศได้มีความร่วมมือทางการทำงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการประยุกต์เทคนิค chromatography-mass spectrometry กับ Dr. Norman W. Smith, Head of MicroSeparations Group, Pharmaceutical Science Research Division, School of Biomedical & Health Sciences, King's College, University of London ประเทศสหราชอาณาจักร ภายใต้โครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษกที่ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

หากงานวิจัยได้ผลเป็นไปตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ จะสามารถเผยแพร่คุณสมบัติของข้าวสีพันธุ์ไทยในการพัฒนาให้เป็นอาหารเพื่อสุขภาพ ที่ได้รับการยอมรับในแง่ของปริมาณสารออกฤทธิ์เพื่อสุขภาพที่สำคัญ นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้ยังเป็นพื้นฐานในกระบวนการตรวจสอบทางคลินิกหรือพิษวิทยา และกระบวนการแปรรูปผลผลิตข้าวสีไปเป็นสารสกัดเพื่อสุขภาพที่ได้รับการรับรองมาตรฐานและสามารถแข่งขันกับอาหารหรือสารสกัดเพื่อสุขภาพอื่นๆ ได้

บทที่ 2

ทฤษฎีและผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้าว (*Oryza sativa* L.)^[1,2]

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชวงศ์หญ้า (family Gramineae) มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ แบ่งออกเป็น 6 ส่วนดังต่อไปนี้

รากของข้าวมีหน้าที่ยึดลำต้นให้ตั้งตรงและหาอาหารไปเลี้ยงลำต้น รากของข้าวจัดอยู่ในประเภทรากฝอย (fibrous root system)

ต้นของข้าวประกอบด้วยข้อและปล้อง ข้อเป็นที่เกิดของใบ ที่ข้อมีตา ตาจะเจริญขึ้นเป็นหน่อใหม่ซึ่งจะทำให้ข้าวหนึ่งต้นแตกกอขึ้นเป็นหลายต้นได้ ปล้องของข้าวกลวงและมีแถบบวมเล็กอยู่เหนือตำแหน่งตาก่อนที่ข้าวจะสร้างช่อดอก ข้าวจะไม่ยืดปล้องขึ้นมา ลักษณะที่เราเรียกว่า ต้นข้าวในระยะก่อนที่ข้าวจะสร้างช่อดอกนั้นก็คือ ใบและกาบใบ ต้นข้าวจริงจะมีลักษณะสั้นถี่ อยู่เหนือจุดกำเนิดราก หน่อจะเจริญมาจากตา หน่อปฐมภูมิ (primary tiller) จะเจริญมาจากตาของข้อต้นเดิม (main culm) ที่อยู่ต่ำสุดขึ้นมา ฉะนั้นหน่อปฐมภูมิที่เจริญมาจากตาต่ำที่สุด จะมีอายุมากกว่าหน่อปฐมภูมิที่เจริญมาจากตาที่อยู่เหนือขึ้นมา หน่อปฐมภูมิเหล่านี้ จะสามารถเจริญต่อมาเป็นหน่อทุติยภูมิ (secondary tiller) และจากตาของหน่อทุติยภูมิ จะเจริญต่อมาเป็นหน่อตติยภูมิ (tertiary tiller)

ใบข้าว มีลักษณะเป็นแผ่น บาง แฉก และยาว มีกำเนิดจากข้อในทิศทางกลับกัน ตรงข้าม ใบ ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ กาบใบ และตัวใบ กาบใบ (leaf sheath) ซึ่งก็คือก้านใบ (peduncle) ที่เปลี่ยนรูปมานั่นเอง มีกำเนิดมาจากข้อและหุ้มห่อปล้องที่อยู่เหนือขึ้นไป แต่ละข้อจะมีเพียงกาบใบเดียวเท่านั้น ตัวใบ (leaf blade) จะต่อเชื่อมอยู่บนกาบใบตรงที่เรียก ข้อต่อใบ (collar) ตัวใบ เส้นใบ (vein) เป็นเส้นขนานตามลักษณะของพืชใบเลี้ยงเดี่ยว

รวงข้าว คือ ช่อดอก (inflorescence) ของข้าว เกิดที่ปล้องสุดท้าย ระยะตั้งแต่ข้อของปล้องสุดท้ายลงมาถึงกาบใบของใบธง เรียกว่า คอรวง ข้าวต่างๆ จะมีคอรวงสั้นยาวต่างกันไปตามพันธุ์ที่มีลักษณะคอรวงยาว แขนรวง (panicle axis) เกิดขึ้นที่ข้อปล้องสุดท้ายและก็มีข้อ ซึ่งจากข้อเหล่านี้จะเป็นที่เกิดของแขนงปฐมภูมิ (primary branch) และแขนงทุติยภูมิ (secondary) ก็มีกำเนิดมาจากข้อของแขนงปฐมภูมิ ที่แขนงทุติยภูมินี้เป็นที่เกิดก้านดอก (pedicel) และดอกข้าว (spikelet)

ดอกข้าว เป็นดอกสมบูรณ์เพศ (perfect flower) ลักษณะดอกประกอบด้วยเปลือกนอก (glume) 2 แผ่น (ที่เรียกว่าเกลบ ซึ่งก็คือ ใบประดับ หรือ bract) เปลือกนอกแผ่นใหญ่ เรียกว่า lemma มีเส้นที่เปลือกนี้ 5 เส้น ที่ปลายสุด lemma มีลักษณะยื่นออกไปเรียกว่า หางข้าว (awn) ภายใน lemma และ pelea ประกอบด้วยเกสรตัวผู้ (stamen) และเกสรตัวเมีย (pistil) เกสรตัวผู้ประกอบด้วยก้านชูเกสรตัวผู้ (filament) 6 เส้นกำเนิดมาจากฐานดอก ที่ปลายก้านชูเกสรตัวผู้แต่ละเส้นมีอับเรณู (anther) ภายในอับเรณูมีละอองเรณู (pollen grain) เกสรตัวเมียประกอบด้วย รังไข่ (ovary)

เมล็ดข้าวประกอบด้วยส่วนประกอบที่สำคัญคือ เปลือกนอก (hull or husk) หรือส่วนที่เราเรียกว่าแกลบ เปลือกเมล็ด (caryopsis) เป็นส่วนห่อหุ้มแป้งแต่อยู่ภายในแกลบ ประกอบด้วยเนื้อเยื่อ 3 ส่วนด้วยกัน คือ เพริคาร์พ (pericarp) เยื่อหุ้มเมล็ด (seed coat) และชั้นของนูเซลลัส (nucellus) และส่วนของแป้ง (endosperm) ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือชั้นอะลูโรน (aleurone layer) เป็นเนื้อเยื่อนอกสุดของส่วนแป้ง และส่วนที่เป็นเนื้อแป้ง (starch endosperm)

การพัฒนาการในการเจริญเติบโตของข้าว^[3]

การพัฒนาการในการเจริญเติบโตของข้าว ตั้งแต่เมล็ดงอกจนถึงเก็บเกี่ยวแบ่งได้เป็น 3 ช่วง คือ

1. ช่วงการเจริญเติบโตทางใบและลำต้น (Vegetative phase)
2. ช่วงการเจริญเติบโตทางการเจริญพันธุ์ (Reproductive phase)
3. ช่วงการเจริญของเมล็ด (Ripening phase)

1. ช่วงการเจริญเติบโตทางใบและลำต้น (Vegetative phase) การเจริญเติบโตของข้าวในช่วงนี้ แบ่งเป็น 4 ระยะด้วยกัน (รูป 2.1) คือ

ระยะเริ่มงอก (Germination to emergence)

ระยะนี้ข้าวจะเริ่มงอกโดยจะเห็นรากอ่อนงอกออกมาก่อน หลังจากนั้นเยื่อหุ้มยอดอ่อนก็เจริญขึ้น หลังจากเยื่อหุ้มยอดอ่อนเจริญออกมาใบแรกจะเริ่มงอกมาจากเยื่อหุ้มยอดอ่อนนั้น

ระยะกล้า (Seedling stage)

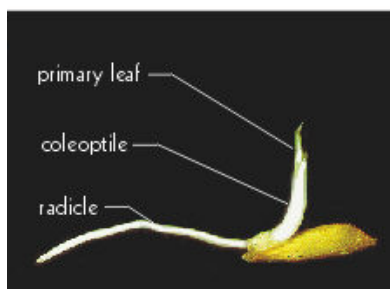
ระยะนี้นับตั้งแต่ใบแรกเจริญขึ้นมาจนถึงระยะก่อนที่หน่อแรกจะเกิดขึ้น เมื่อข้าวมีอายุประมาณ 10 วันแรกแล้ว ควรจะมีใบ 3 ใบ อาหารแป้งในเมล็ดจะถูกนำไปใช้ในการเจริญเติบโตจนหมด ในช่วงนี้ตามปกติใบจะเกิดขึ้น 3-4 ใบต่อวัน ในระยะนี้เช่นกันที่ระบบรากฝอยจะเริ่มพัฒนาขึ้น และรากแรกกำเนิดจะหมดอายุและค่อยๆ สลายตัวไป ระยะนี้กินเวลาประมาณ 18 วัน นับตั้งแต่ข้าวเริ่มงอก

ระยะแตกกอ (Tillering stage)

ระยะแตกกอนับตั้งแต่หน่อปฐม (primary tiller) กำเนิดขึ้นจากตาของข้อที่อยู่ต่ำสุดหน่อปฐมหน่อต่อไปก็จะถือกำเนิดจากตาที่อยู่เหนือๆ ขึ้นมาของต้นข้าวต้นเดิม (main culm) หน่อทุติยภูมิ (secondary tillers) จะเกิดขึ้นจากตาของหน่อปฐมภูมิ ถ้าเป็นข้าวอายุสั้น หน่อทุติยภูมิจะเกิดขึ้นเมื่อข้าวอายุประมาณ 30 วันหลังจากงอก หลังจากนั้น ทั้งหน่อปฐมภูมิและหน่อทุติยภูมิจะเกิดขึ้นมากตามความสูง ก็จะเพิ่มมากขึ้นด้วย หน่อตติยภูมิ (tertiary tillers) จะเริ่มเจริญขึ้นในช่วงท้ายของระยะการเจริญเติบโตนี้ความสูงจะยังคงเพิ่มขึ้นเมื่อหน่อตติยภูมิถือกำเนิดขึ้นแล้วการเกิดขึ้นของหน่อปฐมภูมิและหน่อทุติยภูมิจะหยุดลง

ระยะย่างปล้อง (Stem elongation stage)

ต้นข้าวจะย่างปล้องหลังจากที่แตกกอสูงสุดแล้ว สำหรับข้าวเบา ต้นเตี้ยบางพันธุ์ เวลาการแตกกอกับเวลาของการย่างปล้องอาจคาบเกี่ยวกัน กล่าวคือ อาจมีหน่อตติยภูมิเจริญขึ้นมาบ้าง ในขณะที่ต้นข้าวเริ่มย่างปล้อง การย่างปล้องจะเกิดขึ้นก่อนที่ข้าวจะสร้างช่อดอก (panicle initiation) โดยอาจจะยืดปล้องขึ้นอาจสูงถึง 1 เมตร แล้วจึงเริ่มสร้างจุกกำเนิดช่อดอก



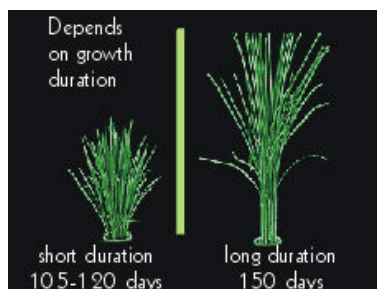
A



B



C



D

รูป 2.1 A) ระยะเริ่มงอก B) ระยะกล้า C) ระยะแตกกอ และ D) ระยะย่างปล้อง

2. ช่วงการเจริญเติบโตทางการเจริญพันธุ์

ช่วงการเจริญพันธุ์ นับตั้งแต่ต้นข้าวเริ่มสร้างช่อดอกที่ยอดอ่อนเป็นต้นไป โดยปรกติการสร้างช่อดอกจะเริ่มตั้งแต่ต้นข้าวแตกกอสูงสุดแล้ว ช่วงการเจริญเติบโตทางการเจริญพันธุ์แบ่งออกเป็น 3 ระยะ (รูป 2.2) คือ

ระยะการสร้างช่อดอก (Panicle initiation)

ระยะนี้เริ่มตั้งแต่ข้าวสร้างจุกกำเนิดช่อดอกขึ้นที่ปล้องสุดท้าย ซึ่งยังคงค้างอยู่ภายในกาบใบหลังจากข้าวเริ่มสร้างช่อดอกแล้ว 11 วัน ถ้าลอกกาบใบออก จะเห็นรวงอ่อนที่พัฒนาขึ้นมาจากจุกกำเนิดช่อดอกได้ด้วยตาเปล่า มีลักษณะคล้ายพู่ขนนก สีขาว ยาว 1.0-1.5 มม ถ้าเป็นข้าวกลางหรือข้าวหนักจะยืดปล้องขึ้นมาก่อน แล้วจึงเริ่มสร้างจุกกำเนิดช่อดอก จากนั้นการวิวัฒนาการของรวง

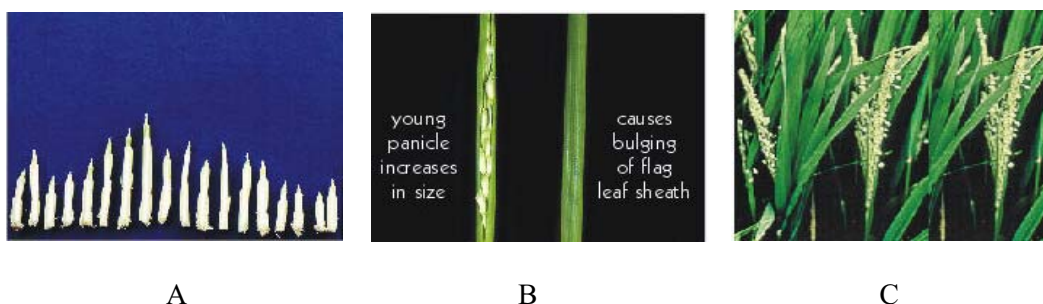
อ่อนจึงจะเกิด การสร้างจุดกำเนิดช่อดอกจะเกิดขึ้นที่ต้นข้าวต้นแรกก่อน หลังจากนั้นก็จะเกิดขึ้นที่หน่อปฐมภูมิ หน่อทุติยภูมิและตติยภูมิ ตามลำดับ

ระยะการพัฒนารช่อดอก (Panicle development)

ระยะนี้ นับตั้งแต่จุดกำเนิดช่อดอกวิวัฒนาการขึ้นช่อดอกเป็นพู่สีขาวบนปลายสุดของปล้องสุดท้ายแล้วกลายเป็นช่อดอกอ่อนอยู่ภายในกาบใบของใบธง ถ้าลอกเอาใบและกาบใบซึ่งหุ้มอยู่ออกจะเห็นช่อดอกขาวชัดเจน ถึงระยะนี้ จำนวนของดอกข้าวในช่อดอกจะถูกกำหนดขึ้นแล้ว เมื่อใบธงขึ้นจนถึงจุดหนึ่ง ซึ่งข้อต่อของใบธงอยู่ในระดับเดียวกันกับข้อต่อของใบแรกที่อยู่ถัดไป

ระยะออกดอก-ดอกบาน (Heading-flowering stage)

ระยะนี้นับตั้งแต่รวงเริ่มโผล่จากกาบใบธง รวงที่โผล่ออกมาในระยะแรกๆ จะชี้ตั้งตรงขึ้น รวงข้าวทั้งรวงจะโผล่พ้นกาบใบธงในระยะเวลาประมาณ 7 วัน ดอกที่โผล่ออกมาก่อนจะผสมพันธุ์ก่อน การผสมพันธุ์เกิดขึ้นหลังจากดอกบานเล็กน้อย ข้าวเกือบทุกพันธุ์จะผสมพันธุ์ในเวลาเช้าโดยที่ดอกจะเริ่มบาน ก้านชูเกสรตัวผู้ส่งอับเรณูออกมา ในขณะที่อับเรณูถูกส่งออกมาจะเป็นเวลาเดียวกันกับที่มันแตกให้ละอองเรณู และทำให้เกิดการผสมเกสร หลังจากนั้น lemma และ palea ก็จะไปปิดหุ้มให้อับเรณูอยู่ภายนอก



รูป 2.2 A) ระยะการสร้างช่อดอก B) ระยะการพัฒนารช่อดอก และ C) ระยะออกดอก-ดอกบาน

3. ช่วงการเจริญเติบโตของเมล็ด

เมื่อละอองเรณูตกลงบนยอดเกสรตัวเมีย ท่อนำเชื้อตัวผู้จะเริ่มงอก นำเชื้อเข้าไปผสมกับไข่ การเจริญในช่วงนี้ของข้าวแบ่งออกเป็น 3 ระยะ (รูป 2.3) คือ

ระยะน้ำนม (Milk grain stage)

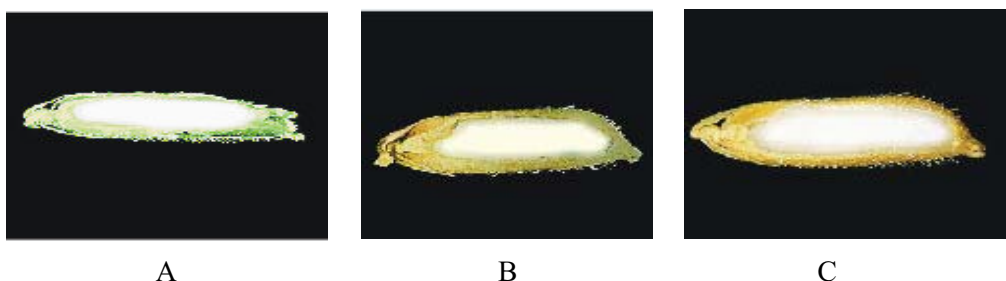
ในระยะนี้รวงยังมีสีเขียว ใบคงเขียวและตั้งตรง หน่อที่เกิดขึ้นในระยะหลังๆ ซึ่งจะไม่ออกรวงจะยังคงตายไปเรื่อยๆ ภายในดอกข้าวเริ่มสร้างน้ำนมสีขาว ถ้าบีบเมล็ดอ่อนดูน้ำนมจะทะลักออกมาภายนอก ระยะน้ำนมจะสิ้นสุดลงเมื่อน้ำนมเริ่มแข็ง ลักษณะภายนอกที่สังเกตได้เมื่อถึงระยะน้ำนมเริ่มแข็ง คือปลายรวงจะเริ่มถ่วงโน้มลงในระดับที่ปลายรวงชี้ขนานกับพื้นดิน หรือเอียงจากแนวตั้งฉากประมาณ 90 องศา

ระยะรวงกัม (Dough stage)

เมื่อน้ำนมในเมล็ดเริ่มแข็งตัว น้ำหนักของเมล็ดจะมากขึ้น เมล็ดเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลือง เมล็ดที่อยู่ปลายรวงจะเริ่มแก่ก่อน และเมล็ดที่อยู่ถัดไปจะเริ่มทยอยแก่ตามมา ระยะรวงกัมหรือระยะเมล็ดแข็งตัวนี้จะสิ้นสุดเมื่อเมล็ดที่ปลายรวงกัมสุ่พื้นดิน และเมล็ดกลางๆ รวงชี้ขนานกับพื้นดิน

ระยะเมล็ดแก่ (Mature grain stage)

ในระยะนี้เมล็ดทุกเมล็ดขยายขนาดเต็มที่และมีความแข็ง เมล็ดทุกเมล็ดในรวงจะไม่มีสีเขียว อาจมีบางเมล็ดที่ยังมีสีเขียวอยู่ เป็นข้อยกเว้น ใบจะแห้งอย่างรวดเร็ว มีบางพันธุ์เท่านั้นที่ใบยังมีสีเขียวเมื่อเมล็ดแก่แล้ว หากนับตั้งแต่รวงโผล่พ้นกาบใบจนถึงระยะนี้จะกินเวลาประมาณ 30 วันก็เก็บเกี่ยวได้



รูป 2.3 A) ระยะน้ำนม B) ระยะรวงกัม และ C) ระยะเมล็ดแก่

2.2 ข้าวสี (Pigmented Rice)

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าว ทำให้เกิดความแตกต่างทางสรีระของข้าวแต่ละพันธุ์ สีของเมล็ดข้าวเป็นลักษณะหนึ่ง que แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์ข้าวได้อย่างชัดเจน ข้าวหลายพันธุ์มีการสร้างและสะสมสารสี (pigments) ที่เมล็ด ซึ่งส่วนใหญ่อยู่ที่ส่วนของรำข้าว ทำให้ได้ข้าวกล้องที่มีเมล็ดสีต่างๆ เช่น ม่วง แดง และเหลือง ข้าวสีเหล่านี้ปัจจุบันได้รับการยอมรับในการบริโภคเป็นอาหารหลักมากขึ้น เนื่องจากสารสีส่วนใหญ่เป็นสารที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ และด้วยเทคโนโลยีการปรับปรุงพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพ ทำให้ปัจจุบันได้มีพันธุ์ข้าวสีใหม่ๆ เกิดขึ้นหลากหลายพันธุ์



2.2.1 ข้าวเหนียวดำ^[4]

ข้าวเหนียวดำ หรือเรียกตามภาษาพื้นเมืองของทางเหนือว่า ข้าวดำ เป็นการเรียกตามลักษณะสีของเมล็ดที่มีสีม่วงดำ หรือแดงดำ นิยมปลูกมากในภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย นอกจากนี้ยังมีการปลูกทั่วไปในประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว และสาธารณรัฐเวียดนาม อินเดีย ญี่ปุ่น และสาธารณรัฐประชาชนจีน พันธุ์ข้าวเหนียวดำมีลักษณะเป็นข้าวพันธุ์ไวแสงและเป็นข้าวเหนียว ปลูกได้เฉพาะนาปี นอกจากนี้ข้าวเหนียวดำพันธุ์พื้นเมืองจะมีความทนแล้งและการฟื้นตัวจากแล้งดี ต้านทานต่อเพลี้ยจักจั่นสีเขียว ลักษณะที่แตกต่างไปจากข้าวทั่วไปที่เห็นได้อย่างชัดเจนคือ การปรากฏของสีม่วงบนส่วนต่างๆ ของต้น เช่น กาบใบ แผ่นใบ กลีบดอก เปลือกเมล็ด เยื่อหุ้มเมล็ด เป็นต้น ปริมาณของสีจะเข้มข้นแตกต่างกันไป เป็นลักษณะเฉพาะประจำพันธุ์ซึ่งตามภูมิปัญญาท้องถิ่นข้าวเหนียวดำไรจะมีลักษณะสีม่วงเฉพาะส่วนของเยื่อหุ้มเมล็ดเท่านั้น ในขณะที่ข้าวเหนียวดำนา จะมีลักษณะสีม่วงปรากฏอยู่ส่วนอื่นๆ ด้วย นอกจากนี้อาจแบ่งลักษณะประจำตามสีเยื่อหุ้มเมล็ดโดยเฉพาะข้าวเหนียวดำนาเรียกตามท้องถิ่น คือ ข้าวดำล้น (เมล็ดข้าวมีสีม่วงทั้งเมล็ด) กับ ข้าวดำผ่า (เมล็ดมีสีม่วงเพียงบางส่วน)



คุณค่าของข้าวเหนียวดำพันธุ์พื้นเมืองตามภูมิปัญญาท้องถิ่นเชื่อว่าข้าวเหนียวดำเป็นสมุนไพร การปลูกข้าวเหนียวดำจึงเป็นการปลูกเพียงเพื่อใช้ในการรักษาโรคเท่านั้น ซึ่งโรคที่ใช้ข้าวเหนียวดำรักษา คือการตกเลือดของหญิงคลอดลูก กล่าวกันว่าในอดีต หากสตรีใดคลอดลูกและมีการตกเลือดจะนำเอาต้นข้าวเหนียวดำมาต้มกับใบเมี่ยง (ใบชา) ให้รับประทาน ดังนั้นการปลูกข้าวเหนียวดำในอดีตจึงมิได้ปลูกเพื่อบริโภค แต่จะปลูกเพื่อสมุนไพร ดังนั้นการเก็บเกี่ยวจึงจะเก็บเกี่ยวไว้ทั้งต้นและมัดห้อยไว้จนกว่าจะนำมาใช้เป็นสมุนไพร นอกจากนี้อาจมีความสำคัญสำหรับโรคอื่นๆ อีก ดังเช่น สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ได้ทรงกล่าวไว้ในบทพระราชนิพนธ์ “ย่าแดนมังกร” เมื่อเสด็จเยี่ยมเมืองซีอาน ว่า “ข้าพเจ้าลืมหากล่าวถึงอาหารอีกอย่างหนึ่ง เป็นข้าวต้มทำจากข้าวสีดำ ซึ่งมีอยู่ที่หมู่บ้านเดียวในมณฑล ดูเหมือนจะต้องใช้น้ำในลำธารสายนั้นรดจึงขึ้น ทางจีนกำลังวิจัยข้าวพันธุ์นี้อยู่ เขว่ว่ากันว่าข้าวพันธุ์นี้มีค่ามากกว่ารักษาโรคมะเร็ง รับประทานได้ทั้งเป็นของหวานและของคาว” (น่าสังเกตว่าเป็นข้าวเจ้าไม่ใช่ข้าวเหนียว)

ผลการวิจัยพบว่าข้าวเหนียวดำ มีคุณค่าทางโภชนาศาสตร์เกษตรสูงกว่าข้าวอื่น ๆ น้ำมันในรำข้าวก็มีคุณสมบัติเฉพาะที่ทำให้มีคุณค่ามากกว่าน้ำมันจากพืชอื่นเช่นกัน โดยเฉพาะพืชผัก กล่าวคือน้ำมันในรำข้าวจะมีลักษณะของกลิ่นหอมคล้ายลูกนัท (Nut-like flavor) นอกจากส่วนของ unsaponifiable components และ fatty acids แล้ว ยังมี tocopherol (vitamin E) และสารประกอบ phenols ที่มีคุณสมบัติทำให้น้ำมันจากเปลือกข้าวไม่หืนง่ายอีกด้วย พบว่ามี γ -oryzanol (ชนิดของ ferulic acids) อยู่ประมาณ 2-3% สารนี้มีคุณสมบัติในการช่วยการหมุนเวียนของโลหิต ช่วยการสังเคราะห์ฮอร์โมน ซึ่งจะช่วยเร่งการเจริญเติบโตในมนุษย์ ซึ่งปัจจุบันได้มีการสังเคราะห์และผลิตสารนี้เพื่อใช้เป็นยาเสริมสุขภาพแล้ว นอกจากนี้ความเชื่อในความเป็นสมุนไพรและคุณค่าทางโภชนาศาสตร์เกษตรของข้าวเหนียวดำแล้ว การปรากฏขึ้นของสีม่วงในข้าวอาจเป็นปรากฏการณ์ของธรรมชาติเพื่อที่จะเป็นประโยชน์ต่อพืช โดยเป็นจุดดึงดูดหรือไม่ดึงดูดความสนใจของโรคและแมลง เพื่อช่วยเหลือหรือต้านทานพฤติกรรมในการเจริญเติบโตและการสืบสายพันธุ์ของพืชเอง

2.2.2 ข้าวเจ้าหอมนิล^[5]



ข้าวเจ้าหอมนิลเป็นข้าวที่ได้รับการคัดเลือก และพัฒนาจนได้ข้าวที่มีเมล็ดข้าวกล้องเรียวยาว สีม่วงเข้ม ข้าวกล้องเมื่อหุงสุกจะนุ่มเหนียว และมีกลิ่นหอม ข้าวเจ้าหอมนิล เป็นข้าวเจ้าสีดำนีละโด๋ ที่ได้จากการคัดพันธุ์กลายของข้าวเหนียวดำต้นเดี่ยวจากจีน ข้าวเจ้าหอมนิลสูงประมาณ 60-75 เซนติเมตร มีอายุวันเก็บเกี่ยว 95-105 วัน มีการแตกกอดี ใบและลำต้นสีเขียวปนม่วง มีหูใบ โคนต้น ดอก และเมล็ดมีสีม่วงเข้ม ผลผลิตประมาณ 400-700 กิโลกรัมต่อไร่ จากการศึกษาเอกลักษณ์พันธุกรรม โดยใช้ microsatellite จำนวน 48 ตำแหน่ง ชี้ให้เห็นว่า ข้าวเจ้าหอมนิลมีความแตกต่างจากข้าว Hei Bao และ Xua Bue Huq จากจีน ซึ่งมีปริมาณโปรตีนและธาตุเหล็กสูง แสดงให้เห็นว่าข้าวทั้ง 3 ไม่ได้เป็นข้าวพันธุ์เดียวกัน

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ :

ชื่อสามัญ	ข้าวเจ้าหอมนิล
ชื่อวิทยาศาสตร์	Oryza sativa
ชื่อวงศ์	INDICA

ลักษณะประจำพันธุ์ :

ข้าวเจ้าหอมนิลเป็นข้าวนาสวน ไม่ไวแสง สามารถปลูกได้ตลอดทั้งปี การแตกกอดี ต้านทานต่อโรคไหม้ (blast) ทนทานต่อสภาพแล้ง (drought) และดินเค็ม (salinity) แต่ไม่ต้านทานโรคขอบใบแห้ง และแมลงโดยทั่วไป

ความสูงของต้น	75 เซนติเมตร
สีของ ใบ/ลำต้น	เขียวเข้มอมม่วง
เมล็ดข้าวกลี้ยงยาวประมาณ	6.5 มม. มีสีม่วงดำ
เปลือกหุ้มเมล็ดข้าว	มีสีม่วงเข้ม
อายุการเก็บเกี่ยว	95-100 วัน
ผลผลิตเฉลี่ย	400-700 กิโลกรัมต่อไร่

ปริมาณองค์ประกอบของสารอาหารในเมล็ด :

ปริมาณ แป้งอะไมโลส (amylose)	12%
ปริมาณธาตุเหล็ก	2-2.25 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม
ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)	292 ไมโครโมลต่อกรัม
น้ำมันรำข้าว	18%
เส้นใยจากรำข้าว	10%

ลักษณะทางโภชนาการ :

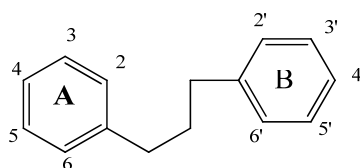
ข้าวเจ้าหอมนิลเป็นข้าวที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง โดยมีโปรตีนอยู่ในช่วงประมาณ 10-12.5 % มีปริมาณแป้งอะไมโลสประมาณ 12-13% มีปริมาณสาร 2-acetyl-1-pyrroline ปานกลาง ร่วมกับสารหอมระเหยจำเพาะพวก cyclohexanone ในปริมาณมาก มีแคลเซียม 4.2 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ปริมาณธาตุเหล็กแปรปรวนอยู่ระหว่าง 2.25- 3.25 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม และธาตุสังกะสีประมาณ 2.9 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ข้าวเจ้าหอมนิลมีปริมาณสาร antioxidation สูงประมาณ 293 ไมโครโมลต่อกรัม ในส่วนของเยื่อหุ้มเมล็ดที่เป็นสีม่วงเข้มประกอบไปด้วยสาร anthocyanin, proanthocyanidin, bioflavonoids และ vitamin E ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและใช้เป็นสีผสมอาหารตามธรรมชาติ

ในส่วนของรำและจมูกข้าว มี vitamin E, vitamin B และกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง ในส่วนของรำมีน้ำมันรำข้าว 18% เป็นองค์ประกอบ ซึ่ง 80 % เป็นชนิด C18:1 และ C18:2 เหมือนกับน้ำมันที่ได้จากถั่วเหลืองและข้าวโพดและพบว่ามีสาร omega-3 ประมาณ 1-2 % รำข้าวของเจ้าหอมนิลมี

ปริมาณเส้นใย digestible fiber สูงถึง 10% จากข้อมูลทางโภชนาการนับได้ว่าข้าวเจ้าหอมนิลเป็นข้าวที่มีศักยภาพในการนำมาแปรรูปทางอุตสาหกรรมอาหารสูง เช่น การผลิตผลิตภัณฑ์อาหารจากแป้งข้าวเจ้าหอมนิล รวมทั้งขนมขบเคี้ยวต่าง

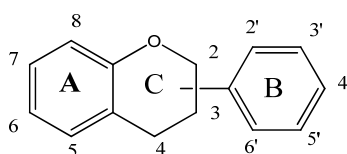
2.3 ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)

Flavonoids เป็นสารประเภท polyphenolic compounds ในโมเลกุลประกอบด้วย 15 คาร์บอน มี benzene จำนวน 2 วง เชื่อมกันด้วย carbon chain ที่มีคาร์บอนจำนวน 3 อะตอม เรียกโครงสร้างดังกล่าวนี้ว่า $C_6 - C_3 - C_6$ system

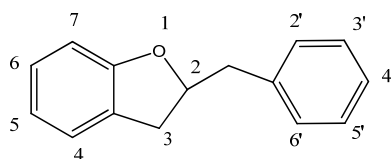


Flavonoids เป็นกลุ่มสารที่พบมากในพืชชั้นสูง สารกลุ่มนี้มีบทบาทสำคัญที่ทำให้เกิดสีในดอกของพืชไม้ดอก (angiosperm families) หลายชนิด อย่างไรก็ตามพบว่าพืชสามารถสร้างสาร flavonoids ได้ในส่วนอื่นๆ แทบทุกส่วน ซึ่งอาจมีโครงสร้างและหน้าที่แตกต่างกันไป

โครงสร้างทางเคมีของ flavonoids ส่วนใหญ่เป็นโมเลกุลที่มี 15 คาร์บอน (C_{15} skeleton) และมี Chromane ring (ring C) ที่มี aromatic ring อีกวงหนึ่ง (ring B) เชื่อมในตำแหน่งที่ 2, 3 หรือ 4



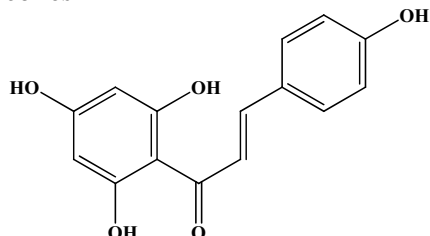
Flavonoids บางโครงสร้างอาจมีส่วนของ six-membered heterocyclic ring (ring C) เกิดเป็น isomer ที่แตกต่างกัน หรือมีการแทนที่ด้วย five-membered ring โดยมี oxygen bridge กับคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ของสายคาร์บอน 3 อะตอม ที่อยู่ระหว่าง ring A และ B ซึ่งโครงสร้างในกรณีเช่นนี้เกิดขึ้นไม่มากนัก ตัวอย่าง เช่น โมเลกุลของ 2-benzyl-coumarone



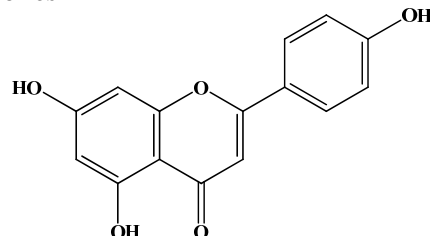
AURONES (2-benzyl-coumarone)

Flavonoids แบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยตามการแทนที่ของหมู่ต่างๆ บน ring C ที่จะทำให้เกิด oxidation state ของ heterocyclic ring C แตกต่างกันไป และตำแหน่งของ ring B ที่เชื่อมต่อบน ring C ทำให้เกิดกลุ่มย่อยแตกต่างกันไปด้วย ตัวอย่างกลุ่มย่อยที่สำคัญของสารกลุ่ม flavonoids ได้แก่

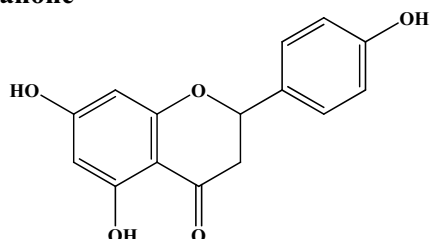
Chalcones



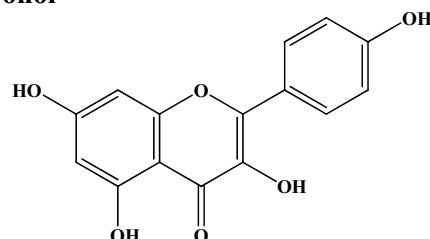
Flavones



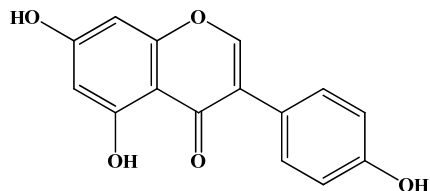
Flavanone



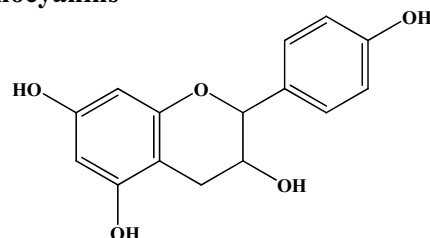
Flavonol



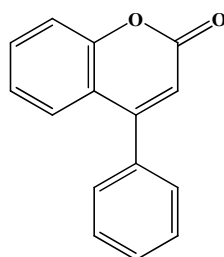
Isoflavonoids



Anthocyanins

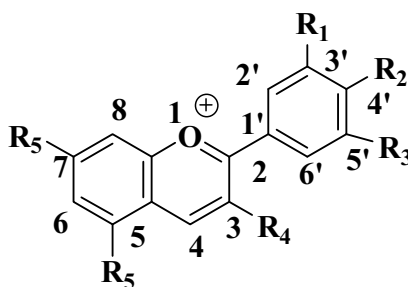


สารในกลุ่ม flavanones, flavones, flavonols และ anthocyanins ส่วนใหญ่มี aromatic ring B เชื่อมต่อกับ heterocyclic ring ที่ตำแหน่งที่ 2 ยกเว้น isoflavonoids ที่มี aromatic ring B เชื่อมต่อกับ heterocyclic ring ที่ตำแหน่งที่ 3 และสารในกลุ่ม neoflavonoids ซึ่ง chromane มี aromatic ring B เชื่อมต่อกับ heterocyclic ring ที่ตำแหน่งที่ 4 (4-phenyl-coumarins) ดังนั้น บางครั้งจัด flavonoids 2 กลุ่มหลังนี้เป็น abnormal flavonoids



2.4 แอนโทไซยานิน (Anthocyanins)

Anthocyanins เป็นสารประกอบกลุ่มย่อยของฟลาโวนอยด์ พบในธรรมชาติในรูปของเฮตเทอโรไซด์ anthocyanins ในรูปอะไกลโคโคนที่เรียกว่า แอนโทไซยานิดิน ซึ่งโครงสร้างประกอบด้วยไอออนของ flavilium หรือ 2-phenylbenzopyrilium และโดยมีหมู่ hydroxy (-OH) และ methoxy (-OCH₃) ที่ตำแหน่งต่างกัน (รูป 2.4 และตาราง 2.1) แอนโทไซยานิน 6 ชนิด (รูป 2.5) พบในผลไม้และผัก สีของแอนโทไซยานินที่แตกต่างกันเป็นผลมาจากรูปแบบของหมู่แทนที่ -OH และ -OCH₃

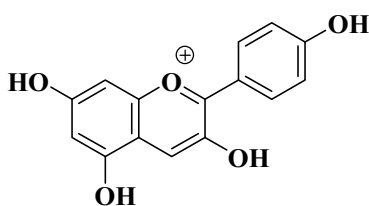


รูป 2.4 แสดงโครงสร้างหลักทางเคมีของสารประกอบ anthocyanins

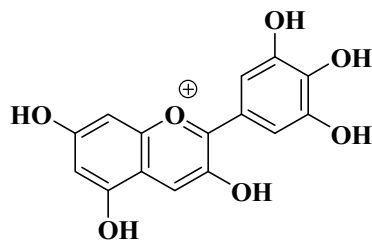
Anthocyanins ที่มีอยู่ในธรรมชาติมากกว่า 250 โครงสร้าง เป็น anthocyanins ที่ถูกรายงานในผลไม้ประมาณ 70 โครงสร้าง anthocyanins ที่ถูกค้นพบจะมีรูปแบบโครงสร้างแบบไกลโคไซด์ (glycoside) ซึ่งประกอบด้วยส่วนที่เป็นน้ำตาล และส่วนที่เป็นอะไกลโคโคน (aglycone) เรียกแอนโทไซยานิดิน (anthocyanidin) ซึ่งแยกออกจากกันได้โดยการทำให้ไฮโดรไลซิสด้วยกรด (acid hydrolysis) ในเนื้อเยื่อพืชจะไม่พบ anthocyanins ที่อยู่ในรูปอิสระจะพบเฉพาะที่อยู่ในรูป glycoside คือ รวมกับน้ำตาลเป็นเอสเทอร์ (ester) เท่านั้น การรวมกับโมเลกุลของน้ำตาลจะสร้างพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic bond) ตรงตำแหน่งคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 และตำแหน่งที่ 5

ตาราง 2.1 แสดง anthocyanins ที่พบในธรรมชาติ

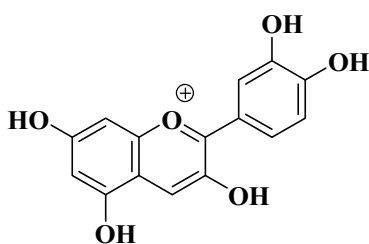
Name	Substitution pattern							Color
	3	5	6	7	3'	4'	5'	
Apigenidin	H	OH	H	OH	H	OH	H	Orange
Auratinidin	OH	OH	OH	OH	H	OH	H	Orange
Cyanidin	OH	OH	H	OH	OH	OH	H	Orange-red
Delphinidin	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH	Bluish-red
Europinidin	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OH	Bluish-red
Hirsutidin	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	OMe	Bluish-red
Leteolinidin	H	OH	H	OH	OH	OH	H	Orange
Malvidin	OH	OH	H	OH	OMe	OMe	OMe	Bluish-red
Pelargonidin	OH	OH	H	OH	H	OH	H	Orange
Peonidin	OH	OH	H	OH	OMe	OH	H	Orange-Red
Petunidin	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OH	Bluish-red
Puchellidin	OH	OMe	H	OH	OH	OH	OH	Bluish-red
Rosinidin	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	H	Red



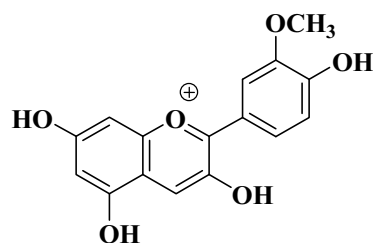
Pelargonidin



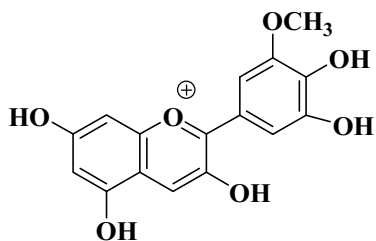
Delphinidin



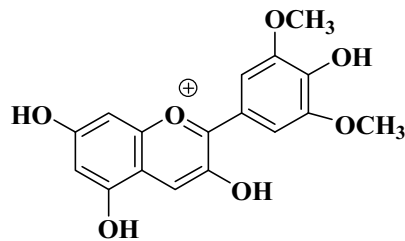
Cyanidin



Peonidin



Petunidin

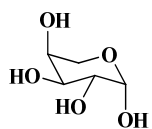


Malvidin

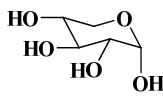
รูป 2.5 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ anthocyanins ที่พบโดยทั่วไปในอาหาร

น้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของ anthocyanins อาจจะมี 1, 2 หรือ 3 โมเลกุลก็ได้และ เป็นได้ทั้ง โมโน- ได- และไตรแซ็กคาไรด์ (mono- di- and trisaccharide) เช่น กลูโคส (glucose), อะราบินโนส (arabinose), ไชโรส (xylose), กาแลคโตส (galactose), แรมโนส (rhamnose), ฟรุคโตส (fructose), รุทีโนส (rutinose (6-O- α -L-rhamnosyl-D-glucose)), ซอฟโฟโรส (sophorose (2-O- β -D-xylosyl-D-glucose), gentobiose (6-O- β -D-glucosyl-D-glucose)), แซมบูไบโอส (sambubiose (2-O- β -D-glucosyl -D-glucose)), ไชโลซิลรุทีโนส (xylosylrutinose), และ ไกลโคซิลรุทีโนส (glucosylrutinose) แสดงโครงสร้างในรูป 2.6 นอกจากโมเลกุลของน้ำตาลที่สามารถสร้างพันธะกับ anthocyanins สารประกอบพวกอัลคิลเลตสามารถสร้างพันธะกับสารประกอบ anthocyanins และ

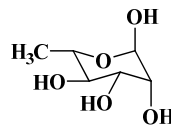
โมเลกุลของน้ำตาลได้ด้วยเหมือนกัน หมู่อัลคิลเลตที่พบ อาทิเช่น *p*-coumaryl, caffeic, ferulic, และ sinapic acid (รูป 2.7) เป็นต้น



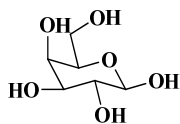
Arabinose



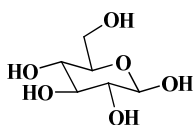
Xylose



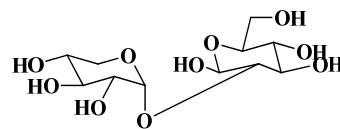
Rhamnose



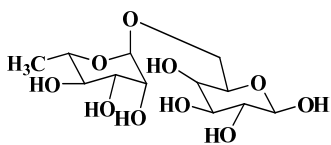
Galactose



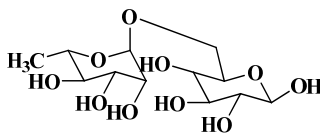
Glucose



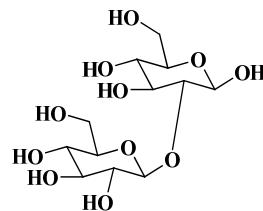
Sambubiose



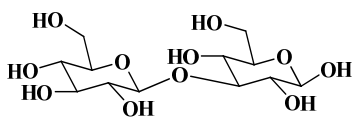
Lathyrose



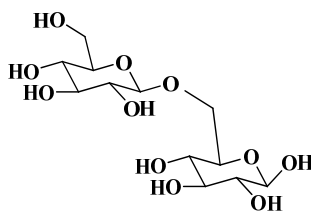
Rutinose



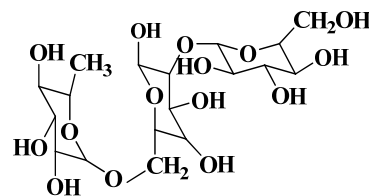
Sohorose



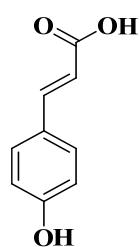
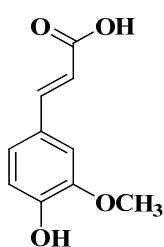
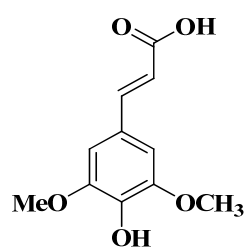
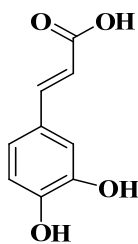
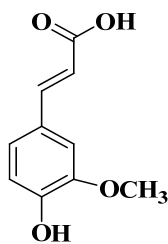
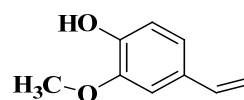
Laminaribiose



Gentiobiose

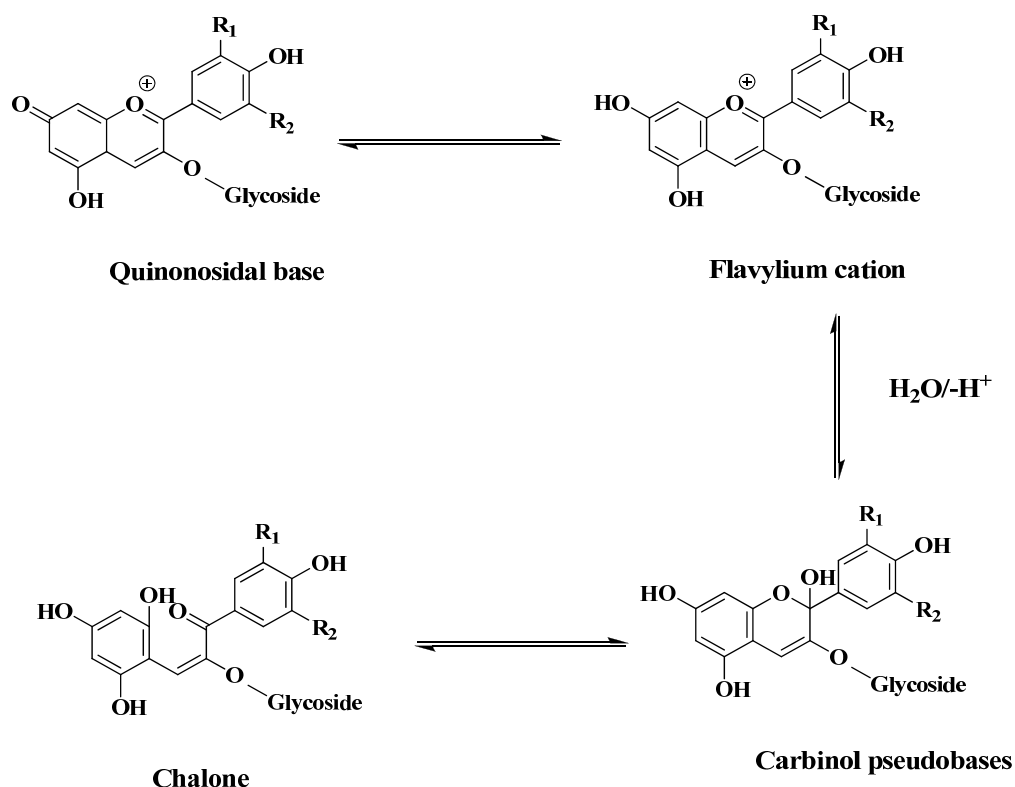
2^G-Glucosylrutinoside

รูป 2.6 โครงสร้างทางเคมีโมเลกุลของน้ำตาลแต่ละชนิด

***p*- Coumaric acid****Coniferyl acid****Sinapyl acid****Caffeic acid****Ferulic acid*****p*-Vinylguaiacol**

รูป 2.7 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบหมู่แอลคิลเลต

Anthocyanins มีการเปลี่ยนแปลงสีตามค่า pH ของสารละลายโดยให้สีแดงเมื่อสารละลายเป็นกรดหรือให้สีน้ำเงินเมื่อสารละลายเป็นด่าง ในระหว่างการเจริญเติบโตของผลจะมีการสังเคราะห์และสะสมของ anthocyanins เพิ่มขึ้นเรื่อยๆทำให้เกิดสีแดงบริเวณเนื้อเยื่อชั้น upper mesocarp โดยมีการสะสมของ anthocyanins ปริมาณสูงใน vacuole การเปลี่ยนแปลงสีและความคงตัวของ anthocyanins ขึ้นกับโครงสร้างที่ผันแปรตามค่า pH โดยจะเปลี่ยนแปลง 4 โครงสร้างคือ quinonidal, flavylium แคตไอออนหรือเกลือ oxonium โครงสร้างที่ไม่มีสี carbinol pseudobase และ chalcone ความเป็นด่างที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ anthocyanins เปลี่ยนสี carbinol pseudobase ซึ่งเป็นรูปที่ถูกทำลายได้ง่ายด้วยเอนไซม์ การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของแอนโทไซยานินทั้งสี่รูปแบบ ดังแสดงในรูป 2.8



รูป 2.8 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของแอนโทไซยานิน

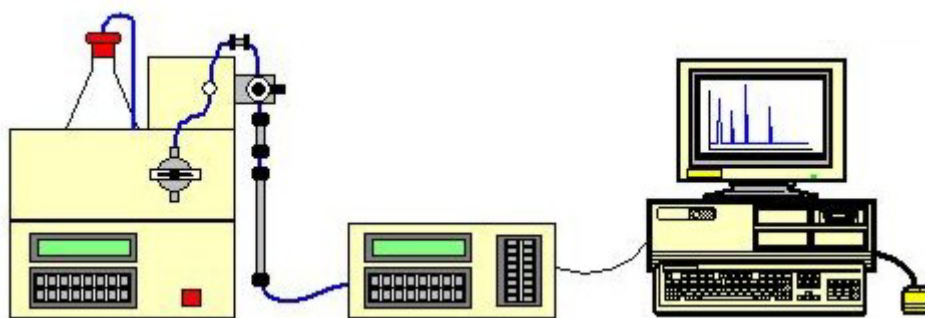
ประโยชน์ทางด้านเภสัชวิทยาและคุณสมบัติทางชีววิทยาของ anthocyanins แสดงคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง ต้านเนื้องอก ต้านการอักเสบ ผลของกระหน่ำต่อการป้องกันหลอดเลือด ผลของโรคเบาหวาน รวมทั้งการหมุนเวียนของโลหิต ผลจากเส้นเลือดแตก และการป้องกันการสะสมของคลอเรสเตอรอลในเลือด คุณสมบัติรีดอกส์ เป็นความสามารถในการมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ anthocyanins ซึ่งมีส่วนสำคัญในการช่วยลดความรุนแรงและฤทธิ์ของสารพวกอนุมูลอิสระยกตัวอย่างเช่น สารที่มีออกซิเจนหนึ่งและสามอะตอม หรือ สารประกอบพวกเปอร์ออกไซด์ กลไกการต้านอนุมูลอิสระของ anthocyanins เนื่องจาก anthocyanins เป็นสารประกอบประเภทสารประกอบฟีนอลิกนั้นมีหมู่ให้อิเล็กตรอนหรือไฮโดรเจน คือ หมู่ไฮดรอกซี (-OH) หรือหมู่เมทอกซี (-OCH₃) จึงสามารถให้อิเล็กตรอนหรือไฮโดรเจนแก่สารที่เป็นอนุมูลอิสระได้ เมื่อสารประกอบ phenolics หรือ anthocyanins เสียอิเล็กตรอนหรือไฮโดรเจนอะตอมไปแล้ว จะสามารถเกิดเรโซแนนซ์ภายในโครงสร้างของสารเองทำให้โมเลกุลของสารประกอบ anthocyanins เสถียร และความสามารถในการให้อิเล็กตรอนหรือไฮโดรเจนอะตอม ยังขึ้นอยู่กับสารที่มาประกอบกันเป็นโครงสร้าง ซึ่งเปรียบได้กับฤทธิ์และหน้าที่ของ anthocyanins

2.5 เทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: LC-MS)^[6]

ลิควิดโครมาโทกราฟี (LC) เป็นเทคนิคการแยกและการวิเคราะห์สารที่อาศัยหลักการเดียวกับแก๊สโครมาโทกราฟี เพียงแต่ต่างกันที่เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) โดย LC นั้น ใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นของเหลว ในการวิเคราะห์สารโดยใช้เทคนิค LC เฟสเคลื่อนที่จะถูกอัดด้วยปั๊มที่มีคุณภาพสูงพาสารละลายตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์ด้วยอัตราการไหลไม่เกิน 5 มิลลิลิตรต่อนาที ภายในคอลัมน์ทั้งเฟสเคลื่อนที่และเฟสคงที่ (stationary phase) จะสามารถเกิดแรงกระทำต่อสารตัวอย่างได้ ทำให้เกิดการแยกขององค์ประกอบในสารผสม จากนั้นองค์ประกอบที่ถูกแยกจะออกจากคอลัมน์เข้าสู่ตัวตรวจวัดสัญญาณต่อไป

การที่เทคนิค LC ได้ถูกพัฒนาเรื่อยมาจนมีสมรรถนะในการแยกสารที่ดี โดยใช้ปั๊มความดันสูงพาของเหลวที่เป็น liquid mobile phase ไหลผ่าน stationary phase ที่มีลักษณะเป็นของเหลวเคลือบอยู่บนอนุภาคของแข็งขนาดเล็กเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5-10 ไมครอนนั้น ทำให้ปัจจุบันเทคนิค LC มักมีชื่อเรียกว่า HPLC ย่อมาจาก High Performance Liquid Chromatography หรือ High Pressure Liquid Chromatography

HPLC สามารถใช้ในการวิเคราะห์สารที่สลายตัวที่อุณหภูมิสูง และระเหยกลายเป็นไอได้ยาก นอกจากนี้สารที่มีสภาพขี้สาก และมีหมู่ฟังก์ชันที่ถูกไอออนไนซ์ได้ ซึ่งจะแสดงโครมาโทแกรมเป็นลักษณะพีกที่เป็นหาง เมื่อใช้เทคนิค GC สามารถนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ได้ ดังนั้น HPLC จึงเป็นเทคนิคที่เหมาะสมสำหรับสารอนินทรีย์ หรืออนุมูลไอออน สารประกอบทางด้านยาชีวเคมี เช่น สามารถประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์น้ำตาล กรดอินทรีย์ ไขมัน กรดอะมิโน เปปไทด์ สารประกอบเชิงซ้อนของโลหะ สารแอนติออกซิแดนจำพวกฟีนอลิกในอาหาร สารพิษ เช่น อัลฟาโทกซินในถั่วต่างๆ และวิตามิน เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการประยุกต์ HPLC เพื่อการแยกและทำสารตัวอย่างให้บริสุทธิ์ขึ้น เครื่อง HPLC โดยทั่วไปมีส่วนประกอบดังรูป 2.9 คือ ภาชนะบรรจุเฟสเคลื่อนที่ ระบบปั๊ม ตำแหน่งที่ฉีดสาร คอลัมน์ และตัวตรวจวัดสัญญาณ



รูป 2.9 แผนภาพแสดงส่วนประกอบของเครื่อง HPLC

♦ ภาชนะบรรจุเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase reservoir)

โดยทั่วไป ภาชนะที่บรรจุเฟสเคลื่อนที่ที่ทำด้วยเหล็กกล้าไร้สนิม (stainless steel) หรือแก้ว และมีขนาด 1 ลิตร มีท่อเล็กๆ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1/8 นิ้ว ต่อจากภาชนะบรรจุเฟสเคลื่อนที่เพื่อพาเฟสเคลื่อนที่เข้าสู่ปั๊ม เฟสเคลื่อนที่ก่อนจะเข้าสู่ปั๊มจะต้องกรองด้วยเมมเบรนขนาด 0.45 หรือ 0.2 ไมครอน ให้ปราศจากผง ฝุ่น และอนุภาคแขวนลอยต่างๆ ซึ่งจะทำให้เกิดการแทรกสอดการทำงานของปั๊มได้ และอาจทำลายวาล์วของปั๊มได้ อีกประการหนึ่งที่สำคัญ คือ ฟองแก๊สหรืออากาศที่ละลายอยู่ในเฟสเคลื่อนที่ โดยเฉพาะแก๊สออกซิเจน และแก๊สไนโตรเจน ถ้าไม่กำจัดจะทำให้เกิดฟองแก๊สภายในคอลัมน์ หรืออาจจะเข้าไปรบกวนตัวตรวจวัดหรือทำให้การทำงานของปั๊มเสียไปหรือไปทำปฏิกิริยากับเฟสเคลื่อนที่ ดังนั้นจึงต้องกำจัดแก๊สที่ละลายอยู่ในเฟสเคลื่อนที่ก่อนด้วยระบบทำลายแก๊ส (degassing system) การทำลายแก๊สอาจทำได้โดยการเก็บเฟสเคลื่อนที่ไว้ภายใต้สุญญากาศ หรือโดยให้ความร้อนและคนเฟสเคลื่อนที่ด้วยระบบอัลตราโซนิก หรืออาจจะผ่านแก๊สฮีเลียมอย่างช้าๆ และต่อเนื่อง

♦ ระบบปั๊ม (pumping system)

ปั๊มทำหน้าที่ส่งเฟสเคลื่อนที่เข้าสู่คอลัมน์ เนื่องจากคอลัมน์บรรจุด้วยอนุภาคขนาดเล็ก ดังนั้นจึงมีความต้านทานการไหลของเฟสเคลื่อนที่เมื่อเฟสเคลื่อนที่ไหลผ่านคอลัมน์ ความต้านทานการไหลจะมากขึ้นเมื่อคอลัมน์บรรจุด้วยอนุภาคที่มีขนาดเล็กลง เป็นผลให้ต้องใช้ความดันสูงในการดันเฟสเคลื่อนที่ให้ไหลไป ระบบปั๊มที่ใช้ในเครื่อง HPLC แบ่งออกเป็น 2 ระบบ คือ ปั๊มที่ควบคุมให้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่คงที่ และปั๊มที่ควบคุมให้ความดันของการไหลของเฟสเคลื่อนที่คงที่ ระบบปั๊มและท่อเชื่อมต่างๆ ควรทำด้วยเหล็กกล้าไร้สนิม ซึ่งสามารถทนต่อความดันและการกัดกร่อนโดยสารพวกออกซิไดซ์ กรด เบส และตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆ

♦ ตำแหน่งที่ฉีดสาร

การฉีดสารตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์มีความสำคัญค่อนข้างมากต่อการแยกสาร เนื่องจากสารตัวอย่างที่ผ่านเข้าไปในคอลัมน์ควรอยู่ในลักษณะที่เป็นแถบที่แคบมากที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้ ดังนั้นวิธีการต่างๆ ที่ใช้มีมากมายหลายวิธี วิธีที่ง่ายที่สุด คือ การฉีดสารตัวอย่างผ่าน septum ด้วยเข็มฉีดยา (microsyringe) แต่ต้องระมัดระวังเนื่องจากภายในระบบมีความดันสูง ส่วนวิธีที่นิยมใช้กันมากเป็นการฉีดสารตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์ผ่านลู่วาล์ว (loop valve) ซึ่งมี 2 แบบ คือ แบบที่มีลู่วาล์วอยู่ภายนอก (external loop valve) และแบบที่มีลู่วาล์วอยู่ภายใน (internal loop valve) นอกจากนี้ยังมีการฉีดสารตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์แบบอัตโนมัติ (autosampler) ซึ่งสามารถฉีดสารตัวอย่างได้จำนวนมาก ทำให้ช่วยลดแรงงานและปรับปรุงความแม่นยำในการวิเคราะห์ และในงานวิจัยนี้เครื่องลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์ที่ใช้ จะมีระบบฉีดสารตัวอย่างเป็นแบบอัตโนมัติ

◆ คอลัมน์ (column)

คอลัมน์เป็นอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับแยกสารตัวอย่าง ส่วนใหญ่ทำด้วยเหล็กกล้าไร้สนิม ซึ่งเหมาะกับงานที่ต้องใช้ความดันสูง นอกจากนี้อาจทำด้วยแก้ว ซึ่งเหมาะกับงานที่ใช้ความดันต่ำ หรืออาจทำด้วยพลาสติก คอลัมน์ที่ใช้ใน HPLC ประกอบด้วย

- 프리คอลัมน์ (precolumn) ถูกนำมาใช้ในกรณีที่ต้องการปรับภาวะของเฟสเคลื่อนที่ หรือทำให้เฟสเคลื่อนที่อิ่มตัว โดยนำมาต่ออยู่ระหว่างปั๊มและส่วนฉีดสารตัวอย่าง บรรจุด้วยเฟสคงที่เหมือนกับคอลัมน์ที่ใช้แยกสาร เพียงแต่มีอนุภาคขนาดใหญ่กว่า

- การ์ดคอลัมน์ (guard column) อยู่ระหว่างส่วนฉีดสารกับคอลัมน์ที่ใช้ในการแยกสาร ทำหน้าที่ช่วยกรองสิ่งเจือปนออกจากสารละลายตัวอย่างและเฟสเคลื่อนที่ และป้องกันคอลัมน์ที่ใช้ในการแยกสารจากสารที่มีความสามารถในการดูดซับได้ดี มีความยาวไม่เกิน 5 เซนติเมตรภายในบรรจุด้วยอนุภาคเหมือนกับคอลัมน์ที่ใช้ในการแยกสาร และ guard column ถูกออกแบบให้มีปริมาตรช่องว่าง (dead volume) น้อยที่สุด ดังนั้นประสิทธิภาพในการแยกจะลดลงน้อยที่สุด หรือไม่มีการสูญเสียประสิทธิภาพในการแยกเลย

- คอลัมน์ที่ใช้ในการแยกสาร (analytical column) โดยปกติมีความยาว 15, 25 หรือ 30 เซนติเมตร มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 4.6 หรือ 5 มิลลิเมตร บรรจุด้วยอนุภาคขนาด 3, 5 หรือ 10 ไมครอน และอัตราการไหล 1-2 มิลลิลิตรต่อนาที ปัจจุบันคอลัมน์ที่ใช้กับ HPLC มีแนวโน้มที่จะมีเส้นผ่านศูนย์กลางภายในเล็กลง และบรรจุด้วยอนุภาคที่มีขนาดน้อยกว่าหรือเท่ากับ 3 ไมครอน

◆ ตัวตรวจวัด (detector)

การเลือกตัวตรวจวัดในเครื่องลิควิดโครมาโทกราฟี ขึ้นอยู่กับชนิดของสารตัวอย่าง ความเข้มข้น ความไว ความเข้ากันได้กับตัวทำละลาย และแบบของการอีลูชัน (elution) ตัวตรวจวัดในเครื่องลิควิดโครมาโทกราฟี สามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ

1) General detector เป็นการวัดการเปลี่ยนแปลงของสมบัติทางกายภาพของเฟสเคลื่อนที่ร่วมกับของตัวถูกละลาย เช่น refractive index determination และ conductivity detector

2) Selective detector เป็นการวัดการเปลี่ยนแปลงของตัวถูกละลายเพียงอย่างเดียวเท่านั้น เช่น UV-Vis detector, fluorescent detector, electrochemical detector และ mass spectrometer เป็นต้น

การคู่ควบ LC เข้ากับ MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry)

พัฒนาการของ LC-MS เกิดขึ้นเนื่องจากความต้องการวิเคราะห์โครงสร้างของสารอินทรีย์ในตัวอย่างที่ซับซ้อน และมีองค์ประกอบที่สนใจเป็นสารที่ระเหยยาก (non-volatile) หรือสารที่สลายตัวเมื่อให้ความร้อน (thermally labile) สารเหล่านี้จึงไม่สามารถถูกแยกและวิเคราะห์ด้วย GC-MS ได้ ซึ่งในขณะเดียวกันเทคนิค GC-MS มีข้อจำกัดดังนี้

1. ตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ต้องระเหยได้
2. ไม่สามารถวิเคราะห์สารประกอบประเภทมีขั้ว สารที่สลายตัวด้วยความร้อน และ สารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง
3. สารระเหยยากที่มีโมเลกุลไม่ใหญ่นัก อาจต้องเปลี่ยน functional group เพื่อให้ระเหยได้ดี โดยการทำ derivatisation
4. การเตรียมสารสกัดก่อนวิเคราะห์ด้วย GC-MS มีหลายขั้นตอน โดยเฉพาะต้องเลือกตัวทำละลายของสารสกัดที่เหมาะสม และไม่เป็นอันตรายต่อ stationary phase

LC เป็นเทคนิคทางโครมาโทกราฟีที่ใช้ของเหลวเป็น mobile phase ดังนั้นเมื่อต่อ LC เข้ากับ MS ของเหลวที่ผ่านการแยกด้วย LC ไม่สามารถถูกนำเข้าไปใน ion source ของ MS ได้ทันที เพราะ ion source มักทำงานในสถานะอุณหภูมิสูงและความดันต่ำมาก ของเหลวเพียงเล็กน้อยจะระเหยให้แก๊สปริมาณมากเกินไปจนขัดจำกัดของระบบสุญญากาศของ MS ที่จะสามารถกำจัดได้ ดังนั้นจึงต้องมีระบบจัดการที่สามารถกำจัด mobile phase ของ LC ก่อนที่จะนำสารที่ถูกแยกจาก LC เข้าไปใน ion source ของ MS ระบบตัวกลางที่เชื่อมต่อระหว่าง LC และ MS เรียกว่า “LC-MS Interface” ซึ่งมีพัฒนาการเรื่อยมาตั้งแต่ประมาณปี ค.ศ. 1958 จนถึงปัจจุบัน ทำให้มี LC-MS Interface มากมายหลายแบบ อย่างไรก็ตามทุกแบบต้องมีคุณสมบัติคือ กำจัดของเหลวที่เป็น LC mobile phase ออกไป และสามารถเปลี่ยนโมเลกุลของสารที่ต้องการวิเคราะห์ซึ่งอยู่ในสภาพสารละลาย (molecules in solution) ให้กลายเป็นไอออนในสถานะแก๊ส (ions in gas phase) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ LC-MS Interfaces ส่วนใหญ่ทำหน้าที่เป็นทั้งตัวเชื่อมต่อ (interface) และ ion source ในขณะเดียวกัน ที่สำคัญมีดังนี้

1. Direct liquid introduction (DLI)
2. Moving-belt (MB)
3. Particle beam (PB)
4. Fast atom bombardment (FAB) and continuous flow fast atom bombardment (CF-FAB)
5. Thermospray (TS)
6. Matrix assisted laser desorption ionisation (MALDI)
7. Atmospheric pressure ionisation (API)
 - Electrospray ionisation (ESI)
 - Atmospheric pressure chemical ionisation

LC-MS Interfaces บางแบบถูกพัฒนาขึ้นในระยะแรกๆ และประยุกต์กับการวิเคราะห์ได้ดี แต่ต่อมาเมื่อมีการพัฒนา LC-MS Interfaces ชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพดีกว่า จึงทำให้ LC-MS Interfaces แบบเก่าบางชนิดถูกเลิกใช้งานไป อย่างไรก็ตาม LC-MS Interfaces บางชนิด เช่น API ได้มีการคิดค้นขึ้นมาตั้งแต่สมัยแรกๆ และต่อมาภายหลังได้ถูกพัฒนาเพื่อให้มีประสิทธิภาพดีขึ้น และถูกนำมาประยุกต์อย่างแพร่หลายในปัจจุบัน

เมื่อประยุกต์ LC-MS กับการวิเคราะห์สารอินทรีย์ พบว่าความสามารถของ LC-MS interface แต่ละแบบนั้นแตกต่างกัน ส่วนใหญ่สามารถใช้วิเคราะห์สารได้กว้างครอบคลุมทั้งสารที่มีคุณสมบัติ nonpolar และ polar อย่างไรก็ตามความสามารถในการประยุกต์นั้นแตกต่างกันในแต่ละ interface การวิเคราะห์สารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงๆ นั้นมี interface ที่เหมาะสม 2 แบบคือ FAB และ API-Electrospray ในขณะเดียวกันเมื่อพิจารณาน้ำหนักโมเลกุลของสารพบว่า LC-MS interfaces ส่วนใหญ่สามารถประยุกต์ได้กับสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 1,200 amu ในขณะที่ API-Electrospray นั้นเป็น interface เดียวที่สามารถประยุกต์ได้ครอบคลุมถึงสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงถึง 100,000 amu แต่มีข้อเสียตรงที่ไม่สามารถใช้กับสารที่เป็นกลุ่ม nonpolar ได้ ดังนั้นจึงได้มีการปรับโครงสร้างของ electrospray ion source ให้สามารถวิเคราะห์สารกลุ่ม nonpolar โดยมีกลไกช่วยให้สารละลายระเหยเป็นไอโดยใช้ความร้อน และมีการกระตุ้นให้เกิดไอออนด้วยกระบวนการทางเคมี จึงเรียกกระบวนการนี้ว่า atmospheric pressure chemical ionisation (APCI) ซึ่งทั้ง electrospray และ APCI ion source สามารถใช้สลับกันบนเครื่องมือเดียวกันได้ เนื่องจากมีโครงสร้างหลักเหมือนกัน

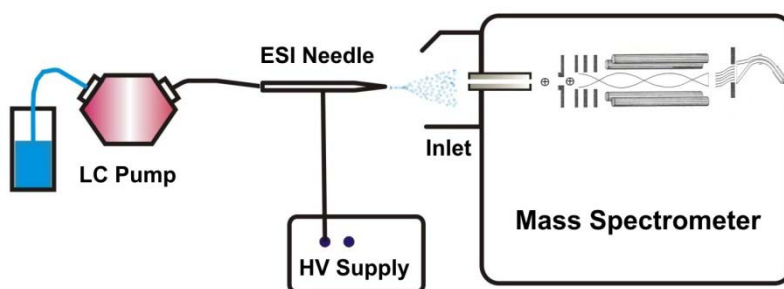
Atmospheric pressure ionisation (API)

เทคนิค API นี้ได้ถูกพัฒนาขึ้นในยุคแรกๆ ของความพยายามต่อ LC เข้ากับ MS แต่ไม่ประสบความสำเร็จเท่าไรนัก จนได้มีการปรับปรุงขึ้นใหม่ในระยะหลังและมีประสิทธิภาพดีล้าหน้า LC-MS interfaces บางแบบ ทำให้ได้รับความนิยมมากขึ้นในปัจจุบัน

API เป็นเทคนิคการ ionization ในความดันบรรยากาศปกติ (atmospheric pressure ionization) ซึ่งแบ่งเป็น 2 เทคนิคย่อยคือ electrospray ionization (ESI) และ atmospheric pressure chemical ionization (APCI) ดังได้กล่าวมาแล้ว เทคนิค API จึงใช้เป็นตัวกลางการต่อควบ LC และ MS ได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ API ยังมีการประยุกต์ใช้กับสารอินทรีย์ได้กว้างกว่า LC-MS interfaces อื่นๆ หากเปรียบเทียบความสามารถของการประยุกต์ระหว่าง API-ESI และ APCI พบว่า เทคนิค ESI มีการประยุกต์ที่ครอบคลุมสารส่วนใหญ่ที่สามารถวิเคราะห์ด้วย APCI เช่นกัน ยกเว้นในกรณีที่เป็นสารประเภทที่มีความเป็น nonpolar สูง ดังนั้น ESI จึงนับได้ว่าเป็น LC-MS interface ที่เป็นตัวเลือกลำดับแรกของการวิเคราะห์ห้องค์ประกอบจาก LC ด้วย MS

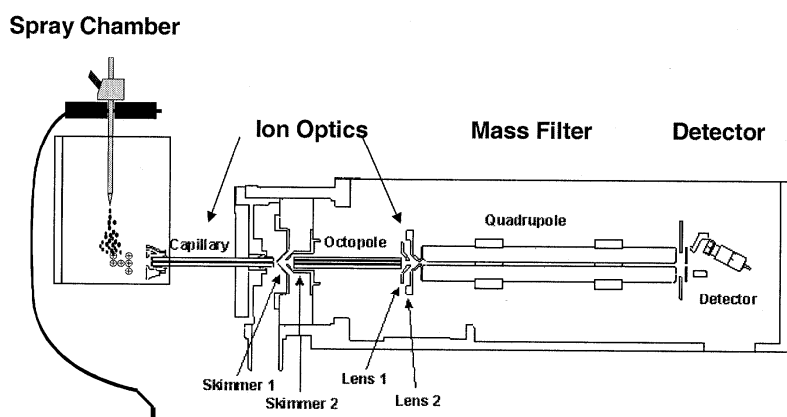
■ Electrospray ionisation : ESI

ESI เป็นเทคนิคที่ทำให้สารตัวอย่างที่ออกมาจากระบบ LC เกิดเป็นไอออนได้โดยการทำให้ของเหลวอยู่ในสภาพเป็นละอองเล็ก ๆ และใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าสูงในการทำให้เกิดการเหนี่ยวนำเป็นประจุของโมเลกุลต่างๆ ที่อยู่ภายในละอองของเหลวเล็กๆ นี้ ดังนั้นโมเลกุลของสารตัวอย่างจึงถูกทำให้อยู่ในสภาวะเป็นไอออน ซึ่งอาจเป็นไอออนบวกหรือไอออนลบก็ได้ จากนั้นเมื่อให้ความร้อนแล้วทำให้ตัวทำละลายระเหยออกจากละอองเล็กๆ เหล่านี้ จนขนาดของมันเล็กลงมาก ในขณะที่จำนวนไอออนมีอยู่เท่าเดิม ในที่สุดจึงเกิดแรงผลักกันของประจุภายในละอองที่มีขนาดเล็กลง ทำให้ไอออนของสารตัวอย่างแตกออกมาอยู่ในสภาวะแก๊ส หรือสรุปได้ว่าเป็นเทคนิคที่ทำให้เกิดไอออนของสารตัวอย่างในสารละลายและเปลี่ยนไปเป็นไอออนในสภาวะแก๊ส โดยเกิดขึ้นภายใต้ความดันบรรยากาศ ภาพแสดงการคู่ควบ LC และ MS โดยมีตัวกลางเป็น ESI แสดงดังรูป 2.10



รูป 2.10 แสดงการต่อควบ LC และ MS โดยมีตัวกลางเป็น ESI

ส่วนประกอบภายในของเครื่อง mass spectrometer ที่มี LC interface เป็น ESI และ mass analyzer เป็นชนิด quadrupole แสดงในรูป 2.11 ของเหลวจากระบบ LC ไหลเข้ามาใน ESI interface โดยผ่านท่อ capillary ที่ปลายมีรูขนาดเล็กทำให้ของเหลวเกิดการแตกตัวกระจายออกเป็นละอองเล็กๆ ในห้องที่เรียกว่า spray chamber และ ionization เกิดขึ้นต่อมาใน spray chamber นี้ ซึ่งอยู่ภายใต้ความดันบรรยากาศปกติ หลังจากนั้นไอออนที่เกิดขึ้นถูกดึงดูดให้เข้ามาใน capillary ที่เชื่อมต่อระหว่าง spray chamber กับส่วนภายในของ MS ซึ่งอยู่ภายใต้สุญญากาศ จากนั้นไอออนถูกปรับให้เดินทางเป็นแนวตรงด้วยระบบของ ion optics, skimmers, lens และ octapole ก่อนที่จะเข้าสู่ quadrupole analyzer เพื่อวิเคราะห์มวลต่อไป ส่วนโมเลกุลของแก๊สไนโตรเจนและตัวทำละลายส่วนเกินถูกกำจัดโดยจะถูกปั๊มออกไปด้วย turbomolecular pump ของระบบสุญญากาศ



รูป 2.11 แผนภาพส่วนประกอบภายในของ ESI-MS แบบที่มีทิศทางการเคลื่อนที่ของ spray ตั้งฉากกับทิศทางการเคลื่อนที่ของไอออน (Orthogonal electrospray system)^[7]

กลไกของกระบวนการ ionization ใน ESI

Electrospray ionisation ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลัก ๆ คือ

1. Nebulization และ Charging
2. Desolvation
3. Ion evaporation

การ *nebulization* และ *charging* (รูป 2.12 ก) เกิดขึ้นโดยของเหลวจากระบบ HPLC ถูกนำเข้ามาในแหล่งกำเนิดไอออน (ion source หรือ spray chamber) โดยผ่าน nebulizing needle ซึ่งทำด้วยเหล็กกล้าไร้สนิม เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 100 ไมครอนอยู่ในหัวฉีด (nebulizer) โดยที่หัวฉีดนี้จะมีมีความต่างศักย์ไฟฟ้าสูงมาก จากความแตกต่างของความต่างศักย์ไฟฟ้าประมาณ 3-6 กิโลโวลต์ระหว่างหัวฉีด และ counter electrode (เช่น mass spectrometer sampling orifice) ซึ่งอยู่ห่างกัน 0.5-3 ซม. นี้ จะทำให้เกิดสนามไฟฟ้าอย่างแรง ซึ่งจะเหนี่ยวนำให้เกิดประจุขึ้นภายในของเหลว ขณะออกจากหัวฉีดเป็นละอองเล็กๆ ในลักษณะรูปกรวย (aerosol plume) ซึ่งประจุที่เกิดขึ้นมีทั้งประจุบวกและประจุลบอยู่ภายในละอองเล็กๆ มากมาย

จากนั้นในขั้นตอนของการ *desolvation* ตัวทำละลายที่อยู่ในละอองเล็กๆ จะถูกทำให้ระเหยออกไปโดยแก๊สไนโตรเจนร้อน ซึ่งพ่นออกมาจากหลอดเล็กๆ ที่อยู่ตรงกันข้ามกับหัวฉีด ดังแสดงในรูป 2.12 ข ทำให้ขนาดของละอองเล็กๆ หดลงเรื่อยๆ ส่งผลให้ charge density เพิ่มขึ้นจนประจุบนละอองเล็กๆ ไม่สามารถอยู่ด้วยกันได้ หรือทำให้ repulsive electrostatic (coulombic) forces เกินกว่าแรง cohesive forces (surface tension) ทำให้ละอองเล็กๆ แตกออกเป็นละอองขนาดเล็กลงไปอีก กระบวนการนี้จะเกิดขึ้นซ้ำกันไปเรื่อยๆ จนกระทั่งที่ผิวของของเหลวมีสนามไฟฟ้ามากเกินพอที่จะทำให้ไอออนของสารตัวอย่างแยกตัวกันออกมาอยู่ในสถานะแก๊สในขั้น *ion evaporation* (รูป 2.12 ค) ประสิทธิภาพของการเกิดไอออนในสภาวะแก๊สขึ้นอยู่กับทำให้สารตัวอย่างเกิด

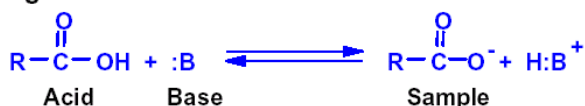
ประจุ (charging) และการที่ไอออนของสารตัวอย่างแยกตัวกันออกมาจากละอองเล็ก ๆ (evaporation) การเกิด ion evaporation สำหรับสารโมเลกุลขนาดเล็กและปานกลางมักได้ไอออนผลลัพธ์เป็น singly charged ions และหากสารที่วิเคราะห์เป็นสารโมเลกุลใหญ่ เช่น โปรตีน ที่สามารถถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการรับถ่ายโปรตอนได้หลายตำแหน่งในโมเลกุล ไอออนผลลัพธ์ที่เกิดขึ้นจึงเป็นแบบ multiply charged ions

โดยทั่วไปไอออนของสารโมเลกุลเล็กที่เกิดขึ้นโดยอิเล็กโตรสเปรย์ไอออนในเซชัน จะให้ mass spectrum ที่มี base peak เป็น $[M+H]^+$ ดังแสดงในสมการ

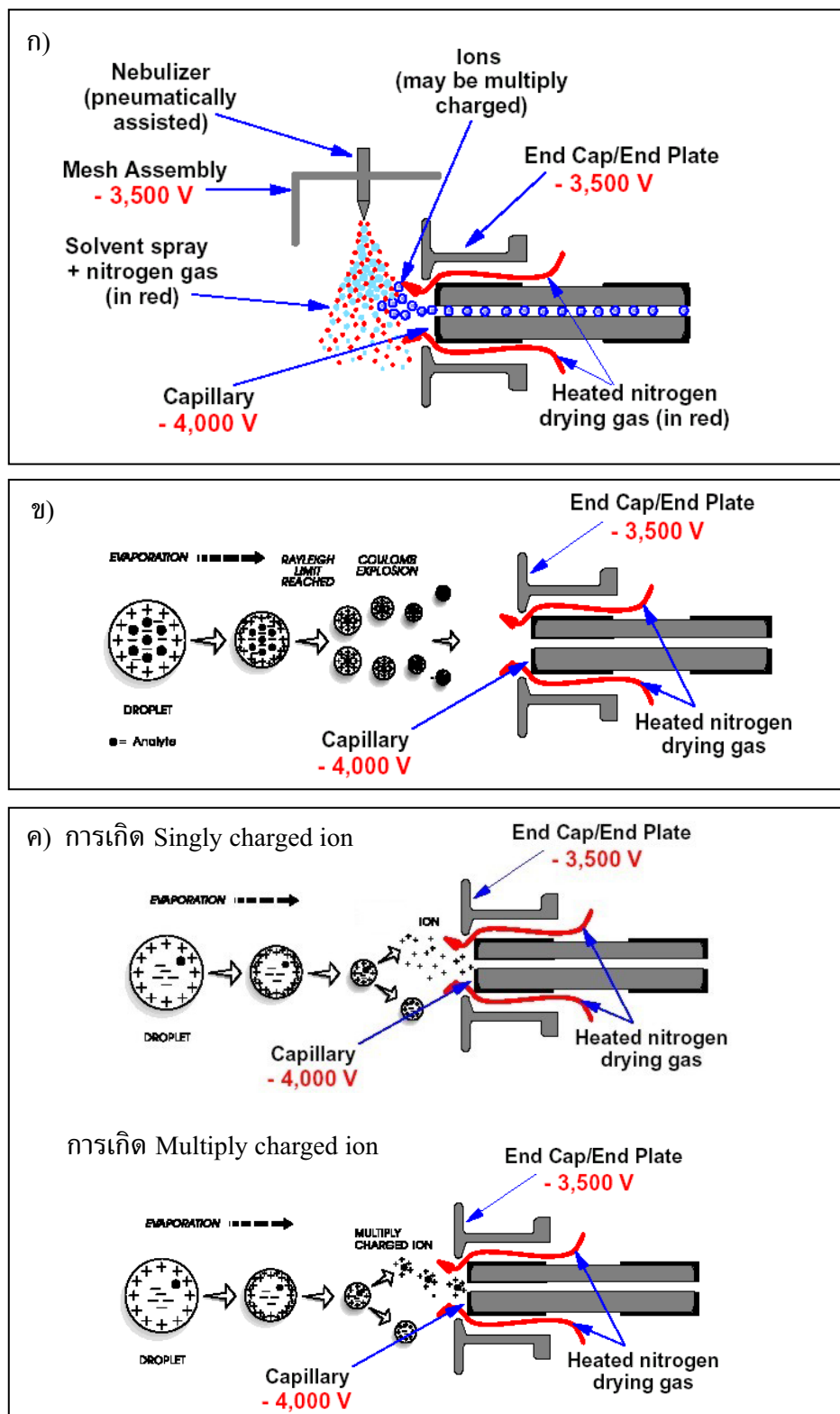
Positive Ion Mode



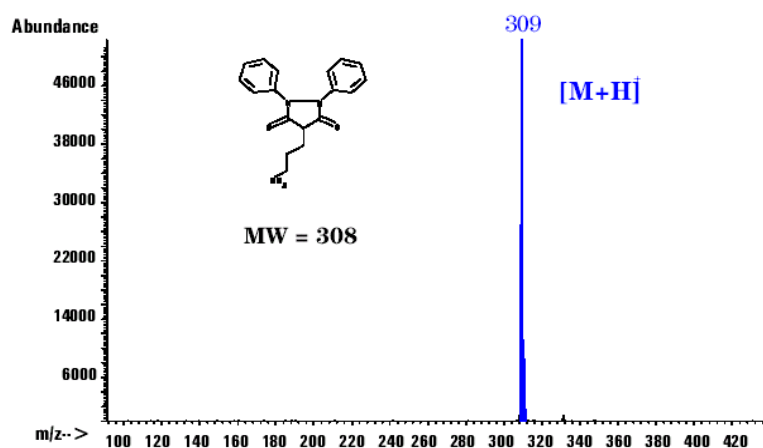
Negative Ion Mode



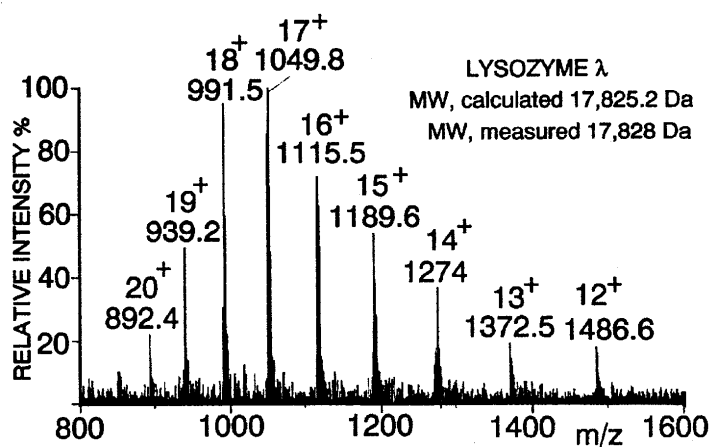
ตัวอย่าง mass spectrum ของ phenylbutazone ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย ESI-MS ในรูป 2.13 ให้ base peak ที่ m/z 309 ซึ่งเป็น protonated molecular ion ของ phenylbutazone โดยไม่ให้ fragment ions ส่วนรูป 2.14 แสดง ESI mass spectrum ของ myoglobin ที่แสดงการเกิด multiply charged ions และ singly charged ion ในรูปบนและล่างตามลำดับ ให้ค่า molecular weight ของสารอย่างชัดเจน ตัวอย่างในรูป 2.15 แสดงการแยกและวิเคราะห์สารผสมของยาระงับประสาทบางตัวที่ให้ ESI mass spectrum ที่แตกต่างกัน เนื่องจากแต่ละสารมีสูตรโมเลกุลและน้ำหนักโมเลกุลต่างกัน



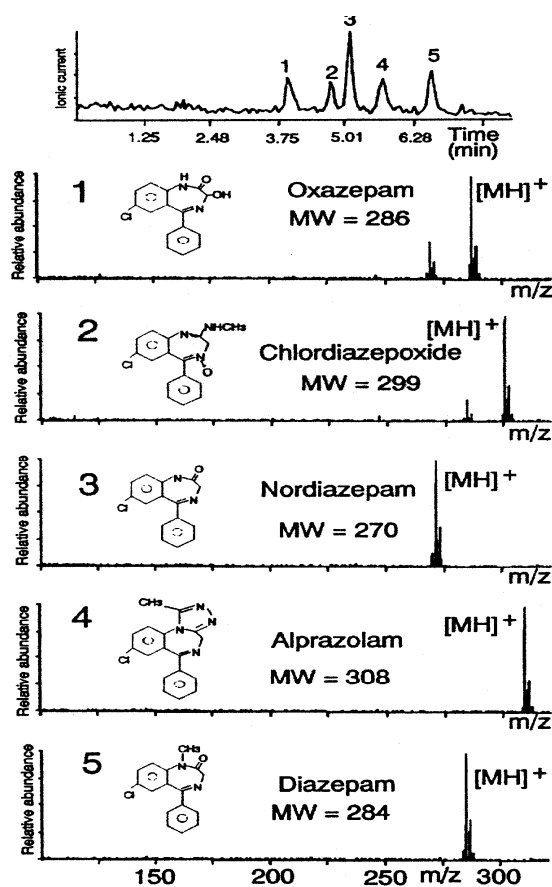
รูป 2.12 กลไกการเกิด ionization ใน ESI ก) Nebulization และ Charging
ข) Desolvation ค) Ion evaporation 2 แบบ^[7]



รูป 2.13 ESI mass spectrum ของ Phenylbutazone^[7]



รูป 2.14 ESI mass spectrum ของ Phage λ lysozyme แสดง multiply charged ions และสามารถคำนวณ MW ได้เท่ากับ $17,828 \pm 2$ Da^[8]



รูป 2.15 TIC และ ESI mass spectrum ของยาระงับประสาทบางตัว^[8]

ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดเป็นไอออนโดยอิเล็กโตรสเปย์

- 1) สารละลายที่ใช้เป็น mobile phase ของ HPLC ได้แก่
 - อัตราการไหลของ mobile phase ซึ่งจะสัมพันธ์กับการระเหยของตัวทำละลายในละอองเล็ก ๆ อัตราการไหลไม่ควรสูงกว่า 1 mL/min โดยเฉพาะหากมีน้ำเป็นตัวทำละลายอยู่ด้วย หากอัตราการไหลเร็วไปจะทำให้ละอองของเหลวซึ่งมีเวลาอยู่ใน spray chamber ไม่นานนักแห้งไม่ทัน และไม่เกิด ion evaporation ตัวทำละลายที่เหมาะสมกับเทคนิค ES ได้แก่ H₂O, acetonitrile, methanol, ethanol, isopropyl alcohol, acetone, t-butyl alcohol และ tetrahydrofuran เป็นต้น
 - ค่า pK ของสารตัวอย่าง และค่า pH ของสารละลาย
 - สารละลายที่มี pH > 7 (basic solution) จะเอื้อต่อการเกิด negative ion โดย pH ที่เหมาะสมคือ ที่ pH 9
 - สารละลายที่มี pH < 7 (acid solution) จะเอื้อต่อการเกิด positive ion โดย pH ที่เหมาะสมคือ ที่ pH 5

- ความสามารถในการนำไฟฟ้าของสารละลาย จะมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการหลุด (desorb) ของไอออนออกจากละอองเล็กๆ ซึ่งอาจเติม isopropanol เพื่อปรับปรุงความสามารถในการนำไฟฟ้าของตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว

2) ควรหลีกเลี่ยงสารตัวอย่างที่ไม่มีขั้ว เช่น polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) และ polychlorinated biphenyl (PCBs)

3) ตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับตัวกลางอิเล็กโตรสเปย์ (electrospray interface) ได้แก่ methanol, ethanol, propanol, isopropanol, butanol, acetonitrile, water, acetic acid, formic acid, acetone, dichloromethane, chloroform, ส่วน dimethylformamide และ dimethylsulfoxide ควรใช้ $\leq 10\%$ เพื่อช่วยทำให้เกิดไอออนในสารละลายและควรหลีกเลี่ยงตัวทำละลายดังต่อไปนี้ ได้แก่ toluene, benzene, hydrocarbon เช่น hexane, styrene, cyclic hydrocarbon, CCl_4 และ CS_2

นอกจากนี้ ตำแหน่งและสภาวะของ spray needle และความดันที่เนบิวไลเซอร์ (nebulizer pressure) มีผลต่อการเกิดเป็นไอออนของสาร เนื่องจากการปรับ needle นี้จะถูกกำหนดโดยลักษณะของละอองเล็กๆ เช่น ความสมมาตรของละอองเล็กๆ ที่ถูกสเปย์ออกมา ขนาดของละอองเล็กๆ และสารละลายตัวอย่างที่ออกมาจากหัวฉีด สภาวะและการตั้งค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่คาปิลลารี และ chamber มีผลต่อกระบวนการการเกิดเป็นไอออน

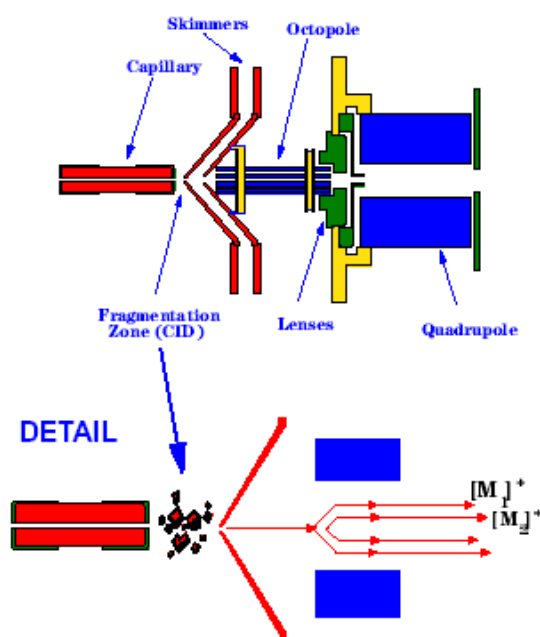
การทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของการเกิดเป็นไอออนของสารตัวอย่างในเทคนิคอิเล็กโตรสเปย์ในอันดับแรกทราบว่าสารตัวอย่างนั้นมีแนวโน้มที่จะเกิดไอออนชนิด $[\text{M}+\text{H}]^+$ หรือ $[\text{M}-\text{H}]^-$ และเลือก mode ของการตรวจวัดไอออนให้ตรงกับประเภทไอออนของสาร คือ positive และ negative mode สำหรับ cation และ anion ตามลำดับ จากนั้นควรทำการทดลองเพื่อศึกษาผลของความต่างศักย์ไฟฟ้าที่แฟร็กเมนเตอร์ (fragmentor voltage) ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่คาปิลลารี (capillary voltage) ความดันที่เนบิวไลเซอร์ (nebulizer pressure) อัตราการไหลของแก๊สอบแห้ง (drying gas flow) และ อุณหภูมิของแก๊สอบแห้ง (drying gas temperature) ต่อการเกิดเป็นไอออนของสาร แต่ปัจจัยดังกล่าวจะขึ้นอยู่กับคุณสมบัติทางเคมีของสารตัวอย่าง องค์ประกอบ และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่อีกด้วย โดยความดันที่เนบิวไลเซอร์ อัตราการไหลของแก๊สอบแห้ง และ อุณหภูมิของแก๊สอบแห้งจะขึ้นอยู่กับองค์ประกอบและอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ ส่วนความต่างศักย์ไฟฟ้าที่คาปิลลารีจะขึ้นอยู่กับคุณสมบัติทางเคมีของสารตัวอย่าง

การเกิด fragmentation ใน API : Collision Induced Dissociation (CID)

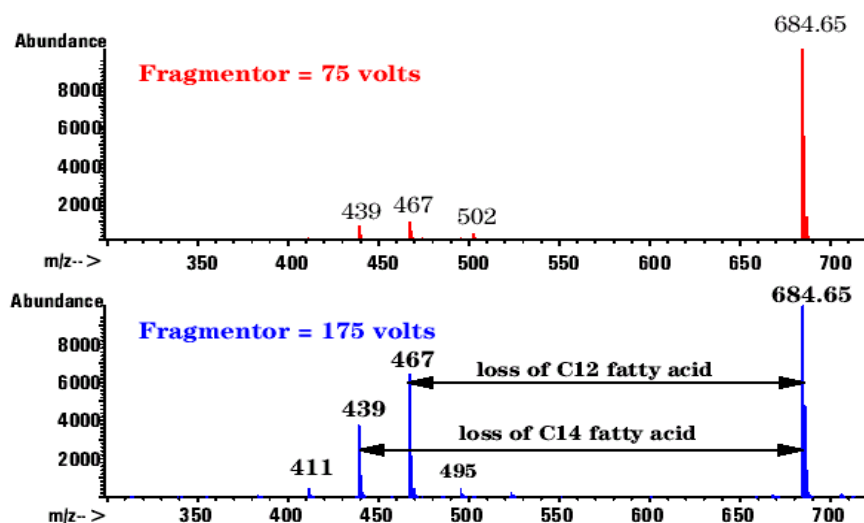
เนื่องจากการ ionization ในกระบวนการแบบ API ทั้ง ESI และ APCI นั้นเกิดโดย chemical reaction ซึ่งส่วนใหญ่เป็นกลไกแบบ proton transfer และ electrophilic addition ดังนั้น การเกิด fragmentation จึงมีโอกาสน้อยมากโดยเฉพาะสารที่มีพันธะคู่หรือมี aromatic ring อยู่ในโมเลกุล สำหรับสารที่มีพันธะที่ไม่แข็งแรงอาจเกิดการแตกพันธะได้ fragment ions แต่ไม่ได้มีจำนวนมากนัก mass spectrum ที่ได้จึงมีรายละเอียดไม่เพียงพอที่จะใช้ระบุโครงสร้างทางเคมีของสารนั้น

เทียบกับสารมาตรฐาน ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อให้ไอออนโมเลกุลที่ได้จากเทคนิค API เกิดการแตกตัวให้ fragment ions เทคนิคดังกล่าวนี้เรียกว่า *collision induced dissociation (CID)* ซึ่งในกระบวนการ API ทำโดยใช้แก๊สเฉื่อยเช่น N_2 เข้าพุ่งชนไอออนโมเลกุลในขณะเดินทางไปยัง mass analyzer รูป 2.16 แสดงตำแหน่งของการเกิด CID (fragmentation zone) ใน ESI ที่ช่องว่างหลังจากที่ไอออนเคลื่อนที่ออกจาก capillary ก่อนเข้าสู่ skimmer

ในกรณีของ CID นี้ พลังงานของไอออนที่ได้รับจากปลายด้านในของ capillary (fragmentor voltages) เป็นตัวกำหนดอัตราการแตกตัวของไอออนโมเลกุล โดยที่แก๊ส N_2 ที่เข้าพุ่งชนไอออนนั้นมีพลังงานและความเร็วคงที่ ดังนั้นรายละเอียดของ mass spectrum ที่ได้จะมากน้อยเพียงไรขึ้นอยู่กับความต่างศักย์ที่ให้แก่อิออนที่ปลายของ capillary รูป 2.17 แสดง mass spectrum ของ triglyceride ตัวอย่างที่ใช้ fragmentor voltages ต่างกัน โดย fragmentor voltage สูงให้ mass spectrum ที่มี fragment ions ที่เกิดจากการสูญเสีย side-chain fatty acids ที่มีความสมบูรณ์สัมพันธ์สูงกว่าที่ใช้ fragmentor voltage ต่ำ



รูป 2.16 ตำแหน่งของการเกิด fragmentation แบบ CID^[7]

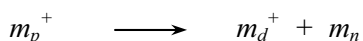


รูป 2.17 ESI mass spectrum ของ triglyceride แสดง fragment ions ที่มีความสมบูรณ์สัมพัทธ์สูงขึ้น เมื่อใช้ fragmentor voltage ที่สูงขึ้น^[7]

2.6 เทคนิคแมสสเปกโตรเมตรีแบบต่อเรียงกัน (Tandem Mass Spectrometry: MS/MS)

เทคนิค MS/MS ได้ถูกนำมาประยุกต์เพื่อวิเคราะห์สารอินทรีย์ในตัวอย่างที่มีความซับซ้อนขององค์ประกอบสูง เช่น สารสกัดจากธรรมชาติ การวิเคราะห์ด้วย MS/MS มีข้อดีตรงที่ไม่ต้องทำองค์ประกอบที่สนใจนั้นให้อยู่ในรูปสารบริสุทธิ์ก่อน หรือไม่ต้องอาศัยการแยกองค์ประกอบที่สนใจออกจากองค์ประกอบอื่นๆ ในสารสกัดด้วยเทคนิค chromatography

หาก mass spectrometer ที่ใช้เป็นแบบที่มี mass analyser มากกว่าหนึ่งตัว เช่น triple-stage quadrupole หรือ hybrid mass spectrometer เช่น quadrupole และ time-of-flight เมื่อสารตัวอย่างที่ประกอบด้วยหลายองค์ประกอบถูกนำเข้าไปใน ion source ของ MS โดยไม่ได้ผ่านการแยกองค์ประกอบด้วย chromatography สารเหล่านั้นเกิด ionisation ตามด้วย fragmentation ได้ molecular ions และ fragment ions ของสารแต่ละตัวอยู่รวมกัน ไอออนเหล่านั้นเมื่อผ่านเข้ามายัง mass analyser ตัวแรก (MS1) ซึ่งถูกโปรแกรมไว้ให้เลือกไอออนเพียงตัวเดียว (SIM mode) และเป็นไอออนที่แสดงลักษณะเฉพาะของสารที่สนใจ เช่น molecular ion (หากไม่มี isomer ของสารนั้นรวมอยู่ในสารสกัด) จากนั้นไอออนตัวเดียวนั้น (ซึ่งขณะนี้คือ parent ion) จะถูกส่งผ่านเข้าไปในระบบเลนส์หรือ octapole ซึ่งทำหน้าที่ปรับวิถีการเคลื่อนที่ของไอออนให้เป็นแนวตรง และก่อนที่ไอออนนั้นจะเดินทางเข้าไปยัง mass analyser ตัวที่สอง (MS2) มันจะถูกชนด้วยโมเลกุลของแก๊สเฉื่อยเช่น N_2 ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นแบบ bimolecular dissociation เรียกปฏิกิริยาการแตกตัวที่เกิดขึ้นว่า “collision induced dissociation: CID” ได้ผลลัพธ์เป็น daughter ions และ neutral fragments ดังสมการ



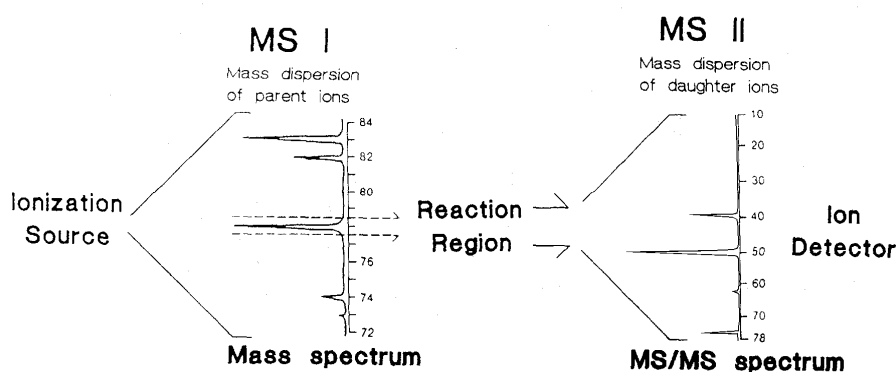
เมื่อ m_p^+ = parent ion

m_d^+ = daughter ions

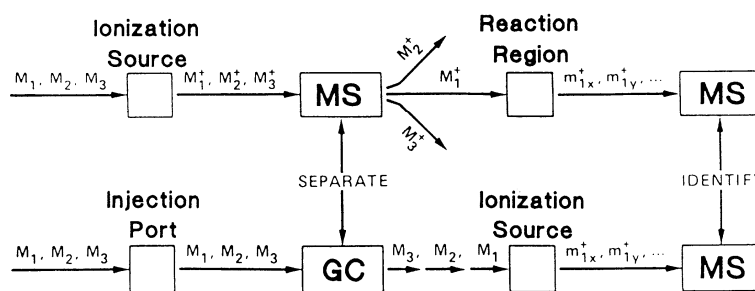
m_n = neutral fragments

ดังนั้น mass spectrum ที่ได้จากการ scan ด้วย mass analyser ตัวที่สองจึงเป็น mass spectrum ของ daughter ions หาก parent ion มีพลังงานและโครงสร้างของโมเลกุลที่เอื้อต่อการแตกพันธะจะทำให้เกิด daughter ions ขึ้นหลากหลายไอออน ซึ่งจะเป็นข้อมูล mass spectrum ที่มีรายละเอียดสามารถใช้ในการเปรียบเทียบเพื่อระบุหรือยืนยันโครงสร้างของสารได้ดี โดยปกติในการทำงานแบบ MS/MS โปรแกรมของคอมพิวเตอร์สามารถเก็บข้อมูลทั้ง mass spectrum ที่เกิดจากการ scan ของ mass analyser ตัวแรก และ MS/MS spectrum ที่ได้จากการ scan ของ mass analyser ตัวที่สองดังแสดงในรูป 2.18 ไอออนที่เลือกโดย mass analyser ตัวแรกนั้น ไม่จำเป็นต้องเป็น molecular ion อาจเป็นไอออนใดๆ ที่แสดงเอกลักษณ์ของสารที่สนใจ และไอออนนั้นควรมีความสมบูรณ์สัมพัทธ์ไม่ต่ำเกินไปนัก

แผนภาพรูป 2.19 แสดงการวิเคราะห์ห้องค์ประกอบที่สนใจในสารสกัดด้วย MS/MS ซึ่งเทียบได้กับการแยกและวิเคราะห์ด้วย chromatography-mass spectrometry เช่น GC-MS โดยที่ mass analyser ตัวแรกของ MS/MS ทำหน้าที่แยกสารที่สนใจออกมาจากองค์ประกอบอื่นๆ เช่นเดียวกับการแยกด้วย GC หรือ LC

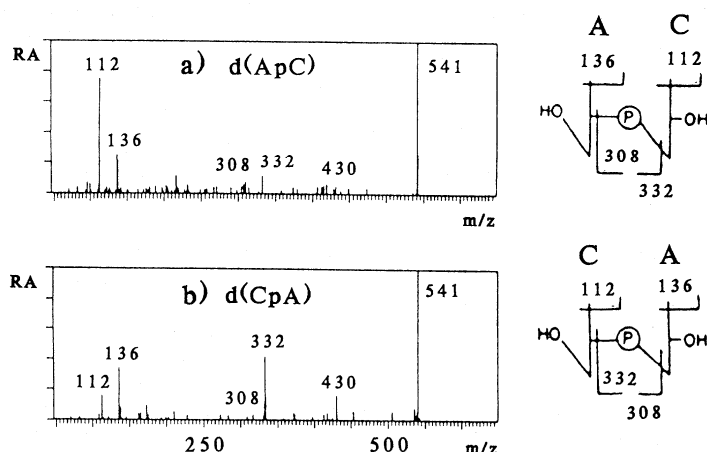


รูป 2.18 แผนภาพแสดงข้อมูล mass spectrum ที่ได้จากเทคนิค MS/MS^[9]



รูป 2.19 แผนภาพแสดงการเปรียบเทียบเทคนิค MS/MS และ GC-MS^[9]

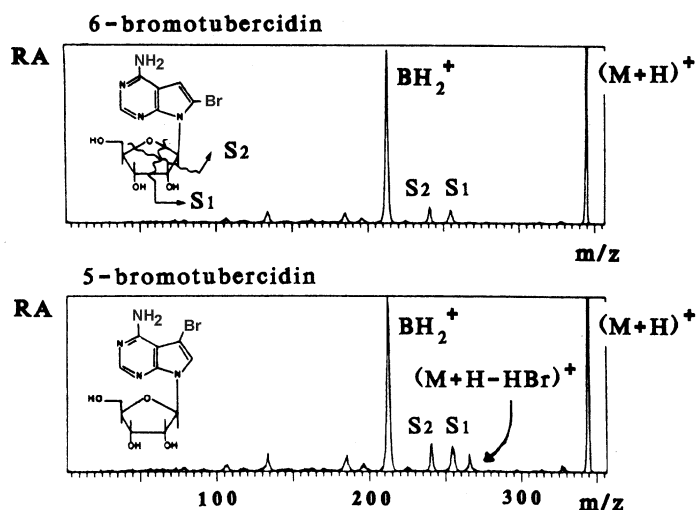
ประโยชน์ของเทคนิค MS/MS ที่สำคัญอีกประการหนึ่งคือ ความสามารถในการแยกแยะ isomers ของสารอินทรีย์ที่ให้ mass spectrum ในลำดับแรกมีความคล้ายคลึงกันมากจนไม่สามารถระบุโครงสร้างได้ แต่เมื่อเลือกไอออนหนึ่งของสารไอโซเมอร์ทั้งสองนั้นมาทำการแตกตัวโดย CID พบว่าให้ MS/MS spectra ที่แตกต่างกัน เช่น ตัวอย่าง MS/MS spectra ของไอโซเมอร์ของ deoxyribonucleoside phosphates ในรูป 2.20 ได้จาก CID ของ molecular ion ที่ m/z 541 ได้ daughter ions ที่ m/z 112, 136, 308, 332 และ 430 เหมือนกันต่างกันที่ความสมบูรณ์สัมพัทธ์ของแต่ละไอออนใน mass spectra ทั้งสอง



รูป 2.20 แผนภาพแสดงการเปรียบเทียบเทคนิค MS/MS และ GC-MS^[9]

ส่วนใหญ่ MS/MS spectra ของไอโซเมอร์จะมีความแตกต่างกันเล็กน้อยขึ้นกับโครงสร้างของ parent ion ที่เลือก และพลังงานของไอออนขณะเกิดการชน รูป 2.21 แสดง MS/MS spectra ของ 5- และ 6-bromotubercidin ที่คล้ายคลึงกันมาก แตกต่างกันที่ MS/MS spectrum ของ

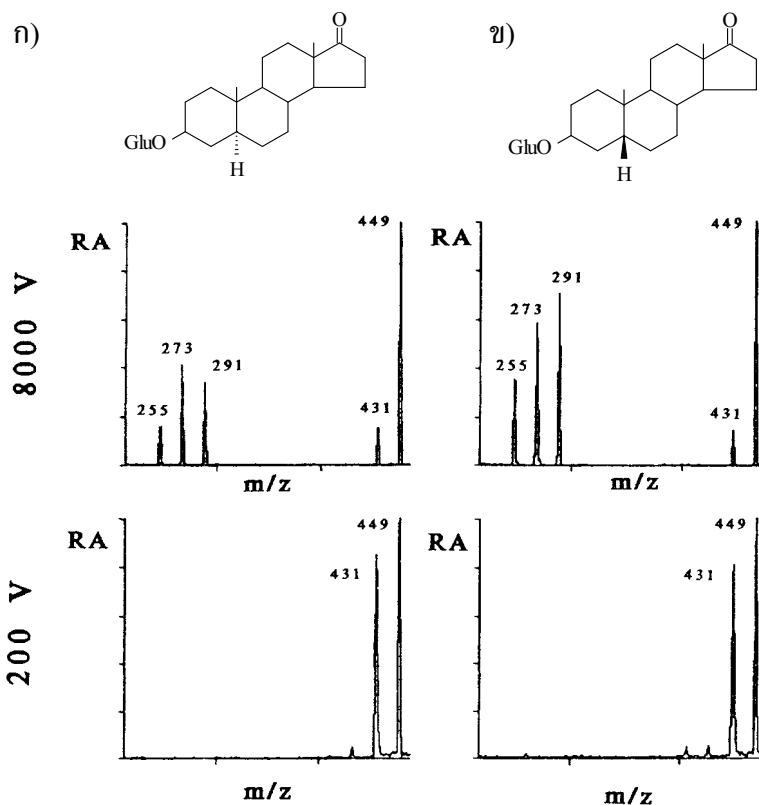
5-bromotubercidin แสดง m/z ที่เกิดจากการสูญเสีย HBr ในขณะที่ 6-bromotubercidin ไม่เกิดปฏิกิริยานี้



รูป 2.21 MS/MS spectra ของ 5- และ 6-bromotubercidin^[9]

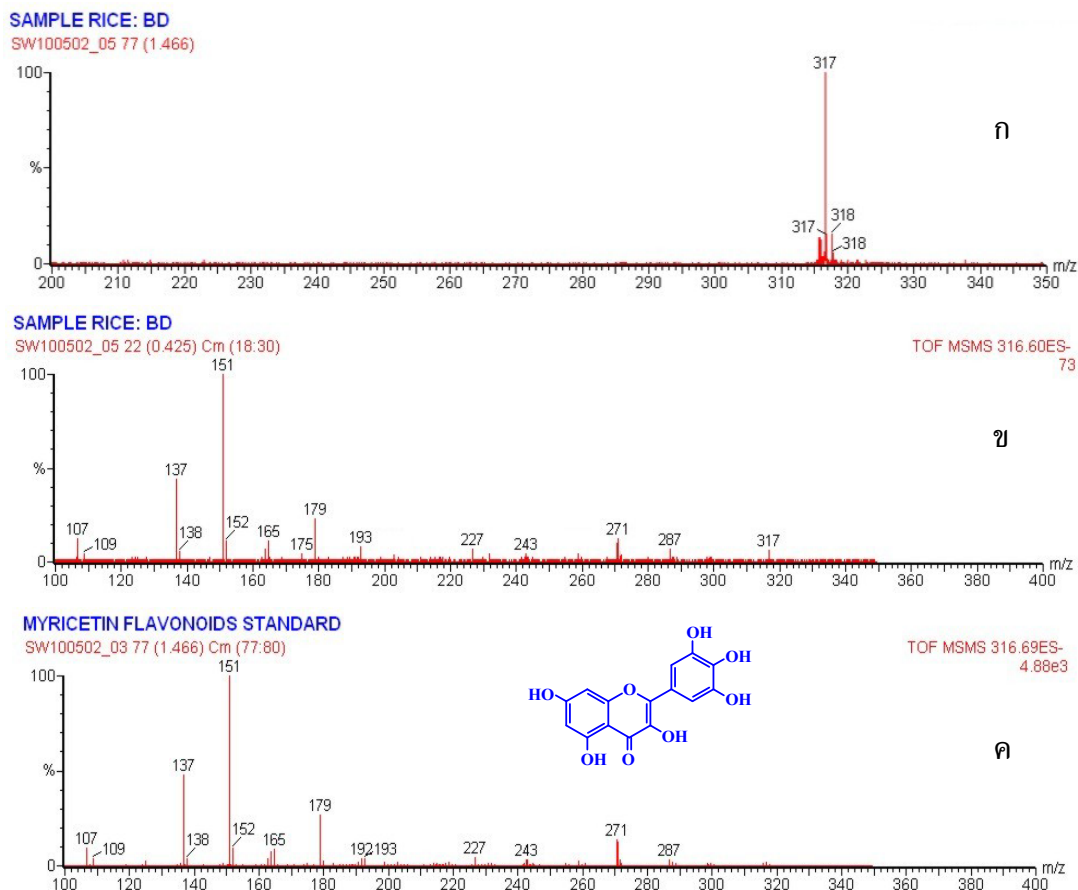
เนื่องจากพลังงานของไอออนขณะเกิดการชน (collision energy) มีผลต่อการแตกตัวของไอออน ดังนั้นการเลือกพลังงานที่เหมาะสมจะทำให้ได้คุณภาพของ MS/MS spectra ตามที่ต้องการ เช่น MS/MS spectra ของ 5- α - และ 5- β -androsterone glucuronide ในรูป 2.22 ก) และ ข) ตามลำดับ เมื่อใช้ collision energy 200 V (mass spectrum รูปล่าง) พบว่า MS/MS spectra ของสารทั้งสองให้ daughter ions เด่นๆ ที่ m/z 449 และ 431 เหมือนกัน และมี pattern ของ MS/MS spectra ที่คล้ายคลึงกันมาก แต่เมื่อเพิ่ม collision energy เป็น 8000 V พบว่า MS/MS spectra ของสารทั้งสอง (mass spectrum รูปบน) มี pattern ที่แสดงความแตกต่างกันชัดเจนขึ้น

อย่างไรก็ตามการใช้ collision energy ที่สูงเกินไปอาจทำให้เกิดการแตกตัวได้ดีมาก จนขาดไอออนที่ m/z สูงและเป็นไอออนที่สำคัญไปได้เช่นกัน ที่สำคัญคือค่า collision energy ที่เหมาะสมของสารแต่ละตัวนั้นแตกต่างกันไปตามลักษณะโครงสร้างของสาร ดังนั้นก่อนการวิเคราะห์สารตัวอย่างจึงควรนำสารมาตรฐานมาทำการทดลองเพื่อหาค่า collision energy ที่เหมาะสมก่อน ในการวิเคราะห์ตัวอย่างสารอินทรีย์ที่ระเหยยากหรือสลายตัวด้วยความร้อน ซึ่งต้องใช้ในการแยกด้วย LC นั้น mass spectrum ที่ได้มักไม่มีรายละเอียดของไอออนย่อย เนื่องจากการ ionisation ส่วนใหญ่นั้นเกิดแบบ chemical ionisation และ mass spectrum ที่ได้ส่วนใหญ่แสดงเฉพาะ protonated molecular ion หรือ adduct ion เทคนิค MS/MS สามารถแก้ปัญหานี้ได้ โดย mass spectrum ของ daughter ions มีรายละเอียดและมีความสมบูรณ์ของ fragment ions สูงพอที่จะใช้ในการระบุโครงสร้างทางเคมีของสารตัวอย่างเทียบกับสารมาตรฐานได้อย่างมั่นใจ



รูป 2.22 MS/MS spectra ของ ก) 5- α - และ ข) 5- β -androsterone glucuronide^[9]

ตัวอย่างการวิเคราะห์สารสกัดจากรำข้าวพันธุ์หนึ่งที่ไม่ได้ผ่านการแยกด้วย chromatography ด้วยเทคนิค ESI-MS (negative ion) ให้ mass spectrum ที่มีไอออนมากมาย แสดงว่ามีสารหลายองค์ประกอบ และพบไอออนหนึ่งที่ m/z 317 $[M-H]^-$ คาดว่าน่าจะเป็น dehydrogenated molecular ion ของ flavonoid myricetin ซึ่งมี MW 318 การศึกษาต่อมาด้วย MS/MS ที่ m/z 317 นี้พบว่า MS/MS spectra ของไอออนในสารสกัดและ standard myricetin นั้นเหมือนกันมากทั้ง m/z ของไอออนย่อยที่หลากหลายและความสมบูรณ์สัมพันธ์ของแต่ละไอออนนั้น (รูป 2.23)



รูป 2.23 ก) ESI-MS spectrum ขององค์ประกอบในสารสกัดจากข้าว ข) MS/MS spectra ของสารสกัดที่ m/z 317 และ ค) ของ standard myricetin

การใช้ MS/MS spectrum ในการระบุโครงสร้างทางเคมีของสารที่สนใจ จึงอาจทำได้โดยการศึกษาร่วมเทียบกับ MS/MS ของสารมาตรฐานที่ได้ทำการทดลองในสถานะและเครื่องมือชุดเดียวกัน เนื่องจาก pattern ของ MS/MS spectrum นั้นมีความแปรปรวนไปตามสถานะและพลังงานของไอออนในขณะเกิดปฏิกิริยา dissociation และการใช้ฐานข้อมูลสากลจึงไม่เป็นที่นิยม อย่างไรก็ตามการประยุกต์เทคนิค MS/MS ในการพิสูจน์โครงสร้างของสารอินทรีย์ได้มีรายงานมาอย่างต่อเนื่อง และมีแนวโน้มที่จะได้รับความนิยมมากขึ้นอีกในปัจจุบัน

2.7 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

รายงานการศึกษาเกี่ยวกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเมล็ดข้าวสี (pigmented rice) ซึ่งได้แก่ ข้าวสีดำ (black rice) ข้าวสีแดง (red rice) และข้าวสีม่วง (purple rice) นั้นได้มีผลงานตีพิมพ์ออกมามากในช่วงทศวรรษหลัง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการพัฒนาของเทคนิคการสกัดและเครื่องมือวิเคราะห์ทางเคมีที่ทันสมัย และสามารถให้ประสิทธิภาพการวิเคราะห์ที่แม่นยำขึ้นในราคาที่ไม่แพงนัก ประกอบกับความสนใจของนักวิจัยในเรื่องของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในอาหารจำพวกธัญพืช

ที่มีมากขึ้นในระยะหลังจนถึงปัจจุบัน จากการศึกษาข้อมูลพบว่ารายงานดังกล่าวที่ได้ตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารทั้งระดับนานาชาติ และระดับประเทศส่วนใหญ่อยู่ในแถบภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ที่มีการนำมาตีพิมพ์เผยแพร่มากที่สุดได้จากคณะวิจัยของประเทศจีน รองลงมาคือ ญี่ปุ่นและเกาหลี โดยไม่พบรายงานจากประเทศไทยทั้งที่พันธุ์ข้าวสีพื้นเมืองของไทยนั้นมีเป็นจำนวนมาก

ในระยะแรกรายงานการวิจัยดังกล่าว ได้เน้นการพัฒนาเทคนิคการสกัดสารสีจากรำข้าวสีเพื่อนำมาใช้เป็นสารเติมแต่งในอาหาร^[10-12] พบว่ารายงานการวิจัยระยะต่อมาได้มีการศึกษาธาตุและสารอาหารที่สำคัญในข้าวสีเปรียบเทียบกับข้าวขาว เช่น รายงานของ Chung และ Lim^[13] ในปี 1999 พบว่า ข้าวสีดำมีเส้นใย กรดอะมิโนที่จำเป็นบางตัว และสารกลุ่มวิตามินบี เช่น thiamine, riboflavin และ niacin รวมทั้งเกลือแร่ เช่น โพแทสเซียม แมกนีเซียม และแคลเซียม มากกว่าข้าวขาว และได้มีรายงานการประยุกต์เทคนิค VU-Vis spectrophotometry ในการวินิจฉัยเอกลักษณ์สาร anthocyanin ในข้าวสีดำพันธุ์ของประเทศจีน พบว่าเป็นสาร petunidin 3-(6'-malonylglucoside)^[14]

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของข้าวสีดำได้มีรายงานโดย Sun และคณะ^[15] โดยศึกษาจากข้าวพันธุ์ของประเทศจีน 12 พันธุ์ พบว่าสารสกัดด้วย 60% ethanol ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงและยังพบว่าฤทธิ์ดังกล่าวสัมพันธ์กับปริมาณ total flavonoids และสารสีในสารสกัดนั้น การวิจัยต่อมาโดย Ling และคณะ^[16-17] ได้รายงานผลการวิจัยลึกลงไปโดยศึกษาผลของการกินข้าวสีแดงและข้าวสีดำในกระต่ายเปรียบเทียบกับข้าวขาวธรรมดาเป็นเวลา 10 สัปดาห์ พบว่าการกินข้าวสีมีผลต่อการลดลงของภาวะผนังเส้นเลือดแดงตีบ (antiatherosclerotic effect) นอกจากนี้คาดว่าจะส่งผลต่อเนื่องถึงการเพิ่มขึ้นของสารต้านอนุมูลอิสระในกระต่าย การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในข้าวสีแดงและสีม่วงพันธุ์ของประเทศญี่ปุ่น^[18] โดยการวิเคราะห์สารสกัดใน ethanol ของข้าวสีแดง และข้าวสีม่วง อย่างละ 2 พันธุ์ เปรียบเทียบกับข้าวขาว พบปริมาณของสารกลุ่ม polyphenols มากกว่าในข้าวที่มีสี และจากการประยุกต์เทคนิค spectrophotometry ทำให้ผู้วิจัยกลุ่มนี้บอกได้ว่าสารต้านอนุมูลอิสระในข้าวสีแดงและสีม่วง คือสารกลุ่ม tannins และ anthocyanins ตามลำดับ การประยุกต์เทคนิคการวิเคราะห์ระดับสูง เช่น liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) ในการวิเคราะห์โครงสร้างของสารกลุ่ม anthocyanins ในส่วนสกัดของข้าวสีดำที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดย Hu และคณะ^[19] เมื่อไม่นานมานี้พบว่าพบว่าเป็นสาร cyanidin 3-glucoside และ peonidin 3-glucoside คณะผู้วิจัยกลุ่มนี้ยังได้สรุปศักยภาพของข้าวดำในการนำมาเป็นส่วนผสมของอาหารเพื่อสุขภาพหรืออาหารเสริมได้อีกด้วย

รายงานการวิจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวกับการศึกษาสารกลุ่ม flavonoids ในเมล็ดข้าวสีโดยตรงในแง่ของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สัมพันธ์กับโครงสร้างทางเคมีนั้นพบไม่มากนัก หนึ่งในนั้นเป็นรายงานการพบสาร isovitexin ในรำข้าวซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ^[20] รายงานที่เหลือส่วนใหญ่เป็นการศึกษาสาร allelochemicals ที่มีฤทธิ์ต้านแมลงศัตรูข้าว^[21] และสาร phytoalexins ที่มีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโต (growth inhibition) ของเชื้อโรคข้าว เช่น มีรายงานพบการสะสมมากขึ้นของสาร sakuranetin, momilactone A และ oryzalexin S ในใบข้าวพันธุ์อ่อนแอที่ได้รับเชื้อ Pyricularia

oryzae หลังการกระตุ้นด้วยรังสี UV โดย Dillon และคณะ^[22] ส่วนอีกรายงานหนึ่งโดย Padmavati และคณะ^[23] พบสาร naringenin ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Xanthomonas*, และ *Pyricularia oryzae* ได้ รายงานการวิจัยที่ถึงลงไปอีกโดย Rakwal และคณะ^[24] เมื่อไม่นานมานี้ พบว่าสาร sakuranetin ซึ่งเป็น phytoalexin ที่สำคัญของข้าวขึ้นเกิดจากปฏิกิริยา methylation ของ naringenin โดยการกระตุ้นของเอนไซม์ naringenin 7-O-methyltransferase

ในด้านการศึกษาเพื่อพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ทางเคมีทั้งในเชิงปริมาณและคุณภาพของสารกลุ่ม flavonoids ในตัวอย่างเมล็ดข้าวมีรายงานน้อยมาก แต่พบมีรายงานการวิจัยลักษณะดังกล่าวค่อนข้างมากในพืชอาหารชนิดอื่นๆ และในตัวอย่างอาหารที่ได้รับความนิยมในท้องตลาด ซึ่งรายงานส่วนใหญ่ในระยะแรกเน้นการวิเคราะห์เชิงคุณภาพแบบรวม (total flavonoids analysis) ต่อมาการประยุกต์เทคนิคทาง chromatography ทำให้สามารถวิเคราะห์ flavonoid แต่ละตัวได้โดยเน้นกลุ่มที่ได้มีรายงานไปแล้วว่ามีศักยภาพสูงในเชิงชีวภาพ ซึ่งประกอบด้วย catechin, myricetin, quercetin, apigenin, kaempferol, taxifolin, naringenin และ luteolin

วิธีการสกัดสาร flavonoids เหล่านี้จากตัวอย่างพืชและอาหารส่วนใหญ่มักใช้เทคนิคเดิมที่นิยมใช้กันโดยทั่วไป คือการสกัดด้วยตัวทำละลาย จากนั้นนำสารสกัดมาแยกวิเคราะห์ด้วยเทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC) ที่มีตัวตรวจวัดแบบต่างๆ พัฒนาขึ้นมาเป็นลำดับ เช่น รายงานของ Mattila และคณะในปี 2000^[25] ศึกษาการหาปริมาณ flavonoids 17 ตัว ในตัวอย่างพืชอาหารหลายชนิด โดยประยุกต์เทคนิค HPLC ที่มี diode array detector (DAD) และ electro array detector (EAD) เป็นตัวตรวจวัด ซึ่งสามารถตรวจวัดปริมาณ flavonoids ที่ปรากฏอยู่ในสารสกัดได้ต่ำถึงช่วง 20-200 ng เท่านั้น ในปีเดียวกัน Merken และ Beecher^[26] ได้รายงานรวบรวมข้อมูล (review) ถึงประโยชน์ของการวิเคราะห์ flavonoids ในตัวอย่างพืชด้วยเทคนิค HPLC ที่สามารถใช้วิเคราะห์เชิงคุณภาพและปริมาณของ flavonoids ได้หลายตัวในขณะเดียวกัน และสามารถประยุกต์กับตัวอย่างพืชต่างกลุ่มกันได้ รายงานเมื่อเร็วๆ นี้ โดย Sakakibara และคณะ^[27] ก็สามารถแสดงประสิทธิภาพของ HPLC-DAD ในแยกและการวิเคราะห์หาปริมาณ flavonoids ในผัก ผลไม้ และใบชาประเภทต่างๆ ได้ โดยมีการพัฒนาเทคนิค HPLC ให้สามารถวิเคราะห์ flavonoids ในสารสกัดได้โดยไม่ต้องทำปฏิกิริยา hydrolysis ก่อน ซึ่งทำให้สามารถหลีกเลี่ยงการสลายตัวของ flavonoids บางตัวได้ จึงนับว่าให้วิธีการวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องและแม่นยำขึ้น

อย่างไรก็ตามเทคนิค HPLC ที่ใช้ DAD เป็นตัวตรวจวัดนั้นให้ความมั่นใจในการวินิจฉัยเอกลักษณ์ (identification) โครงสร้างทางเคมีได้ไม่สมบูรณ์พอ รายงานการวิจัยในระยะหลังจึงเน้นการวิเคราะห์ด้วย HPLC ที่มี mass spectrometer (MS) เป็นตัวตรวจวัดควบคู่กับ DAD ทำให้สามารถยืนยันน้ำหนักโมเลกุลของ flavonoids ได้ ซึ่ง MS ที่ใช้วิเคราะห์ flavonoids ในสารสกัดนั้นต่อเชื่อม (on line) เข้ากับ HPLC ด้วยเทคนิค electrospray ionisation เป็นส่วนใหญ่ พร้อมกับได้มีรายงานการศึกษาเพื่อวิเคราะห์ข้อมูลของ mass spectrum ของสาร flavonoids ในสถานะต่างๆ ของเทคนิค เช่น positive หรือ negative electrospray ionisation^[28-30] และ collision induced dissociation (CID)^[31-32] ตลอดจน tandem MS^[33-34] เป็นต้น

ถึงแม้ยังไม่ได้มีรายงานการนำเทคนิคควบตั่งกล่าว (HPLC-DAD-ESI-MS/MS) มาประยุกต์ใช้กับการวิเคราะห์ flavonoids ในเมล็ดข้าวสาลี แต่ได้มีรายงานการนำมาประยุกต์เพื่อวิเคราะห์ปริมาณ flavonoids ในตัวอย่างพืชและอาหารอื่นๆ มากมาย^[35-38] นอกจาก HPLC แล้ว capillary electrophoresis (CE) ก็เป็นอีกเทคนิคทางเลือกหนึ่งที่นิยมใช้รองลงมาในการแยกและวิเคราะห์ flavonoids ในตัวอย่างพืชและอาหาร เนื่องจากสามารถประยุกต์ควบคู่กับตัวตรวจวัดที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพอย่างเช่น DAD และ MS ได้เช่นกัน^[39-40] นอกจากนี้ยังสามารถให้สภาพไวของการวิเคราะห์ที่ต่ำมากถึงช่วง 0.2-20 fmol ดังที่ได้รายงานโดย Aramendia และคณะ^[40]

สำหรับ anthocyanins มีผู้ให้ความสนใจในการศึกษาและวิจัยเป็นจำนวนมากซึ่งส่วนมากมุ่งศึกษาถึงการแยกประเภทและคุณสมบัติลักษณะการทำงานของ anthocyanins ผัก ผลไม้ ดอกไม้ และในพืชชนิดอื่นๆ ซึ่งการศึกษาพบว่าองค์ประกอบหลักเป็นสารกลุ่ม ไกลโคไซด์และสารประกอบของ anthocyanins ชนิดย่อยๆ อื่นๆ Farina^[41] และคณะได้วิเคราะห์ anthocyanins ในดอก mallow โดยใช้เทคนิค HPTLC-densitometry ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตรและเทคนิค reversed-phase HPLC จากการศึกษาค้นพบ malvidin-3,5-*O*-diglucoside (malvidin) และ malvidin-3-*O*-(6-*O*-malonylglucoside)-5-*O*-glucoside เป็นองค์ประกอบในดอก mallow การศึกษาเพื่อระบุเอกลักษณ์ anthocyanins ในไวท์แดงและสารสกัดของผล elderberry ของ Bridle และคณะ^[42] พบ cyanidin-3-sambubioside-5-glucoside และสารประกอบประเภท non-coloured phenolic เช่น gallic acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid, rutin, และ quercetin เป็นองค์ประกอบในไวท์แดง Bakker และคณะ^[43] ได้ระบุเอกลักษณ์ anthocyanins และ Vitisin A ในไวท์แดงและองุ่นหลังการเก็บเกี่ยว ซึ่ง Vitisin A ถูกแยก และทำให้บริสุทธิ์หลังจากนั้นทำการระบุเอกลักษณ์โดยใช้ FAB-MS และ NMR เทคนิค

ในปี ค.ศ 1998 Norbtek และ Tado^[44] ศึกษา anthocyanins ใน perianth segments ของ *crocus* สามพันธุ์โดย HPLC จากการศึกษาค้นพบ anthocyanins จากดอกสีน้ำเงินของพันธุ์ *chrysanthus* สามารถระบุเอกลักษณ์ของ anthocyanins คือ petunidin-3-*O*-(6-*O*-malonyl-D-glucoside)-7-*O*-(6-*O*-malonyl-D-glucoside) และ malvidin-3-*O*-(6-*O*-malonyl-D-glucoside)-7-*O*-(6-*O*-malonyl-D-glucoside) ส่วน anthocyanins ที่ถูกแยกจากดอกไม้สีน้ำเงินจาก *C. sieberi* ssp. *Sublirnis*, คือ 3,5-D-diglucosides ของ delphinidin และ petunidin ส่วนพันธุ์ *C. chrysanthus* พบ petunidin-3-rutinosides พิสูจน์เอกลักษณ์โครงสร้างโดยใช้เทคนิค one-dimensional และ two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy techniques (1D and 2D NMR) ต่อมา Torskangerpoll และคณะ^[45] ได้ทำการแยก anthocyanins จากดอกทิวลิปสีส้ม-แดงพันธุ์ *Queen Wilhelmina* พบ anthocyanins ที่มีโครงสร้างเป็น pelargonidin-3-*O*-[6-*O*-(2-*O*-acetyl-a-rhamnopyranosyl)-glucopyranoside] cyanidin-3-*O*-[6-*O*-(2-*O*-acetyl-a-rhamnopyranosyl)-glucopyranoside], pelargonidin-3-*O*-(6-*O*-a-rhamnopyranosyl-glucopyranoside) และ cyanidin-3-*O*-(6-*O*-a-rhamnopyranosyl-b-glucopyranoside) ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์โครงสร้างของสารประกอบ anthocyanins เหล่าดังกล่าวโดยใช้ข้อมูล 1D NMR, 2D NMR และ ESI-MS

Narayan และ Venkataraman^[46] ได้ทำการแยก anthocyanins จากแครอท โดยวิธีการไฮโดรไลซิส (chemical hydrolysis) และการใช้คอลัมน์โคมาโทกราฟี หลังจากนั้นทำการพิสูจน์

เอกลักษณ์โครงสร้างของสารประกอบ anthocyanins โดยใช้เทคนิค HPLC, ^1H และ ^{13}C NMR และ MS จากการศึกษาค้นพบ cyanidin-3-lathyroside [cyanidin-3-{xylopyranosyl-galacto pyranoside}] และ cyanidin-3-glucopyranoside และ cyanidin-3-lathyroside ในสารสกัดแครอท

Dugo และคณะ^[47] ระบุเอกลักษณ์ของแอนโทไซยานินในผลไม้ เช่น black biberry, black berry และ mulberry โดยใช้ narrow-bore HPLC-ESI-MS เทคนิค ตัวตรวจวัดที่ใช้คือ UV-DAD และ MS ร่วมกับ ESI-source จากการศึกษาค้นพบว่าในสารสกัด black biberry มีแอนโทไซยานินเป็นองค์ประกอบ 14 โครงสร้าง สารสกัด black berry พบแอนโทไซยานิน 6 โครงสร้าง และสารสกัด mulberry anthocyanins 5 โครงสร้าง

Fossen และคณะ^[48] ศึกษาหาปริมาณสัมพัทธ์ของ anthocyanins ขององุ่น 23 ชนิด แอนโทไซยานินที่มีโครงสร้าง 3-(6-Malonylglucosides) และ 3-glucosides ของ cyanidin, peonidin และ delphinidin, 3-(3,6-dimalonylglucoside), 3-(6-rhamnosylglucoside) และ 3-(6-glucosylglucoside) ของ cyanidin และ peonidin-3-dimalonylglucoside และ delphinidin-3-(6-rhamnosylglucoside) ถูกระบุเอกลักษณ์ในองุ่นที่ทำการศึกษา

Fossena และ Olavstedal^[49] ทำการศึกษาแยกแอนโทไซยานินหลักจากดอกกล้วยไม้พันธุ์ *Dracula chimaera* และ *D. cordobae* จากการศึกษาค้นพบ anthocyanins ที่ได้คือ cyanidin-3-O-(6-O-malonyl-glucopyranoside), cyanidin-3-O-(6-O-rhamnopyranosyl-glucopyranoside), cyanidin-3-O-glucopyranoside, peonidin-3-O-(6-O-rhamnopyranosyl-glucopyranoside) และ peonidin-3-O-(6-O-malonyl-glucopyranoside) ซึ่งระบุเอกลักษณ์โครงสร้างดังกล่าวโดยใช้ข้อมูล 1D และ 2D NMR spectroscopy, UV-Vis spectroscopy และ MS.

Villiersa และคณะ^[50] รายงานวิธีการวิเคราะห์ anthocyanins 16 โครงสร้างในไวท์ โดยใช้เทคนิค HPLC-DAD จากการศึกษาค้นพบในไวท์มี anthocyanins เป็นองค์ประกอบคือ malvidin-3-glucoside, malvidin-acetyl-glucoside, malvidin-coumaroyl-glucoside, vitisin A, pinotin A, และ pigment A

Tian และคณะ^[51] รายงานผลการศึกษาสารประกอบ anthocyanins ที่เป็นองค์ประกอบของสารสกัดมันฝรั่งสีม่วง purple-fleshed sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) โดยใช้เทคนิค HPLC ควบคู่กับ PAD และ ESI-MS/MS ที่เป็น triple quadrupole เทคนิค ในการตรวจหาและพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารประกอบ anthocyanins จากใช้วิธีการ precursor ion analysis, product ion analysis, and selected reaction monitoring (SRM) MS/MS การวิเคราะห์ Precursor ion จะทำการตรวจวัด molecular cations ของแอนโทไซยาโนโดยใช้โมเลกุลไอออนของแอนโทไซยานิน (cyanidin, peonidin, and pelargonidin) การตรวจวัดโมเลกุลไอออนของแอนโทไซยานินแต่ละตัวจะทำการแตกตัวของไอออนโดยใช้วิธีการวิเคราะห์ product-ion โดย collisionally activated dissociation (CAD) เทคนิค MS/MS จะใช้วิธีการตรวจวัดแบบ SRM หลังจากนั้นทำการยืนยันรูปแบบการแตกตัวของไอออนโดยใช้วิธีการวิเคราะห์แบบ product ion analysis ในการเปรียบเทียบวิธีการศึกษา product-ion analysis รวมถึงการใช้ precursor-ion analysis, product ion analysis และ SRM ซึ่งใช้

ในการระบุเอกลักษณ์ของ anthocyanins สารสกัดและเทคนิคยังกล่าวถึงให้รูปแบบการแตกตัวเป็นไอออนที่สำคัญที่ใช้ในการยืนยันโครงสร้าง จากการทดลองพบว่าในสารสกัดมันฝรั่งสีม่วง (*Ipomoea batatas* L.) มี anthocyanins เป็นองค์ประกอบอยู่ 26 โครงสร้าง

การศึกษาสกัดและระบุเอกลักษณ์ anthocyanins ในสารสกัดจาก berries พันธุ์ *Smilax aspera* L. โดย Longo และ Vasapollo^[52] ใช้ HPLC-DAD-MS พบว่ามี Pelargonidin-3-O-rutinoside เป็นองค์ประกอบถึง 83% ของปริมาณสัมพัทธ์ของ anthocyanins ทั้งหมดในสารสกัดจากเปลือกของ *Smilax aspera* berries ในขณะที่และ cyanidin-3-O-rutinoside พบเพียง 13% ของปริมาณสัมพัทธ์ของ anthocyanins ทั้งหมด ต่อมาคณะวิจัยนี้^[53] ได้ศึกษาสกัด anthocyanins ใน berries พันธุ์ *Pistacia lentiscus* L., *Phillyrea latifolia* L. และ *Rubia peregrina* L. ซึ่งในการสกัด anthocyanins ใน berries จะใช้สารละลาย 0.1% HCl ใน methanol เป็นตัวทำละลายในการสกัด หลังจากนั้นทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ C-18 solid-phase cartridge และทำการพิสูจน์เอกลักษณ์โดยใช้เทคนิค HPLC-DAD-MS ซึ่งพบว่า anthocyanins ที่เป็นองค์ประกอบหลัก *P. lentiscus* berries คือ cyanidin-3-O-glucoside ส่วนพันธุ์ *P. latifolia* and *R. peregrina* berries คือ cyanidin-3-O-rutinoside ในขณะที่ cyanidin-3-O-glucoside ตรวจวัดในปริมาณที่น้อย

เมื่อไม่นานมานี้ Duenas และคณะ^[54] ได้ศึกษาและสกัด anthocyanins ใน fig fruit (*Ficus carica* L.) 5 พันธุ์ (Colar, Cuello de Dama (green), Cuello de Dama (dark purple), Granilla and Bursa Siyahi) ซึ่งพบว่ามี anthocyanins ที่เป็นองค์ประกอบทั้งหมดอยู่ 15 โครงสร้าง ซึ่ง anthocyanins ที่พบมี aglycone เป็น cyanidin (Cy) และ pelargonidin (Pg) เป็นองค์ประกอบหลัก และในส่วนของเนื้อในของผลยังพบ peonidin-3-rutinoside (Pn-3-rutinoside) แต่พบในปริมาณที่น้อย 5-carboxypyranocyanidin-3-rutinoside, cyanidin-3-rutinoside dimmer และ 5 anthocyanins ที่เชื่อมต่อกันตรงพันธะ C-C linked (Cy and Pg) และ ฟลาโวนอล (catechin and epicatechin) เป็นสารประกอบที่เป็นองค์ประกอบ

โดยสรุปแล้วพบว่า ปัจจุบันเทคนิคการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและปริมาณสำหรับสารกลุ่ม flavonoids ในพืชอาหารนั้นเน้นการวิเคราะห์แบบ simultaneous analysis คือวิเคราะห์เชิงปริมาณและ/หรือเชิงคุณภาพของสาร flavonoids หลายๆ ตัวในขณะเดียวกัน นอกจากนี้ยังเน้นลดขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์เพื่อป้องกันการสูญเสียสาร โดยการสลายตัวไปในระหว่างการสกัดและเตรียมตัวอย่าง ดังนั้นเทคนิคควบ chromatography-mass spectrometry ที่กล่าวมาแล้วจึงเป็นเทคนิคทางเลือกที่สำคัญ อย่างไรก็ตามการประยุกต์เทคนิคดังกล่าวเพื่อวิเคราะห์สารแต่ละกลุ่มในตัวอย่างที่แตกต่างกันนั้นต้องการสภาวะของเทคนิคที่ต่างกันไปด้วย การศึกษาเชิงคุณภาพและปริมาณของสาร flavonoids ในตัวอย่างชีวสังเคราะห์ได้มีการศึกษาให้ถ่องแท้ โดยการประยุกต์เทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูงดังกล่าว เพื่อสามารถยืนยันการใช้ประโยชน์จากข้าวสีในเชิงการพัฒนาให้เป็นอาหารเพื่อสุขภาพต่อไปได้

บทที่ 3

ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากใบและรำข้าวสีดำบางพันธุ์

3.1 พันธุ์ข้าวที่ใช้ทดลอง

ตัวอย่างข้าวที่ใช้ทดลองแบ่งเป็น 2 กลุ่ม

- รำข้าว ได้แก่ รำจากข้าวเจ้าสีดำพันธุ์เจ้าหอมนิล KHNBT, KHNBT no. 3, และ พันธุ์ 1000-11-2-26 และข้าวเหนียวดำพันธุ์ KHNBD พันธุ์ข้าวทั้งหมดปลูกที่มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม ระหว่างปี พ.ศ. 2548 (รูป 3.1) รำข้าวทั้ง 4 พันธุ์นี้ใช้ในการทดลองหาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยเทคนิคต่างๆ และการวิเคราะห์ flavonoids ในกลุ่ม flavone, flavonol, flavanone และ isoflavone



ก



ข

รูป 3.1 ก. ลักษณะเมล็ดข้าวเจ้าหอมนิล ข. รำข้าวที่แยกมาใช้ทดลอง

- ต้นข้าว เลือกจากพันธุ์ข้าวเหนียวเก่า 10 พันธุ์ คือ ส.1, กำดอยสะเก็ด, 7677, 9103, 13815, 13842, 16083, 16089, 16815 และ 19125 ข้าวทุกพันธุ์เพาะกล้า (รูป 3.2) และปลูกในแปลงทดลองปลูกพืช ของภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (รูป 3.3) ในปี 2548 จากนั้นนำใบข้าวในระยะกล้า (seedling), ระยะแตกกอ (tillering) ระยะยืดตัวของลำต้น (stem elongation) ระยะสร้างรวง (booting and heading) ระยะเมล็ดนํ้านม (milking) ระยะเมล็ดแป้งแข็ง (hard dough) และระยะสุกแก่ทางสรีรวิทยา (mature grain) มาทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ต่อไป



รูป 3.2 ต้นกล้าพันธุ์ข้าวเหนียวกำ้า พื้นเมืองในเขตภาคเหนือ บางพันธุ์มีใบเป็นสีแดงเข้ม-ดำ ในขณะที่บางพันธุ์มีใบเขียวปกติเหมือนพันธุ์ข้าวขาวทั่วไป



รูป 3.3 ข้าวเหนียวกำ้าทั้ง 10 พันธุ์ในแปลงปลูกพืชทดลอง ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตร ศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ บางพันธุ์รวงที่เก็บเกี่ยวได้มีลักษณะและสีของเมล็ดต่างกัน

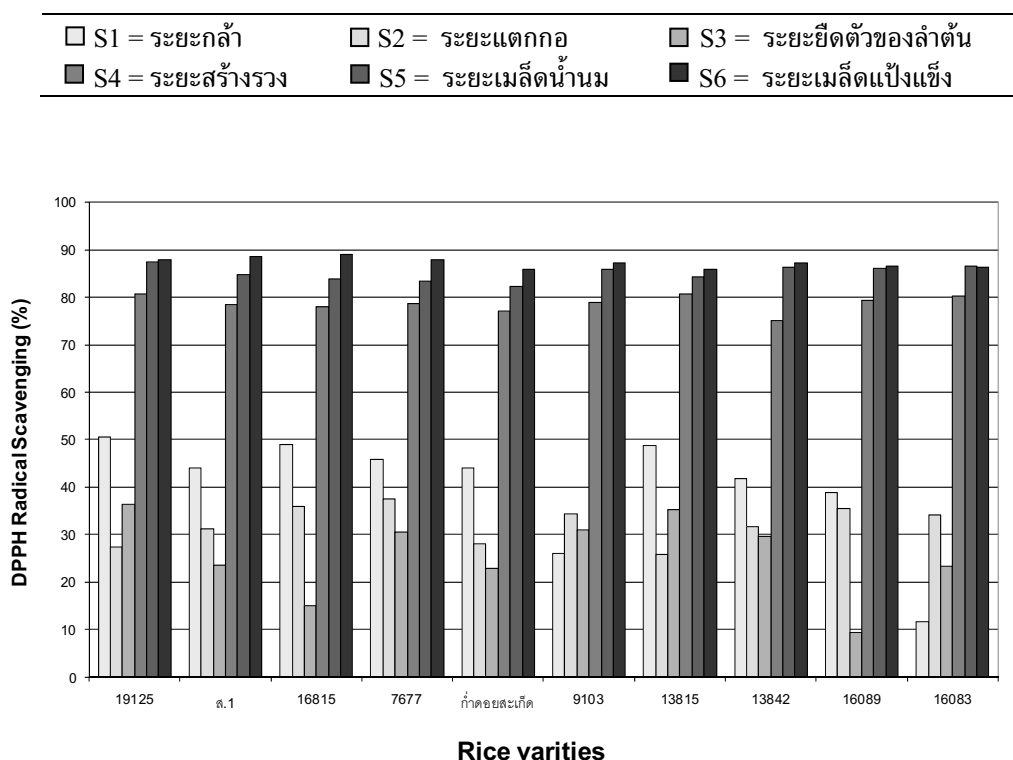
3.2ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่อ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) และปริมาณ total phenolics ของสารสกัดจากใบข้าวเหนียวกำ้า

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่อ DPPH

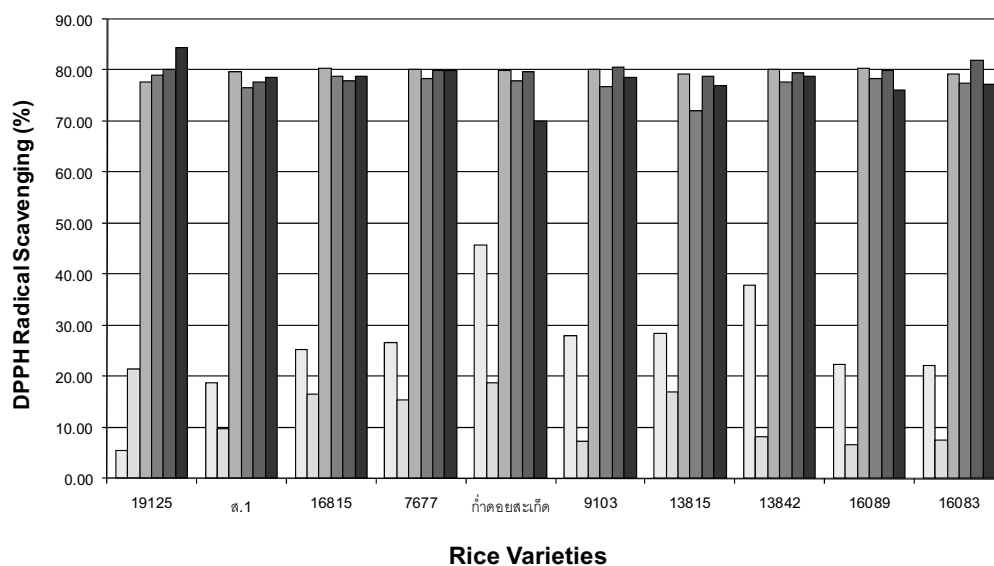
ในส่วนของใบข้าวเหนียวกำ้า ได้ทำการทดลองเพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของใบข้าวเหนียวกำ้าจำนวน 10 พันธุ์ ที่ต่างระยะการเจริญเติบโต คือ ระยะกล้า (S1) ระยะแตกกอ (S2) ระยะยี่ต้วของลำต้น (S3) ระยะสร้างรวงและตั้งท้องเต็มที่ (S4) ระยะเมล็ดน้ามน (S5) และ ระยะเมล็ดแป้งแข็ง (S6) โดยสกัดใบข้าวด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ methanol และน้ำ เนื่องจากพบว่า สารสกัดที่ได้จากตัวทำละลายทั้งสองให้สีต่างกัน จึงน่าจะม้องค์ประกอบของสารประกอบฟีนอลต่างกันด้วย อย่างไรก็ตามพบว่าโดยรวมแล้วสารสกัดด้วย methanol แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่อ DPPH สูงกว่าสารสกัดด้วยน้ำ จึงแสดงผลเฉพาะที่สกัดด้วย methanol

การทดลองในส่วนนี้ใช้ตัวอย่างข้าวจาก 2 แปลง มีที่ระยะการเพาะปลูกต่างกัน คือ แปลงแรกปลูกเมื่อวันที่ 12 กรกฎาคม 2549 (C1) ส่วน แปลงที่สองปลูกเมื่อวันที่ 11 สิงหาคม 2549 (C2) ข้าวทั้งสองแปลงปลูกในบริเวณพื้นที่เดียวกัน

กราฟในรูป 3.4 และ 3.5 แสดงผลเปรียบเทียบของ % DPPH scavenging ของสารสกัดจากใบข้าวเหนียวดำ 10 พันธุ์ จากแปลงปลูกแรกและหลังตามลำดับ พบว่าสารสกัดจากใบข้าวทั้ง 10 พันธุ์ มีฤทธิ์ใกล้เคียงกัน และให้ % DPPH scavenging น้อยกว่าใน 2-3 ระยะแรก แต่จะมากขึ้นในระยะหลัง พบว่าค่า % DPPH scavenging ที่ระยะยี่ดตัวของลำต้น (S3) ของใบข้าวจากแปลงแรก ให้ผลที่แตกต่างจากแปลงหลัง ซึ่งพบมีค่าน้อยกว่าในแปลงหลัง แสดงถึงผลของสภาพแวดล้อมของการเพาะปลูกที่ต่างกัน เช่น อุณหภูมิ ความเข้มแสง และปริมาณน้ำ ที่มีต่อการเจริญเติบโตของต้นข้าว และส่งผลถึงการสร้างและสะสมสารต้านอนุมูลอิสระในใบข้าวที่แตกต่างกันด้วย ดังนั้นทั้งระยะการเจริญเติบโตของข้าวและระยะการเพาะปลูก เป็นปัจจัยที่พบมีผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบข้าว และน่าจะสามารสรสรุปได้ว่า ต้นข้าวเริ่มมีการสร้างสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากในระยะยี่ดตัวของลำต้นจนถึงระยะสร้างเมล็ดแบ่งแข็ง และมีปริมาณโดยเฉลี่ยมากกว่าระยะกล้าและระยะแตกกอประมาณ 3-4 เท่า



รูป 3.4 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่อ DPPH ของสารสกัดด้วย methanol ของใบข้าวเหนียวดำ 10 พันธุ์ ที่ 6 ระยะการเติบโต จากแปลงทดลองที่ปลูกเมื่อวันที่ 12 กรกฎาคม 2549

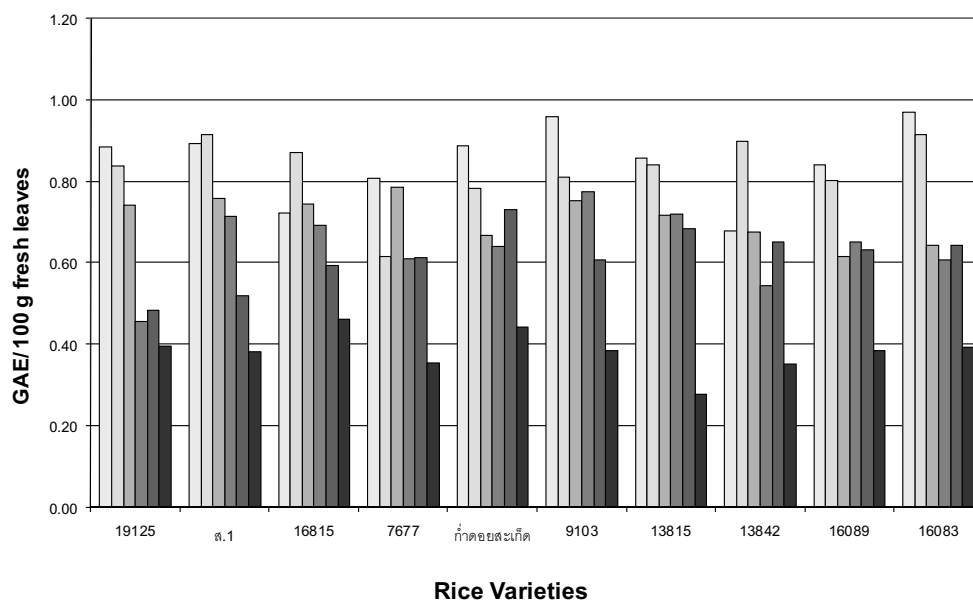


รูป 3.5 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่อ DPPH ของสารสกัดด้วย methanol ของใบข้าวเหนียวกล้า 10 พันธุ์ ที่ 6 ระยะการเจริญเติบโต จากแปลงทดลองที่ปลูกเมื่อวันที่ 11 สิงหาคม 2549

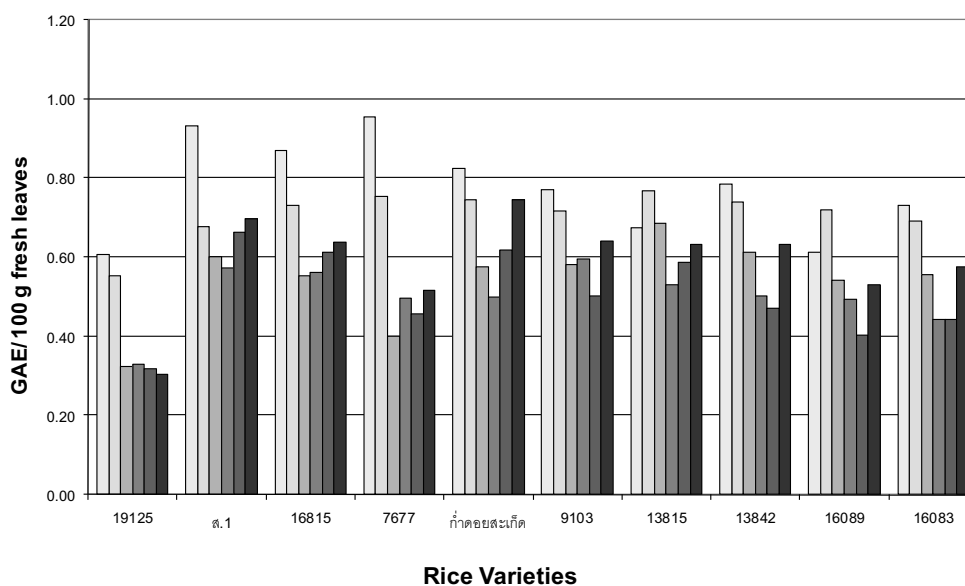
ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolics) ในใบข้าวเหนียวกล้า

การวิเคราะห์ปริมาณ total phenolics ในสารสกัดจากใบข้าวทำโดยใช้วิธีเทียบกับปริมาณของ gallic acid จากกราฟมาตรฐานซึ่งสร้างโดยเตรียมสารละลาย gallic acid ที่ความเข้มข้น 0.200, 0.150, 0.100, 0.050, 0.025 mg/mL นำมาทำปฏิกิริยากับ Folin-Ciocalteu reagent จนปฏิกิริยาเกิดอย่างสมบูรณ์ จึงวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer ปริมาณ total phenolics ในสารสกัดจากตัวอย่างข้าวที่ได้ มีหน่วยเป็น gallic acid equivalent (GAE)/g ของรำข้าว

ผลปริมาณ total phenolics ของใบข้าวที่มีระยะการเพาะปลูกต่างกัน (C1 และ C2) แสดงดังกราฟรูป 3.6 และ 3.7 ตามลำดับ พบว่าใบข้าวในระยะกล้าและระยะแตกกอมีปริมาณ total phenolic สูงกว่าในระยะอื่น ซึ่งเป็นผลในทางตรงกันข้ามกับ % DPPH scavenging ที่มีค่าสูงกว่าในระยะการเจริญเติบโตช่วงหลัง แสดงให้เห็นว่าตั้งแต่ระยะยี่ตั่วของลำต้นจนถึงระยะเมล็ดแบ่งแ่ง ต้นข้าวมีการสร้างและสะสมของสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกลุ่มอื่นที่ไม่ใช่สารประกอบฟีนอลในใบ ในปริมาณที่มากขึ้นกว่าในระยะแรกของการเจริญเติบโต ความแตกต่างของปริมาณ total phenolics ในระยะแบ่งแ่ง (S6) ของข้าวที่มีระยะการเพาะปลูกต่างกันทั้งสองแปลง ซึ่งพบมีค่าสูงในแปลงหลัง แสดงถึงผลของสภาพแวดล้อมของการเพาะปลูกที่มีต่อการสร้างและสะสมสารประกอบ phenolics ในใบข้าวที่ระยะการเจริญเติบโตดังกล่าวเช่นกัน



รูป 3.6 ปริมาณ total phenolics ของสารสกัดด้วย methanol ของใบข้าวเหนียวดำ 10 พันธุ์ ที่ 6 ระยะการเติบโต จากแปลงทดลองที่ปลูกเมื่อวันที่ 12 กรกฎาคม 2549



รูป 3.7 ปริมาณ total phenolics ของสารสกัดด้วย methanol ของใบข้าวเหนียวดำ 10 พันธุ์ ที่ 6 ระยะการเติบโต จากแปลงทดลองที่ปลูกเมื่อวันที่ 11 สิงหาคม 2549

3.3 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากรำข้าวเจ้าหอมนิลและข้าวเหนียวดำหาด้วยวิธี thiocyanate

ในส่วนของการทดลองหาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันนี้ตัวอย่างรำข้าวสีดำที่ใช้ทดลองแบ่งเป็น 2 ประเภท

- ข้าวเจ้า ได้แก่ข้าวสีดำพันธุ์เจ้าหอมนิล พันธุ์ KHNBT, KHNBT no. 3 และ พันธุ์ 1000-11-2-26 ปลุกที่มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จ. นครปฐม ระหว่างปี 2548
- ข้าวเหนียว ได้แก่ข้าวเหนียวสีดำพันธุ์เจ้าหอมนิล KHNBD ปลุกที่มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จ. นครปฐม ระหว่างปี 2548

การหาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากรำข้าวดำโดย thiocyanate method มีรายละเอียดตามที่รายงานโดย Tsuda และคณะ^[55] และ Osawa and Namiki^[56] เริ่มจากปฏิกิริยาของ linoleic acid และ antioxidants ในสารสกัดจากรำข้าว จากนั้นทำปฏิกิริยาต่อกับ NH_4SCN reagent และวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายจากปฏิกิริยาด้วย spectrophotometer ค่า % lipid peroxidation ที่ได้แสดงดังกราฟในรูป 3.8 ส่วน % inhibition of lipid peroxidation คำนวณจากสมการ

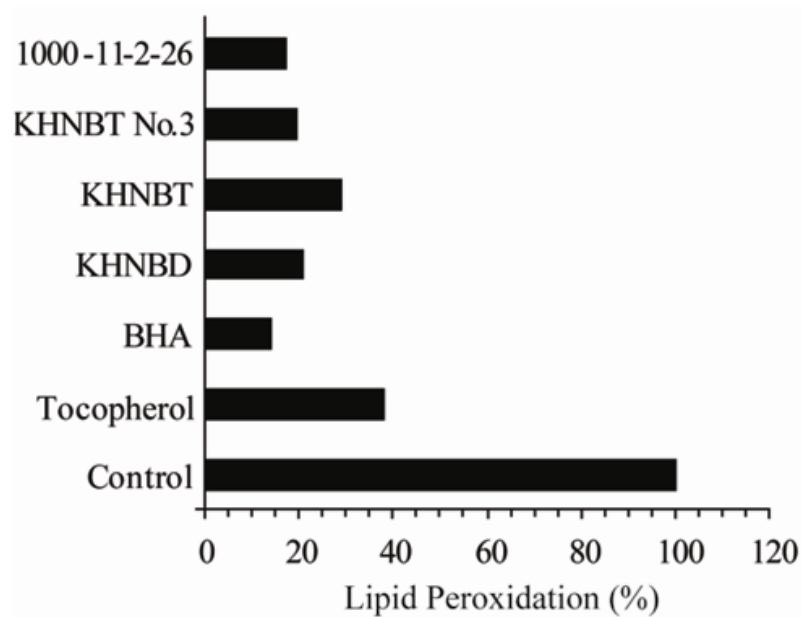
$$\text{Inhibition (\%)} = [(A_c - A_s)/A_c] \times 100,$$

เมื่อ

A_c is the absorbance of the control solution, and

A_s is the absorbance in the presence of the black rice bran extracts

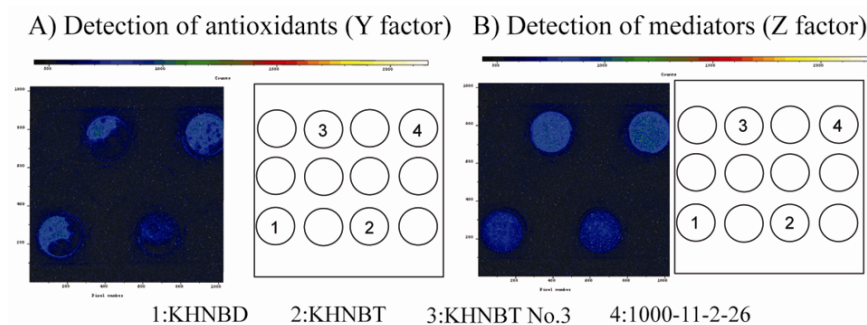
ในการทดลองนี้ใช้ butylated hydroxyanisole (BHA) และ vitamin E เป็นสารเทียบมาตรฐาน พบว่า % inhibition of lipid peroxidation ของสารสกัดจากรำข้าวสีดำมีค่าเปรียบเทียบกับจากมากไปน้อยได้ตามลำดับดังนี้ BHA > พันธุ์ 1000-11-2-26 > KHNBT no. 3 > KHNBD > KHNBT > vitamin E (α -tocopherol) ซึ่งจะเห็นว่า สารสกัดของรำข้าวทุกพันธุ์แสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยการยับยั้งการเกิด peroxidation ของไขมันได้ค่าใกล้เคียงกันและอยู่ในระดับสูงกว่า vitamin E ข้าวพันธุ์ 1000-11-2-26 ซึ่งเป็นข้าวเจ้าลูกผสมจากพันธุ์ KHNBT ให้ % inhibition of lipid peroxidation สูงกว่าพันธุ์อื่น ในขณะที่พันธุ์ KHNBT ให้ค่า % inhibition of lipid peroxidation ต่ำที่สุด ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากรำข้าวสีดำพันธุ์ดังกล่าวมีสารออกฤทธิ์ที่สามารถยับยั้ง free radicals ที่ก่อให้เกิด peroxidation ของกรดไขมัน



รูป 3.8 แสดงเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยค่า % lipid peroxidation ของสารสกัดจากรำข้าวแต่ละพันธุ์ และสารมาตรฐาน BHA และ vitamin E (α -tocopherols)

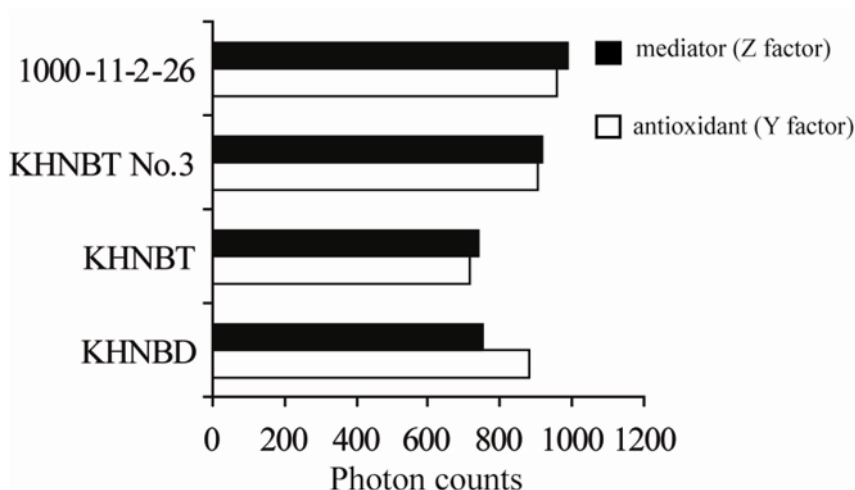
3.4 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากรำข้าวเจ้าหอมนิลและข้าวเหนียวท่าหาดด้วยวิธี XYZ System

ในการทดลองนี้ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากรำข้าวดำหาโดยวิธี XYZ photon emission system (XYZ system) ซึ่งมีรายละเอียดของวิธีการทดลองตามที่รายงานโดย Okubo และ Yoshiki^[57] และ Yoshiki และคณะ^[58] โดยใช้วิธีวัดความเข้มของแสงที่ถูกปลดปล่อยจาก H_2O_2 (X factor) ในขณะที่เกิดปฏิกิริยากับ antioxidants (Y factor) ซึ่งพบว่าปฏิกิริยาจะเกิดได้ดีเมื่อเติมตัวเร่ง (mediators; Z factor) วัดค่าความเข้มของ photon emission ซึ่งสัมพันธ์กับ H_2O_2 -scavenging capacity ของสารสกัด โดยใช้ Bio-Emission Detector (Model Bio-ED21; E&T Corporation, Sendai, Japan) แสดงผลดังรูป 3.9



รูป 3.9 ภาพถ่ายแสดงความเข้มของ chemiluminescence ที่เกิดจากปฏิกิริยาใน XYZ system ของสารสกัดจากรำข้าวทั้ง 4 พันธุ์: 1. KHNBD; 2. KHNBT; 3. KHNBT No. 3; และ 4. 1000-11-2-26

ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากรำข้าวตัวอย่าง คำนวณโดยหักล้างด้วยค่าความเข้มของ photon emission ของ mediator activity (Z factor) แสดงผลดังรูป 3.10

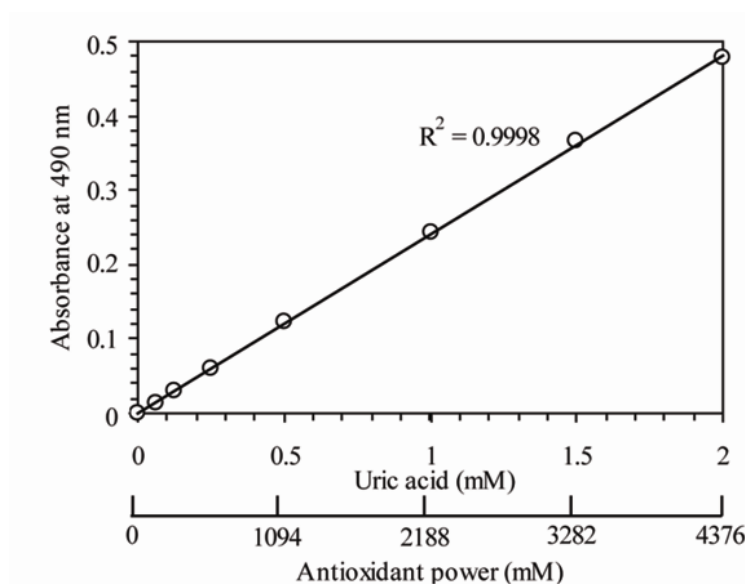


รูป 3.10 แสดงเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่วัดโดยวิธี XYZ ของสารสกัดจากรำข้าวแต่ละพันธุ์ด้วย photon count values คำนวณจาก CCD sensor control software (Andor MCD software version 2.61)

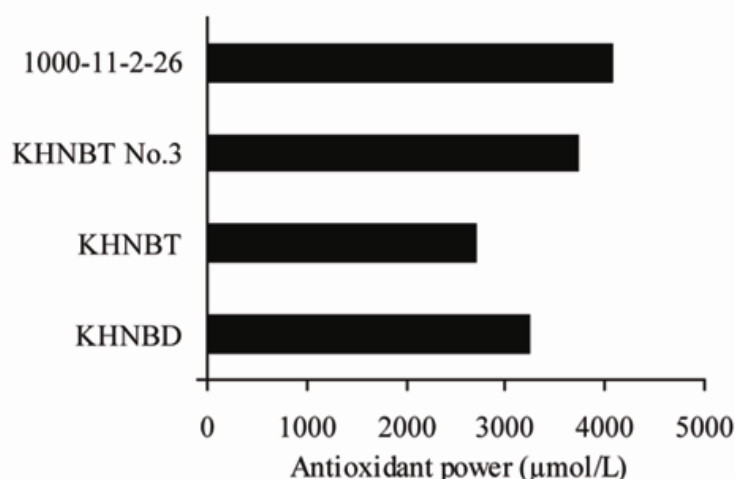
พบว่าความเข้มของแสงจาก chemiluminescence ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกถึง H_2O_2 -scavenging capacity ของสารสกัดจากรำข้าวสีดำมีค่าจากมากไปน้อยตามลำดับดังนี้ พันธุ์ 1000-11-2-26 > KHNBT no. 3 > KHNBD > KHNBT ซึ่งจะเห็นว่าให้ผลเช่นเดียวกันกับค่า % inhibition of lipid peroxidation ที่หาด้วย thiocyanate method ข้างต้น นอกจากนี้พบว่า H_2O_2 -scavenging capacity ของสารสกัดจากรำข้าวมีค่าสูงกว่าของน้ำแอปเปิ้ลและน้ำมะนาว (photon count: 578 and 531, ตามลำดับ ข้อมูลที่ไม่ได้เผยแพร่จาก the Japan Institute for the Control of Aging)

3.5 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากรำข้าวเจ้าหอมนิลและข้าวเหนียวกำหาด้วยวิธี PAO assay

การหาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันรวม (total antioxidant capacity) ของสารสกัดจากรำข้าวดำ ทำโดยใช้ PAO assay kit ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีวางจำหน่ายในประเทศญี่ปุ่น (Institute for the Control of Aging, Shizuoka, Japan) หลักของวิธีนี้คือการตรวจวัด Cu^+ ion ที่เกิดจากปฏิกิริยา reduction ของ Cu^{2+} ion ใน micro plate ของชุด PAO assay kit จากนั้นให้ Cu^+ ion เกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีกับ reagent และอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 nm กำลังของฤทธิ์ต้านออกซิเดชันหาเปรียบจากกราฟมาตรฐานที่ใช้ uric acid เป็นสารมาตรฐาน ดังแสดงในรูป 3.11 ผล total antioxidant capacity ของสารสกัดจากรำข้าวที่วิเคราะห์โดยเทคนิคนี้แสดงในกราฟรูป 3.12



รูป 3.11 กราฟมาตรฐานของสารละลายของ uric acid ใช้เทียบหาค่า antioxidant power ให้ regression coefficient 0.9998 ในช่วงความเข้มข้น 0-2.0 mM ของ uric acid



รูป 3.12 แสดงเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันรวม (total antioxidant capacity) ที่หาโดยวิธี PAO assay ของสารสกัดจากรำข้าวแต่ละพันธุ์

ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันรวมของสารสกัดจากรำข้าวดำทั้ง 4 พันธุ์ ที่หาโดยใช้ PAO assay kit ให้ผลสอดคล้องผลที่ได้จากวิธีข้างต้น โดยมีลำดับของ total antioxidant capacity คือ 1000-11-2-26 > KHNBT No. 3 > KHNBD > KHNBT (ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 5 mg/mL) เช่นเดียวกัน

3.6 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากรำข้าวเจ้าหอมนิลและข้าวเหนียวดำหาด้วยวิธี

DPPH assay

การหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากรำข้าวดำโดยวิธี DPPH assay มีรายละเอียดของวิธีการทดลองตามที่รายงานโดย Amarowicz และคณะ^[59] สาร antioxidants ในสารสกัดจากรำข้าวและสารมาตรฐาน vitamin E (α -tocopherol) เกิดปฏิกิริยากับ DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical (สีม่วง) จากนั้นวัดปริมาณของ DPPH radical ที่ถูกกำจัดไปจากความเข้มของสีม่วงที่ลดลง ให้ผลเป็นค่า % scavenging effect ดังสมการ

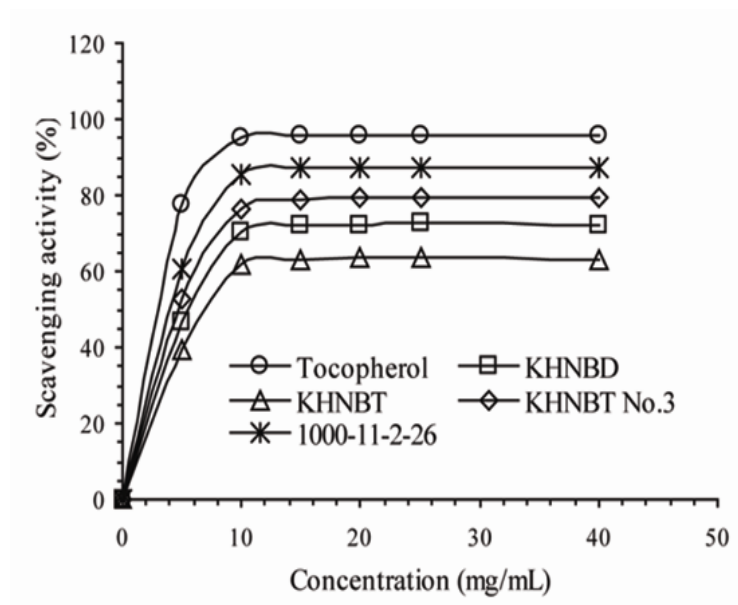
$$\text{Scavenging effect (\%)} = [(A_c - A_s)/A_c] \times 100,$$

เมื่อ

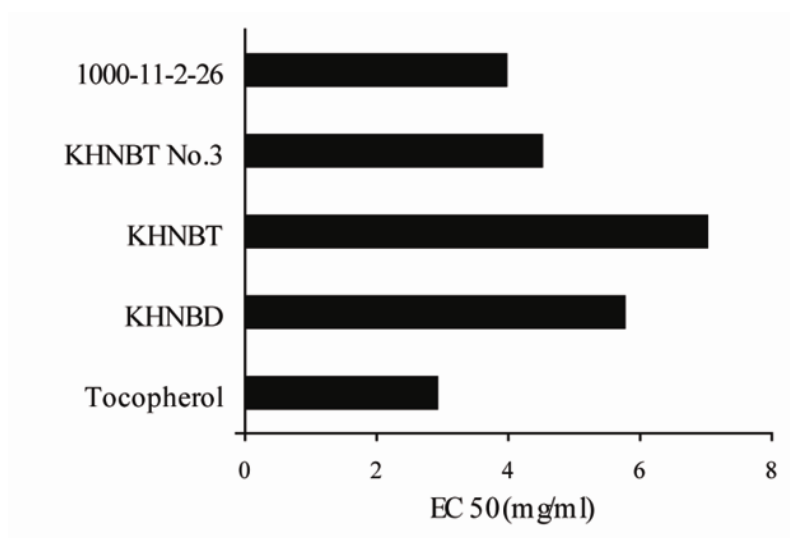
A_c is the absorbance of the control at 517 nm, and

A_s is the absorbance of the extract/standard at 517nm.

กราฟในรูป 3.13 แสดง % DPPH scavenging ของสารสกัดจากรำข้าวดำแต่ละพันธุ์ที่ความเข้มข้นต่างๆ และความเข้มข้นของสารสกัดจากรำข้าวดำแต่ละพันธุ์ที่ให้ % scavenging เท่ากับครึ่งหนึ่ง (EC 50) แสดงในกราฟรูป 3.14 เมื่อเทียบกับ EC 50 ของ vitamin E พบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากรำข้าวดำแต่ละพันธุ์มีค่าตามลำดับดังนี้ α -tocopherol > 1000-11-2-26 > KHNBT no. 3 > KHNBD > KHNBT



รูป 3.13 แสดงเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยค่า % DPPH scavenging ของสารสกัดจากรำข้าวแต่ละพันธุ์ และ vitamin E ที่ความเข้มข้นของสารสกัดในช่วง 5-40 mg/mL



รูป 3.14 แสดงเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยค่า EC₅₀ ของสารสกัดจากรำข้าวแต่ละพันธุ์ และ vitamin E (Tocopherol)

3.7 การจับไอออนโลหะ (metal chelating capacity) ของสารสกัดจากรำข้าวสีดำ

การหาความสามารถในการจับไอออนโลหะทำการทดลอง โดยให้สารสกัดจากรำข้าวดำ (5-25 mg/mL) ทำปฏิกิริยากับสารละลาย FeCl_2 และ ferrozine จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาด้วย Spectrophotometer ที่ 562 nm ค่า % metal chelating activity คำนวณจากสมการ

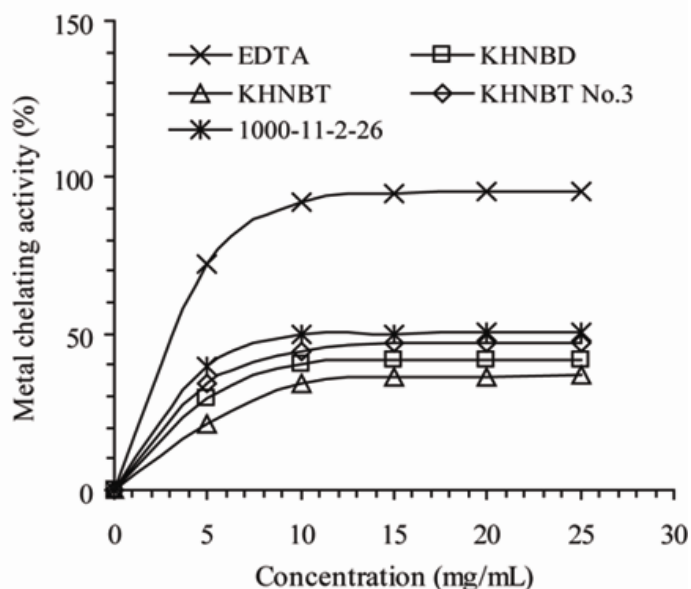
$$\% \text{ Metal chelating activity} = [(A_c - A_s)/A_c] \times 100,$$

เมื่อ

A_c is the absorbance of the control at 562 nm, and

A_s is the absorbance of the extract/standard at 562 nm.

ผลของ % metal chelating ของสารสกัดจากรำข้าวเจ้าและข้าวเหนียวดำที่ใช้ทดลอง แสดงเทียบกับสารมาตรฐาน Na_2EDTA ดังกราฟรูป 3.15

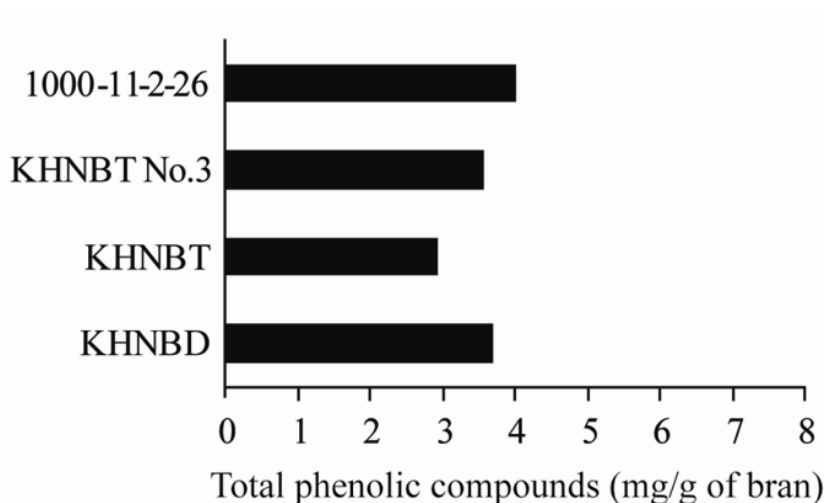


รูป 3.15 แสดงเปรียบเทียบ % metal chelating ของสารสกัดจากรำข้าวแต่ละพันธุ์ และสารมาตรฐาน EDTA ที่ความเข้มข้นของสารสกัดและสารมาตรฐานในช่วง 5-25 mg/mL

ความสามารถในการจับไอออนโลหะของสารสกัดจากรำข้าวประเมินจากวิธี ferrozine assay พบว่ามีค่ามากขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดในช่วง 5-15 mg/mL และคงที่ที่ความเข้มข้น 15 mg/mL ขึ้นไป โดยสารสกัดของรำข้าวแต่ละพันธุ์มี metal chelating ability ตามลำดับคือ 1000-11-2-26 > KHNBT No. 3 > KHNBD > KHNBT ที่ความเข้มข้น 5 mg/mL ซึ่งพบว่าเป็นค่าที่ต่ำเทียบกับของสารละลายของ EDTA ที่ใช้เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ อย่างไรก็ตาม metal chelating ability ของสารสกัดจากรำข้าว พบว่ามีค่าโดยเฉลี่ยมากกว่าของสารสกัดจากรำข้าวขาวที่ได้มีรายงานไปก่อนหน้านี้ โดยและคณะ^[60] และอาจคาดคะเนได้ว่าสารประกอบ phenolics เป็นกลุ่มสารที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับความสามารถในการจับไอออนโลหะของสารสกัดจากรำข้าว

3.8 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolics) ในสารสกัดจากรำข้าวดำ

การวิเคราะห์ปริมาณ total phenolics ทำโดยใช้วิธีเทียบกับปริมาณของ gallic acid จากกราฟมาตรฐาน ซึ่งสร้างโดยเตรียมสารละลาย gallic acid และนำมาทำปฏิกิริยากับ Folin–Ciocalteu’s phenol reagent จนปฏิกิริยาเกิดอย่างสมบูรณ์ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer กราฟมาตรฐานดังกล่าวให้ค่า correlation coefficient (R^2) เท่ากับ 0.9990 ในช่วงความเข้มข้น 20-120 $\mu\text{g/mL}$ ปริมาณ total phenolics ในสารสกัดจากตัวอย่างรำข้าวดำที่ได้ จึงมีหน่วยเป็น gallic acid equivalent (GAE)/g ของรำข้าว ได้ผลปริมาณ total phenolic ของสารสกัดจากรำข้าวดำแต่ละพันธุ์ที่ใช้ทดลองแสดงดังกราฟรูป 3.16



รูป 3.16 แสดงเปรียบเทียบปริมาณ total phenolics (GAE/g ของรำข้าว) ของสารสกัดจากรำข้าวแต่ละพันธุ์

ค่าเฉลี่ยของปริมาณ total phenolics ในสารสกัดจากรำข้าวที่ใช้วิเคราะห์หาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธีต่างๆ ดังที่ผ่านมา พบว่าอยู่ในช่วง 2.93-4.01 mg GAE/g ของรำข้าว ข้าวพันธุ์ 1000-11-2-26 ให้ค่าสูงที่สุด รองลงมาคือ พันธุ์ KHNBD, KHNBT No. 3 และ KHNBT ซึ่งจะพบว่าลำดับปริมาณ total phenolics ในสารสกัดข้าวแตกต่างไปจากลำดับความมากน้อยของฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน อย่างไรก็ตามผลที่สอดคล้องกันคือ การที่ข้าวพันธุ์ 1000-11-2-26 ให้ปริมาณ total phenolics สูงที่สุด

สรุปโดยรวมแล้วพบว่าฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ของสารสกัดจากรำข้าวดำพันธุ์ที่ใช้ทดลอง มีค่าสอดคล้องกันในแต่ละวิธีเรียงตามลำดับคือ พันธุ์ 1000-11-2-26 > KHNBT no. 3 > KHNBD > KHNBT ผลการทดลองนี้ยังสอดคล้องกับความสามารถในการจับไอออนโลหะ (Fe^{2+}) ของสารสกัดหยาบจากรำข้าว แต่แตกต่างกันกับลำดับของปริมาณ total

phenolics จึงเป็นไปได้ว่าฤทธิ์ทางชีวภาพเหล่านี้นอกจากจะเป็นผลมาจากสารประกอบ phenolics ซึ่งมีกลุ่มสารที่เป็นองค์ประกอบหลักคือกลุ่ม flavonoids และสารกลุ่มนี้แบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้แก่ chalcones, flavones, flavonols, flavanones, isoflavonoids และ anthocyanins แล้ว ยังมีสารประกอบกลุ่มอื่นในต้นหรือเมล็ดข้าวที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเช่นกัน เช่น vitamin E และ carotenoids เป็นต้น ซึ่งสารออกฤทธิ์เหล่านี้ควรจะได้มีการวิจัยต่อไปด้วย

บทที่ 4

การหาโครงสร้าง ลักษณะเฉพาะ และปริมาณของฟลาโวนอยด์กลุ่ม ฟลาโวน ฟลาโวนอล ฟลาวาโนน และไอโซฟลาโวน ในสารสกัดจากรำข้าวสีดำ

4.1 การศึกษาการแยก การดูดกลืนรังสี UV-Vis ของฟลาโวนอยด์ด้วยเทคนิค HPLC-DAD

1. เตรียมสารละลายของ flavonoids ที่ต้องการศึกษาความเข้มข้น 1000 ppm ในตัวทำละลายเมทานอลกับน้ำ (50:50) โดยทำการเตรียมสารละลาย flavonoids ใหม่ทุกครั้งที่ทำ การวิเคราะห์ เนื่องจาก flavonoids บางชนิดไม่เสถียรเมื่ออยู่ในสารละลายผสม โดย flavonoids ที่ใช้ในการศึกษาแสดงดังตาราง 4.1

2. นำสารละลายของ flavonoids ที่ต้องการศึกษาไปทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ที่มี DAD เป็นตัวตรวจวัด โดยมีสภาวะของการวิเคราะห์ดังนี้

HPLC column:	zorbax SB-C18, 35 μ m, 2.1x100 mm		
Injection volume:	5 μ l		
Flow rate:	0.2 ml/min		
Mobile phase:	Solvent A:	0.1% formic acid in water	
	Solvent B:	Methanol or acetonitrile or isopropanol	
Gradient elution:	Time	Solvent A	Solvent B
	0.00	95.0	5.0
	120.00	0	100

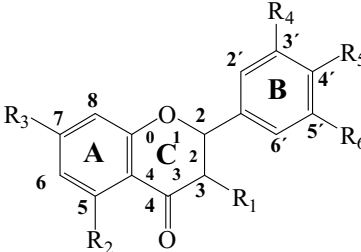
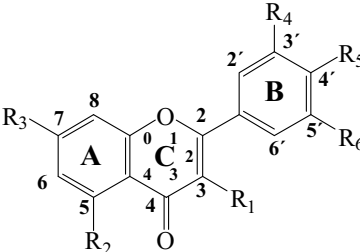
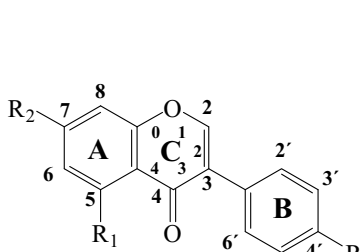
DAD scan range: 200-400 nm

ได้ลักษณะการดูดกลืนแสง UV ที่ระดับความยาวคลื่น 200-400 nm และลำดับการแยกของสารกลุ่ม flavonoids ดังตาราง 4.2 และ 4.3 ตามลำดับ โดยการเปรียบเทียบลำดับการแยกของ flavonoids เมื่อใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เป็น methanol หรือ acetonitrile หรือ isopropanol แสดงดังรูป 4.1

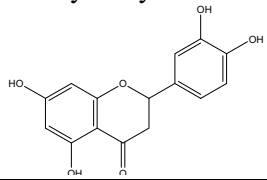
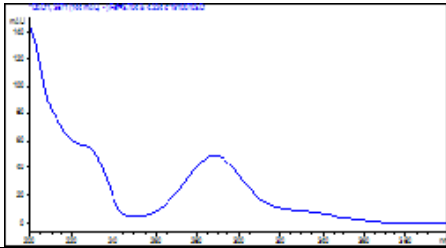
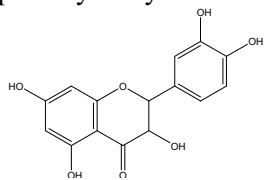
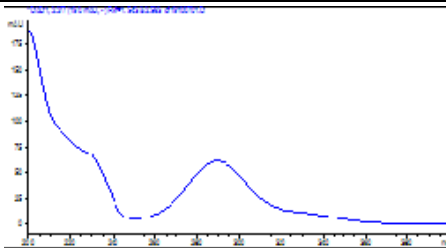
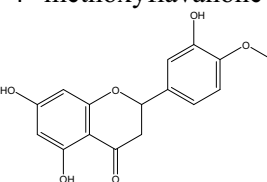
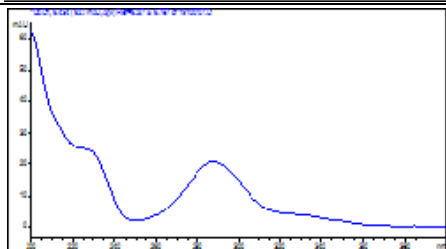
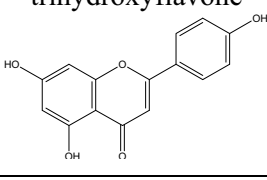
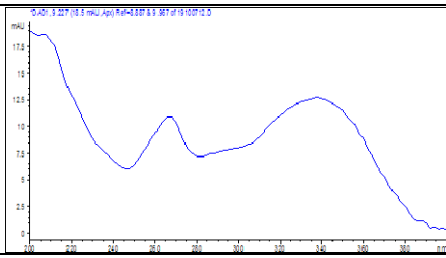
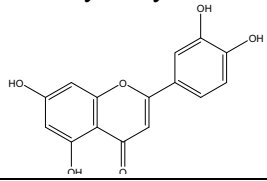
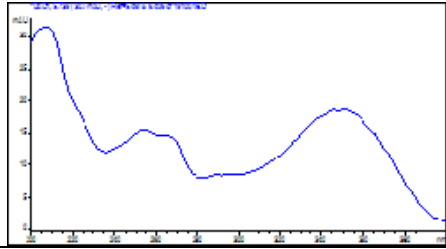
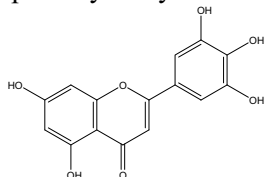
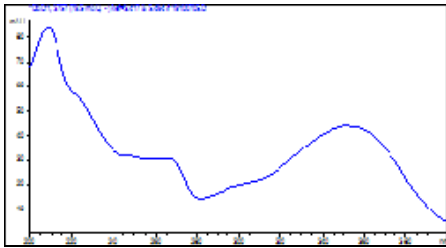
จากผลการดูดกลืนแสงที่ระดับความยาวคลื่น 200-400 nm ของ flavonoids พบว่า flavonoids ทั้ง 17 ตัว แสดง characteristic ของ UV-spectra ตามกลุ่มของ flavonoids โดย flavonoids แต่ละชนิดจะมีการดูดกลืนแสง 2 ช่วง (band I และ II) สอดคล้องกับโครงสร้างพื้นฐานของ flavonoids ซึ่ง band I จะเกี่ยวข้องกับ benzoyl system ใน A-ring ส่วน band II จะเกี่ยวข้องกับ cinnamoyl system ของ B-ring โดยสารกลุ่ม flavones จะมี band I และ II อยู่ในช่วง 240-285 และ 304 nm เช่นเดียวกันกับ flavonol ที่มี band I อยู่ในช่วงเดียวกันคือ 240-285 nm อย่างไรก็ตาม band II ของ flavonol จะช่วงประมาณอยู่ที่ 325 nm ตรงกันข้ามกับสารกลุ่ม flavanone ที่จะมี band II ใกล้เคียงกับกลุ่ม flavones คือ 300-303 nm แต่มี band I ในช่วงที่ความยาวคลื่นที่สูงกว่าทั้ง

flavones และ flavonol นั้นคือ 270-295 nm ในขณะที่สารกลุ่ม isoflavone กลับพบเพียง band I ที่เด่นมาก ซึ่งอยู่ในช่วง 240-280 nm

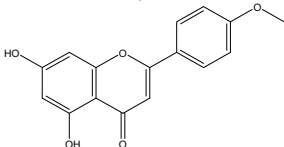
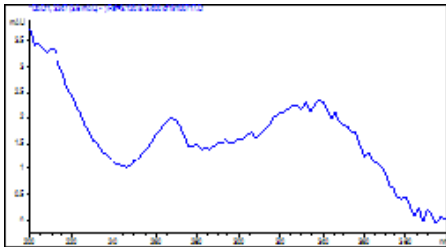
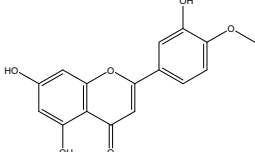
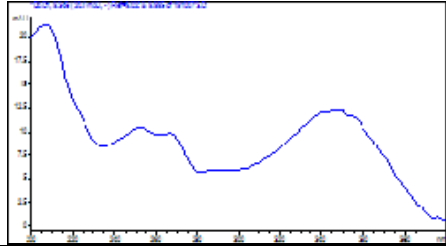
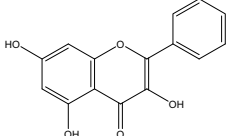
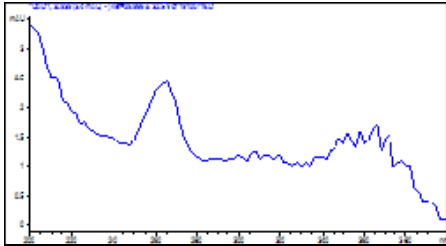
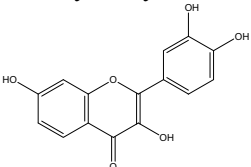
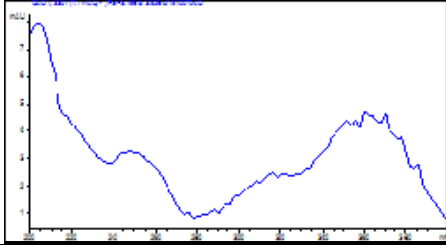
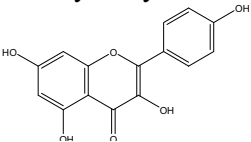
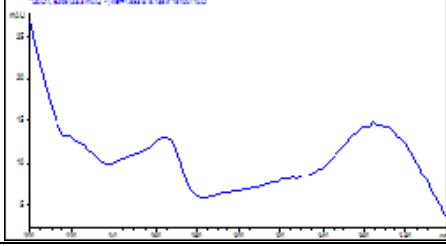
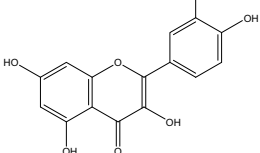
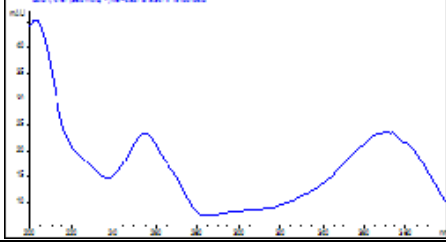
ตาราง 4.1 โครงสร้างของสาร flavonoidss ที่ใช้ในการศึกษา

							
Flavanone type	Flavone type	Isoflavone type					
Name	M_r	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6
Flavanone type							
[1] eriodictyol; 5,7,3',4'-tetrahydroxyflavanone	287	H	OH	OH	OH	OH	H
[2] taxifolin; 3,5,7, 3',4'-pentahydroxyflavone	304	OH	OH	OH	OH	OH	H
[3] hesperidin; 5,7,3'-trihydroxy-4'-methoxyflavanone	302	H	OH	OH	OH	OCH ₃	H
Flavone type							
[4] apigenin; 5,7,4'-trihydroxyflavone	270	H	OH	OH	H	OH	H
[5] luteolin; 5,7,3',4'-tetrahydroxyflavone	286	H	OH	OH	OH	OH	H
[6] 5,7, 3',4',5'-pentahydroxyflavone	302	H	OH	OH	OH	OH	OH
[7] acacetin; 5,7-dihydroxy- 4'-methoxyflavone	284	H	OH	OH	OCH ₃	H	H
[8] diosmetin; 5,7, 3'-trihydroxy-4'-methoxyflavone	300	H	OH	OH	OH	OCH ₃	H
Flavonol type							
[9] galengin; 3,5,7-trihydroxyflavone	270	OH	OH	OH	H	H	H
[10] fisetin; 3,7,3',4'-tetrahydroxyflavone	286	OH	H	OH	OH	OH	H
[11] kaempferol; 3,5,7,4'-tetrahydroxyflavone	286	OH	OH	OH	H	OH	H
[12] quercetin; 3,5,7, 3',4'-pentahydroxyflavone	302	OH	OH	OH	OH	OH	H
[13] myricetin; 3,5,7, 3',4',5'-hexahydroxyflavone	319	OH	OH	OH	OH	OH	OH
[14] kaempferid; 3,5,7,-trihydroxy-4'-methoxyflavone	300	OH	OH	OH	H	OCH ₃	H
[15] isorhamnetin; 3,5,7, 4'-tetrahydroxy-3'-methoxyflavone	316	OH	OH	OH	OCH ₃	OH	H
Isoflavone type							
[16] genistein; 5,7,4'-trihydroxyisoflavone	270	OH	OH	OH	-	-	-
[17] biochanin-A; 5,7-dihydroxy-4'-methoxyisoflavone	284	OH	OH	OCH ₃	-	-	-

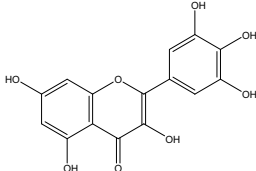
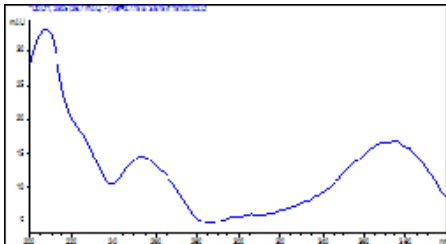
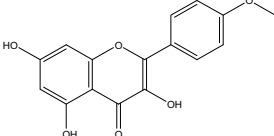
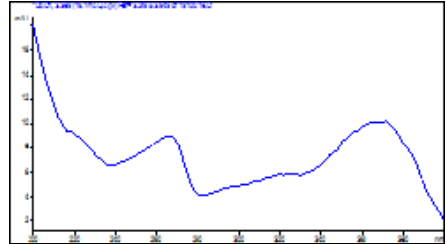
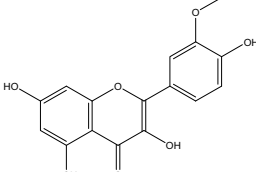
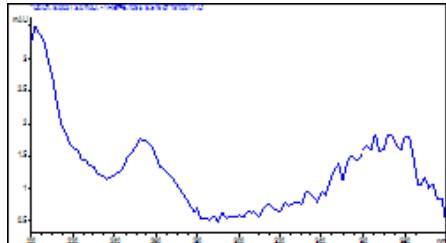
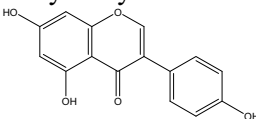
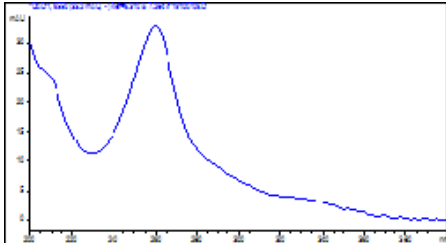
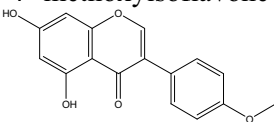
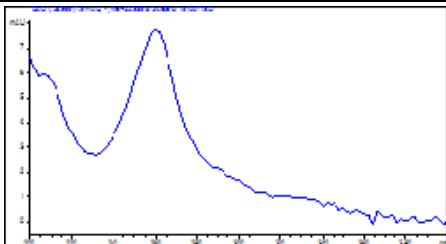
ตาราง 4.2 การดูดกลืนคลื่นแสงที่ระดับความยาวคลื่น 200-400 nm ของ flavonoids.

Name	M_r	UV spectra ที่ λ 200-400 nm
Flavanone type		
[1] eriodictyol; 5,7,3',4'-tetrahydroxyflavanone 	287	
[2] taxifolin; 3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavanone 	304	
[3] hesperidin; 5,7,3'-trihydroxy-4'-methoxyflavanone 	302	
Flavone type		
[4] apigenin; 5,7,4'-trihydroxyflavone 	270	
[5] luteolin; 5,7,3',4'-tetrahydroxyflavone 	286	
[6] 5,7,3',4',5'-pentahydroxyflavone 	302	

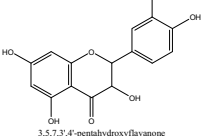
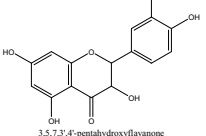
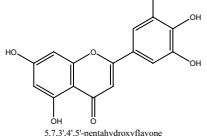
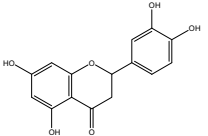
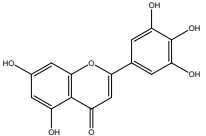
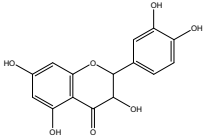
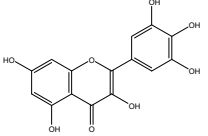
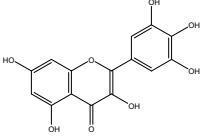
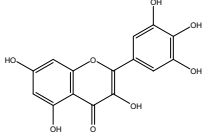
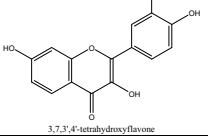
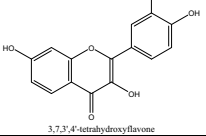
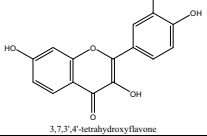
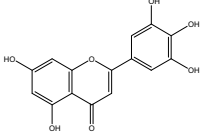
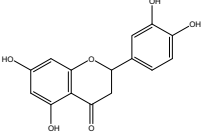
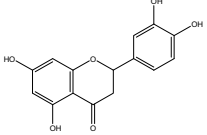
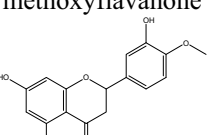
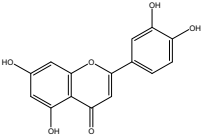
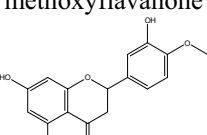
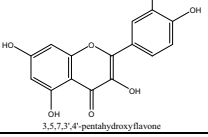
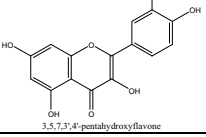
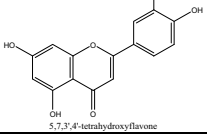
ตาราง 4.2 การดูดกลืนคลื่นแสงที่ระดับความยาวคลื่น 200-400 nm ของ flavonoids (ต่อ)

Name	M_r	UV spectra ที่ λ 200-400 nm
[7] acacetin; 5,7-dihydroxy- 4'-methoxyflavone 	284	
[8] diosmetin; 5,7, 3'-trihydroxy-4'-methoxyflavone 	300	
Flavonol type		
[9] galengin; 3,5,7-trihydroxyflavone 	270	
[10] fisetin; 3,7,3',4'-tetrahydroxyflavone 	286	
[11] kaempferol; 3,5,7,4'-tetrahydroxyflavone 	286	
[12] quercetin; 3,5,7, 3',4'-pentahydroxyflavone 	302	

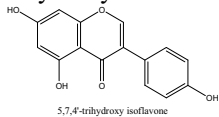
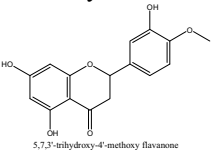
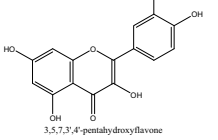
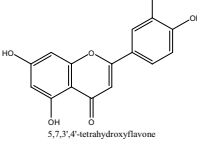
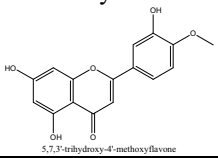
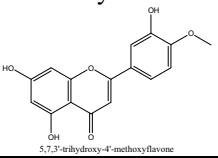
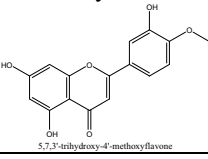
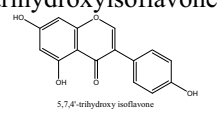
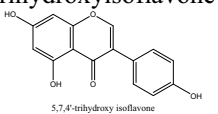
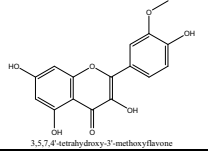
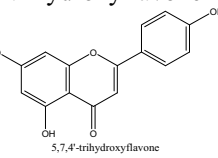
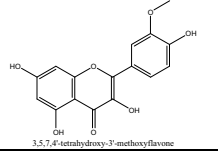
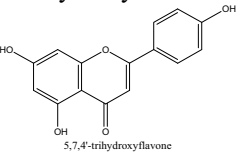
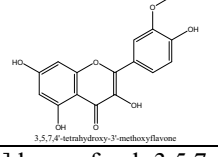
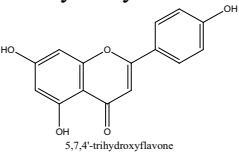
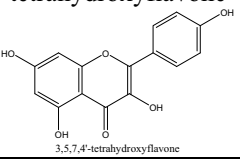
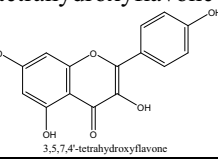
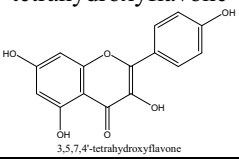
ตาราง 4.2 การดูดกลืนคลื่นแสงที่ระดับความยาวคลื่น 200-400 nm ของ flavonoids (ต่อ)

Name	M_r	UV spectra ที่ λ 200-400 nm
[13] myricetin; 3,5,7,3',4',5'-hexahydroxyflavone 	319	
[14] kaempferid; 3,5,7,-trihydroxy-4'-methoxyflavone 	300	
[15] isorhamnetin; 3,5,7,4'-tetrahydroxy-3'-methoxyflavone 	316	
Isoflavone type		
[16] genistein; 5,7,4'-trihydroxyisoflavone 	270	
[17] biochanin-A; 5,7-dihydroxy-4'-methoxyisoflavone 	284	

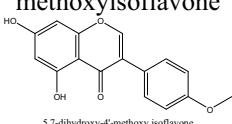
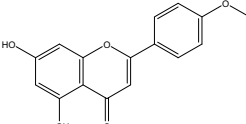
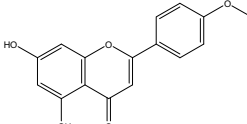
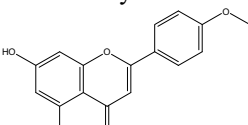
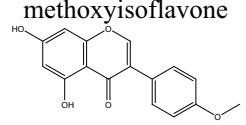
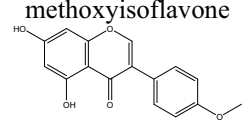
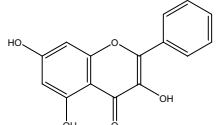
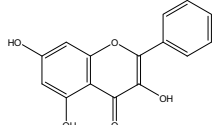
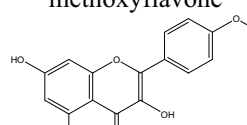
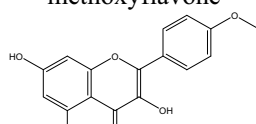
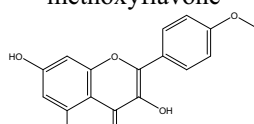
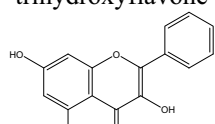
ตาราง 4.3 ลำดับการแยกของ flavonoids 17 สารเมื่อใช้ตัวทำละลายอินทรีย์คือ methanol, acetonitrile และ isopropanol ในการแยกด้วยระบบ HPLC แบบ reversed phase

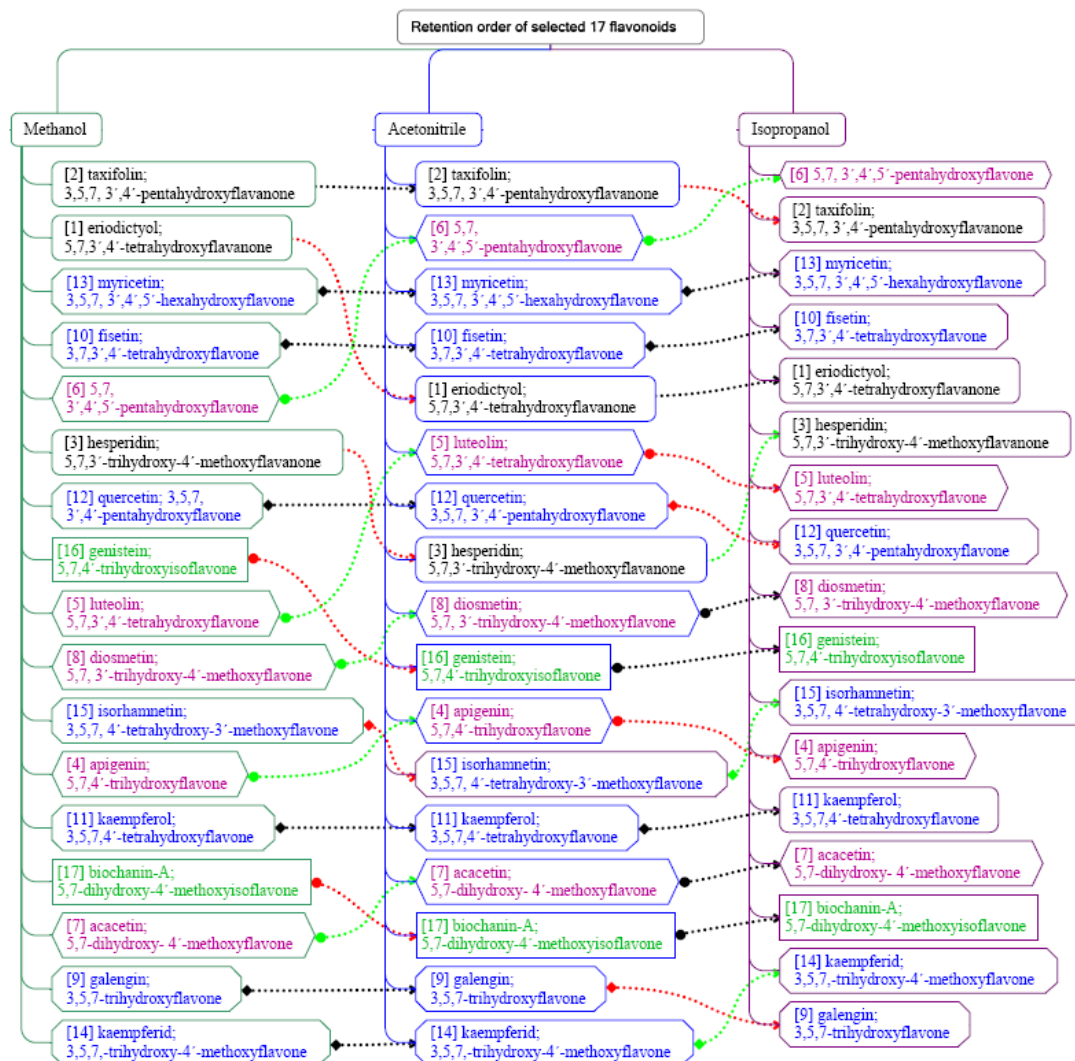
Retention order	Mobile phase B		
	MeOH	Acetonitrile	Isoflavone
1	[2] taxifolin; 3,5,7, 3',4'-pentahydroxyflavanone 	[2] taxifolin; 3,5,7, 3',4'-pentahydroxyflavanone 	[6] 5,7, 3',4',5'-pentahydroxyflavone 
2	[1] eriodictyol; 5,7,3',4'-tetrahydroxyflavanone 	[6] 5,7, 3',4',5'-pentahydroxyflavone 	[2] taxifolin; 3,5,7, 3',4'-pentahydroxyflavanone 
3	[13] myricetin; 3,5,7, 3',4',5'-hexahydroxyflavone 	[13] myricetin; 3,5,7, 3',4',5'-hexahydroxyflavone 	[13] myricetin; 3,5,7, 3',4',5'-hexahydroxyflavone 
4	[10] fisetin; 3,7,3',4'-tetrahydroxyflavone 	[10] fisetin; 3,7,3',4'-tetrahydroxyflavone 	[10] fisetin; 3,7,3',4'-tetrahydroxyflavone 
5	[6] 5,7, 3',4',5'-pentahydroxyflavone 	[1] eriodictyol; 5,7,3',4'-tetrahydroxyflavanone 	[1] eriodictyol; 5,7,3',4'-tetrahydroxyflavanone 
6	[3] hesperidin; 5,7,3'-trihydroxy-4'-methoxyflavanone 	[5] luteolin; 5,7,3',4'-tetrahydroxyflavone 	[3] hesperidin; 5,7,3'-trihydroxy-4'-methoxyflavanone 
7	[12] quercetin; 3,5,7, 3',4'-pentahydroxyflavone 	[12] quercetin; 3,5,7, 3',4'-pentahydroxyflavone 	[5] luteolin; 5,7,3',4'-tetrahydroxyflavone 

ตาราง 4.3 ลำดับการแยกของ flavonoids 17 สารเมื่อใช้ตัวทำละลายอินทรีย์คือ methanol, acetonitrile และ isopropanol ในการแยกด้วยระบบ HPLC แบบ reversed phase (ต่อ)

Retention order	Mobile phase B		
	MeOH	Acetonitrile	Isoflavone
8	[16] genistein; 5,7,4'-trihydroxyisoflavone  5,7,4'-trihydroxy isoflavone	[3] hesperidin; 5,7,3'-trihydroxy-4'-methoxyflavanone  5,7,3'-trihydroxy-4'-methoxy flavanone	[12] quercetin; 3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavone  3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavone
9	[5] luteolin; 5,7,3',4'-tetrahydroxyflavone  5,7,3',4'-tetrahydroxyflavone	[8] diosmetin; 5,7,3'-trihydroxy-4'-methoxyflavone  5,7,3'-trihydroxy-4'-methoxyflavone	[8] diosmetin; 5,7,3'-trihydroxy-4'-methoxyflavone  5,7,3'-trihydroxy-4'-methoxyflavone
10	[8] diosmetin; 5,7,3'-trihydroxy-4'-methoxyflavone  5,7,3'-trihydroxy-4'-methoxyflavone	[16] genistein; 5,7,4'-trihydroxyisoflavone  5,7,4'-trihydroxy isoflavone	[16] genistein; 5,7,4'-trihydroxyisoflavone  5,7,4'-trihydroxy isoflavone
11	[15] isorhamnetin; 3,5,7,4'-tetrahydroxy-3'-methoxyflavone  3,5,7,4'-tetrahydroxy-3'-methoxyflavone	[4] apigenin; 5,7,4'-trihydroxyflavone  5,7,4'-trihydroxyflavone	[15] isorhamnetin; 3,5,7,4'-tetrahydroxy-3'-methoxyflavone  3,5,7,4'-tetrahydroxy-3'-methoxyflavone
12	[4] apigenin; 5,7,4'-trihydroxyflavone  5,7,4'-trihydroxyflavone	[15] isorhamnetin; 3,5,7,4'-tetrahydroxy-3'-methoxyflavone  3,5,7,4'-tetrahydroxy-3'-methoxyflavone	[4] apigenin; 5,7,4'-trihydroxyflavone  5,7,4'-trihydroxyflavone
13	[11] kaempferol; 3,5,7,4'-tetrahydroxyflavone  3,5,7,4'-tetrahydroxyflavone	[11] kaempferol; 3,5,7,4'-tetrahydroxyflavone  3,5,7,4'-tetrahydroxyflavone	[11] kaempferol; 3,5,7,4'-tetrahydroxyflavone  3,5,7,4'-tetrahydroxyflavone

ตาราง 4.3 ลำดับการแยกของ flavonoids 17 สารเมื่อใช้ตัวทำละลายอินทรีย์คือ methanol, acetonitrile และ isopropanol ในการแยกด้วยระบบ HPLC แบบ reversed phase (ต่อ)

Retention order	Mobile phase B		
	MeOH	Acetonitrile	Isoflavone
14	[17] biochanin-A; 5,7-dihydroxy-4'-methoxyisoflavone  5,7-dihydroxy-4'-methoxy isoflavone	[7] acacetin; 5,7-dihydroxy-4'-methoxyflavone  5,7-dihydroxy-4'-methoxy flavone	[7] acacetin; 5,7-dihydroxy-4'-methoxyflavone  5,7-dihydroxy-4'-methoxy flavone
15	[7] acacetin; 5,7-dihydroxy-4'-methoxyflavone  5,7-dihydroxy-4'-methoxy flavone	[17] biochanin-A; 5,7-dihydroxy-4'-methoxyisoflavone  5,7-dihydroxy-4'-methoxy isoflavone	[17] biochanin-A; 5,7-dihydroxy-4'-methoxyisoflavone  5,7-dihydroxy-4'-methoxy isoflavone
16	[9] galengin; 3,5,7-trihydroxyflavone  3,5,7-trihydroxy flavone	[9] galengin; 3,5,7-trihydroxyflavone  3,5,7-trihydroxy flavone	[14] kaempferid; 3,5,7-trihydroxy-4'-methoxyflavone  3,5,7-trihydroxy-4'-methoxy flavone
17	[14] kaempferid; 3,5,7-trihydroxy-4'-methoxyflavone  3,5,7-trihydroxy-4'-methoxy flavone	[14] kaempferid; 3,5,7-trihydroxy-4'-methoxyflavone  3,5,7-trihydroxy-4'-methoxy flavone	I18 [9] galengin; 3,5,7-trihydroxyflavone  3,5,7-trihydroxy flavone



รูป 4.1 เปรียบเทียบลำดับการแยกของ flavonoids 17 สารเมื่อใช้ตัวทำละลายอินทรีย์คือ methanol, acetonitrile และ isopropanol ในการแยกด้วยระบบ HPLC แบบ reversed phase

ผลการศึกษาลำดับการแยกพบว่าทั้ง methanol, acetonitrile และ isopropanol ที่ใช้เป็น mobile phase (Solvent B) ส่งผลในลักษณะเดียวกันต่อลำดับการแยกของสารกลุ่ม flavonoids ที่เป็นชนิดเดียวกัน นั่นคือหาก flavonoids มีหมู่แทนที่ภายในโมเลกุลเพิ่มมากขึ้นจะทำให้ลำดับการแยกของสารนั้น ๆ จะออกมาก่อน flavonoids ที่มีหมู่แทนที่น้อยกว่า นอกจากนี้การหมู่แทนที่เป็นกลุ่มของ methoxy ก็จะทำให้ลำดับการแยกออกมาช้ากว่า flavonoids ที่มีเฉพาะ hydroxyl เป็นหมู่แทนที่ อย่างไรก็ตามผลการเปรียบเทียบลำดับการแยกของ flavonoids ด้วย mobile phase ซึ่งใช้ methanol, acetonitrile และ isopropanol เป็น solvent B พบว่าในกรณีที่ใช้ methanol นั้น flavonoids ที่มีจำนวนหมู่แทนที่เท่ากัน เช่น flavanone ([2] taxifolin; 3,5,7, 3',4'-pentahydroxyflavanone), flavone ([6] 5,7, 3',4',5'-pentahydroxyflavone) และ flavonol ([12] quercetin; 3,5,7, 3',4'-pentahydroxyflavone) พบว่าสารกลุ่ม flavanone จะมีลำดับการแยกออกมา ก่อน flavone และ flavonol ตามลำดับ เช่นเดียวกับสารกลุ่ม isoflavone ([16] genistein; 5,7,4'-

trihydroxyisoflavone) จะมีลำดับการแยกออกมาก่อน flavone ([4] apigenin; 5,7,4'-trihydroxyflavone) เช่นกัน ทั้งนี้ลำดับการแยกของ flavonoids เปลี่ยนแปลงไปเมื่อใช้ acetonitrile เป็น mobile phase ซึ่งพบว่าส่งผลอย่างมากต่อลำดับการแยกของสารกลุ่ม flavone โดยทำให้สารกลุ่ม flavone ส่วนใหญ่มีลำดับการแยกที่ออกมาเร็วขึ้น เช่น flavone ([6] 5,7, 3',4',5'-pentahydroxyflavone) ซึ่งมีจำนวนหมู่แทนที่เท่ากับ 5 แต่มีลำดับการแยกที่เร็วกว่า flavonol ([13] myricetin; 3,5,7, 3',4',5'-hexahydroxyflavone) ซึ่งมีจำนวนหมู่แทนที่เท่ากับ 6 ซึ่งแตกต่างจากการใช้ methanol เป็น mobile phase เช่นเดียวกับการใช้ isopropanol เป็น mobile phase ซึ่งให้ความแตกต่างของลำดับการแยกของ flavonoids เช่นเดียวกัน ดังนั้นอิทธิพลดังกล่าวนี้จึงส่งผลดีและสามารถให้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อการบ่งชี้ชนิดและระบุเอกลักษณ์ของ flavonoids จากการวิธีการวิเคราะห์ตัวอย่างด้วย mobile phase ที่แตกต่างกัน

4.2 การศึกษาอิทธิพลของ collision energy ในขบวนการ collision induce dissociation (CID)

ในการวิเคราะห์ flavonoids ด้วยเทคนิค ESI-MS/MS ทั้ง positive และ negative ion mode

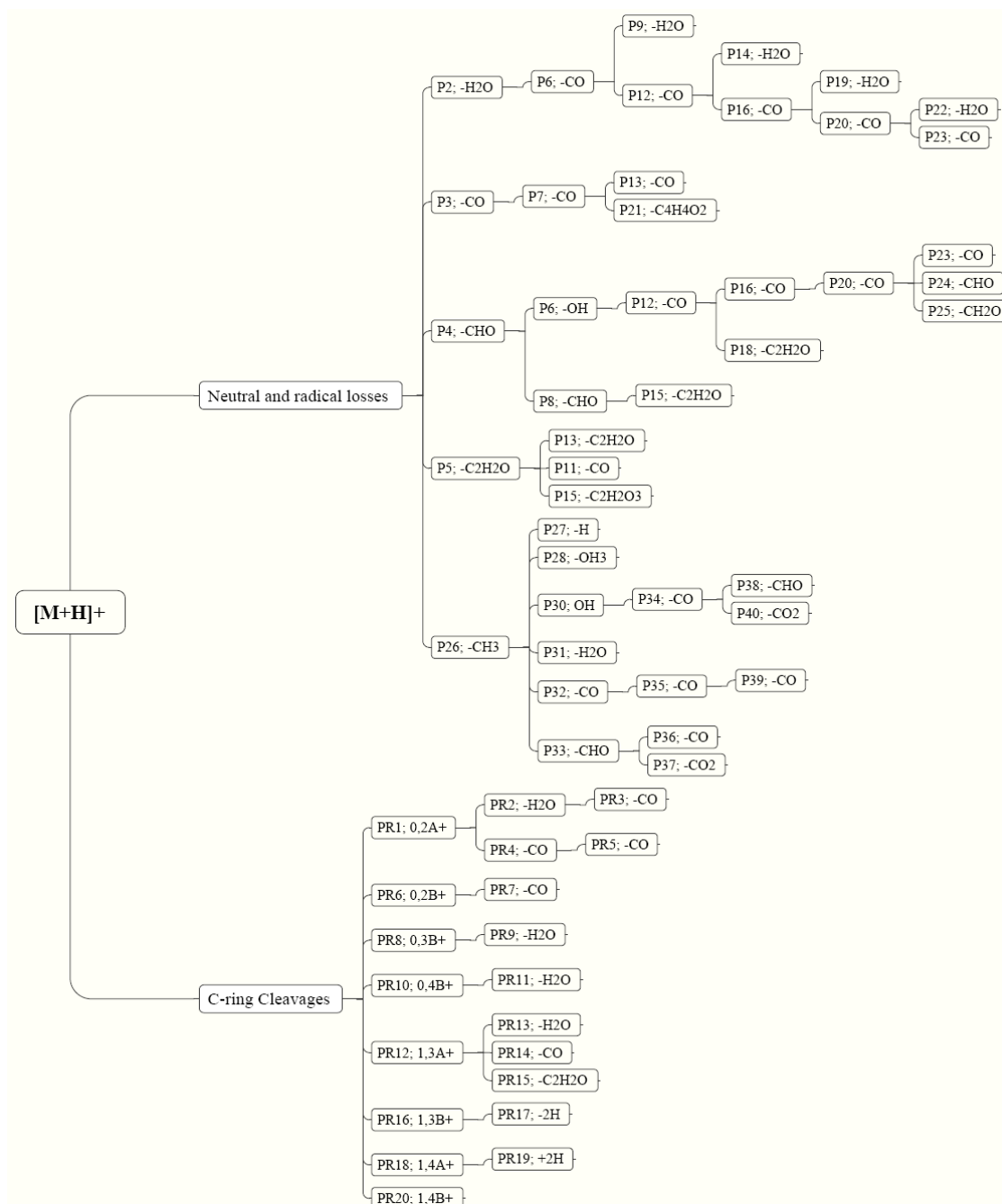
นำ flavonoids ที่ต้องการศึกษาไปทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง ESI-QTOF ทั้ง positive และ negative ion mode โดยในแต่ละ mode ทำการศึกษาอิทธิพลของค่า collision energy ต่อรูปแบบการแตกตัวของ flavonoids โดยค่า collision energy ที่ใช้คือ 20 25 และ 30 eV ตามลำดับ ได้ผลดัง ESI-MS/MS spectra จากการวิเคราะห์ flavonoids จำนวน 17 ตัว ด้วย positive ion mode แสดงดังรูป 4.4 ถึง 4.26 และ negative ion mode แสดงดังรูป 4.27 ถึง 4.49 ซึ่งจากการวิเคราะห์รูปแบบการแตกตัวพบ fragment ion ที่สำคัญของทั้งสอง mode แสดงดังแผนภาพรูป 4.2 และ 4.3 สำหรับการวิเคราะห์ด้วย positive และ negative ion mode ตามลำดับ ทั้งนี้รูปแบบการแตกตัวดังกล่าวสามารถสรุปได้ดังตาราง 4.6 และนำไปใช้อธิบายรูปแบบการแตกตัวของ flavonoids ชนิดต่างจากอิทธิพลของ collision energy และจากผลการศึกษา flavonoid standard ทั้ง 17 ตัวนี้ ซึ่งแสดงดังรูป 4.4-4.49 ทำให้ได้รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญนำไปใช้ในการบ่งชี้และระบุเอกลักษณ์ของสารกลุ่ม flavonoids ที่พบในสารสกัดจากรำข้าวดำพันธุ์ไทย โดยสภาวะของเครื่อง ESI-MS/MS ทั้ง positive และ negative ion mode ที่ใช้แสดงดังตาราง 4.4 และ 4.5 ตามลำดับ ซึ่งใช้การนำสารเข้าสู่การวิเคราะห์โดยตรงด้วย micro syringe pump ด้วยอัตราเร็ว 1000 $\mu\text{l/h}$

ตาราง 4.4 สภาวะของเครื่อง ESI-MS/MS ของการวิเคราะห์แบบ positive ion mode ในการศึกษาอิทธิพลของ collision energy ต่อรูปแบบการแตกตัวของ flavonoids.

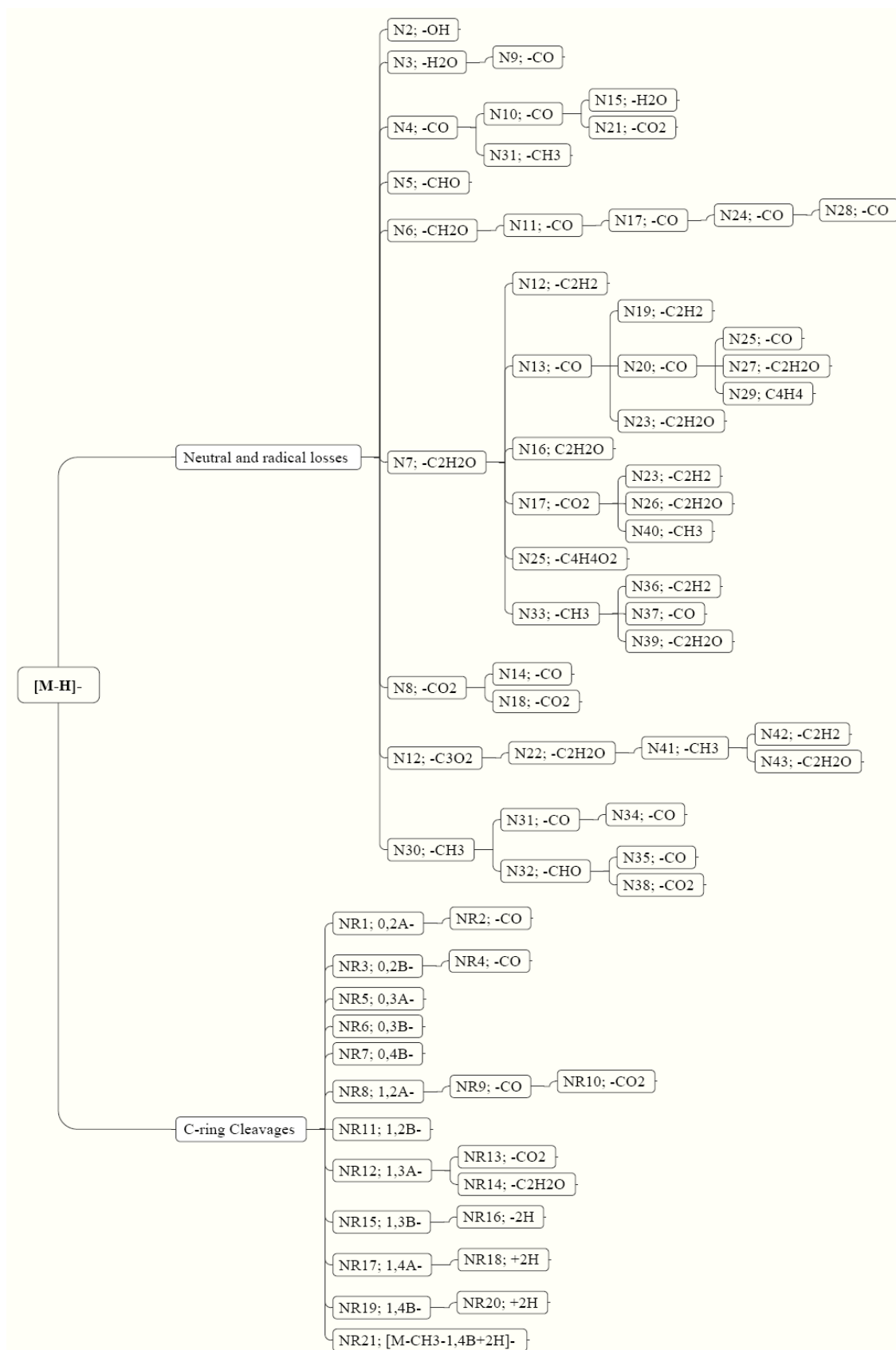
Instrument Parameter		
Polarity	ES+	
Calibration	Dynamic 2	
	Set point	Actual
Capillary	3	3.01
Cone	30	42
Extractor	0	11
RF Lens	1	9.16
Source Temp (°C)	100	125
Desolvation Temp (°C)	270	267
LM Resolution	15	
HM Resolution	15	
Collision Energy	Vary for 20, 25 and 30 eV	9.9
Ion Energy	3	
Steering	0	-1.09
Entrance	80	-78.4
Pre-filter	5	4.5
Transport	11	-12
Aperture2	16	-17.3
Acceleration	200	-200
Focus	0	0
Tube Lens	160	-159
Offset1	0	-76.2
Offset2	0	-79.3
Pusher	980	912
TOF (kV)	9.1	-9.23
Reflectron	35.25	2.04
Pusher Cycle Time (μs)	Auto	
Pusher Frequency (Hz)	22727.27	
Multiplier	550	-565
MCP	2000	1989
Centroid Threshold	0	
Min Points	2	
Np Multiplier	1	
Resolution	4000	
Lock Mass	0	
Mass Window +/-	1	
Lteff	1805	
Veff	9100	
Pirani Pressure(mbar)	1.91E+00	
Penning Pressure(mbar)	OFF	
Tof Penning Pressure(mbar)	6.53E-07	

ตาราง 4.5 สภาวะของเครื่อง ESI-MS/MS ของการวิเคราะห์แบบ negative ion mode ในการศึกษาอิทธิพลของ collision energy ต่อรูปแบบการแตกตัวของ flavonoids.

Instrument Parameters		
Polarity	ES-	
Calibration	Dynamic 2	
	Set point	Actual
Capillary	3	-2.21
Cone	30	-42
Extractor	0	-11
RF Lens	1	-9.16
Source Temp (°C)	120	129
Desolvation Temp (°C)	270	267
LM Resolution	15	
HM Resolution	15	
Collision Energy	Vary for 20, 25 and 30 eV	-9.9
Ion Energy	3	
Steering	0	-0.78
Entrance	80	77.7
Pre-filter	5	-6
Transport	11	10.1
Aperture2	16	14.8
Acceleration	200	198
Focus	0	-2
Tube Lens	160	157
Offset1	0	79.3
Offset2	0	77.7
Pusher	980	912
TOF (kV)	9.1	9.18
Reflectron	35.25	2.05
Pusher Cycle Time (μs)	Auto	
Pusher Frequency (Hz)	22727.27	
Multiplier	550	-565
MCP	2000	1984
Centroid Threshold	0	
Min Points	2	
Np Multiplier	1	
Resolution	0	
Lock Mass	0	
Mass Window +/-	1	
Lteff	1806.89	
Veff	9100	
Pirani Pressure(mbar)	1.95E+00	
Penning Pressure(mbar)	OFF	
Tof Penning Pressure(mbar)	6.31E-07	



รูป 4.2 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญของ flavonoids จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ESI-MSMS แบบ positive ion mode ซึ่งประกอบด้วย neutral and radical losses และ C-ring cleavages



รูป 4.3 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญของ flavonoids จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ESI-MSMS แบบ negative ion mode ซึ่งประกอบด้วย neutral and radical losses และ C-ring cleavages

ตาราง 4.6 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญของ flavonoids จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ESI-MSMS แบบ positive และ negative ion mode ซึ่งประกอบด้วย neutral and radical losses และ C-ring cleavages

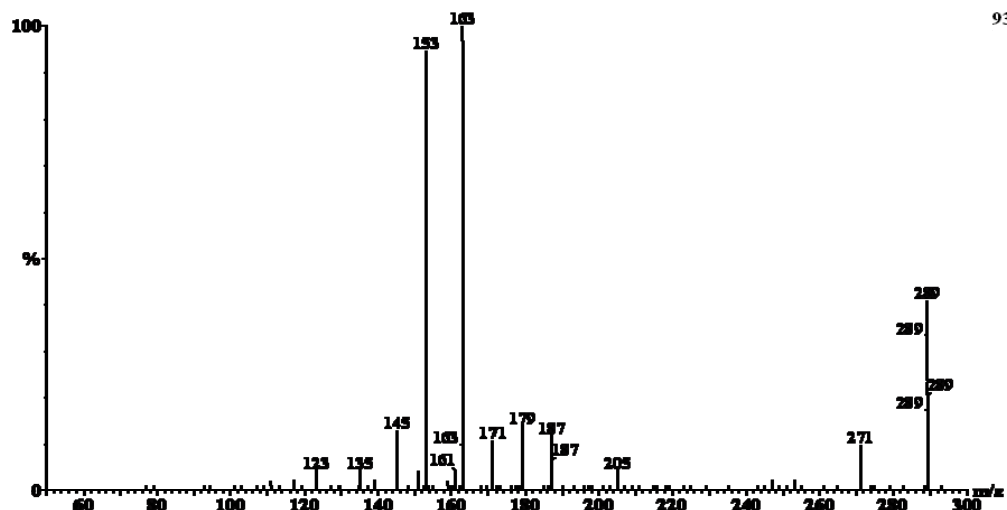
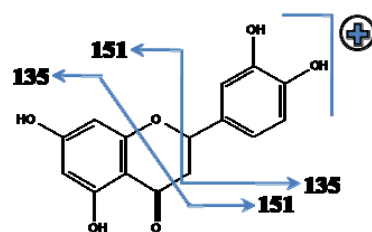
Fragmentation pathways	Positive ion mode	Negative ion mode
Neutral and radical losses fragmentation pathway	P 1 ^a ; [M+H] ⁺ P2; [M+H-H ₂ O] ⁺ P3; [M+H-CO] ⁺ P4; [M+H-CHO] ⁺ P5; [M+H-C ₂ H ₂ O] ⁺ P6; [M+H-H ₂ O-CO] ⁺ , [M+H-CHO-OH] ⁺ P7; [M+H-2CO] ⁺ P8; [M+H-2CHO] ⁺ P9; [M+H-H ₂ O-CO-H ₂ O] ⁺ P10; [M+H-C ₂ H ₂ O-C ₂ H ₂] ⁺ P11; [M+H-C ₂ H ₂ O-CO] ⁺ P12; [M+H-H ₂ O-2CO] ⁺ , [M+H-CHO-OH-CO] ⁺ P13; [M+H-3CO] ⁺ , [M+H-2C ₂ H ₂ O] ⁺ P14; [M+H-H ₂ O-2CO-H ₂ O] ⁺ P15; [M+H-2CHO-C ₂ H ₂ O] ⁺ , [M+H-C ₂ H ₂ O-C ₂ H ₂ O ₂] ⁺ P16; [M+H-H ₂ O-3CO] ⁺ , [M+H-CHO-OH-2CO] ⁺ P17; [M+H-4CO] ⁺ P18; [M+H-CHO-OH-CO-C ₂ H ₂ O] ⁺ P19; [M+H-H ₂ O-3CO-H ₂ O] ⁺ P20; [M+H ₂ O-4CO] ⁺ , [M-CHO-OH-3CO] ⁺ P21; [M+H-2CO-C ₄ H ₄ O ₂] ⁺ P22; [M+H-H ₂ O-4CO-H ₂ O] ⁺ P23; [M+H-H ₂ O-5CO] ⁺ , [M-CHO-OH-4CO] ⁺ P24; [M+H-CHO-OH-3CO-CHO] ⁺ P25; [M+H-CHO-OH-3CO-CH ₂ O] ⁺ P26; [M+H-CH ₃] ⁺ P27; [M+H-CH ₃ -H] ⁺ P28; [M+H-CH ₃ -OH] ⁺ P29; [M+H-CHO] ⁺ P30; [M+H-CH ₃ OH] ⁺ P31; [M+H-CH ₃ -H ₂ O] ⁺ P32; [M+H-CH ₃ -CO] ⁺ P33; [M+H-CH ₃ -CHO] ⁺ P34; [M+H-CH ₃ OH-CO] ⁺ P35; [M+H-CH ₃ -2CO] ⁺ P36; [M+H-CH ₃ -CHO-CO] ⁺ P37; [M+H-CH ₃ -CHO-CO ₂] ⁺ P38; [M+H-CH ₃ OH-CO-CHO] ⁺ P39; [M+H-CH ₃ -3CO] ⁺ P40; [M+H-CH ₃ -2CO-CO ₂] ⁺	N1 ^b ; [M-H] ⁻ N2; [M-OH] ⁻ N3; [M-H ₂ O] ⁻ N4; [M-CO] ⁻ N5; [M-CHO] ⁻ N6; [M-CH ₂ O] ⁻ N7; [M-C ₂ H ₂ O] ⁻ N8; [M-CO ₂] ⁻ N9; [M-H ₂ O-CO] ⁻ N10; [M-2CO] ⁻ N11; [M-CH ₂ O-CO] ⁻ N12; [M-C ₂ H ₂ O-C ₂ H ₂] ⁻ , [M-C ₃ O ₂] ⁻ N13; [M-C ₂ H ₂ O-CO] ⁻ N14; [M-CO ₂] ⁻ , [M-CO ₂ -CO] ⁻ N15; [M-2CO-H ₂ O] ⁻ N16; [M-2C ₂ H ₂ O] ⁻ N17; [M-CH ₂ O-2CO] ⁻ , [M-C ₂ H ₂ O-CO ₂] ⁻ N18; [M-2CO ₂] ⁻ N19; [M-C ₂ H ₂ O-CO-C ₂ H ₂] ⁻ N20; [M-C ₂ H ₂ O-2CO] ⁻ N21; [M-2CO-CO ₂] ⁻ N22; [M-C ₃ O ₂ -C ₂ H ₂ O] ⁻ N23; [M-C ₂ H ₂ O-CO-C ₂ H ₂ O] ⁻ , [M-C ₂ H ₂ O-CO ₂ -C ₂ H ₂] ⁻ N24; [M-CH ₂ O-3CO] ⁻ N25; [M-C ₂ H ₂ O-3CO] ⁻ , [M-C ₂ H ₂ O-C ₄ H ₄ O ₂] ⁻ N26; [M-C ₂ H ₂ O-CO ₂ -C ₂ H ₂ O] ⁻ N27; [M-C ₂ H ₂ O-2CO-C ₂ H ₂ O] ⁻ N28; [M-CH ₂ O-4CO] ⁻ N29; [M-C ₂ H ₂ O-2CO-C ₄ H ₄] ⁻ N30; [M-CH ₃] ⁻ N31; [M-CH ₃ -CO] ⁻ , [M-CO-CH ₃] ⁻ N32; [M-CH ₃ -CHO] ⁻ N33; [M-C ₂ H ₂ O-CH ₃] ⁻ N34; [M-CH ₃ -2CO] ⁻ N35; [M-CH ₃ -CHO-CO] ⁻ N36; [M-C ₂ H ₂ O-CH ₃ -C ₂ H ₂] ⁻ N37; [M-C ₂ H ₂ O-CH ₃ -CO] ⁻ N38; [M-CH ₃ -CHO-CO ₂] ⁻ N39; [M-C ₂ H ₂ O-CH ₃ -C ₂ H ₂ O] ⁻ N40; [M-C ₂ H ₂ O-CO ₂ -CH ₃] ⁻ N41; [M-C ₃ O ₂ -C ₂ H ₂ O-CH ₃] ⁻ N42; [M-C ₃ O ₂ -C ₂ H ₂ O-CH ₃ -C ₂ H ₂] ⁻ N43; [M-C ₃ O ₂ -C ₂ H ₂ O-CH ₃ -C ₂ H ₂ O] ⁻
C-ring cleavage fragmentation pathways	PR 1 ^c ; ^{0,2} A ⁺ PR2; ^{0,2} A-H ₂ O ⁺ PR3; ^{0,2} A-H ₂ O-CO ⁺ PR4; ^{0,2} A-CO ⁺ PR5; ^{0,2} A-CO-CO ⁺ PR6; ^{0,2} B ⁺ PR7; ^{0,2} B-CO ⁺ PR8; ^{0,3} B ⁺ PR9; ^{0,3} B-H ₂ O ⁺ PR10; ^{0,4} B ⁺ PR11; ^{0,4} B-H ₂ O ⁺ PR12; ^{1,3} A ⁺ PR13; ^{1,3} A-H ₂ O ⁺ PR14; ^{1,3} A-CO ⁺ PR15; ^{1,3} A-C ₂ H ₂ O ⁺ PR16; ^{1,3} B ⁺ PR17; ^{1,3} B-2H ⁺ PR18; ^{1,4} A ⁺ PR19; ^{1,4} A+2H ⁺ PR20; ^{1,4} B ⁺	NR1 ^d ; ^{0,2} A ⁻ NR2; ^{0,2} A-CO ⁻ NR3; ^{0,2} B ⁻ NR4; ^{0,2} B-CO ⁻ NR5; ^{0,3} A ⁻ NR6; ^{0,3} B ⁻ NR7; ^{0,4} B ⁻ NR8; ^{1,2} A ⁻ NR9; ^{1,2} A-CO ⁻ NR10; ^{1,2} A-CO-CO ₂ ⁻ NR11; ^{1,2} B ⁻ NR12; ^{1,3} A ⁻ NR13; ^{1,3} A-CO ₂ ⁻ NR14; ^{1,3} A-C ₂ H ₂ O ⁻ NR15; ^{1,3} B ⁻ NR16; ^{1,3} B-2H ⁻ NR17; ^{1,4} A ⁻ NR18; ^{1,4} A+2H ⁻ NR19; ^{1,4} B ⁻ NR20; ^{1,4} B+2H ⁻ NR21; [M-CH ₃] ⁻ , ^{1,4} B+2H ⁻

^a P; positive mode

^b N; negative mode

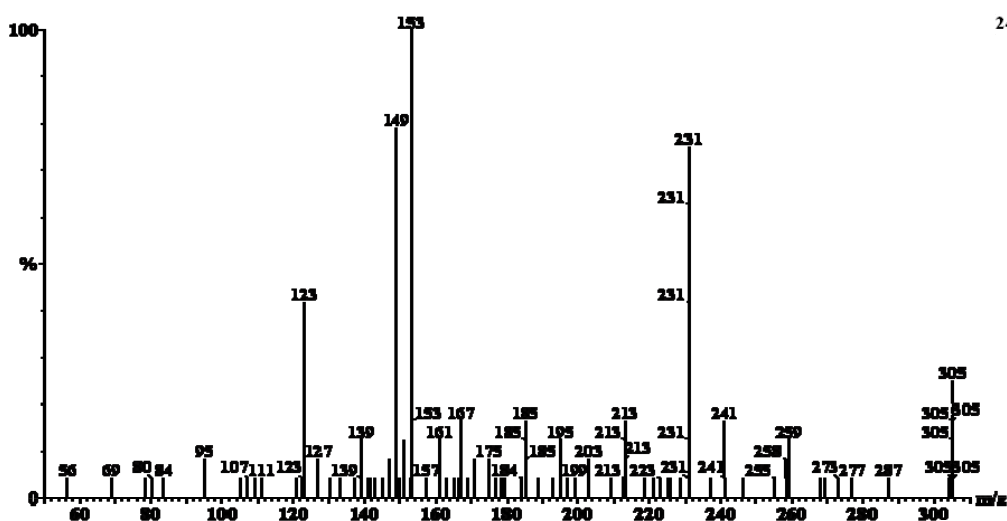
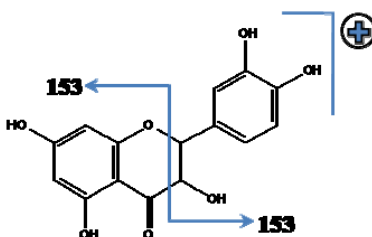
^c PR; ring cleavage in positive mode

^d NR; ring cleavage in negative mode



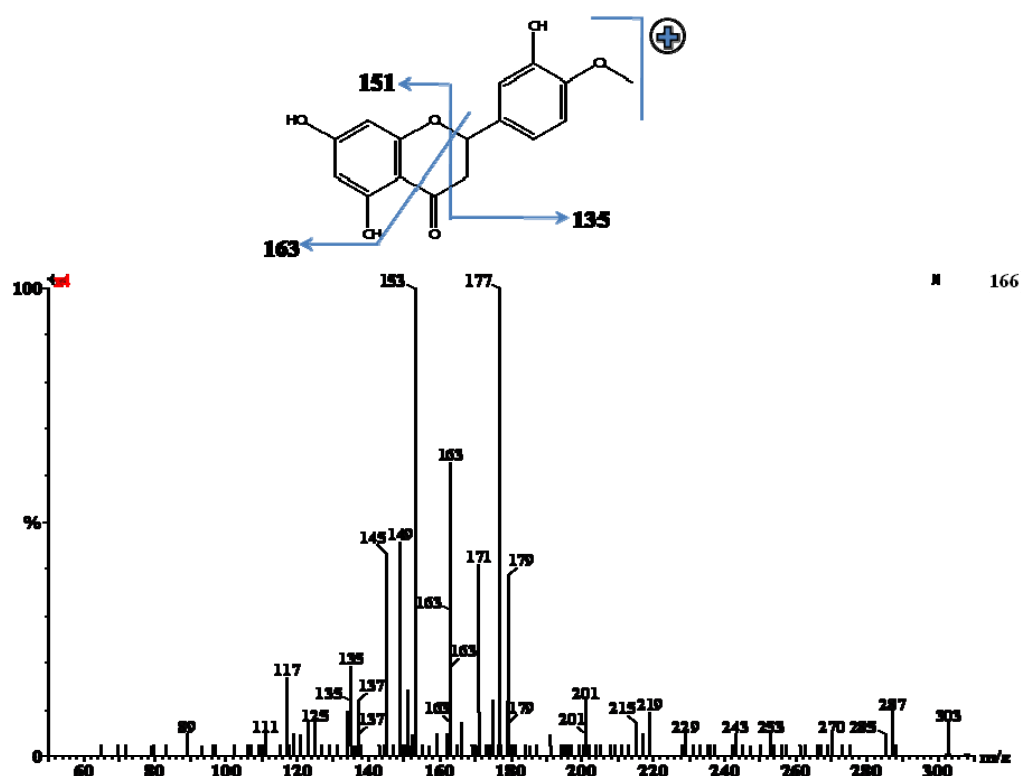
93

รูป 4.4 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ [1] eriodictyol; 5,7,3',4'-tetrahydroxyflavanone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ positive ion mode

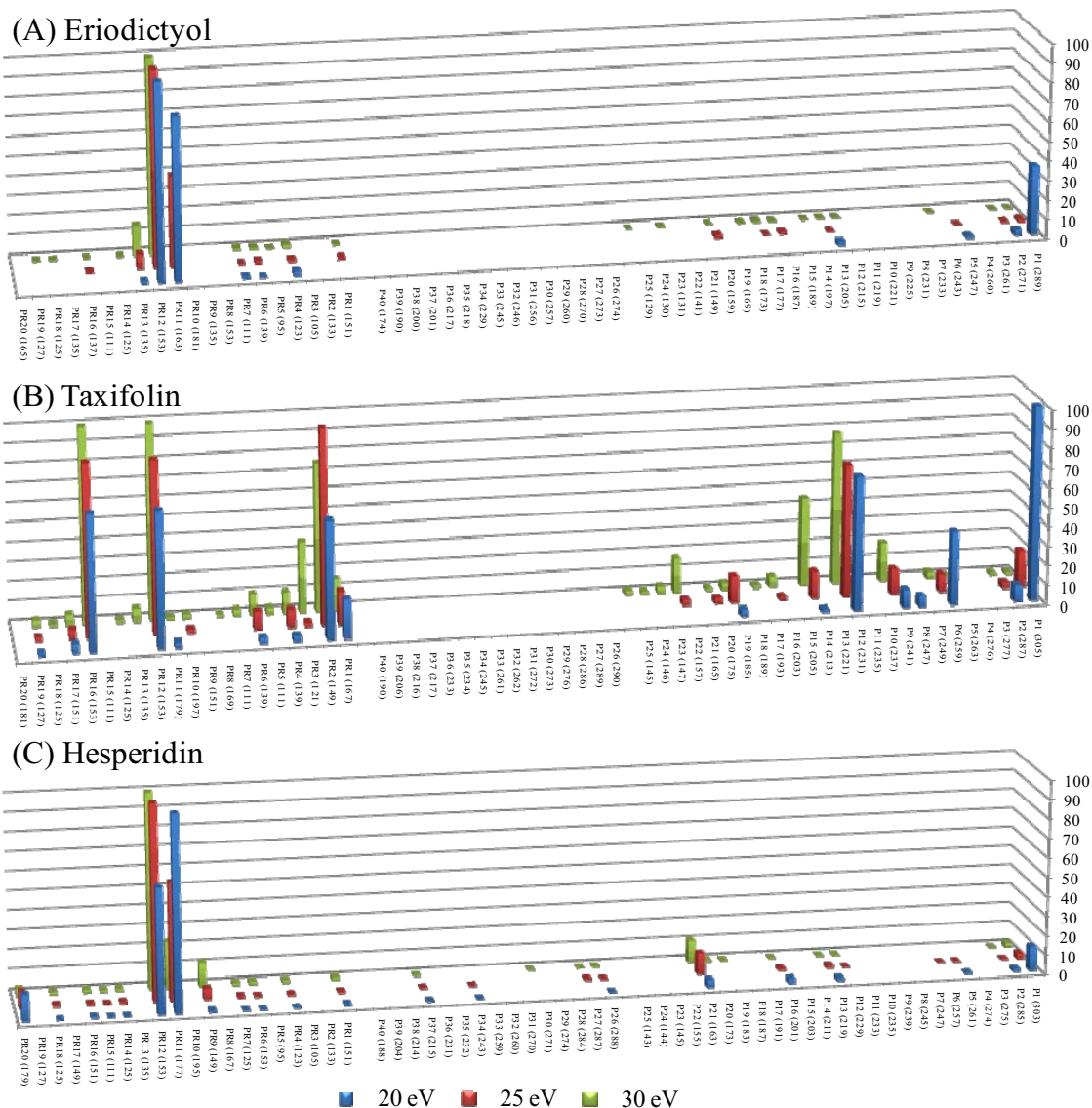


24

รูป 4.5 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ [2] taxifolin; 3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavanone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ positive ion mode



รูป 4.6 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ [3] 5,7,3'-trihydroxy-4'-methoxyflavanone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ positive ion mode



รูป 4.7 ค่า relative ion signal intensity ของไอออนที่พบใน MS/MS spectra จากการวิเคราะห์ด้วย collision energy 20, 25 และ 30 eV ของ [1] eriodictyol; 5,7,3',4'-tetrahydroxyflavanone, [2] taxifolin; 3,5,7, 3',4'-pentahydroxyflavanone และ [3] 5,7,3'-trihydroxy-4'-methoxyflavanone ด้วยเทคนิค ESI-MS/MS แบบ positive ion mode

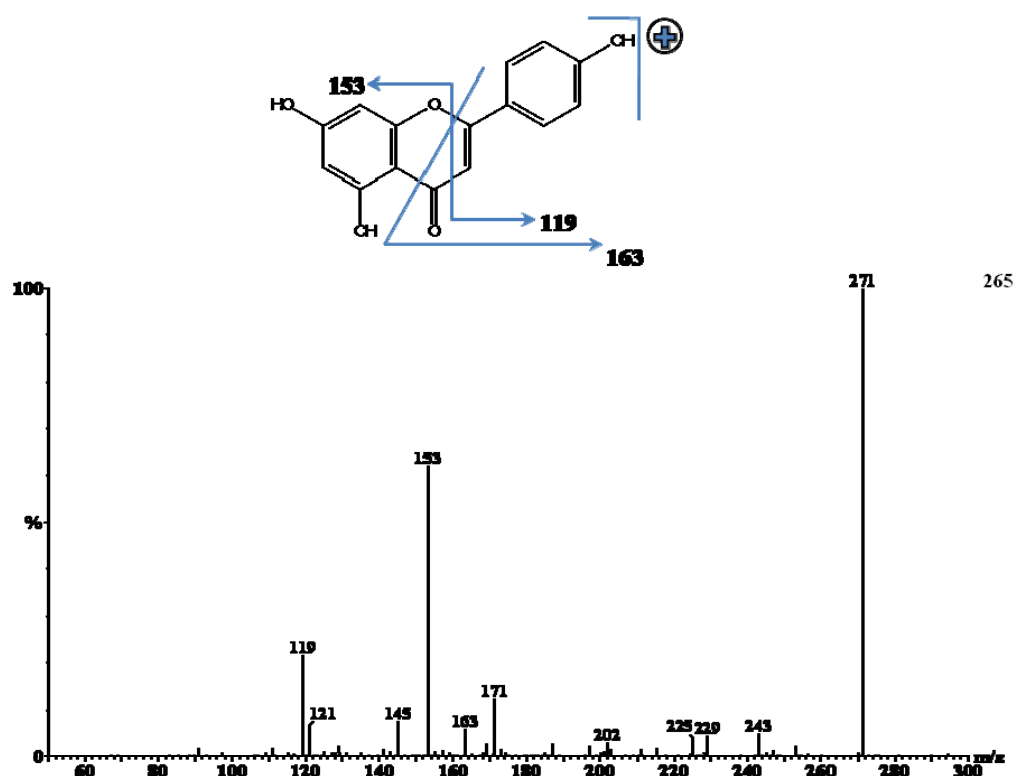
จากกราฟแสดงค่า relative ion signal intensity ของไอออนที่พบใน MS/MS spectra จากการวิเคราะห์ด้วย collision energy 20, 25 และ 30 eV ของ [1] eriodictyol; 5,7,3',4'-tetrahydroxyflavanone, [2] taxifolin; 3,5,7, 3',4'-pentahydroxyflavanone และ [3] 5,7,3'-trihydroxy-4'-methoxyflavanone ด้วยเทคนิค ESI-MS/MS พบว่าสารกลุ่ม flavanone สามารถแตกตัวได้ง่าย ให้ product ion จำนวนมาก โดยสามารถพบ $[M+H]^+$ ได้ที่ collision energy เท่ากับ 20 eV โดยเมื่อค่า collision energy เพิ่มขึ้นค่า relative ion signal intensity ของไอออนนี้มีค่าลดลง อย่างไรก็ตาม ค่า relative ion signal intensity ของ $[M+H]^+$ ณ collision energy 20 eV นี้ก็สามารถใช้ในการแยกแยะ flavanone ทั้งสามออกจากกันได้ เนื่องจาก เฉพาะ [2] Taxifolin เท่านั้น

ที่พบ $[M+H]^+$ เป็น base peak ขณะที่ [1] eriodictyol และ [3] hesperidin พบไอออน PR12 และ PR11 เป็น base peak ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบอีกว่า [2] Taxifolin ซึ่งมี hydroxyl group เป็นหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง C3 ของ A-ring จึงแตกต่างจาก [1] eriodictyol แต่หมู่แทนที่ดังกล่าวมีอิทธิพลอย่างมากต่อรูปแบบการแตกตัวของ [1] Taxifolin ซึ่งเกิดการแตกตัวแบบ neutral and radical losses ได้ง่าย จากการสูญเสียโมเลกุลของ H_2O CO C_2H_2O เป็นต้น ทำให้ได้ P6, P9, P12, P14, P19 และ P22 เป็น product ions นอกจากนี้ การแตกตัวผ่าน C-ring cleavage ก็มีลักษณะเฉพาะ นั่นคือพบไอออน PR1-4 ซึ่งเป็น characteristic ion ของ [1] taxifolin เช่นเดียวกับไอออน PR12 และ PR16 ซึ่งเป็น characteristic ion สำหรับ flavonoids ก็พบเป็น base peak เมื่อถูกวิเคราะห์ที่ collision energy 30 eV

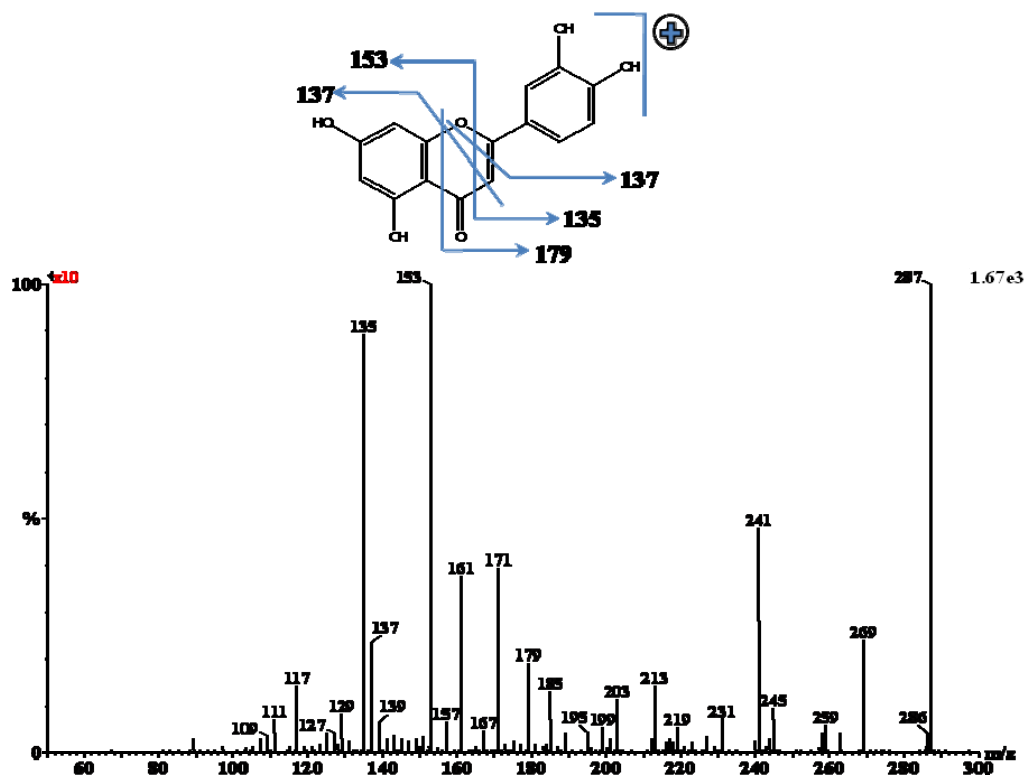
ส่วน [1] eriodictyol พบว่า daughter ion จากการแตกตัวผ่าน C-ring cleavage นั่นคือ PR11 และ PR12 เป็นไอออนที่เด่น โดยไอออน PR12 เป็น base peak ทุก collision energy ที่ใช้ ขณะเดียวกัน product ion ที่ได้จากการแตกตัวแบบ neutral and radical losses ก็สามารถพบได้เช่นเดียวกัน

นอกจากนี้ [3] hesperidin มีการแตกตัวผ่านกลไก radical losses ทำให้ได้ไอออน P26, P27, P30, P37 เป็นต้น ซึ่งทำให้ทราบว่าหมู่ methoxy group เป็นองค์ประกอบอยู่ในโครงสร้าง อย่างไรก็ตามการแตกตัวผ่าน C-ring cleavage ก็ยังคงเกิดได้ดีทำให้ได้ PR11 เป็น base peak ที่ collision energy 20 eV ขณะที่ไอออน PR12 เป็น base peak ทั้งที่ collision energy 25 และ 30 eV

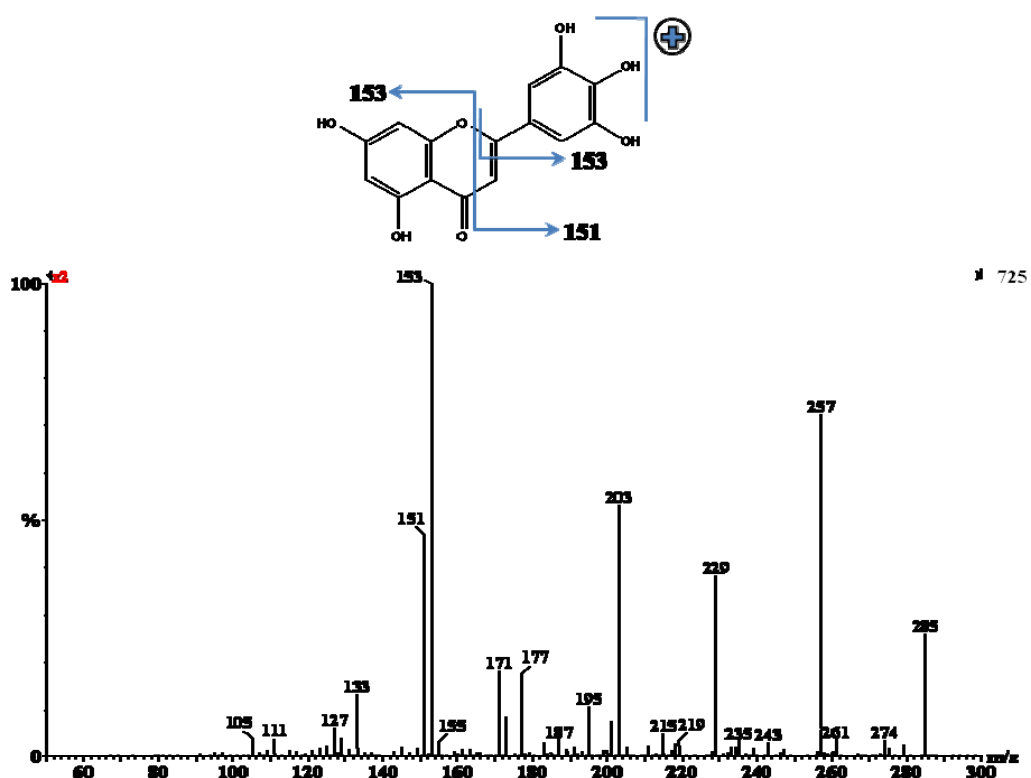
จากผลการวิเคราะห์ดังกล่าวข้างต้นทำให้ทราบว่า $[M+H]^+$ ของ flavanone สามารถแตกตัวได้ง่าย โดยให้ product ion ที่เกิดจากการแตกตัวผ่าน C-ring cleavage เป็นไอออนสำคัญ นอกจากนี้สารกลุ่ม flavanoneol ยังมีรูปแบบการแตกตัวที่แตกต่างออกไป นั่นคือ เกิดการแตกตัวเพิ่มมากขึ้นของไอออนที่เกี่ยวข้องกับ neutral and radical losses ในขณะที่การมีอยู่ของ methoxy group ภายในโครงสร้างก็สามารถทราบได้จากการพบไอออน P26 เป็นต้น ดังนั้น จำนวนของหมู่แทนที่ที่สามารถหาได้จากค่า m/z ของไอออนที่เกิดจาก C-ring cleavage นอกจากนั้นตำแหน่งของหมู่แทนที่และชนิดก็สามารถระบุได้จากไอออนที่เกิดจาก neutral and radical losses



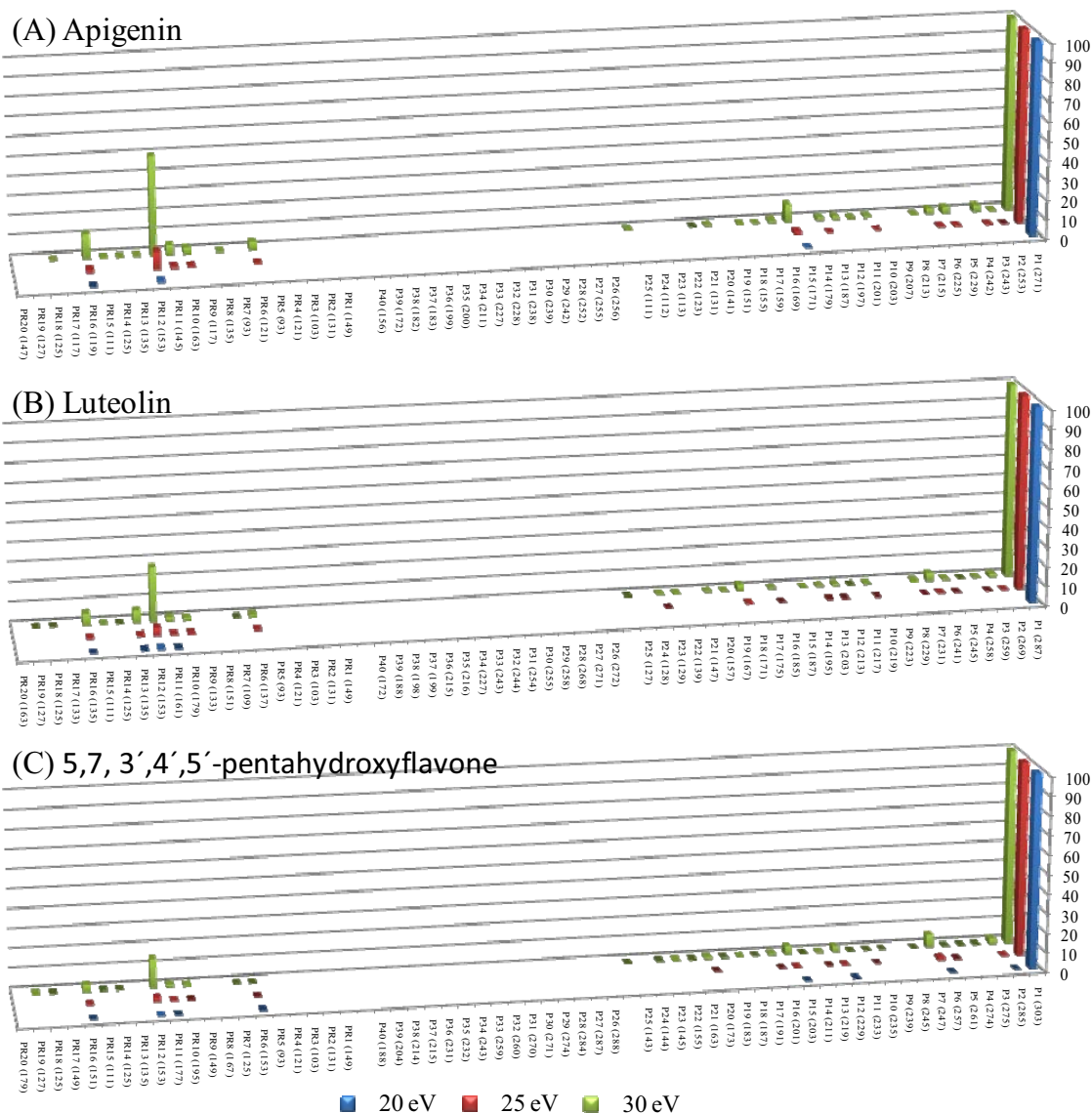
รูป 4.8 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ [4] apigenin; 5,7,4'-trihydroxyflavone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ positive ion mode



รูป 4.9 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ [5] luteolin; 5,7,3',4'-tetrahydroxyflavone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ positive ion mode



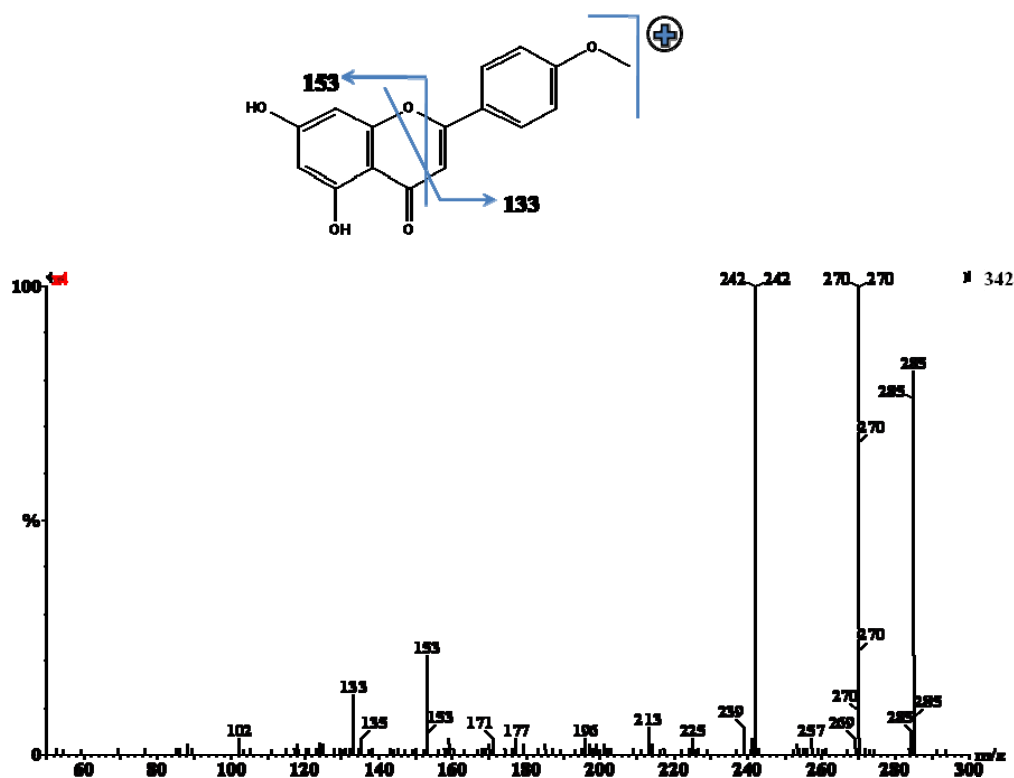
รูป 4.10 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ [6] 5,7,3',4',5'-pentahydroxyflavone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ positive ion mode



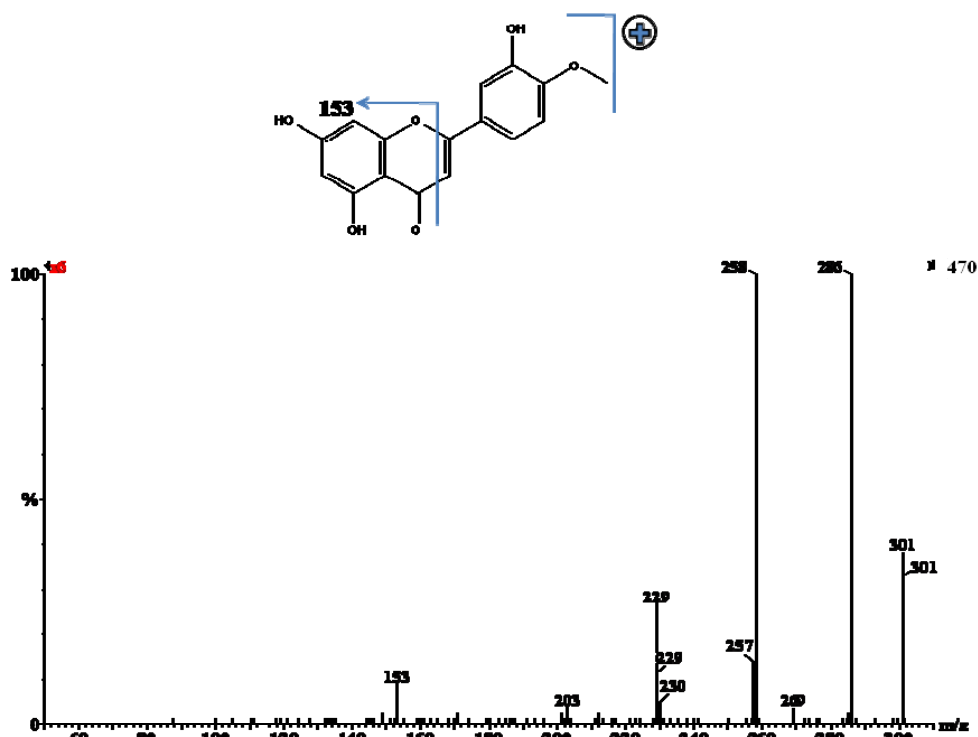
รูป 4.11 ค่า relative ion signal intensity ของไอออนที่พบใน MS/MS spectra จากการวิเคราะห์ด้วย collision energy 20, 25 และ 30 eV ของ [4] apigenin; 5,7,4'-trihydroxyflavone, [5] luteolin; 5,7,3',4'-tetrahydroxyflavone และ [6] 5,7, 3',4',5'-pentahydroxyflavone ด้วยเทคนิค ESI-MS/MS แบบ positive ion mode

จากกราฟแสดงค่า relative ion signal intensity ของไอออนที่พบใน MS/MS spectra จากการวิเคราะห์ด้วย collision energy 20, 25 และ 30 eV ของ [4] apigenin; 5,7,4'-trihydroxyflavone, [5] luteolin; 5,7,3',4'-tetrahydroxyflavone และ [6] 5,7, 3',4',5'-pentahydroxyflavone ด้วยเทคนิค ESI-MS/MS แบบ positive ion mode พบว่า $[M+H]^+$ เป็น base peak ของทุกสารทั้ง [4], [5] และ [6] และทุก collision energy นั้นหมายถึง $[M+H]^+$ ของ flavones นั้นแตกตัวได้ยากกว่าของ flavanone อย่างไรก็ตามพบว่า หากค่า collision energy เพิ่มมากขึ้น จำนวน daughter ion ก็จะมีเพิ่มมากขึ้น และที่ collision energy 30 eV พบการเพิ่มขึ้นของค่า relative ion signal intensity ของไอออน PR12 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 50 25 และ 12% สำหรับสาร [4], [5] และ [6] ตามลำดับ จึงสามารถ

สรุปได้ว่า ถ้าหากจำนวนของ hydroxyl group ซึ่งเป็นหมู่แทนที่ใน B-ring เพิ่มมากขึ้น ค่า relative ion signal intensity ของไอออน PR12 จะลดลง โดยลดลงประมาณ 2 เท่าเมื่อจำนวนของ hydroxyl group ซึ่งเป็นหมู่แทนที่ใน B-ring เพิ่มขึ้น 1 หมู่ ซึ่งส่งผลทำนองเดียวกันต่อไอออน PR16 จากพฤติกรรมดังกล่าวจึงพบว่า จากการ vary ค่า collision energy ทำให้ทราบถึงพฤติกรรมการแตกตัว และทำให้ได้ characteristic relative ion signal intensity ของ ไอออนสำคัญที่สามารถใช้แยกแยะความแตกต่างระหว่าง flavonoids ซึ่งเป็นชนิดเดียวกันได้

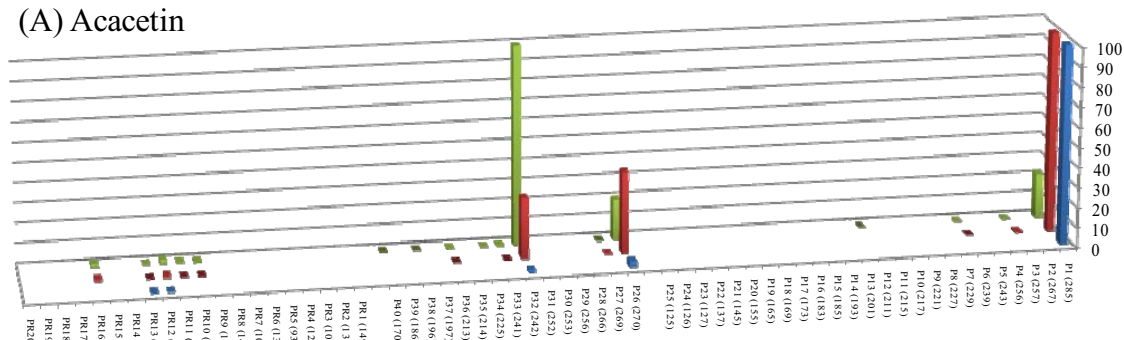


รูป 4.12 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ [7] acacetin; 5,7-dihydroxy- 4'-methoxyflavone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ positive ion mode

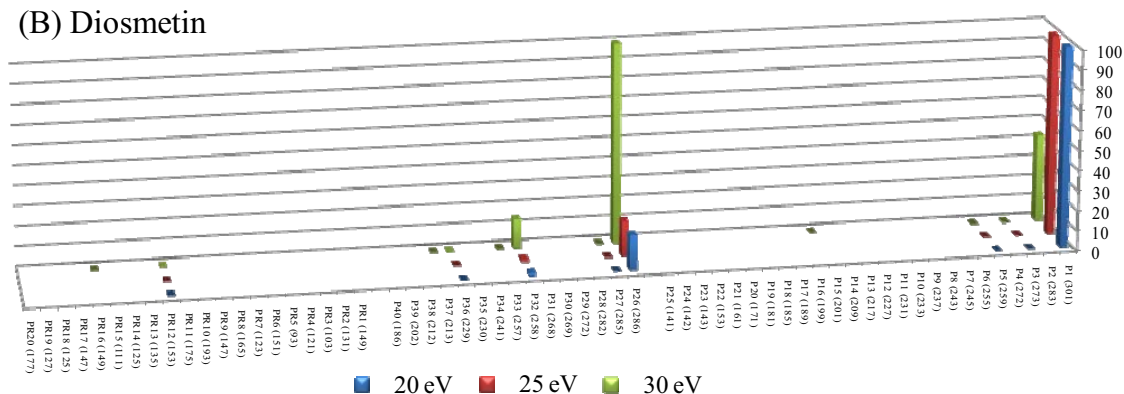


รูป 4.13 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ [8] diosmetin; 5,7, 3'-trihydroxy-4'-methoxyflavone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ positive ion mode

(A) Acacetin

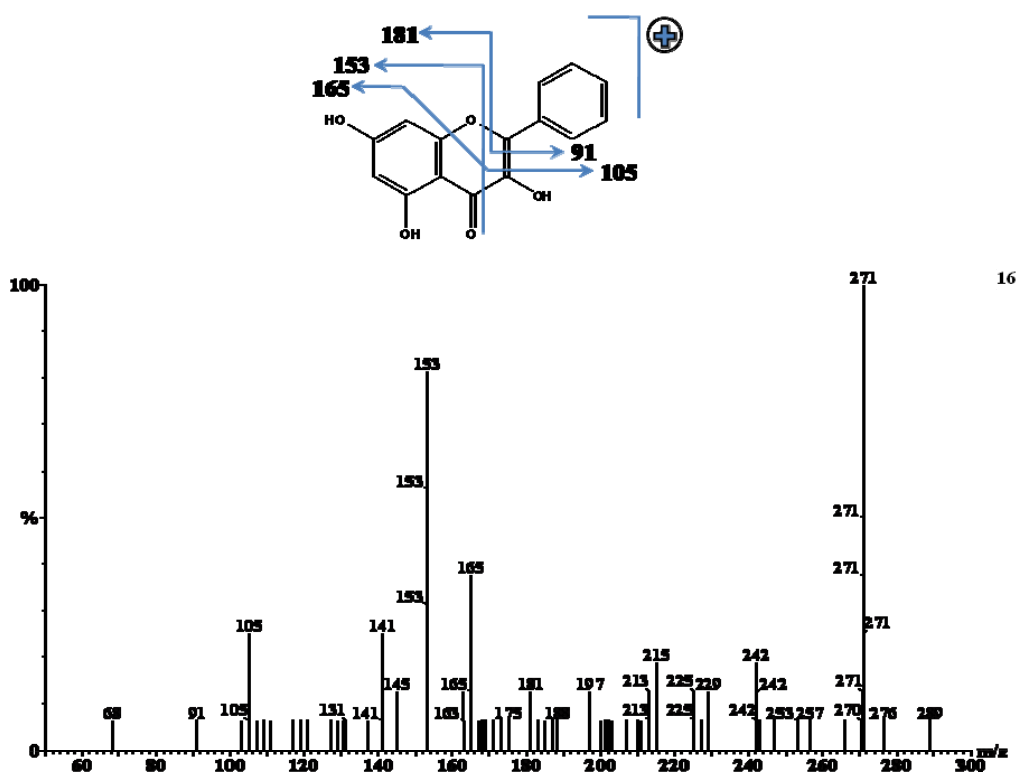


(B) Diosmetin

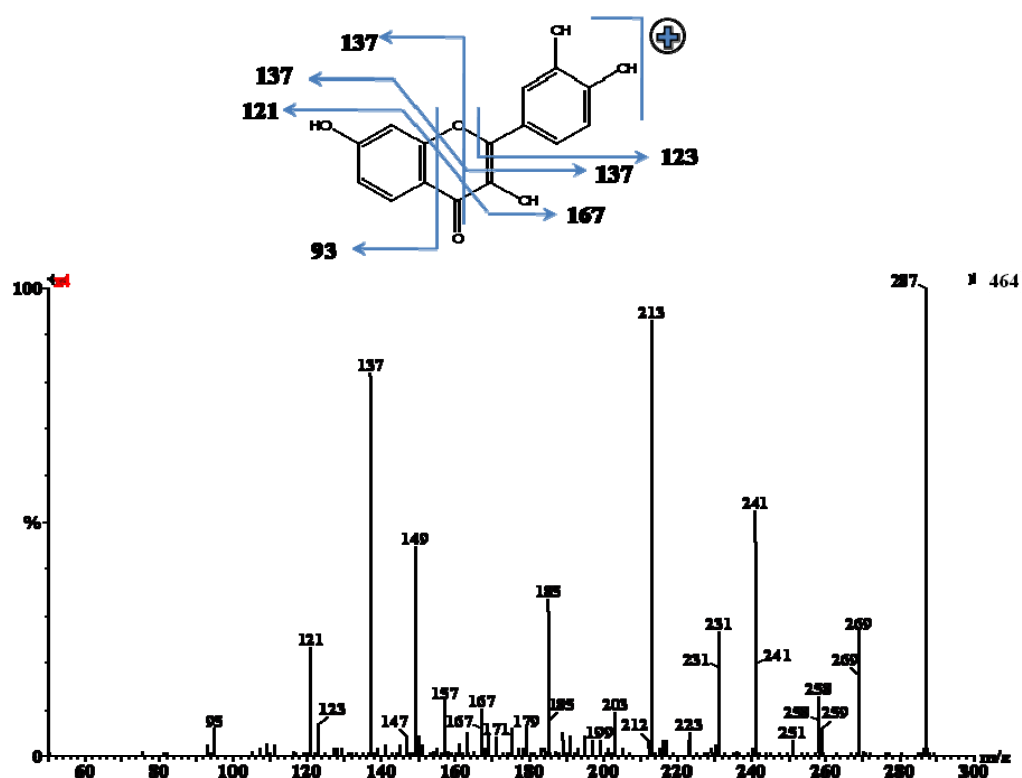


รูป 4.14 ค่า relative ion signal intensity ของไอออนที่พบใน MS/MS spectra จากการวิเคราะห์ด้วย collision energy 20, 25 และ 30 eV ของ [7] acacetin; 4'-methoxy-5,7-dihydroxyflavone และ [8] 4'-methoxy-5,7,3'-trihydroxyflavone ด้วยเทคนิค ESI-MS/MS แบบ positive ion mode

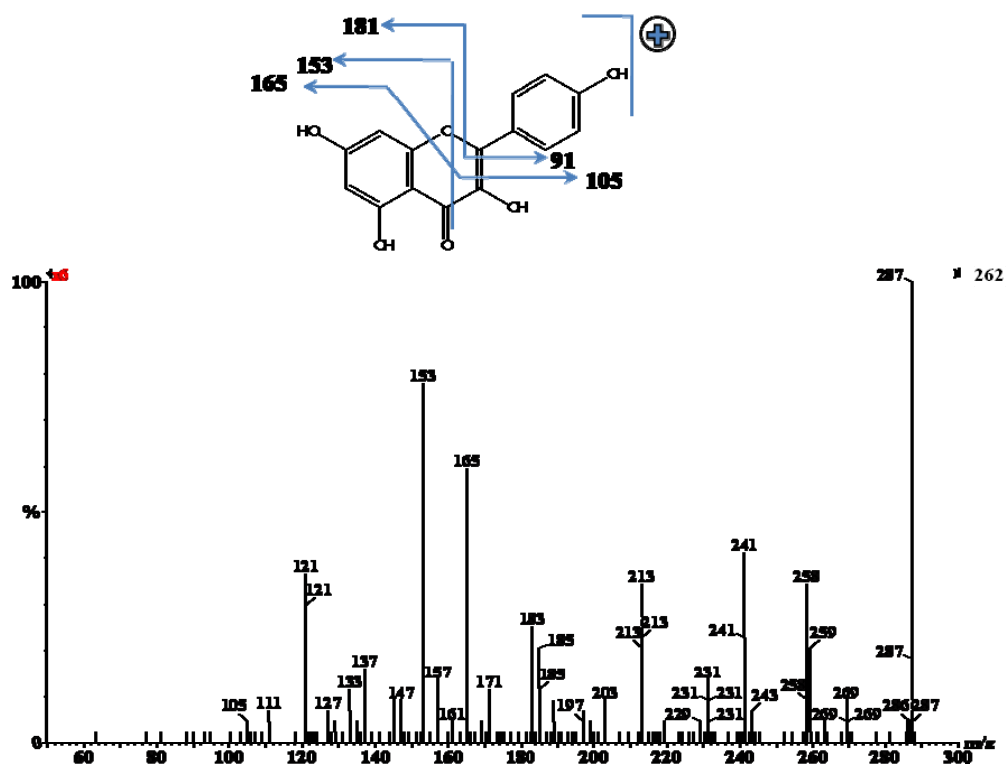
จากกราฟแสดงค่า relative ion signal intensity ของไอออนที่พบใน MS/MS spectra จากการวิเคราะห์ด้วย collision energy 20, 25 และ 30 eV ของ [8] diosmetin; 5,7, 3'-trihydroxy-4'-methoxyflavone และ [8] diosmetin; 5,7, 3'-trihydroxy-4'-methoxyflavone ด้วยเทคนิค ESI-MS/MS แบบ positive ion mode พบว่า methoxylated compounds ของสารกลุ่ม flavones สามารถแตกตัวผ่านกลไก radical loss ได้ง่ายกว่ากลุ่ม flavanone จึงทำให้ได้ไอออนที่สำคัญคือ P26 และ P32 ซึ่ง ณ collision energy ไอออน P26 เป็น base peak สำหรับ compound [8] ขณะที่ไอออน P28 เป็น base peak สำหรับ compound [9] อย่างไรก็ตามที่ collision energy 20 และ 25 eV พบว่า ไอออน $[M+H]^+$ เป็น base peak สำหรับสารทั้งสองตัว ในขณะที่ daughter ion ที่เกิดจาก C-ring cleavage เกิดขึ้นน้อย จึงทำให้เห็นเฉพาะไอออน PR12 หรือ PR16 เป็นต้น ในระดับสัญญาณที่ต่ำ ดังนั้นจากผลดังกล่าวพบว่าการ vary ค่า collision energy ทำให้สามารถแยกแยะความแตกต่างระหว่าง compound [8] และ [9] ได้จากการเกิดขึ้นและค่า relative ion signal intensity ของ ไอออน $[M+H]^+$, P26 และ P32



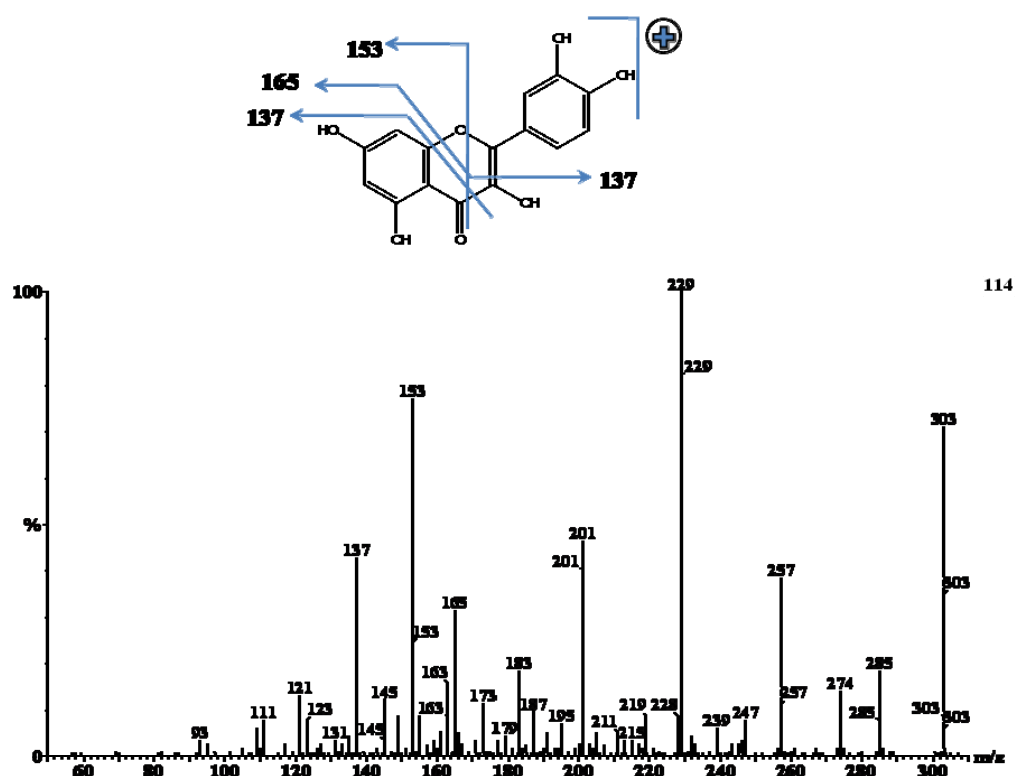
รูป 4.15 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ [9] galengin; 3,5,7-trihydroxyflavone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ positive ion mode



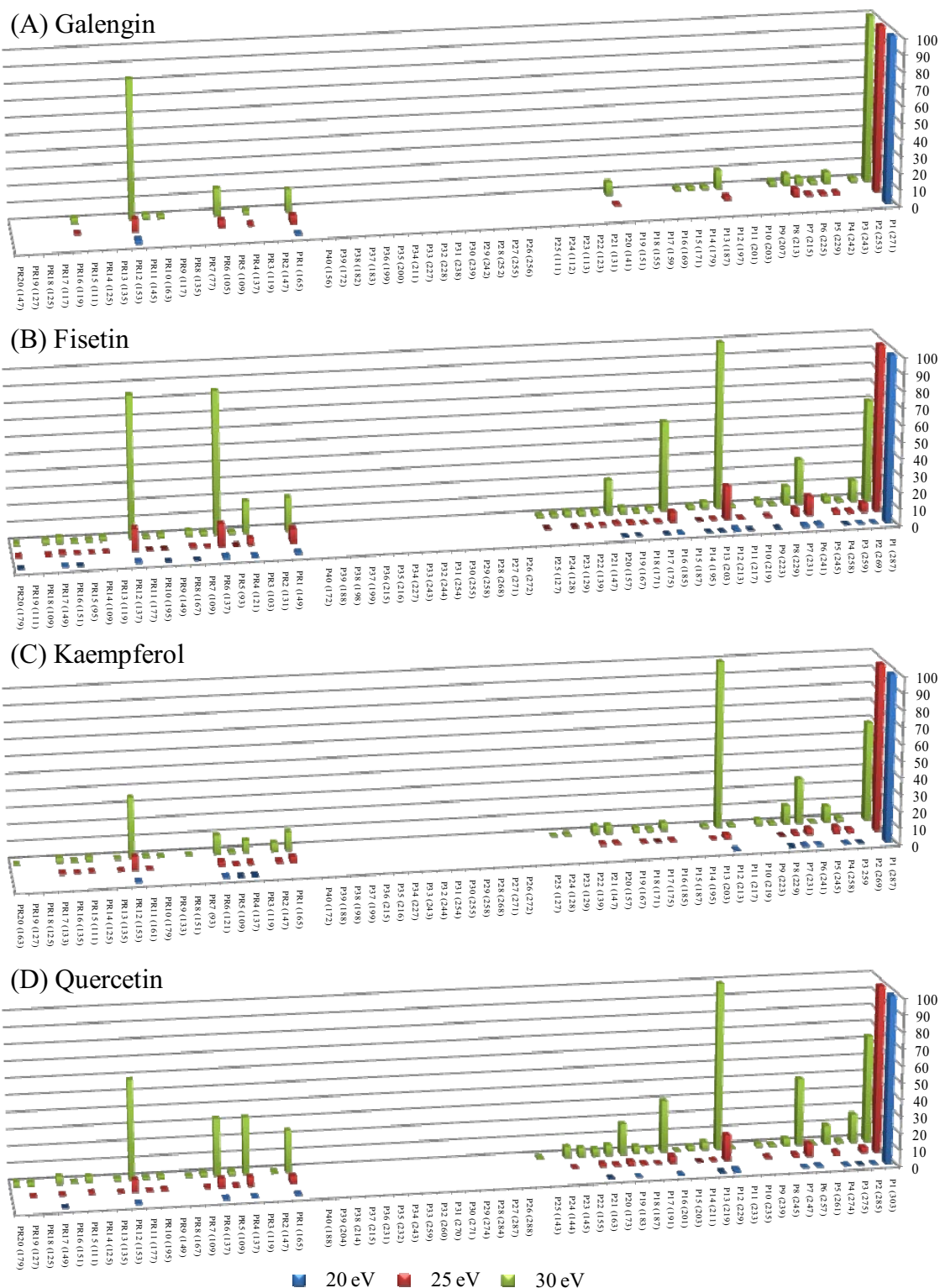
รูป 4.16 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ [10] fisetin; 3,7,3',4'-tetrahydroxyflavone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ positive ion mode



รูป 4.17 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ [11] kaempferol; 3,5,7,4'-tetrahydroxyflavone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ positive ion mode



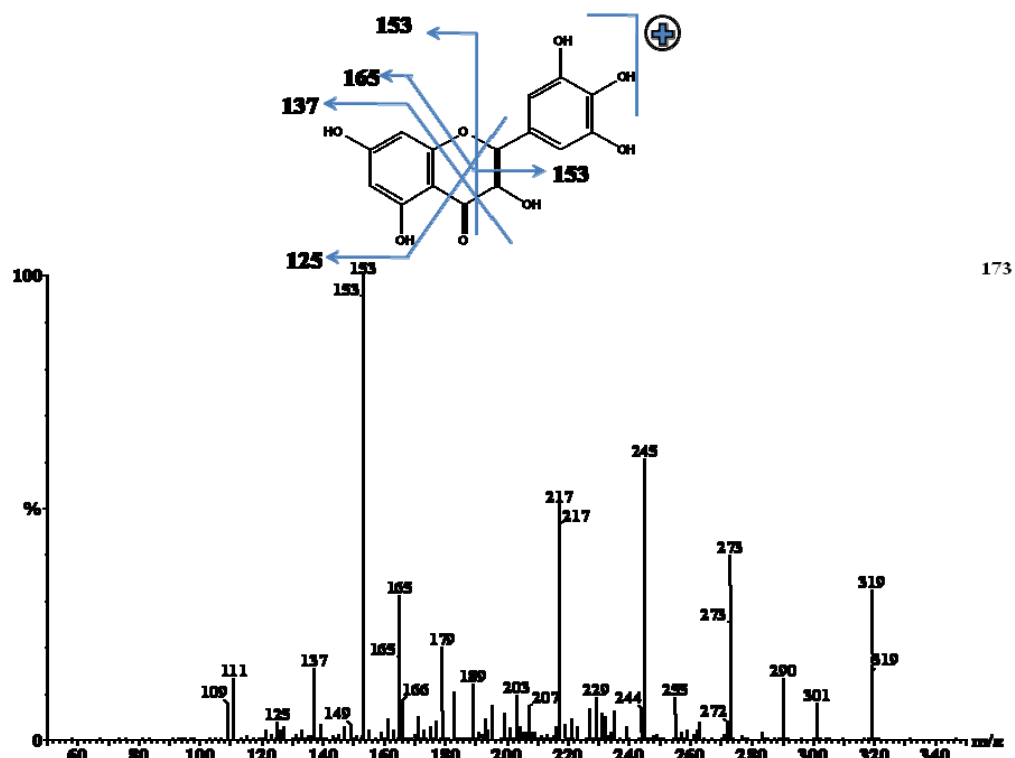
รูป 4.18 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ [12] quercetin; 3,5,7, 3',4'-pentahydroxyflavone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ positive ion mode



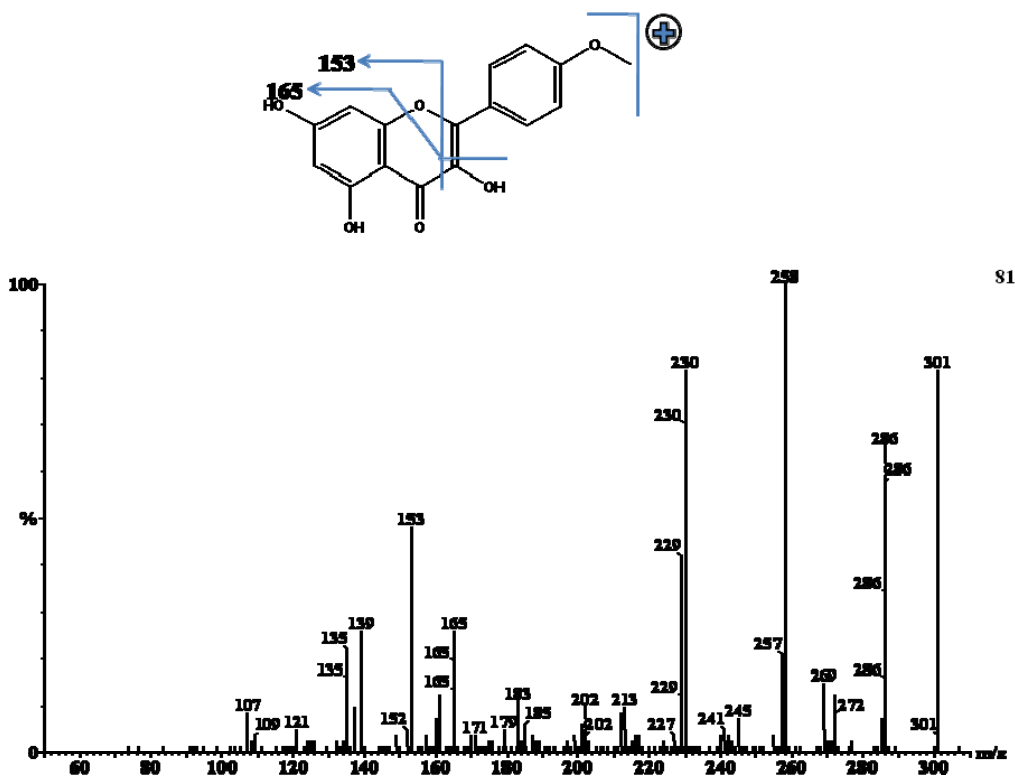
รูป 4.19 ค่า relative ion signal intensity ของไอออนที่พบใน MS/MS spectra จากการวิเคราะห์ด้วย collision energy 20, 25 และ 30 eV ของ [9] galengin; 3,5,7-trihydroxyflavone, [10] fisetin; 3,7,3',4'-tetrahydroxyflavone, [11] kaempferol; 3,5,7,4'-tetrahydroxyflavone และ [12] quercetin; 3,5,7, 3',4'-pentahydroxyflavone เทคนิค ESI-MS/MS แบบ positive ion mode

จากกราฟค่า relative ion signal intensity ของไอออนที่พบใน MS/MS spectra จากการวิเคราะห์ด้วย collision energy 20, 25 และ 30 eV ของ [9] galengin; 3,5,7-trihydroxyflavone, [10] fisetin; 3,7,3',4'-tetrahydroxyflavone, [11] kaempferol; 3,5,7,4'-tetrahydroxyflavone และ [12] quercetin; 3,5,7, 3',4'-pentahydroxyflavone เทคนิค ESI-MS/MS แบบ positive ion mode พบว่าเมื่อเปรียบเทียบระหว่าง compound [9], [11] และ [12] นั้นคืออิทธิพลของจำนวนหมู่ hydroxy ที่แทนที่ใน B-ring พบว่า ถ้าหากหมู่แทนที่ใน B-ring เพิ่มมากขึ้น จะทำให้ $[M+H]^+$ ของสารชนิดนั้นสามารถแตกตัวให้ daughter ion ที่เกี่ยวข้องกับ neutral and radical losses ได้มากกว่าสารชนิดที่มีจำนวนหมู่แทนที่ใน B-ring น้อยกว่า อย่างไรก็ตามอิทธิพลของหมู่แทนที่ดังกล่าวส่งผลไม่ชัดเจนมากนักสำหรับ daughter ion ที่เกิดขึ้นจาก C-ring cleavage เนื่องจากพบว่า compound [9] มีไอออน PR12 ที่มีค่าสูงกว่าเมื่อเทียบกับ compound [11] และ [12] สำหรับ $[M+H]^+$ พบว่าเป็น base peak สำหรับ compound [9] ในทุก ๆ collision energy ขณะที่ค่า relative ion signal intensity ลดลงเป็น 60% สำหรับ compound [11] และ [12] ที่ collision energy 30 eV โดยถูกแทนที่ด้วยไอออน P13 ซึ่งเป็น base peak สำหรับทั้งสอง compound ถึงแม้ว่าความแตกต่างระหว่าง [9] กับ [11] และ [12] สามารถทำได้ง่ายเนื่องจากที่ collision energy นั้น compound พบเพียง 3 ไอออนเท่านั้น ขณะที่ compound [11] และ [12] มีจำนวน daughter ion ที่มากกว่า อย่างไรก็ตามรูปแบบการแตกตัวของ [11] และ [12] มีความใกล้เคียงกันมาก จึงไม่ง่ายในการแยกแยะความแตกต่างระหว่าง compound ทั้งสองโดยอาศัยเฉพาะรูปแบบการแตกตัว อย่างไรก็ตามพบว่าค่า relative ion signal intensity ของ daughter ion ที่ได้รับมีความแตกต่างกันเมื่อใช้ค่า collision energy ที่แตกต่างกัน ดังนั้นความแตกต่างระหว่างค่า relative ion signal intensity ของไอออน P2, P4, P5, P6, P16, P20, PR1, PR4, PR6 และ PR12 จึงสามารถนำมาใช้ได้เป็นอย่างดีสำหรับการแยกแยะความแตกต่างระหว่าง compounds ทั้งสอง นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในการแยกชนิดของ flavonol ออกจาก flavones และ flavanone ซึ่งได้วิจารณ์ไว้ก่อนหน้านี้ได้

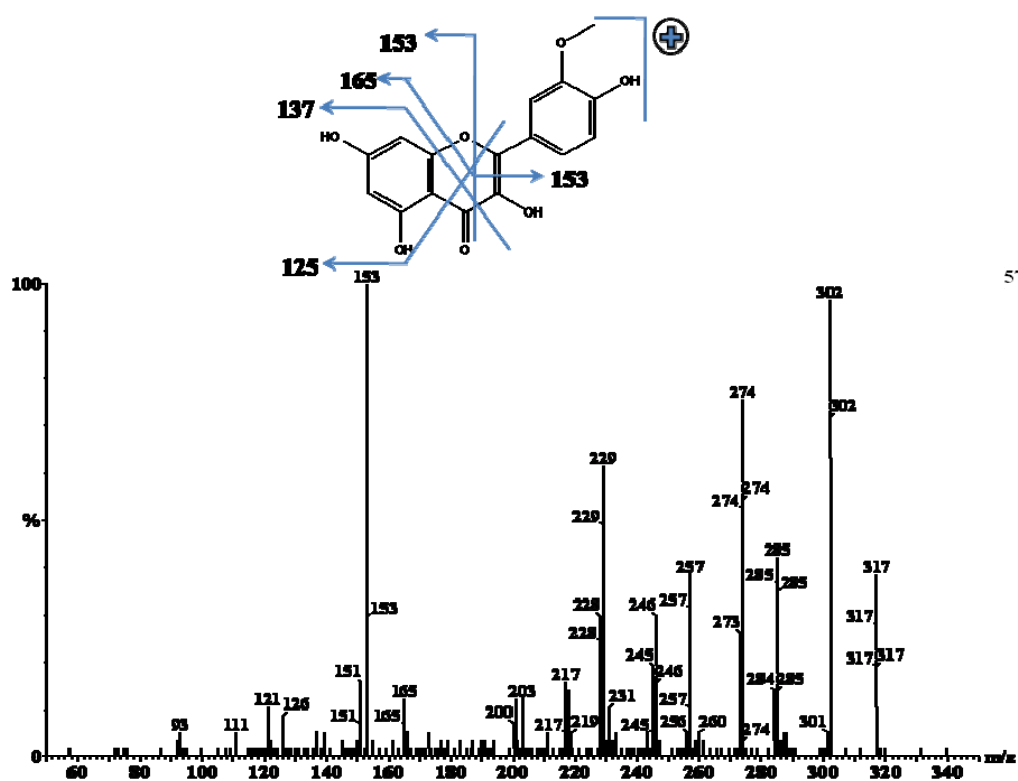
นอกจากนี้การเปรียบเทียบระหว่าง compound [10] กับ [11] ซึ่งเป็น structural isomers กับพบว่า มีรูปแบบการแตกตัวที่คล้ายกัน อย่างไรก็ตามค่า relative ion signal intensity ของไอออนสำคัญก็มีความแตกต่างกันอย่างมากเช่นกัน จึงเป็นผลให้สามารถแยกแยะความแตกต่างของสารทั้งสองได้ โดยไอออนดังกล่าวได้แก่ P2, P4, P16, P20, PR1, PR4, PR6 และ PR12 เช่นเดียวกันกับการเปรียบเทียบ compound [10] กับ [12] ซึ่งสามารถบอกถึงอิทธิพลของหมู่แทนที่ hydroxy ณ ตำแหน่ง C5 ของ A-ring ได้ โดยพบว่า สารทั้งสองมีรูปแบบการแตกตัวที่คล้ายกันอย่างมาก รวมไปถึงค่า relative ion signal intensity ซึ่งก็มีความคล้ายคลึงกันอยู่มาก ต้องพิจารณาอย่างละเอียดจึงจะพบว่าบางไอออนยังให้ค่า relative ion signal intensity ที่แตกต่างกัน อันได้แก่ P2, P4, P6, P7, P16, P19, P20, PR4, PR6 และ PR12 ซึ่งจากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า จำนวนของหมู่แทนที่ใน B-ring มีอิทธิพลต่อรูปแบบการแตกตัวและค่า relative ion signal intensity ของ daughter ion มากกว่าการแทนที่ของหมู่ hydroxyl group ที่ตำแหน่ง C5 ของ A-ring



รูป 4.20 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ [13] myricetin; 3,5,7,3',4',5'-hexahydroxyflavone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ positive ion mode

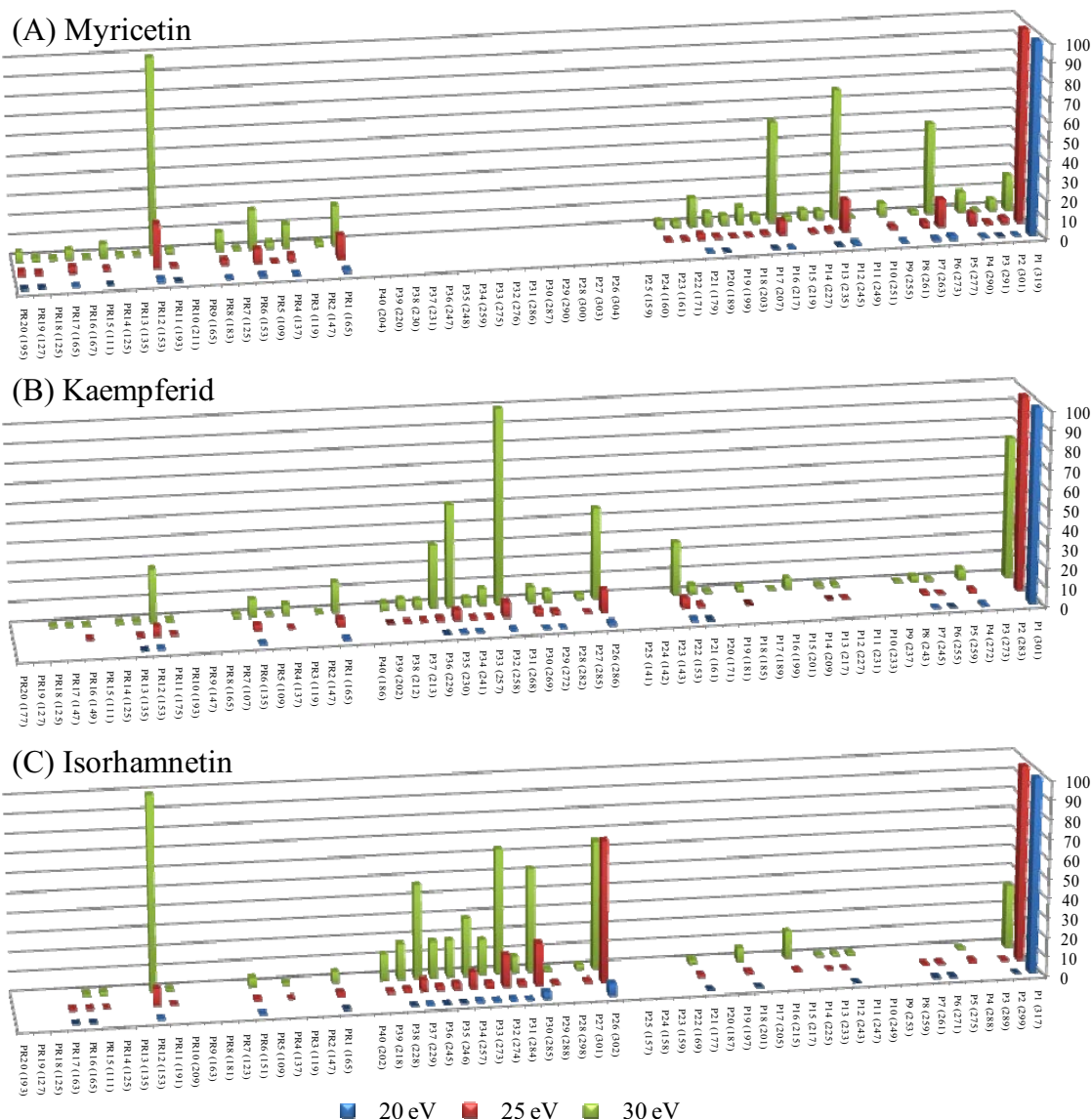


รูป 4.21 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ [14] kaempferid; 3,5,7-trihydroxy-4'-methoxyflavone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ positive ion mode



57

รูป 4.22 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ [15] isorhamnetin; 3,5,7, 4'-tetrahydroxy-3'-methoxyflavone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ positive ion mode



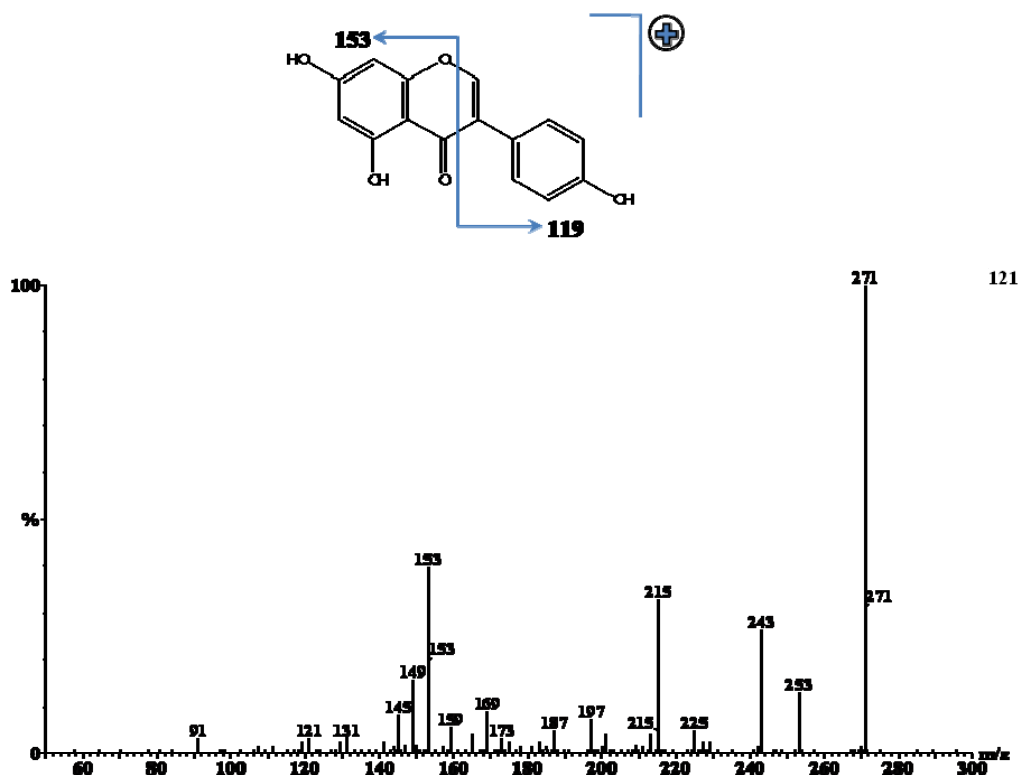
รูป 4.23 ค่า relative ion signal intensity ของไอออนที่พบใน MS/MS spectra จากการวิเคราะห์ด้วย collision energy 20, 25 และ 30 eV ของ [13] myricetin; 3,5,7, 3',4',5'-hexahydroxyflavone, [14] kaempferid; 3,5,7,-trihydroxy-4'-methoxyflavone และ [15] isorhamnetin; 3,5,7, 4'-tetrahydroxy-3'-methoxyflavone ด้วยเทคนิค ESI-MS/MS แบบ positive ion mode

จากกราฟแสดงค่า relative ion signal intensity ของไอออนที่พบใน MS/MS spectra จากการวิเคราะห์ด้วย collision energy 20, 25 และ 30 eV ของ [13] myricetin; 3,5,7, 3',4',5'-hexahydroxyflavone, [14] kaempferid; 3,5,7,-trihydroxy-4'-methoxyflavone และ [15] isorhamnetin; 3,5,7, 4'-tetrahydroxy-3'-methoxyflavone ด้วยเทคนิค ESI-MS/MS แบบ positive ion mode พบว่า compound [13] มีรูปแบบการแตกตัวเหมือน compound [12] อย่างไรก็ตามค่า relative ion signal intensity ของ $[M+H]^+$ และ daughter ion มีความแตกต่างกันอย่างมาก โดยค่า relative ion signal intensity ของ $[M+H]^+$ ของ compound [13] มีค่าลดลงเมื่อเทียบกับ compound

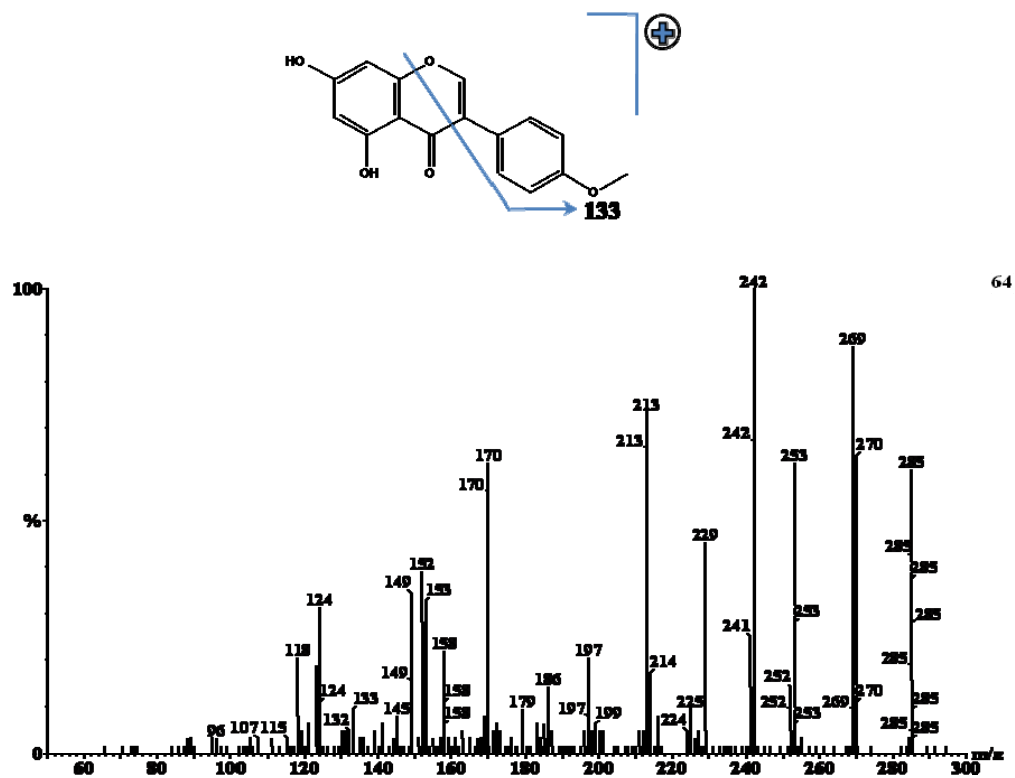
[12] ที่ collision energy 30 eV คือ 18 และ 60% ตามลำดับ เช่นเดียวกับไอออน P12 ที่ลดลงจาก base peak (100%) สำหรับ compound [12] เป็น 64% สำหรับ compound [13] อย่างไรก็ตามพบว่า daughter ion ที่เกิดจาก C-ring cleavage คือ PR12 มีค่า relative ion signal intensity เพิ่มขึ้นสำหรับ compound [13] เมื่อเทียบกับ compound [12]

นอกจากนี้ methoxylated compound ของสารกลุ่ม flavonol สามารถแตกตัวให้ product ion ที่เกี่ยวข้องกับทั้ง neutral losses และ C-ring cleavage โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การแตกตัวที่เกี่ยวข้องกับ radical loss ซึ่งเป็น characteristic สำหรับ methoxylated compound สามารถพบได้ง่ายและเป็นไอออนที่สำคัญและเด่นสำหรับ methoxylated flavonol ซึ่งสามารถแยกแยะความแตกต่างของสารกลุ่มนี้ออกจาก compound อื่น ๆ ในกลุ่ม flavonol ได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ ผลจากการ vary ค่า collision energy ทำให้ทราบรูปแบบการแตกตัวที่สามารถนำมาแยกแยะภายในกลุ่ม methoxylated flavonol เอง นั่นคือ จากการเปรียบเทียบ compound [14] กับ [15] พบว่า ที่ collision energy ค่า relative ion signal intensity ของ $[M+H]^+$ ของ compound [14] คือ 70% มีค่าสูงกว่าอย่างมากเมื่อเทียบกับ compound [15] ซึ่งมีค่าเพียง 30% นั่นคือ ที่ค่า collision energy เท่ากัน $[M+H]^+$ ของ compound [15] สามารถแตกตัวได้ง่ายกว่า compound [14] เนื่องจากอิทธิพลของจำนวนหมู่ hydroxyl ใน B-ring มีการทำให้พบ daughter ion ที่เกี่ยวข้องกับ radical losses ทุกตัว ยกเว้น P28 และ P40 นอกจากนี้ยังพบว่า PR12 เป็น base peak สำหรับ compound [15] ขณะที่ P32 เป็น base peak สำหรับ compound [14] ที่ collision energy เดียวกัน คือ 30 eV

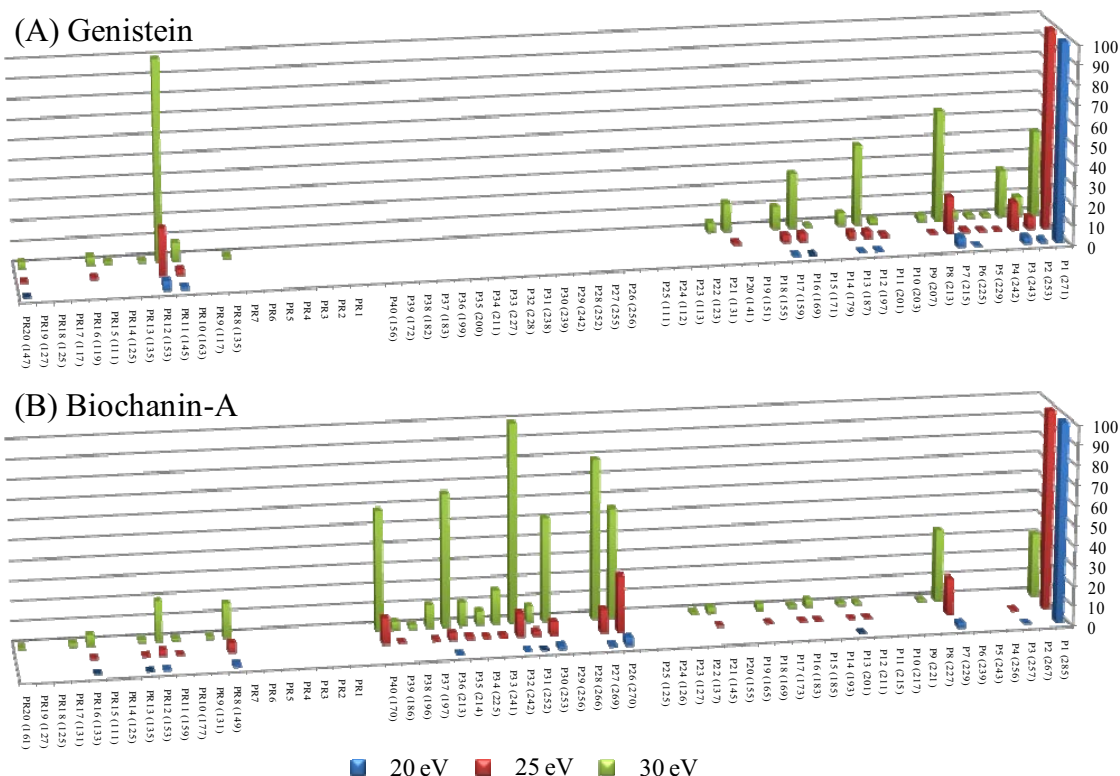
จากพฤติกรรมดังกล่าวจึงสามารถสรุปได้ว่า การแยกแยะระหว่าง methoxylated flavonol ทั้งสองดังกล่าว สามารถทำได้จากการเปรียบเทียบค่า relative ion signal intensity ของ $[M+H]^+$, P26, P30, P32, P34, P35, PR1 และ PR12



รูป 4.24 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ [16] genistein; 5,7,4'-trihydroxyisoflavone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ positive ion mode



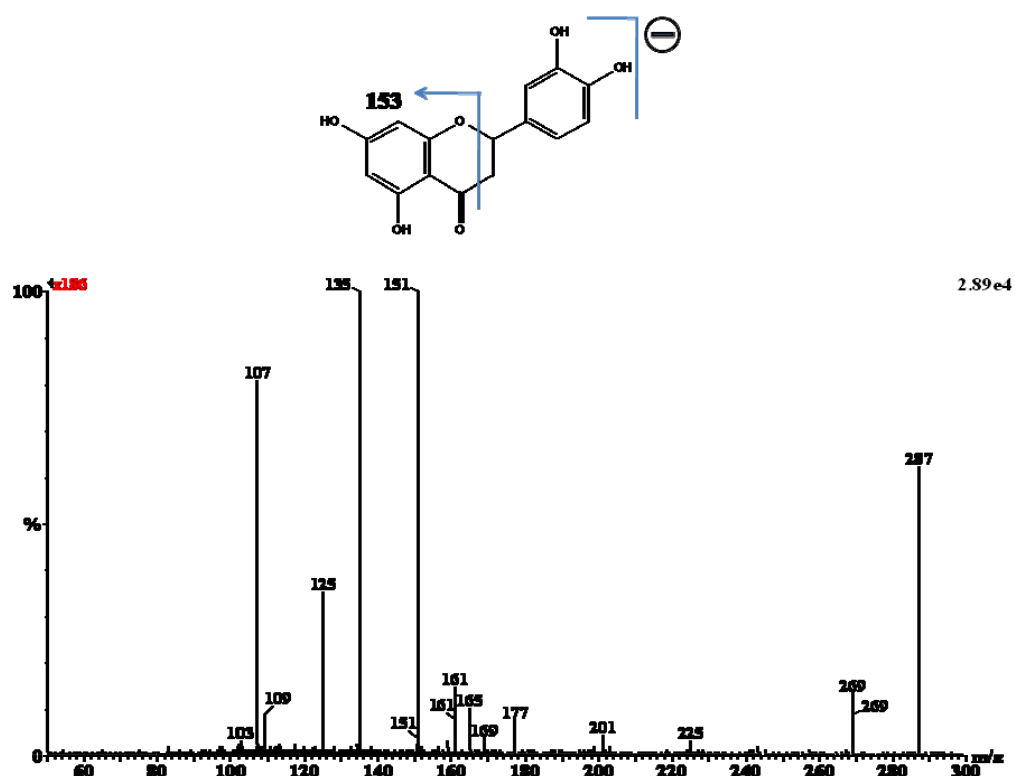
รูป 4.25 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ [17] 5,7-dihydroxy-4'-methoxyisoflavone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ positive ion mode



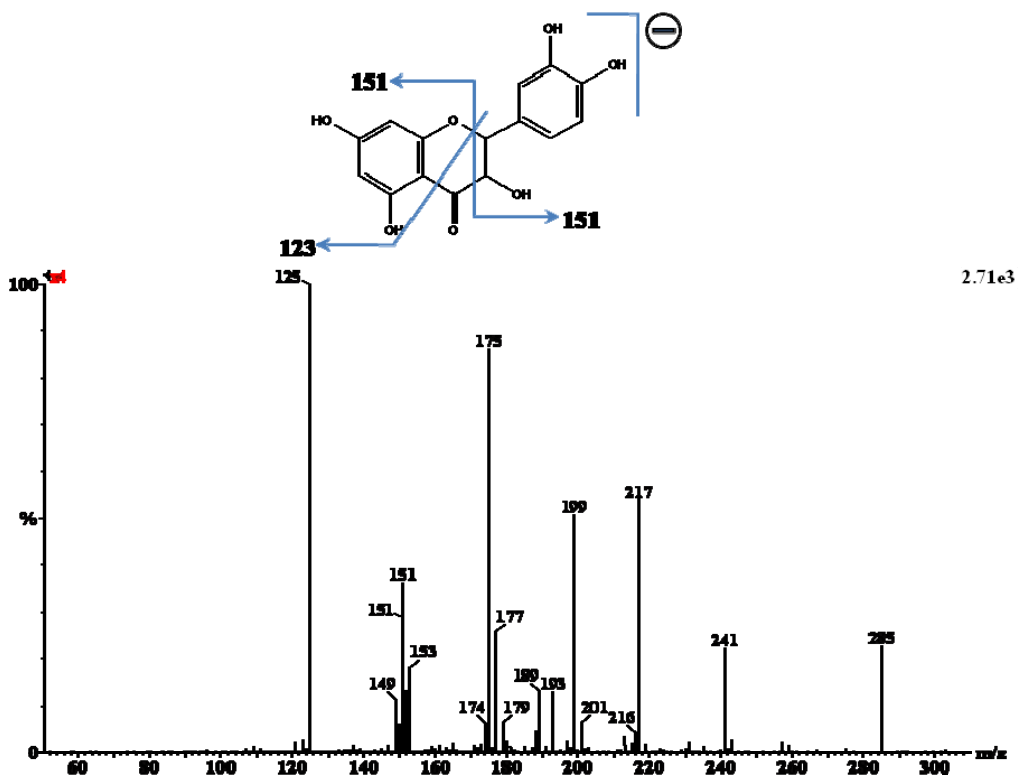
รูป 4.26 ค่า relative ion signal intensity ของไอออนที่พบใน MS/MS spectra จากการวิเคราะห์ด้วย collision energy 20, 25 และ 30 eV ของ [16] genistein; 5,7,4'-trihydroxyisoflavone และ [17] 5,7-dihydroxy-4'-methoxyisoflavone ด้วยเทคนิค ESI-MS/MS แบบ positive ion mode

จากกราฟแสดงค่า relative ion signal intensity ของไอออนที่พบใน MS/MS spectra จากการวิเคราะห์ด้วย collision energy 20, 25 และ 30 eV ของ [16] genistein; 5,7,4'-trihydroxyisoflavone และ [17] 5,7-dihydroxy-4'-methoxyisoflavone ด้วยเทคนิค ESI-MS/MS แบบ positive ion mode เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง compound [16] นี้กับ compound [4] (รูป 4.11(A)) ซึ่งสารทั้งสองเป็น structural isomer กัน โดยพบความแตกต่างกันอย่างมากของค่า relative ion signal intensity และ daughter ion ซึ่งส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับ neutral and radical losses โดยค่า relative ion signal intensity ของ $[M+H]^+$ มีค่าลดลงสำหรับ compound [16] คือ 40% เมื่อเทียบกับ compound [4] เป็น base peak ในขณะที่ไอออน P2, P3, P6, P12, P16, P20 สำหรับ compound [16] มีค่า relative ion signal intensity ที่สูงกว่าอย่างมากเมื่อเทียบกับ compound [4] ทั้งนี้ไอออน PR12 เป็น base peak สำหรับ compound [16] ที่ collision energy 30 eV

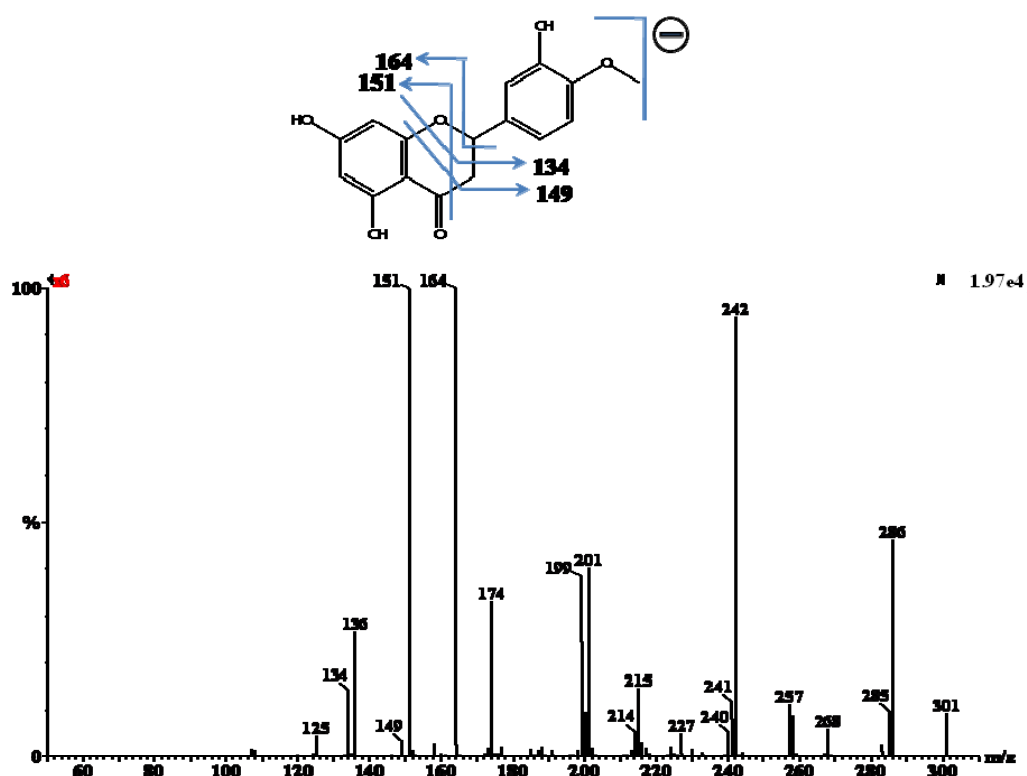
ทำนองเดียวกันกับ methxylated flavonol สำหรับ methxylated isoflavone นั่นคือ พบ $[M+H]^+$ เป็น base peak ที่ collision energy 20 และ 25 eV จากนั้นเมื่อค่า collision energy เพิ่มขึ้นเป็น 30 eV ไอออน $[M+H]^+$ มีค่า relative ion signal intensity ลดลง โดยพบ daughter ion ที่เกิดจาก radical losses เพิ่มขึ้นและเป็นไอออนที่สำคัญ ในจำนวนไอออนเหล่านี้ ไอออน P32 เป็น base peak สำหรับ compound [17] นี้ ที่ collision energy 30 eV



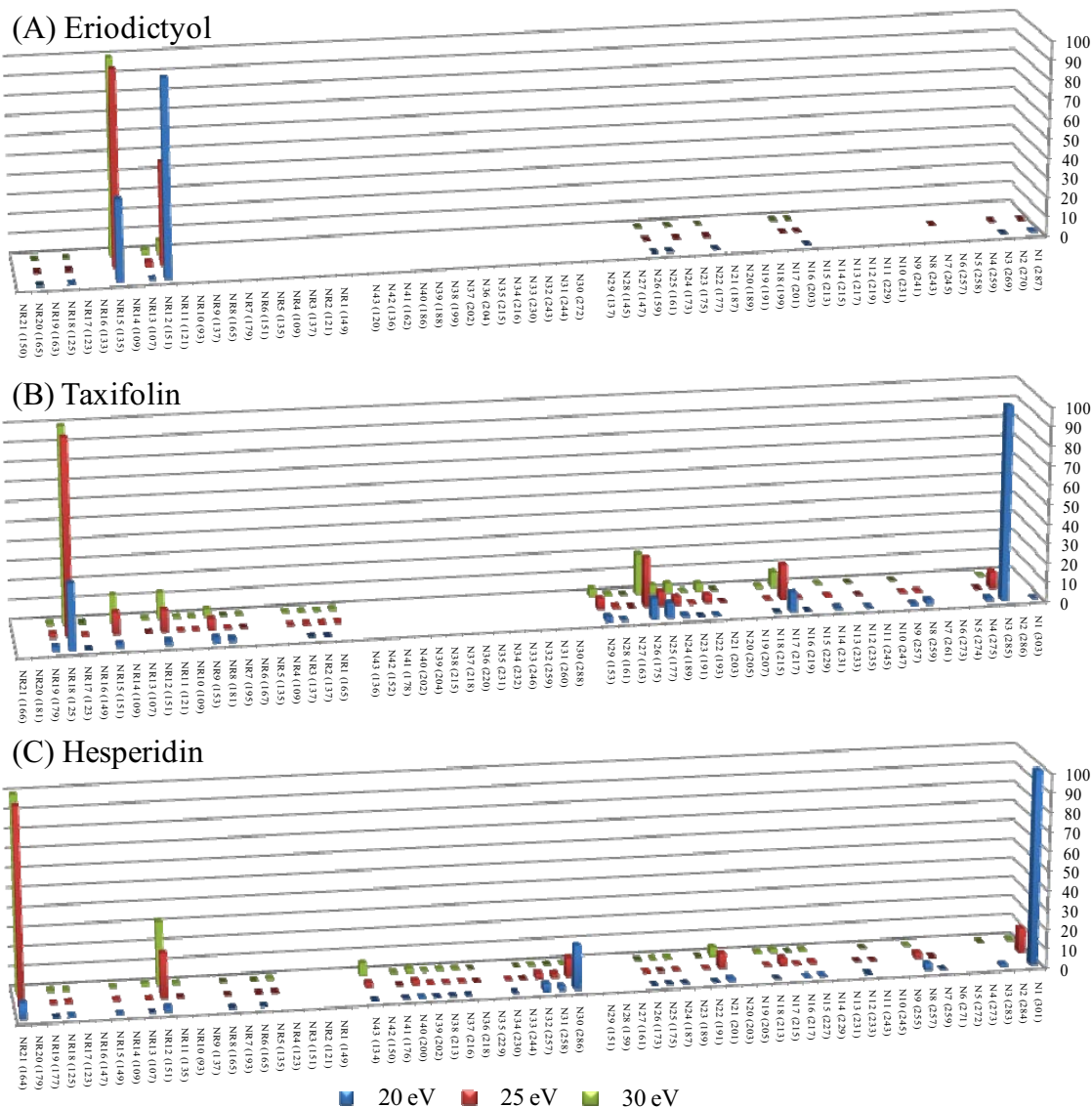
รูป 4.27 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ [1] eriodictyol; 5,7,3',4'-tetrahydroxyflavanone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ negative ion mode



รูป 4.28 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ 3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavanone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ negative ion mode



รูป 4.29 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ 4'-methoxy-5,7,3'-trihydroxyflavanone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ negative ion mode



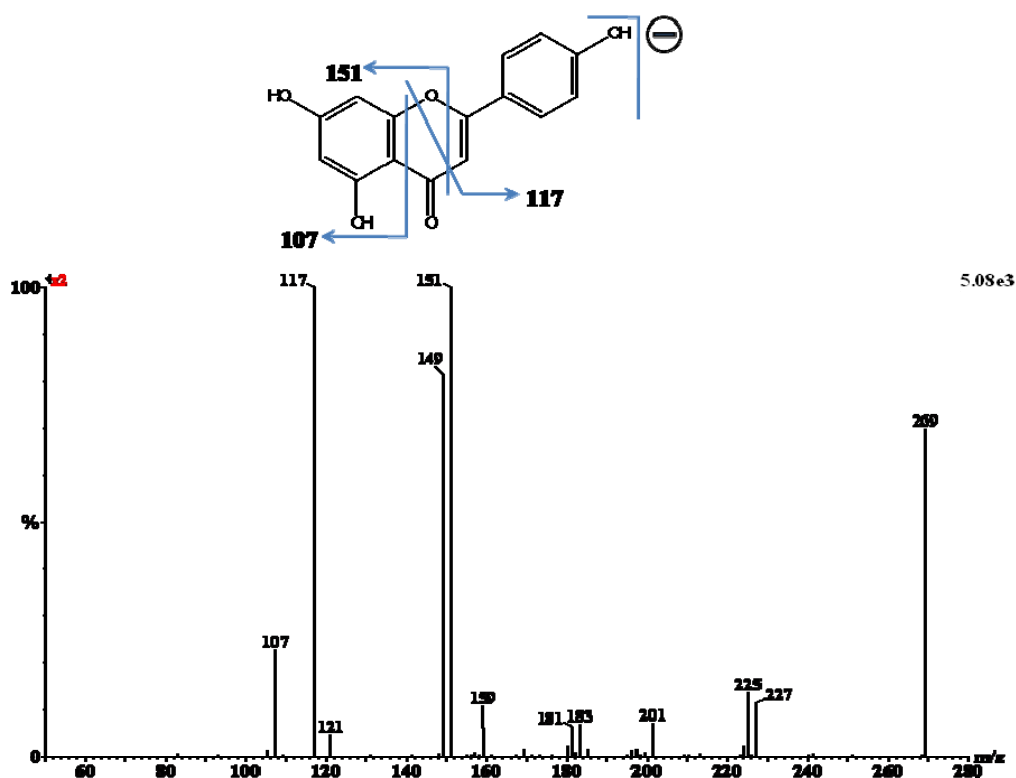
รูป 4.30 ค่า relative ion signal intensity ของไอออนที่พบใน MS/MS spectra จากการวิเคราะห์ด้วย collision energy 20, 25 และ 30 eV ของ [1] eriodictyol; 5,7,3',4'-tetrahydroxyflavanone, [2] taxifolin; 3,5,7, 3',4'-pentahydroxyflavanone และ [3] 5,7,3'-trihydroxy-4'-methoxyflavanone ด้วยเทคนิค ESI-MS/MS แบบ negative ion mode

จากกราฟแสดงค่า relative ion signal intensity ของไอออนที่พบใน MS/MS spectra จากการวิเคราะห์ด้วย collision energy 20, 25 และ 30 eV ของ [1] eriodictyol; 5,7,3',4'-tetrahydroxyflavanone, [2] taxifolin; 3,5,7, 3',4'-pentahydroxyflavanone และ [3] 5,7,3'-trihydroxy-4'-methoxyflavanone ด้วยเทคนิค ESI-MS/MS แบบ negative ion mode พบว่า compound [1] มีไอออนสำคัญเพียง 2 ไอออน คือ NR12 และ NR 15 ซึ่งเกี่ยวข้องกับ C-ring cleavage โดยไอออน NR12 เป็น base peak ที่ collision energy 20 eV ขณะที่ไอออน NR15 เป็น base peak เมื่อค่า collision energy เพิ่มขึ้นเป็น 25 และ 30 eV อย่างไรก็ตามพบ daughter ion ที่เกิดจาก neutral and radical losses เพิ่มมากขึ้นใน compound [2] ซึ่งมีหมู่แทนที่ hydroxy เพิ่มขึ้น

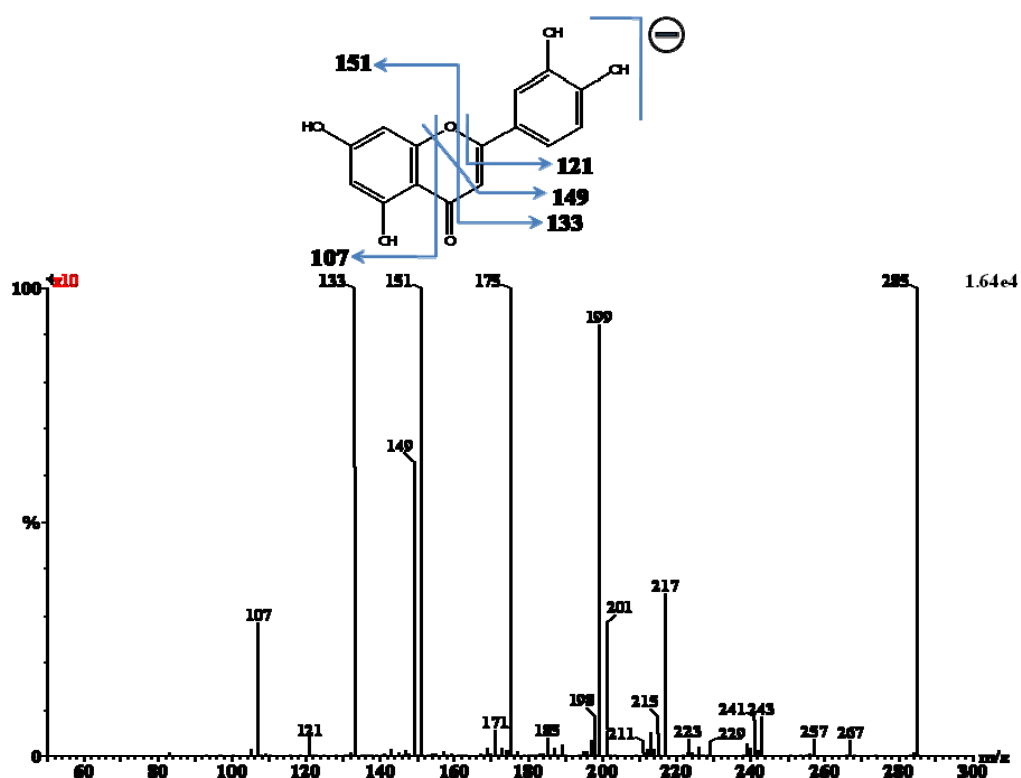
มาในตำแหน่ง C3 ของ C-ring ทำให้รูปแบบการแตกตัวแตกต่างไปอย่างมาก ซึ่งรวมไปถึงไอออนที่สำคัญและเป็น base peak โดยที่ collision energy 20 eV พบว่ามี N3 เป็น base peak ขณะที่เมื่อค่า collision energy เพิ่มมากขึ้นเป็น 25 และ 30 eV ไอออน NR18 เป็น base peak อย่างไรก็ตาม ไอออน NR12 และ NR15 ก็ยังคงพบได้เช่นกัน นอกจากนี้ยังพบไอออนที่สำคัญอื่น ๆ เช่น N17, N25 และ N26

จากการเปรียบเทียบระหว่าง compound [3] กับ [1] ทำให้ทราบถึงอิทธิพลของหมู่ methoxy ต่อรูปแบบการแตกตัวของ flavonol ซึ่งพบว่า ถ้าหากมีหมู่ methoxy ภายในโมเลกุล จะทำให้พบ daughter ion มากขึ้น ในจำนวนนี้คือ N30 ซึ่งเกิดจากการสูญเสีย $\bullet\text{CH}_3$ ออกไปจากโมเลกุล นอกจากนี้ไอออน N12 และ N15 ก็ยังคงพบได้อยู่ อย่างไรก็ตาม compound [3] นี้มีการแตกตัวให้ไอออนที่เป็น characteristic ion นั่นคือ PR21 ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสูญเสีย $\bullet\text{CH}_3$ ออกไปจากโมเลกุลก่อน ก่อนที่จะเกิดการ cleavage ของ C-ring ตามมา ซึ่งใช้ในการระบุ methoxylated flavanone ได้เป็นอย่างดี

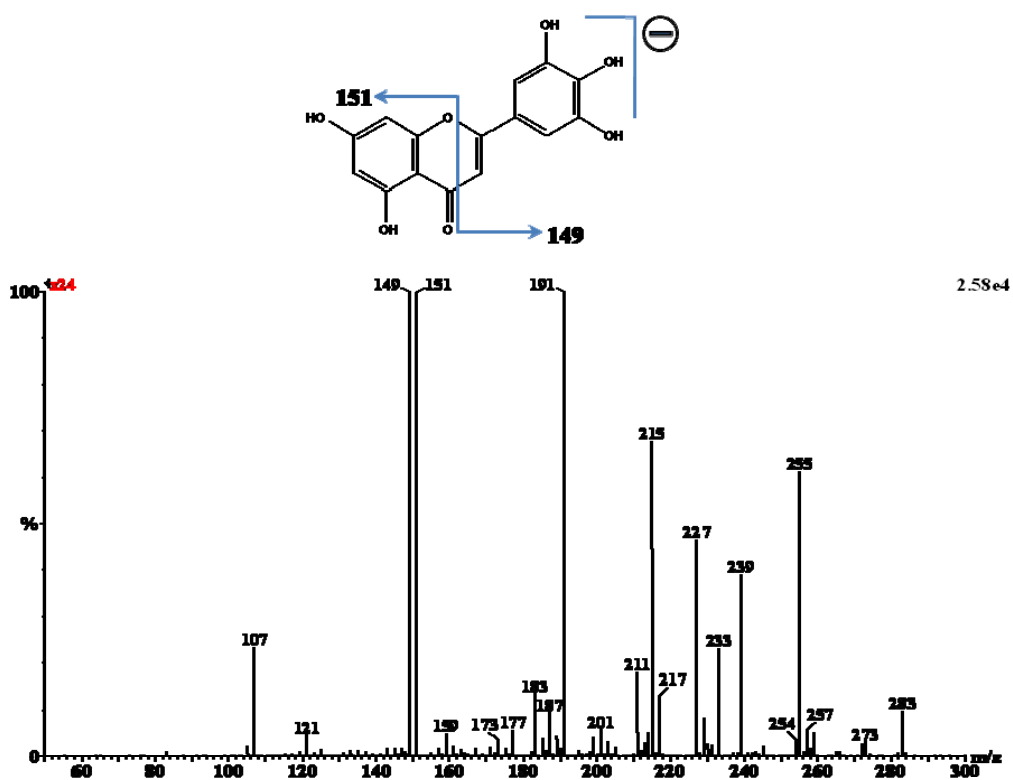
จากพฤติกรรมการแตกตัวดังกล่าวข้างต้นแสดงให้เห็นว่า การแยกแยะความแตกต่างระหว่าง flavanone ทั้ง 3 ทำได้ง่ายโดยการใช้ไอออนที่เกิดจาก C-ring cleavage ซึ่งทั้งมีความแตกต่างกันอย่างมากในแง่ของ รูปแบบการแตกตัวและค่า relative ion signal intensity ของไอออนเหล่านั้น



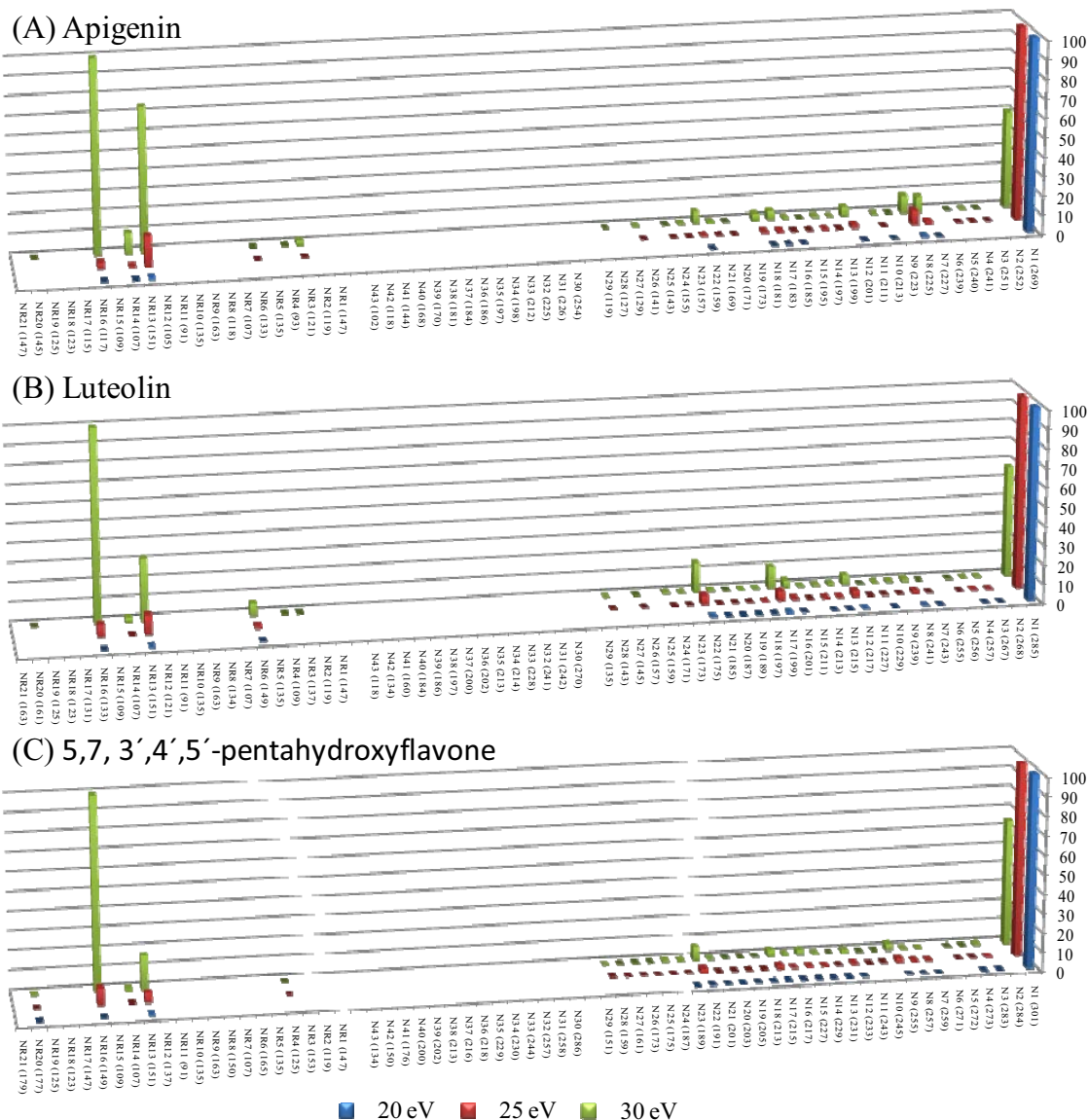
รูป 4.31 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ 5,7,4'-trihydroxyflavone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ negative ion mode



รูป 4.32 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ 5,7,3',4'-tetrahydroxyflavone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ negative ion mode



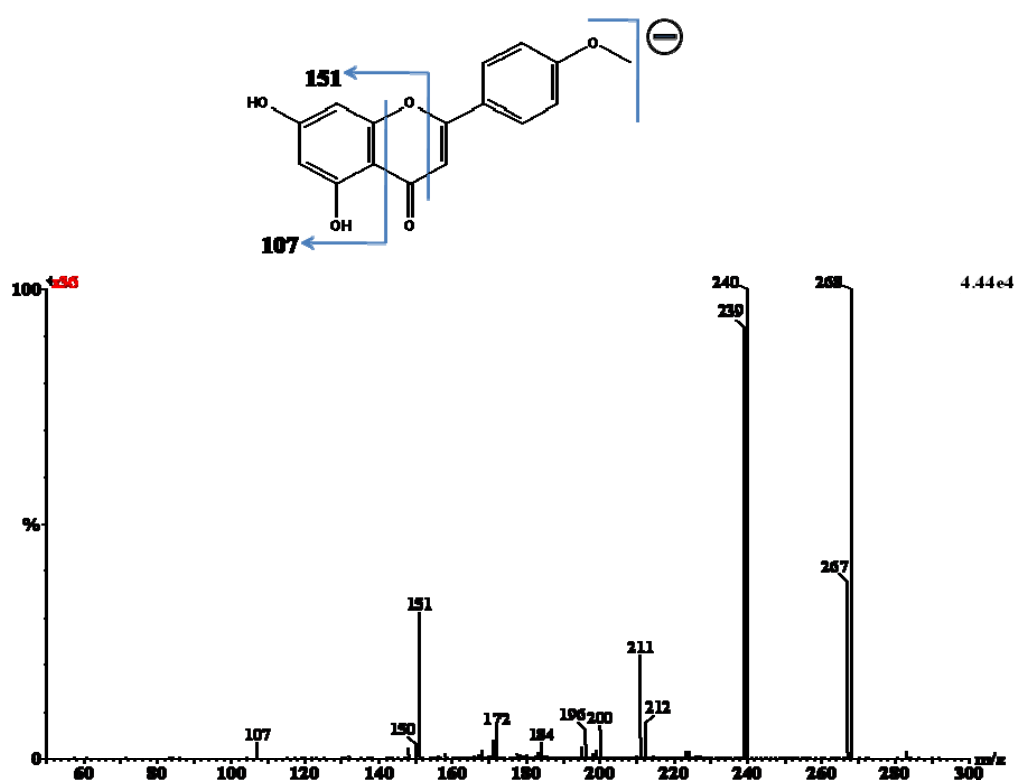
รูป 4.33 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ 5,7,3',4',5'-pentahydroxyflavone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ negative ion mode



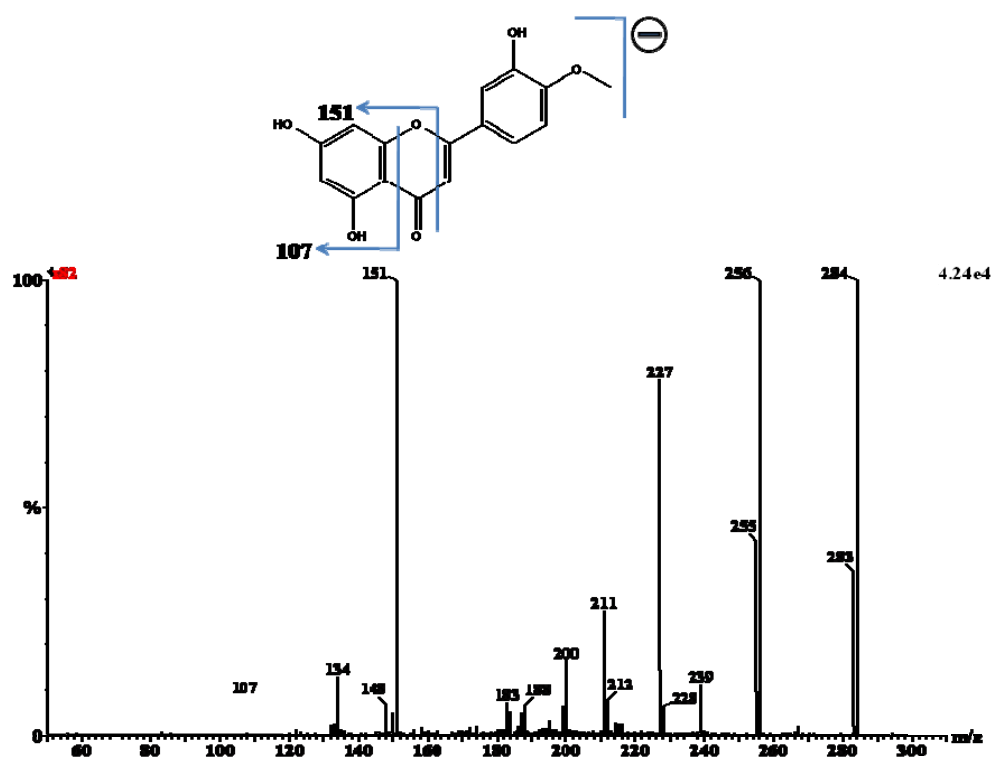
รูป 4.34 ค่า relative ion signal intensity ของไอออนที่พบใน MS/MS spectra จากการวิเคราะห์ด้วย collision energy 20, 25 และ 30 eV ของ [4] apigenin; 5,7,4'-trihydroxyflavone, [5] luteolin; 5,7,3',4'-tetrahydroxyflavone และ [6] 5,7, 3',4',5'-pentahydroxyflavone ด้วยเทคนิค ESI-MS/MS แบบ negative ion mode

จากกราฟแสดงค่า relative ion signal intensity ของไอออนที่พบใน MS/MS spectra จากการวิเคราะห์ด้วย collision energy 20, 25 และ 30 eV ของ [4] apigenin; 5,7,4'-trihydroxyflavone, [5] luteolin; 5,7,3',4'-tetrahydroxyflavone และ [6] 5,7, 3',4',5'-pentahydroxyflavone ด้วยเทคนิค ESI-MS/MS แบบ negative ion mode พบว่า flavone ทั้ง 3 มีรูปแบบการแตกตัวที่คล้ายกัน ทั้งการแตกตัวที่เกี่ยวข้องกับ neutral and radical losses และ C-ring cleavage รวมไปถึง ไอออนที่เป็น base peak ซึ่งพบว่าที่ collision energy 20 และ 25 eV ไอออน $[M-H]^-$ เป็น base peak และเมื่อค่า collision energy เพิ่มขึ้นไอออน NR16 ก็เป็น base peak

สำหรับ flavones ทั้ง 3 ดังนั้นการแยกแยะความแตกต่างระหว่าง flavones ทั้ง 3 ดังกล่าวจึงสามารถทำได้โดยการเปรียบเทียบค่า relative ion signal intensity ของไอออนที่สำคัญเท่านั้น ซึ่งพบว่าค่า relative ion signal intensity ของ NR13 มีความแตกต่างกันอย่างมาก โดยมีค่าเท่ากับ 72, 30 และ 15% สำหรับ compound [4], [5] และ [6] ตามลำดับ กล่าวคือมีค่าลดลงประมาณ 2 เท่า เมื่อจำนวนหมู่ hydroxyl ใน B-ring เพิ่มขึ้น 1 หมู่ นอกจากนี้ยังมีไอออนอื่น ๆ ที่นำมาช่วยในการยืนยันได้แต่อย่างไรก็ตามถือว่าเป็นไอออนที่มีสัญญาณค่อนข้างต่ำ นั่นคือ N7, N8, N12, N17 และ N22 เป็นต้น

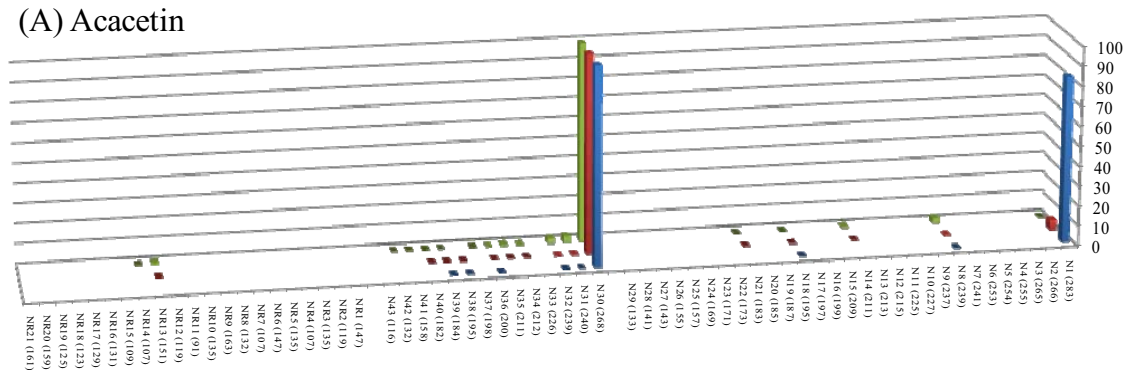


รูป 4.35 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ [7] 4'-methoxy-5,7-dihydroxyflavone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ negative ion mode

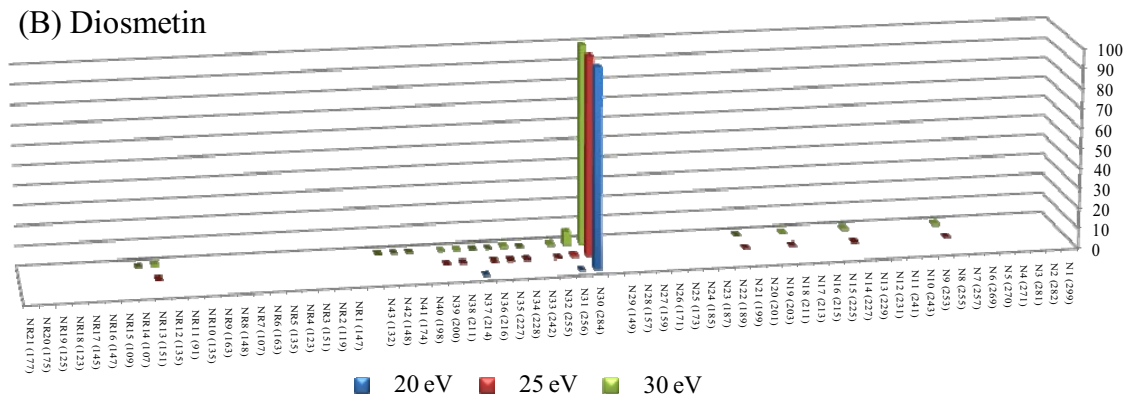


รูป 4.36 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ [8] 4'-methoxy-5,7,3'-trihydroxyflavone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ negative ion mode

(A) Acacetin

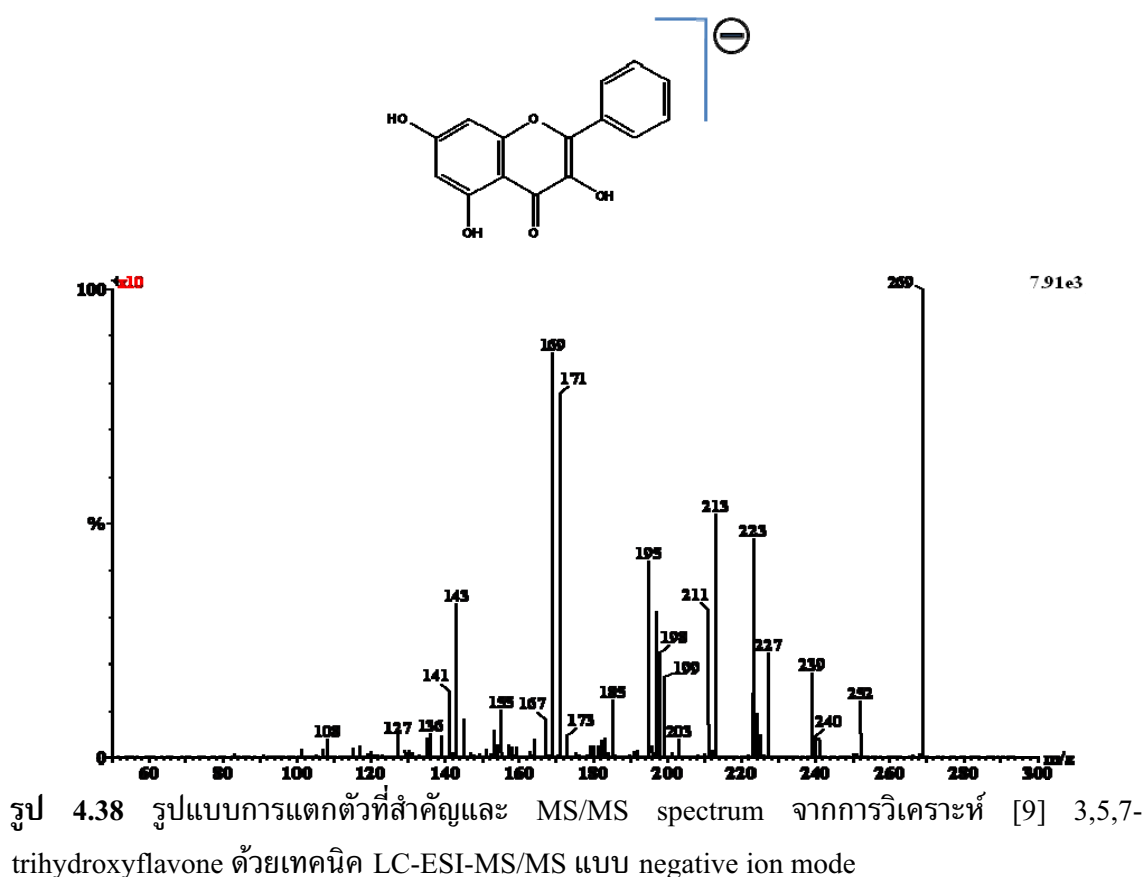


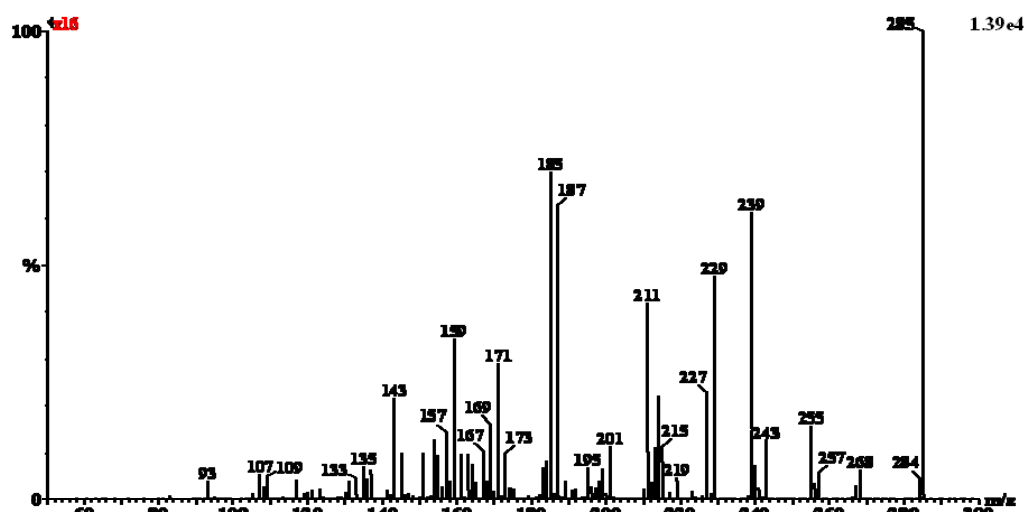
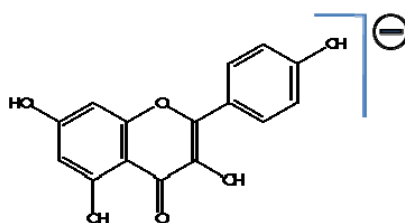
(B) Diosmetin



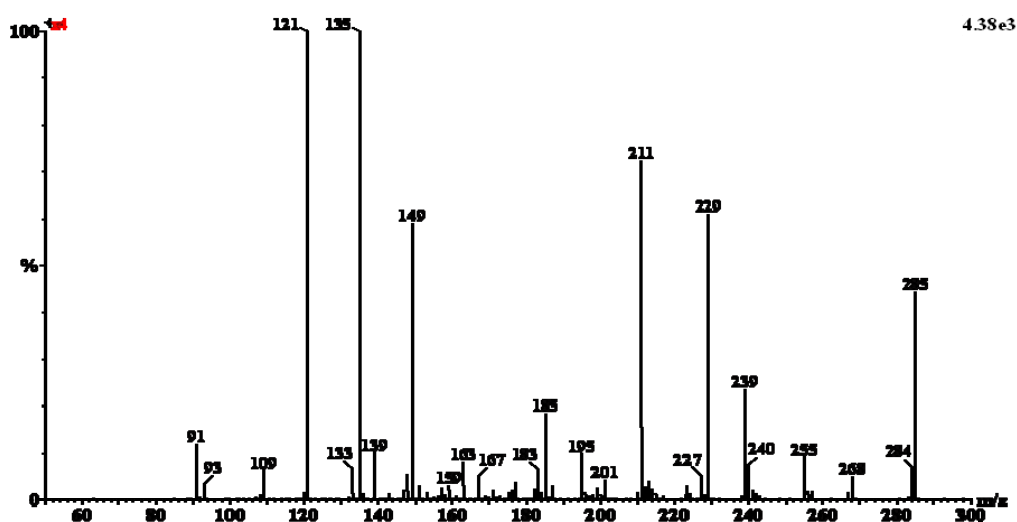
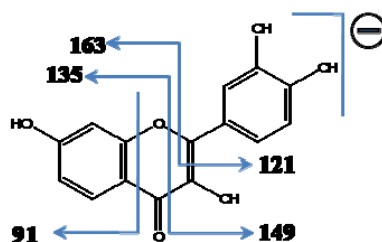
รูป 4.37 ค่า relative ion signal intensity ของไอออนที่พบใน MS/MS spectra จากการวิเคราะห์ด้วย collision energy 20, 25 และ 30 eV ของ [7] acacetin; 4'-methoxy-5,7-dihydroxyflavone และ [8] 4'-methoxy-5,7,3'-trihydroxyflavone ด้วยเทคนิค ESI-MS/MS แบบ negative ion mode

จากกราฟแสดงค่า relative ion signal intensity ของไอออนที่พบใน MS/MS spectra จากการวิเคราะห์ด้วย collision energy 20, 25 และ 30 eV ของ [7] acacetin; 4'-methoxy-5,7-dihydroxyflavone และ [8] 4'-methoxy-5,7,3'-trihydroxyflavone ด้วยเทคนิค ESI-MS/MS แบบ negative ion mode พบว่า methoxylated flavones ทั้ง 2 มีรูปแบบการแตกตัวที่เหมือนกัน อย่างไรก็ตามรูปแบบการแตกตัวดังกล่าวทำให้สามารถแยกแยะสารกลุ่มนี้ออกจาก methoxylated flavonoid กลุ่มอื่น โดยจะพบว่า methoxylated flavones จะแตกตัวให้ไอออน N30 เป็น base peak ที่ทุก collision energy ที่ใช้ซึ่งอยู่ระหว่าง 20 ถึง 30 eV อย่างไรก็ตามก็พบว่าระหว่าง compound [7] สามารถพบ [M-H]⁻ ที่ระดับค่า relative ion signal intensity เท่ากับ 80% เมื่อใช้ collision energy เท่ากับ 20 eV จากนั้นจะลดลงอย่างมากหาเพิ่มค่า collision energy เป็น 25 และ 30 eV ตามลำดับ โดยพบว่าค่า relative ion signal intensity ลดลงเหลือเพียง 3 และ 1% ตามลำดับ อย่างไรก็ตามด้วยพฤติกรรมดังกล่าวสามารถทำให้แยกแยะความแตกต่างระหว่าง compound [7] กับ [8] ได้

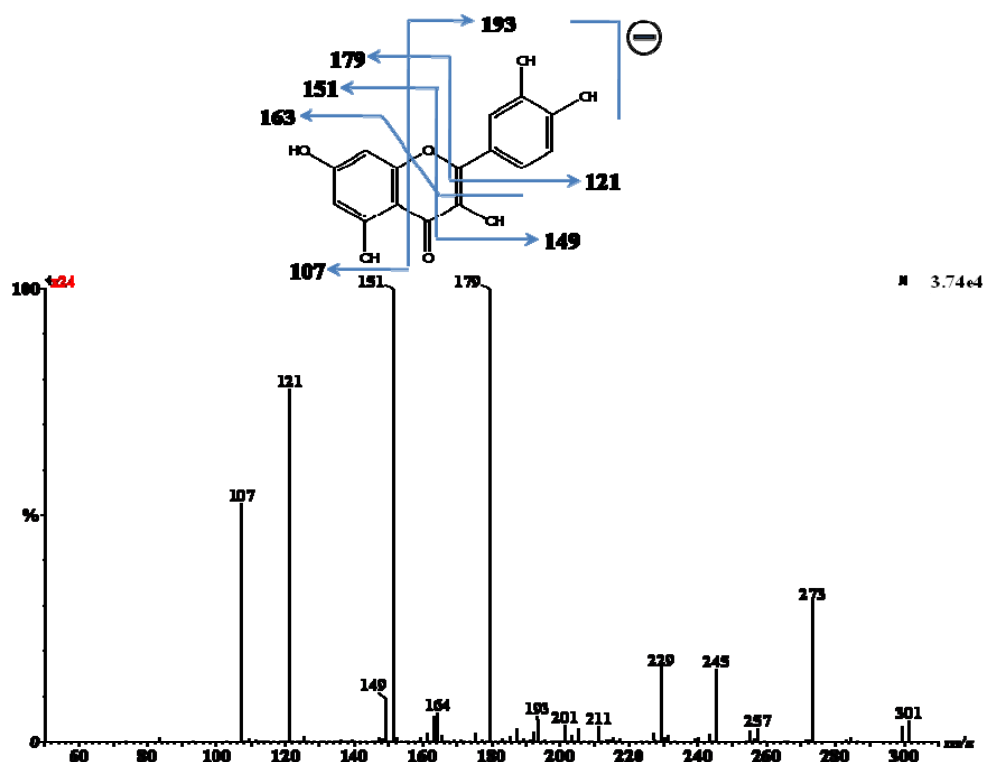




รูป 4.39 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ [10] 3,5,7,4'-tetrahydroxyflavone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ negative ion mode

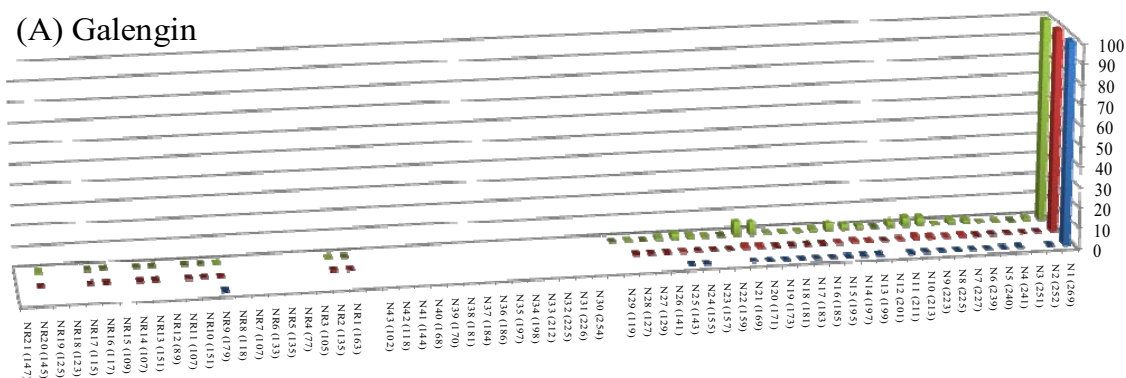


รูป 4.40 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ [11] 3,7,3',4'-tetrahydroxyflavone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ negative ion mode

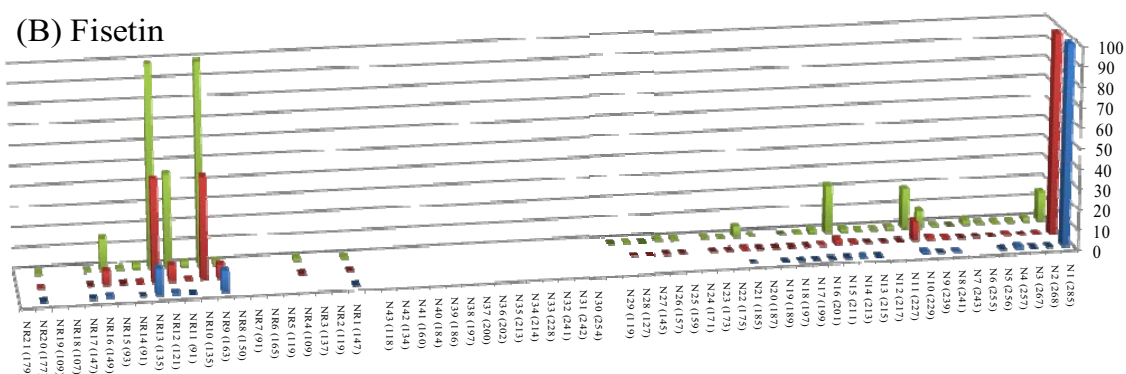


รูป 4.41 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ [12] 3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ negative ion mode

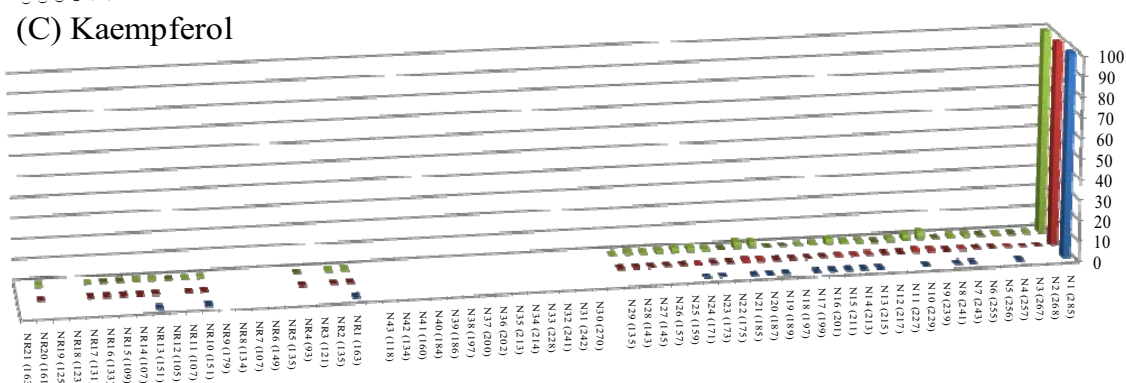
(A) Galengin



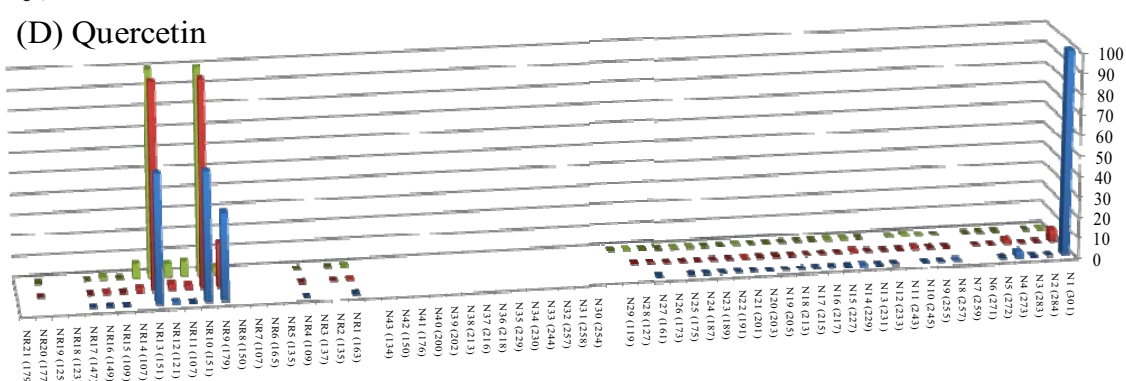
(B) Fisetin



(C) Kaempferol



(D) Quercetin



■ 20 eV ■ 25 eV ■ 30 eV

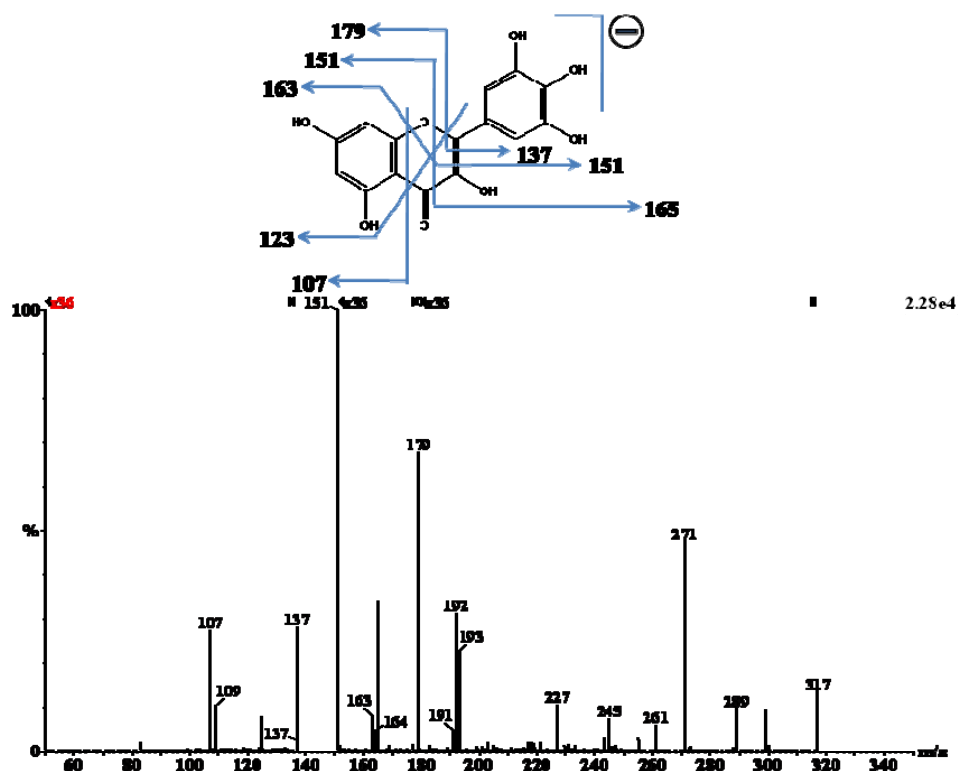
รูป 4.42 ค่า relative ion signal intensity ของไอออนที่พบใน MS/MS spectra จากการวิเคราะห์ด้วย collision energy 20, 25 และ 30 eV ของ [9] galengin; 3,5,7-trihydroxyflavone, [10] fisetin; 3,7,3',4'-tetrahydroxyflavone, [11] kaempferol; 3,5,7,4'-tetrahydroxyflavone และ [12] quercetin; 3,5,7, 3',4'-pentahydroxyflavone เทคนิค ESI-MS/MS แบบ negative ion mode

จากกราฟแสดงค่า relative ion signal intensity ของไอออนที่พบใน MS/MS spectra จากการวิเคราะห์ด้วย collision energy 20, 25 และ 30 eV ของ [9] galengin; 3,5,7-trihydroxyflavone, [10] fisetin; 3,7,3',4'-tetrahydroxyflavone, [11] kaempferol; 3,5,7,4'-tetrahydroxyflavone และ [12] quercetin; 3,5,7, 3',4'-pentahydroxyflavone เทคนิค ESI-MS/MS แบบ negative ion mode พบว่า เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง compound [9], [11] และ [12] จะทำให้ทราบอิทธิพลของจำนวนหมู่แทนที่ hydroxyl ภายใน B-ring ต่อรูปแบบการแตกตัวของ flavonol ซึ่งพบว่า compound ทั้ง 3 มีการแตกตัวให้ daughter ion จำนวนมากแต่ค่า relative ion signal intensity อยู่ในระดับต่ำ โดยสำหรับ compound [9] กับ [11] มีรูปแบบการแตกตัวที่คล้ายคลึงกันมาก สามารถพบ daughter ion ที่เกิดจาก C-ring cleavage ได้เช่นกัน โดยจำนวนนี้พบว่า NR9, NR10 และ NR11 เป็น characteristic ion ของสารกลุ่ม flavonol นอกจากนี้พบว่าที่ทุก ๆ ค่าของ collision energy ไอออน ของสารทั้งสอง อย่างไรก็ตามก็สามารถแยกแยะความแตกต่างระหว่าง compound ทั้งสองได้ โดยการพิจารณาการแตกตัวของสารทั้งสองที่ค่า collision energy โดย daughter ion ที่เกิดจาก C-ring cleavage นั้นพบว่า compound [9] จะพบเพียงไอออน NR9 ขณะที่ compound [11] จะพบไอออน NR1, NR10 และ NR13 แทน

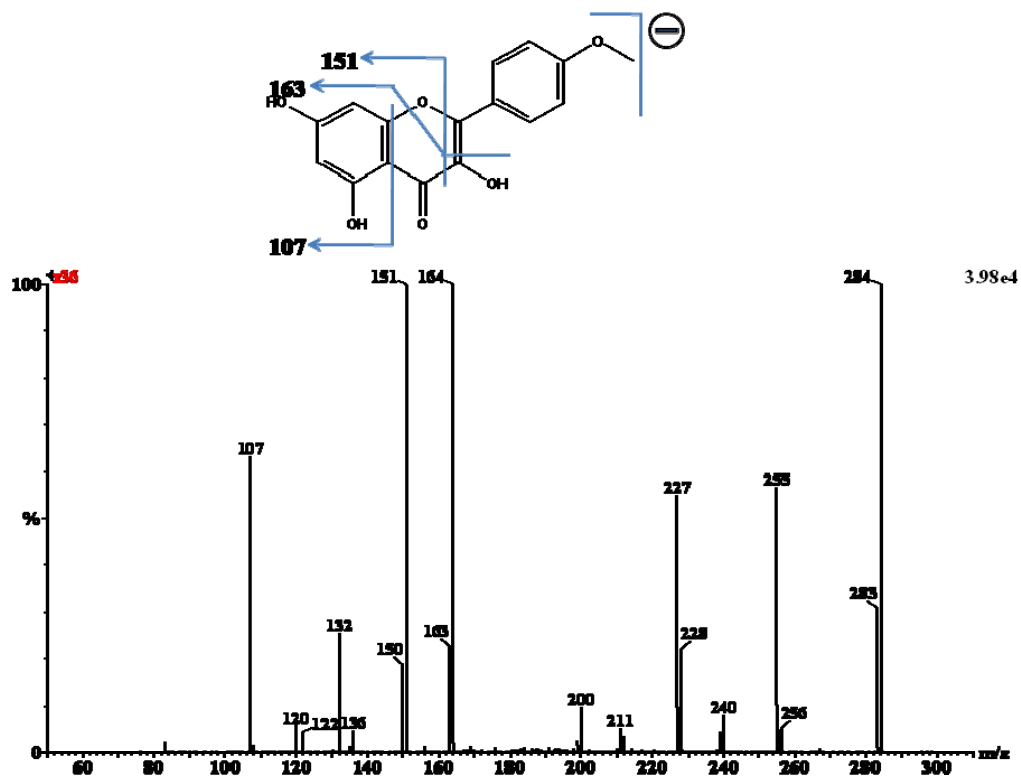
อย่างไรก็ตามถ้าหากจำนวนหมู่แทนที่ภายใน B-ring เพิ่มขึ้น เช่น compound [12] ก็พบว่าไอออน $[M-H]^-$ จะเป็น base peak เฉพาะที่ค่า collision energy เท่ากับ 20 eV จากนั้นถ้าหากค่า collision energy เพิ่มขึ้น จะทำให้ไอออนดังกล่าวมีค่า relative ion signal intensity ลดลงอย่างมาก โดยพบว่ามีค่าเท่ากับ 3 และ 1% เมื่อค่า collision energy เท่ากับ 25 และ 30 eV ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า ไอออน NR10 หรือ NR13 จะเป็น base peak สำหรับ compound [12] นี้ ณ ค่า collision energy ดังกล่าว นอกจากนี้ยังพบไอออน PR9 มีค่า relative ion signal intensity เพิ่มขึ้นอย่างมาก แตกต่างจากทั้ง compound [9] และ [11]

จากพฤติกรรมการแตกตัวของ compound ทั้ง 3 นี้ แสดงให้เห็นว่า ทั้ง 3 มีรูปแบบการแตกตัวที่เหมือนกัน การจะแยกแยะความแตกต่างระหว่างสารทั้ง 3 จำเป็นที่จะต้องใช้ relative ion signal intensity ของไอออนที่สำคัญเข้ามาประกอบการพิจารณา

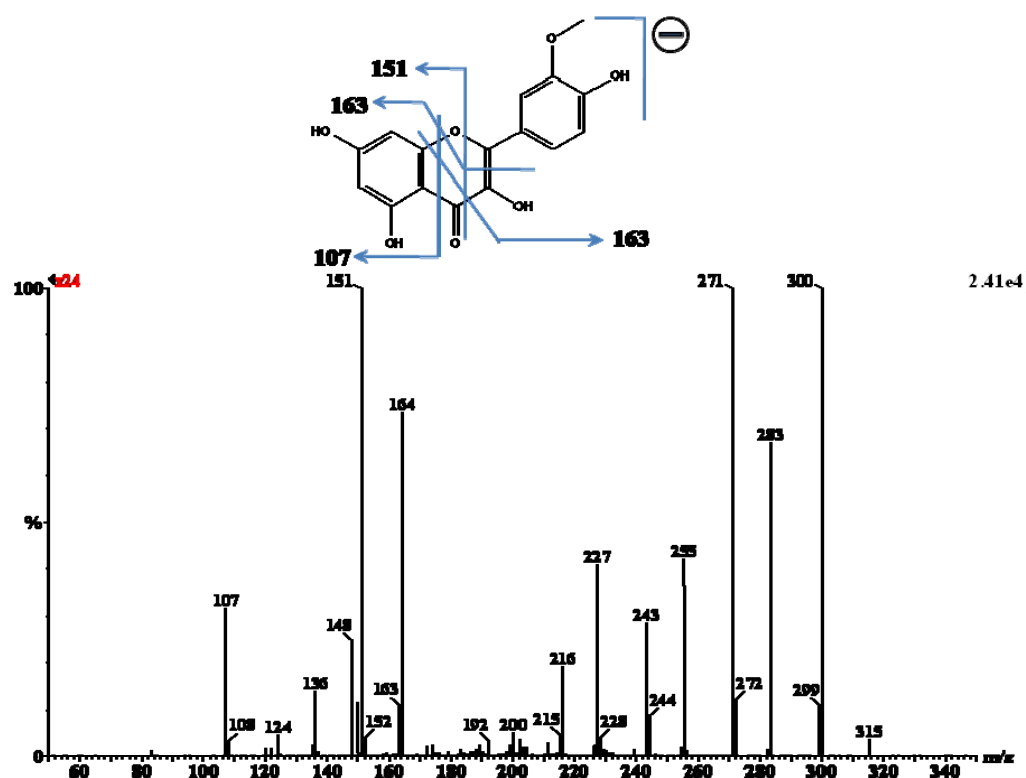
สำหรับ compound [10] ซึ่งเป็น structural isomer กับ compound [11] นั้นพบว่า ถึงแม้จะมีรูปแบบการแตกตัวคล้ายกัน แต่ค่า relative ion signal intensity ของไอออนที่สำคัญ เช่น N9, N10, N15, NR9, NR10 และ NR16 นั้น มีความแตกต่างกันอย่างมาก จึงนำไปสู่การแยกแยะระหว่าง compound ทั้งสองได้



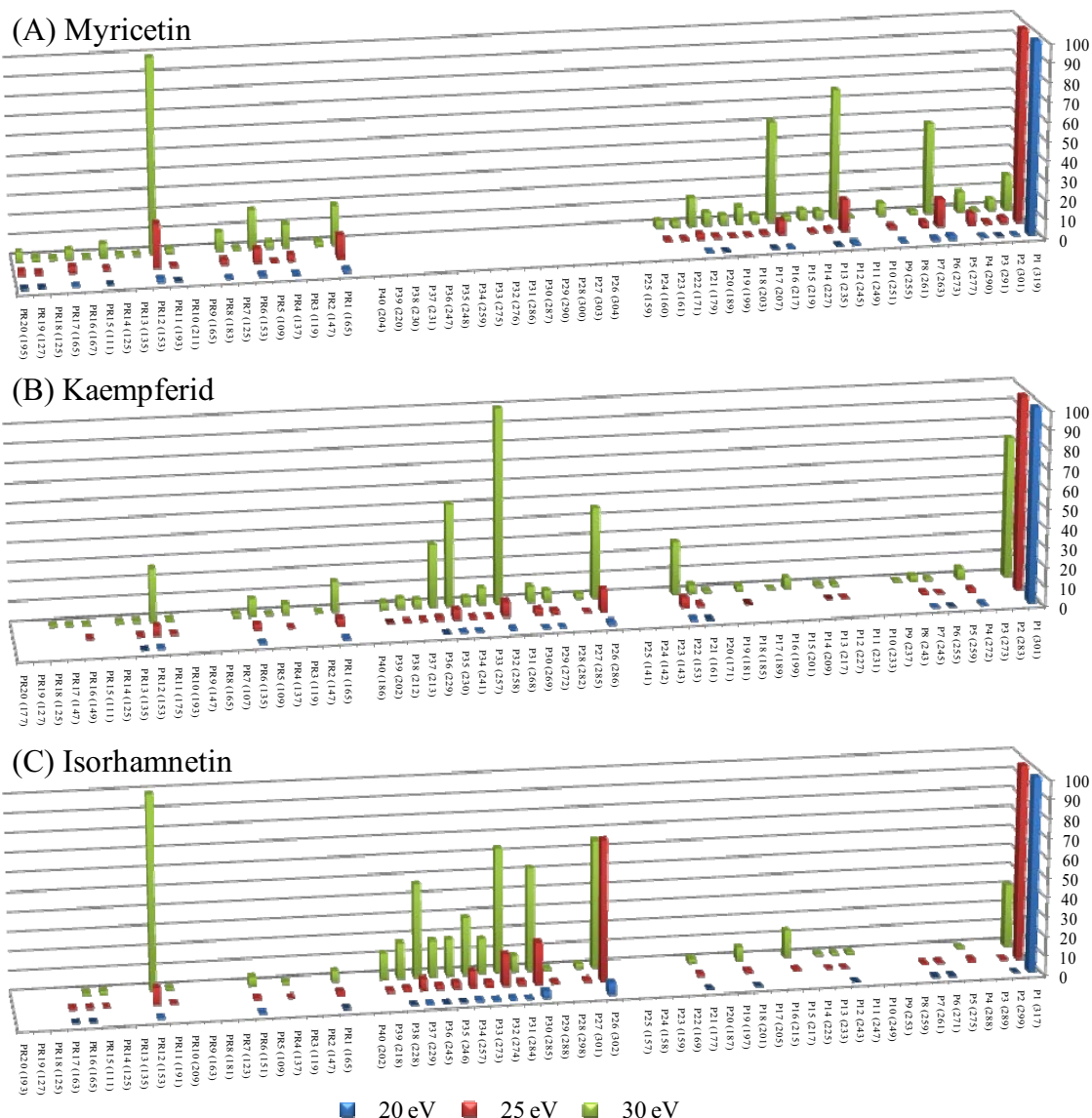
รูป 4.43 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ [13] 3,5,7,3',4',5'-pentahydroxyflavone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ negative ion mode



รูป 4.44 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ [14] 4'-methoxy-3,5,7-trihydroxyflavone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ negative ion mode



รูป 4.45 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ [15] 3'-methoxy-3,5,7,4'-tetrahydroxyflavone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ negative ion mode



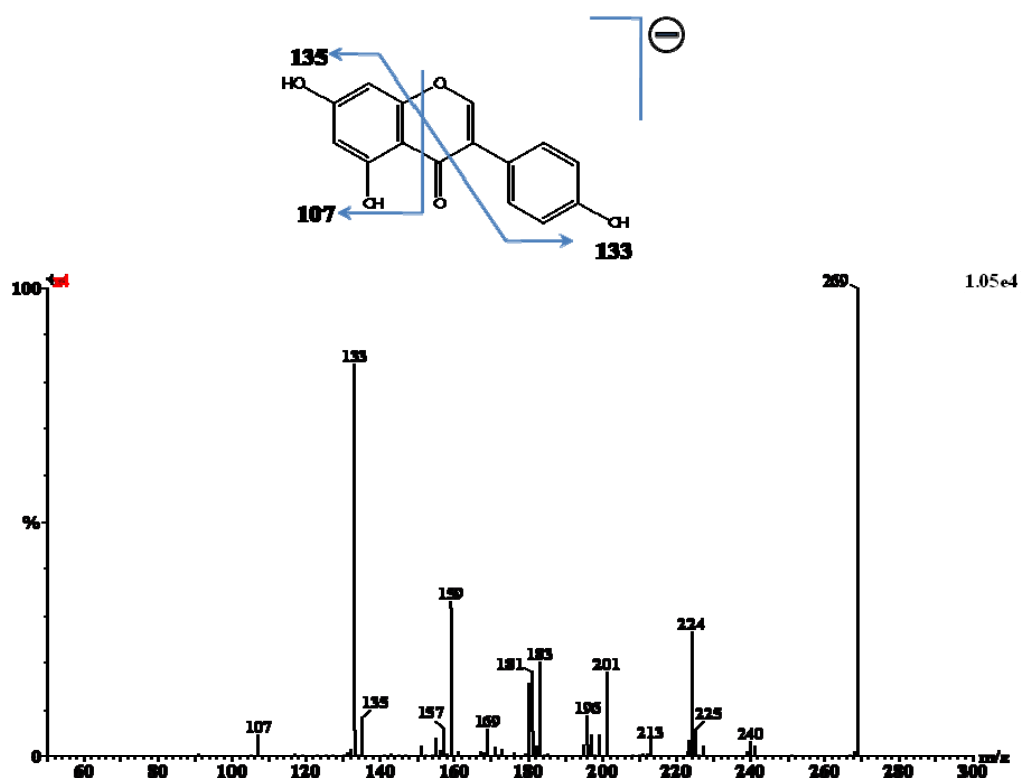
รูป 4.46 ค่า relative ion signal intensity ของไอออนที่พบใน MS/MS spectra จากการวิเคราะห์ด้วย collision energy 20, 25 และ 30 eV ของ [13] myricetin; 3,5,7, 3',4',5'-hexahydroxyflavone, [14] kaempferid; 3,5,7-trihydroxy-4'-methoxyflavone และ [15] isorhamnetin; 3,5,7,4'-tetrahydroxy-3'-methoxyflavone ด้วยเทคนิค ESI-MS/MS แบบ negative ion mode

จากกราฟแสดงค่า relative ion signal intensity ของไอออนที่พบใน MS/MS spectra จากการวิเคราะห์ด้วย collision energy 20, 25 และ 30 eV ของ [13] myricetin; 3,5,7, 3',4',5'-hexahydroxyflavone, [14] kaempferid; 3,5,7-trihydroxy-4'-methoxyflavone และ [15] isorhamnetin; 3,5,7, 4'-tetrahydroxy-3'-methoxyflavone ด้วยเทคนิค ESI-MS/MS แบบ negative ion mode พบว่า compound [13] มีรูปแบบการแตกตัวเหมือนกับ compound [12] อย่างไรก็ตาม การวิเคราะห์ด้วย collision energy ต่างกันก็แสดงให้เห็นความแตกต่างของค่า relative ion signal intensity ของไอออนที่สำคัญ ได้แก่ NR9, NR10, NR12 และ NR13 โดยพบว่า ที่ค่า collision

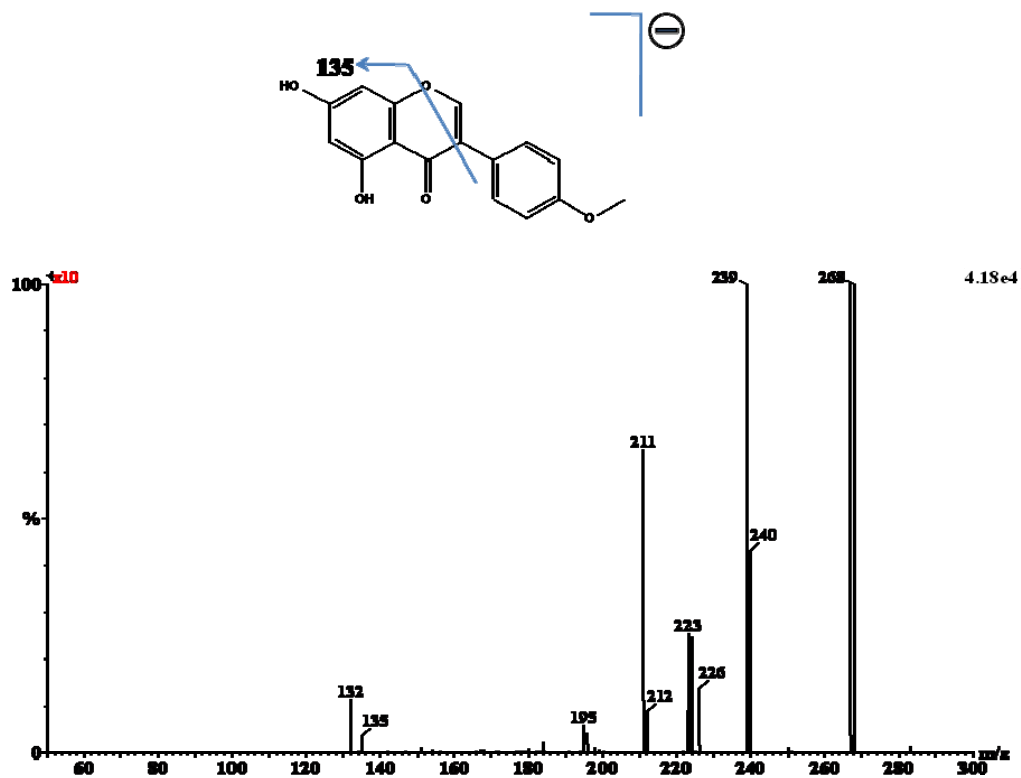
energy เท่ากับ 20 eV นั้น compound [13] จะมีค่า relative ion signal intensity ของไอออน PR10 และ PR13 ที่สูงกว่า ในทางตรงกันข้าม สำหรับไอออน PR9 ใน compound [12] จะมีค่า relative ion signal intensity ที่สูงกว่า compound [13] นอกจากนี้การเพิ่มขึ้นของค่า collision energy จาก 20 เป็น 25 และ 30 eV ตามลำดับ ทำให้ค่า relative ion signal intensity ของไอออน PR12 เพิ่มขึ้นอย่างมากจาก 3 เป็น 20 และ 30% ตามลำดับ สำหรับ compound [13] ขณะที่ compound [12] นั้น ไอออนดังกล่าวมีค่า relative ion signal intensity อยู่ในระดับที่ต่ำกว่า 5%

ส่วน methoxylated flavonol ทั้ง compound [14] และ [15] นั้นก็แสดงรูปแบบการแตกตัวที่คล้าย methoxylated flavones อย่างไรก็ตามกลับพบว่าอิทธิพลของจำนวนหมู่ hydroxy ภายใน B-ring กลับส่งผลในลักษณะตรงข้ามกันระหว่าง methoxylated flavonol และ methoxylated flavones นั่นคือ เมื่อจำนวนของหมู่แทนที่ hydroxy ภายใน B-ring เพิ่มมากขึ้น กลับไม่พบ $[M-H]^-$ ไอออน ซึ่งแสดงพฤติกรรมคล้าย compound [8] และในทำนองเดียวกัน compound [14] กลับพบ $[M-H]^-$ เป็น base peak ที่ collision energy เท่ากับ 20 eV ก่อนที่จะมีค่า relative ion signal intensity จะลดลงอย่างมากเมื่อ collision energy ที่ใช้มีค่าเพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตาม methoxylated flavonol ทั้ง 2 ก็แสดงลักษณะที่แตกต่างกับ methoxylate flavones นั่นคือ ค่า relative ion signal intensity ของไอออน PR13 ซึ่งเพิ่มขึ้นอย่างมาก เมื่อ collision energy ที่ใช้มีค่าเพิ่มมากขึ้น

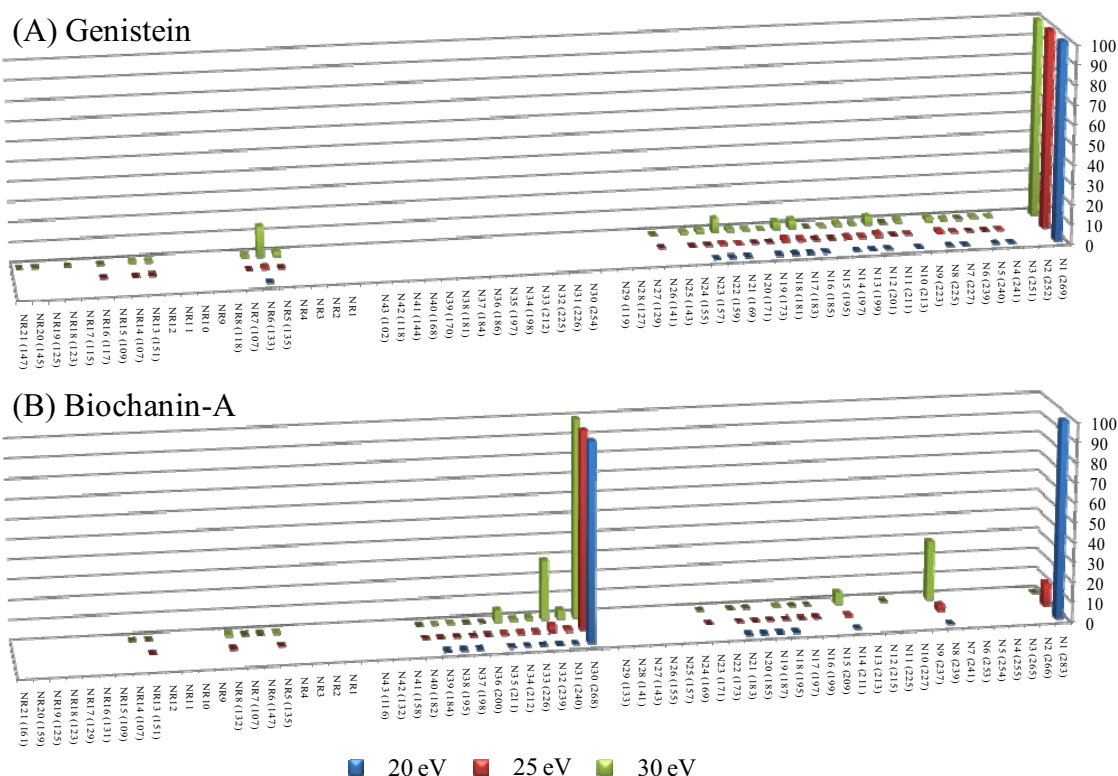
จากพฤติกรรมดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการวิเคราะห์โดยการปรับเปลี่ยนค่า collision energy ทำให้สามารถแยกแยะความแตกต่างระหว่าง methoxylated flavonol กับ methoxylated flavones ได้ด้วยการพิจารณาค่า relative ion signal ของไอออน NR13 เมื่อ collision energy ที่ใช้มีค่าเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้การแยกแยะความแตกต่างระหว่าง methoxylated flavonol เองก็สามารถทำได้เช่นกันโดยอาศัยค่า relative ion signal ของไอออน $[M-H]^-$ เมื่อ collision energy ที่ใช้มีค่าเพิ่มมากขึ้น



รูป 4.47 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ [16] 5,7,4'-trihydroxyisoflavone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ negative ion mode



รูป 4.48 รูปแบบการแตกตัวที่สำคัญและ MS/MS spectrum จากการวิเคราะห์ [17] 4'-methoxy-5,7-dihydroxyisoflavone ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ positive ion mode



รูป 4.49 ค่า relative ion signal intensity ของไอออนที่พบใน MS/MS spectra จากการวิเคราะห์ด้วย collision energy 20, 25 และ 30 eV ของ [16] genistein; 5,7,4'-trihydroxyisoflavone และ [17] 5,7-dihydroxy-4'-methoxyisoflavone ด้วยเทคนิค ESI-MS/MS แบบ negative ion mode

จากกราฟแสดงค่า relative ion signal intensity ของไอออนที่พบใน MS/MS spectra จากการวิเคราะห์ด้วย collision energy 20, 25 และ 30 eV ของ [16] genistein; 5,7,4'-trihydroxyisoflavone และ [17] 5,7-dihydroxy-4'-methoxyisoflavone ด้วยเทคนิค ESI-MS/MS แบบ negative ion mode พบว่า isoflavone (compound [16]) มีรูปแบบการแตกตัวคล้ายกับ flavonol (compound [9]) มากกว่า flavones (compound [4]) โดยทั้ง compound ทั้ง 3 เป็น structural isomer กัน ต่างกันเฉพาะตำแหน่งของหมู่แทนที่ hydroxyl ที่เกาะอยู่กับ A- B- และ C- ring ของ flavonoids อย่างไรก็ตามจากผลการวิเคราะห์ด้วยการใช้ collision energy ที่แตกต่างกัน พบว่า compound [16] ยังมีรูปแบบการแตกตัวที่เป็นลักษณะเฉพาะ รวมไปถึงค่า relative ion signal intensity ของไอออนที่สำคัญ ก็ทำให้สามารถแยกแยะความแตกต่างกับ isomer compound [4] และ [9] ได้ โดย compound [16] สามารถแยกแยะความแตกต่างกับ compound [4] ได้โดยอาศัยความแตกต่างของค่า relative ion signal intensity ของไอออน $[M-H]^-$, NR6, NR13 และ NR16 เมื่อค่า collision energy ที่ใช้เพิ่มมากขึ้น นอกนี้ compound [16] ก็สามารถแยกแยะความแตกต่างกับ compound [9] ได้เช่นกันโดยการใช้ characteristic ion ของ isoflavone นั่นคือ การพบไอออน NR5, NR6 และ NR7 เฉพาะ compound [16] เท่านั้น ไม่พบใน compound [9]

นอกจากนี้ methoxylated isoflavone (compound [17]) ก็มีรูปแบบการแตกตัวและค่า relative ion signal intensity ของไอออนที่สำคัญที่แตกต่างจาก methoxylated flavones (compound

[7]) และ methoxylated flavonol (compound [14]) โดยพบว่าค่า relative ion signal intensity ของไอออน $[M-H]^-$ มีความคล้ายคลึงกันกับ methoxylated flavones (compound [7]) แต่แตกต่างจาก methoxylated flavonol (compound [14]) อย่างไรก็ตาม compound [17] ก็แสดงค่า relative ion signal intensity ของไอออนที่สำคัญ ได้แก่ N8, N14, N32 และ N35 ที่มีความแตกต่างจาก methoxylated flavonoid ทั้งสอง อย่างเห็นได้ชัด โดยเฉพาะอย่างยิ่งค่า relative ion signal intensity ของไอออน N8 ที่มีความแตกต่างอย่างมาก ซึ่งจะมีค่าเพิ่มมากขึ้นเมื่อค่า collision energy ที่ใช้เพิ่มมากขึ้น

จากการวิเคราะห์ flavonoids ทั้ง 17 ตัวด้วยเทคนิค ESI-MS/MS โดยทำการศึกษาอิทธิพลของค่า collision energy ต่อทั้งรูปแบบการแตกตัวและค่า relative ion signal intensity ของไอออนตรวจพบ พบว่า การวิเคราะห์ในแบบ positive ion mode จะให้รายละเอียดการแตกตัวของ $[M+H]^+$ มากกว่าการวิเคราะห์ในแบบ negative ion mode แต่อย่างไรก็ตามพบว่าแบบของการวิเคราะห์ทั้งสอง mode ยังคงให้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ร่วมกัน เพื่อใช้ในการบ่งชี้และระบุเอกลักษณ์ของ flavonoids ได้ นอกจากนี้ยังพบว่า negative ion mode มีสภาพไวที่สูงกว่าการวิเคราะห์ด้วย positive ion mode ดังนั้นจากการศึกษารูปแบบการแตกตัวของ flavonoids แล้วข้างต้น จึงนำไปสู่การบ่งชี้ และระบุโครงสร้างของ flavonoids ที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในสารสกัดจากรำข้าวดำพันธุ์ไทย ทั้งนี้ในการวิเคราะห์ดังกล่าวจะเลือกใช้การวิเคราะห์ ESI-MS/MS แบบ negative ion mode เนื่องจากมีสภาพไวในการวิเคราะห์ที่สอดคล้องกับระดับของ flavonoids ที่มีอยู่ในตัวอย่างสารสกัดดังกล่าว

4.3 การบ่งชี้ ระบุเอกลักษณ์และการเปรียบเทียบปริมาณของสารกลุ่ม flavonoids จากการวิเคราะห์ สารสกัดจากรำข้าวดำพันธุ์ไทยด้วยเทคนิค HPLC-ESI-MS/MS ด้วย negative ion mode

ทำการสกัดรำข้าวดำพันธุ์ไทยจำนวน 8 พันธุ์ได้แก่ KHNBT No.3, rice berry, 16815, 1000-11-2-26, 49-6-6-6-10, 132-1-1-3-3-1-4-4, 132-1-1-4-1-1-1-3, KDML ข้าวทั้งหมดปลูกที่มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ระหว่างปี 2548-2549 โดยนำรำข้าวตัวอย่างจำนวน 5 กรัม มาสกัดด้วยเมทานอลปริมาตร 50 ml ด้วยวิธีการเขย่าเป็นเวลา 30 นาที จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นนำสารสกัดที่ได้รวมกันก่อนนำไประเหยให้แห้งด้วยเครื่องระเหยความดันต่ำจนได้สารละลายตัวอย่างปริมาตร 2 ml นำสารละลายดังกล่าวกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 μm จากนั้นจึงนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC-ESI-MS/MS ด้วย negative ion mode โดยมีสภาวะดังตาราง 4.7 ซึ่งผลการวิเคราะห์พบสารกลุ่ม flavonoids และอนุพันธ์จำนวน 16 ชนิดแสดงดังตาราง 4.8 และกราฟแสดงการเปรียบเทียบปริมาณของสารดังกล่าวที่ตรวจพบในสารสกัดจากรำข้าวดำพันธุ์ต่าง ๆ แสดงดังรูป 4.50. โดยลักษณะการแตกตัวของไอออนที่สำคัญและ ESI-MS/MS ของ flavonoids แต่ละตัวที่บ่งชี้และระบุเอกลักษณ์ได้ แสดงดังรูป 4.51-4.66

ตาราง 4.7 สภาวะของเครื่อง HPLC-ESI-MS/MS ของการวิเคราะห์แบบ negative ion mode ในการวิเคราะห์สารสกัดจากรำข้าวดำพันธุ์ไทย

HPLC instrument parameters					
HPLC column:	zorbax SB-C18, 35 μm , 2.1x100 mm				
Injection volume:	20 μl				
Flow rate:	0.2 ml/min				
Mobile phase:	Solvent A:	0.1% formic acid in water			
	Solvent B:	Methanol			
Gradient elution:	Time	A%	B%	Flow	Curve
	0	5	95	0.2	1
	120	60	40	0.2	6
	150	100	0	0.2	6
	180	100	0	0.2	1
ESI-MS/MS instrument Parameters					
Polarity	ES-				
Calibration	Dynamic 2				
	Set point		Actual		
Capillary	2.5		-2.46		
Cone	35		-47		
Extractor	0		-11		
RF Lens	0.8		-9.4		
Source Temp ($^{\circ}\text{C}$)	80		114		
Desolvation Temp ($^{\circ}\text{C}$)	230		227		
LM Resolution	5				
HM Resolution	5				

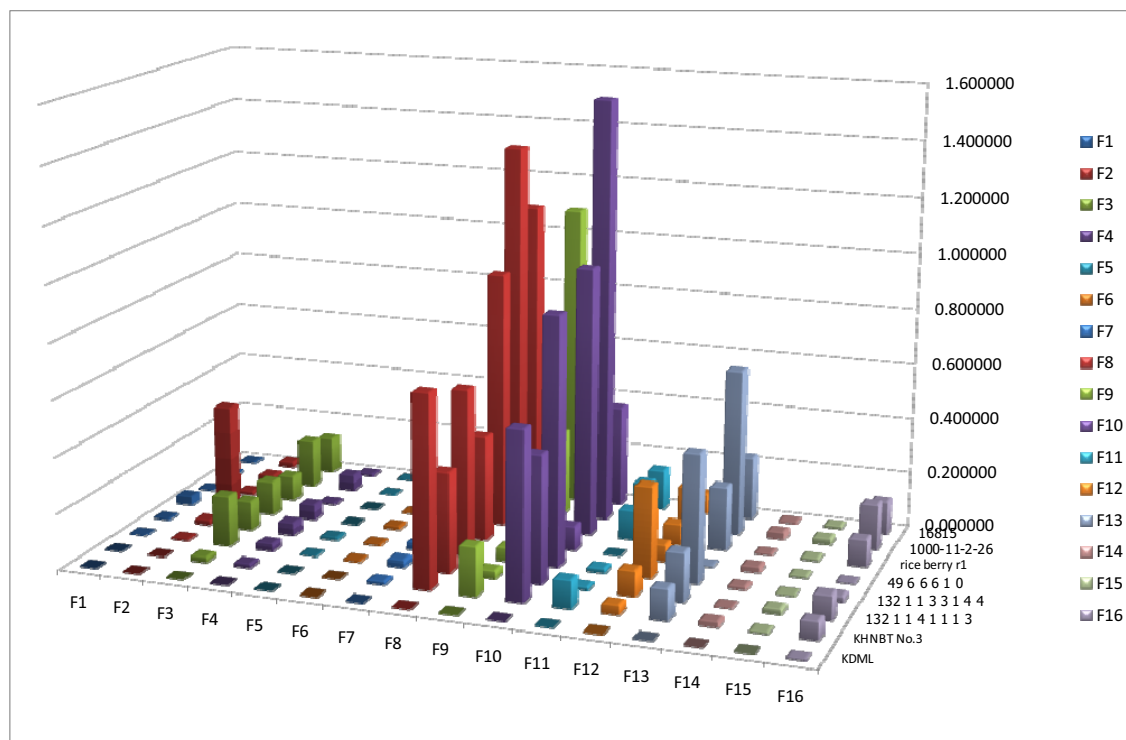
ตาราง 4.7 สภาวะของเครื่อง ESI-MS/MS ของการวิเคราะห์แบบ negative ion mode ในการวิเคราะห์สารสกัดจากรำข้าวดำพันธุ์ไทย (ต่อ)

ESI-MS/MS instrument Parameters	Set point	Actual
Collision Energy	Vary for 20, 25 and 30 eV	-9.9
Ion Energy	1.8	
Steering	0	-1.09
Entrance	80	77.4
Pre-filter	7	-3.8
Transport	10	9.2
Aperture2	15	15.1
Acceleration	200	198
Focus	0	0
Tube Lens	130	128
Offset1	0	77.4
Offset2	0	77.1
Pusher	980	912
TOF (kV)	9.1	9.17
Reflectron	35.25	2.05
Pusher Cycle Time (μs)	Auto	
Pusher Frequency (Hz)	22727.27	
Multiplier	550	-565
MCP	2000	1979
Centroid Threshold	0	
Min Points	2	
Np Multiplier	1	
Resolution	5000	
Lock Mass	0	
Mass Window +/-	1	
Lteff	1806.89	
Veff	9100	
Pirani Pressure(mbar)	1.82E+00	
Penning Pressure(mbar)	OFF	
Tof Penning Pressure(mbar)	4.90E-07	

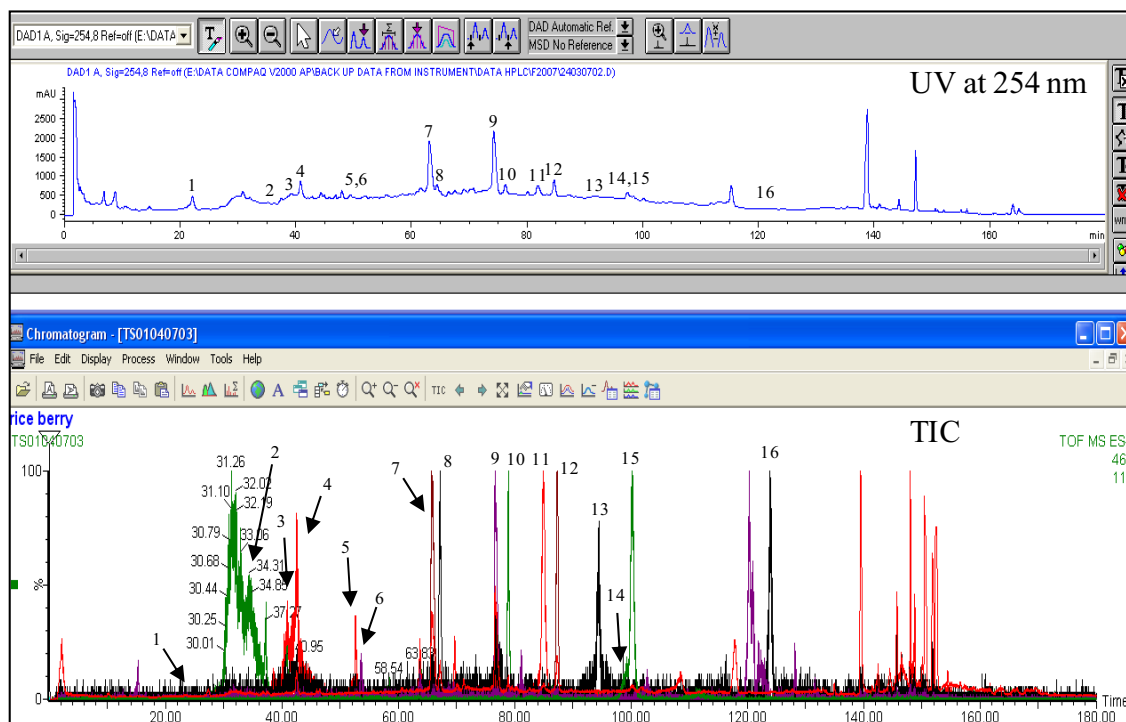
ตาราง 4.8 ปริมาณสัมพัทธ์คำนวณจากอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของ flavonoids ที่ตรวจพบต่อพีคพื้นที่ใต้พีคของ internal standard ที่ได้จากการวิเคราะห์สารสกัดจากรำข้าวพันธุ์ไทยจำนวน 8 พันธุ์

compound	MW	ปริมาณ peak area ratio ของ flavonoid ที่ตรวจพบ ต่อ internal standard ในข้าวพันธุ์ต่าง ๆ							
		16815	1000-11-2-26	rice berry r1	49 6 6 6 1 0	132 1 1 3 3 1 4 4	132 1 1 4 1 1 1 3	KHNB No.3	KDML
F1; 5,3',4',5'-tetrahydroxy-7-O glucoside flavone	463	0.0056	0.0104	0.0035	0.0324	0.0048	0.0011	0.0003	nd
F2; 5,3',4',5'-tetrahydroxy-7-O-glucoside flavanone	465	0.0197	0.0208	0.0133	0.3868	0.0174	0.0055	nd	nd
F3; 5,6,3',4',5'-pentahydroxy-7-O-glucoside flavone	479	0.1313	0.1711	0.0886	0.1227	0.1046	0.1804	0.0191	nd
F4; Taxifolin-3-O-glucoside	465	0.0070	0.0567	0.0056	0.0547	0.0444	0.0270	0.0143	nd
F5 Taxifolin	303	0.0005	0.0013	nd	nd	0.0107	0.0029	nd	nd
F6; quertagetin-7-O-glucoside	479	0.0034	nd	0.0021	0.0120	0.0053	0.0041	nd	nd
F7; Myricetin-7-O-glucoside	479	0.0073	0.0729	0.0056	0.0248	0.0282	0.0266	0.0116	nd
F8; Quercetin-3-O-glucoside	463	1.0871	1.3395	0.9186	0.3775	0.5976	0.3565	0.6856	nd
F9; Rutin; Quercetin-3-O-rutinoside	609	1.0871	0.3033	0.2604	0.0000	0.0474	0.0283	0.1736	nd
F10; isorhamnetin-3-O-glucoside	477	0.3658	1.5276	0.9672	0.0864	0.8887	0.4548	0.5952	nd
F11; isorhamnetin-3-O-rutinoside	623	0.1431	0.1523	0.1055	nd	0.0148	0.0107	0.0979	nd
F12; Quercetin	301	0.0726	0.1535	0.0747	0.0574	0.3249	0.0885	0.0335	nd
F13; isorhamnetin-3-O-acetylglucoside	519	0.2279	0.5987	0.2285	0.0034	0.4574	0.1708	0.1087	nd
F14; 3,5,3'-trihydroxy-4'-methoxyflavone	299	0.0047	0.0252	0.0065	0.0196	0.0108	0.0030	0.0183	nd
F15; 3,5,7,3'-tetrahydroxy-4'-methoxyflavone	315	0.0090	0.0210	0.0081	0.0065	0.0028	0.0191	0.0053	nd
F16; isorhamnetin	315	0.1168	0.1632	0.0958	0.0027	0.0188	0.0864	0.0627	nd

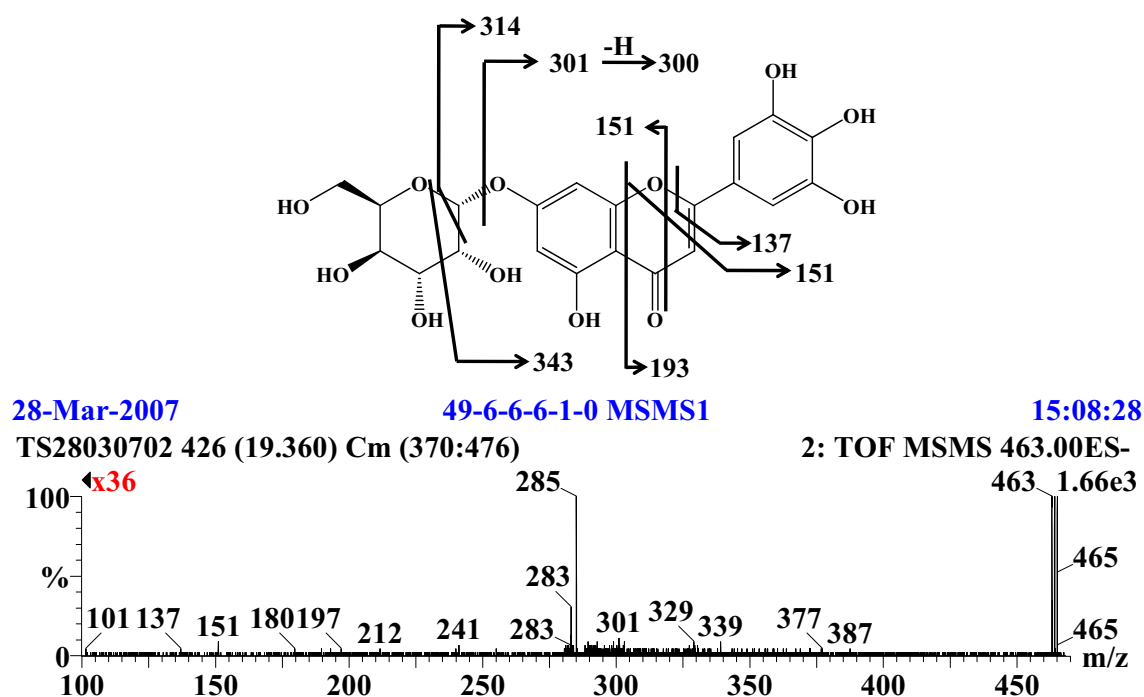
nd = not detect



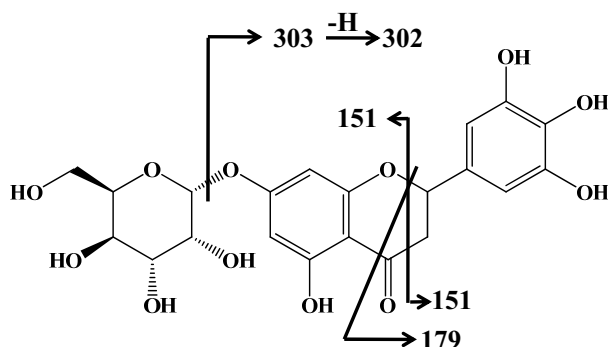
รูป 4.50 อัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของ flavonoids ที่ตรวจพบต่อพีคพื้นที่ใต้พีคของ internal standard ที่ได้จากการวิเคราะห์สารสกัดจากรำข้าวพันธุ์ไทยจำนวน 8 พันธุ์



รูป 4.51 Chromatograms จากการวิเคราะห์สารสกัดข้าวดำพันธุ์ไทยด้วยเทคนิค HPLC-DAD-ESI-MS/MS



รูป 4.52 รูปแบบการแตกตัวของไอออนที่สำคัญและ MSMS spectrum ของ 5,3',4',5'-tetrahydroxylflavone-7-O-glucoside (F1) ที่ได้จากการวิเคราะห์สารสกัดจากรำข้าวดำพันธุ์ไทย ของพีคที่เวลา รีเทนชัน 19.3 นาที ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ negative ion mode



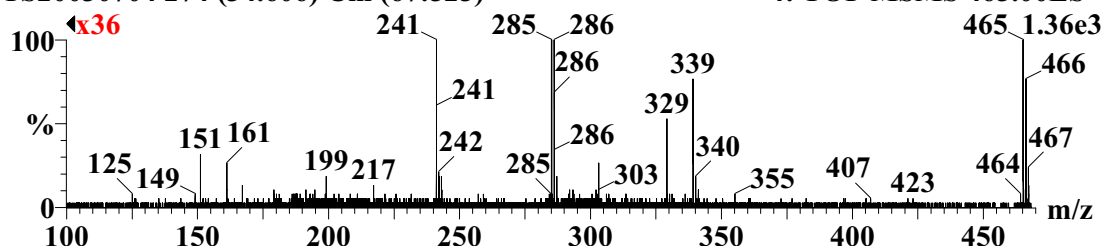
20-Mar-2007

1000 Ex. new MSMS2

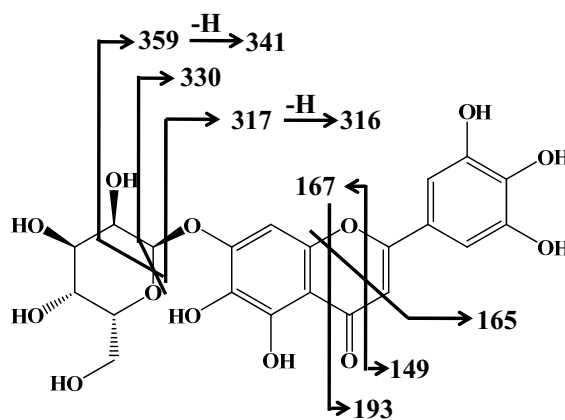
23:52:13

TS20030704 274 (34.606) Cm (67:525)

4: TOF MSMS 465.00ES-



รูป 4.53 การแตกตัวของไอออนที่สำคัญและ MSMS spectrum ของ 5, 3',4',5'-tetrahydroxyflavone-7-O-glucoside (F2) ที่ได้จากการวิเคราะห์สารสกัดจากรำข้าวดำพันธุ์ไทย ของพืชที่เวลาริเทนชัน 34.6 นาที ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ negative ion mode



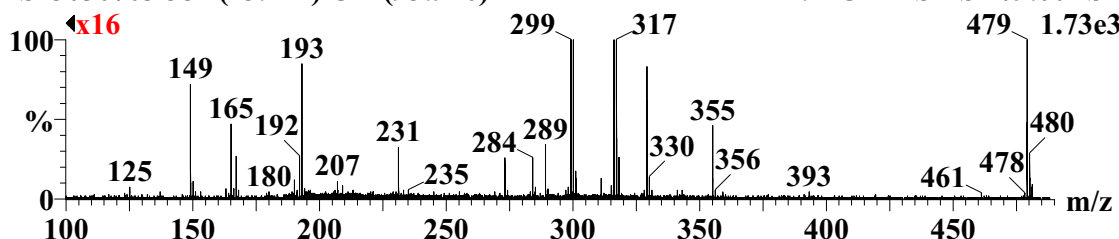
23-Mar-2007

riceberry MSMS

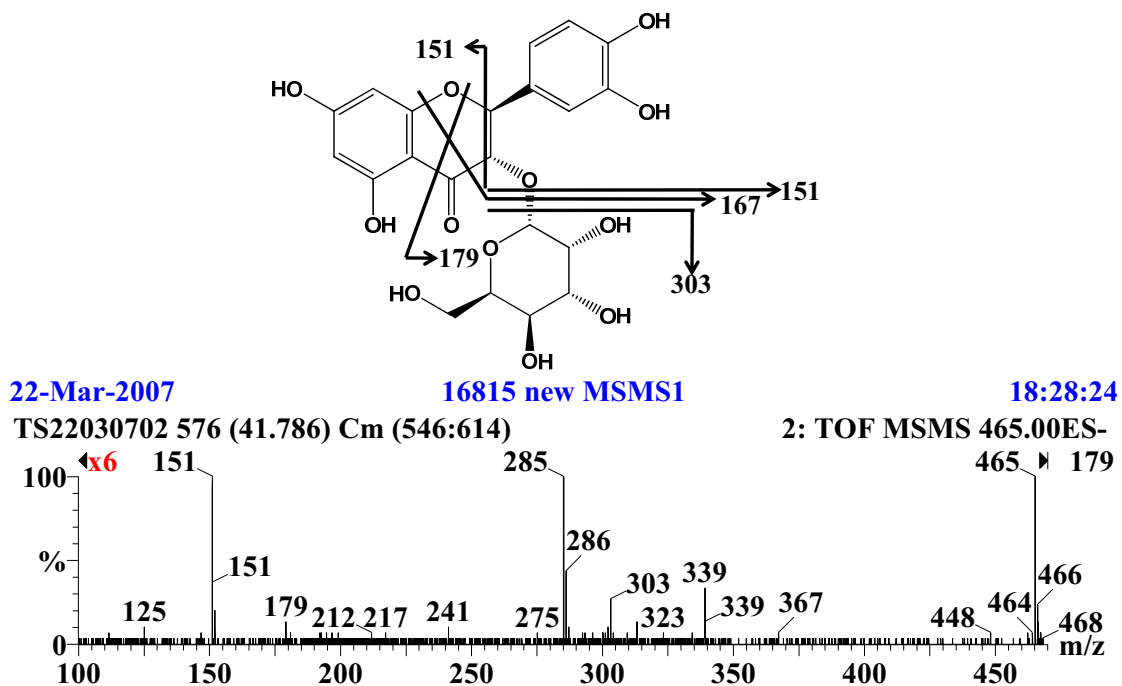
20:07:27

TS23030703 581 (43.114) Cm (93:916)

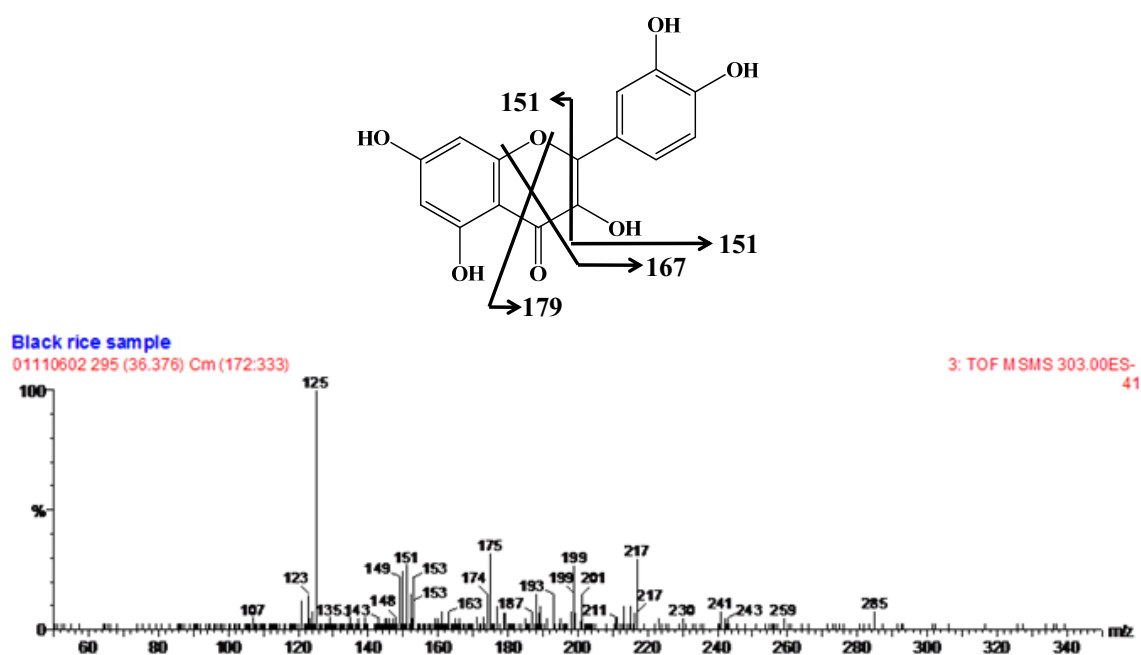
4: TOF MSMS 479.00ES-



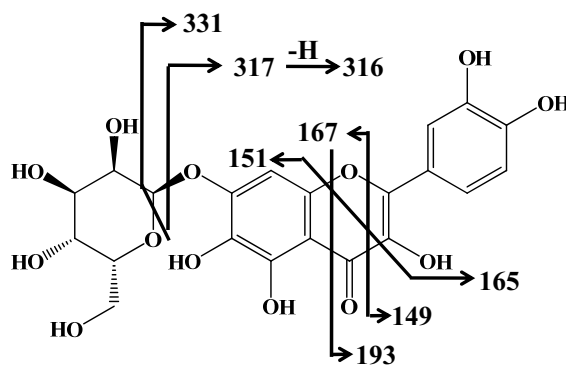
รูป 4.54 การแตกตัวของไอออนที่สำคัญและ MSMS spectrum ของ 5,6,3',4',5'-pentahydroxyflavone-7-O-glucoside (F3) ที่ได้จากการวิเคราะห์สารสกัดจากรำข้าวดำพันธุ์ไทย ของพืชที่เวลาริเทนชัน 43.1 นาที ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ negative ion mode



รูป 4.55 การแตกตัวของไอออนที่สำคัญและ MSMS spectrum ของ taxifolin-3-O-glucoside (F4) ที่ได้จากการวิเคราะห์สารสกัดจากรำข้าวดำพันธุ์ไทย ของพีคที่เวลารีเทนชัน 41.76 นาที ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ negative ion mode



รูป 4.56 การแตกตัวของไอออนที่สำคัญและ MSMS spectrum ของ taxifolin (F5) ที่ได้จากการวิเคราะห์สารสกัดจากรำข้าวดำพันธุ์ไทย ของพีคที่เวลารีเทนชัน 41.76 นาที ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ negative ion mode

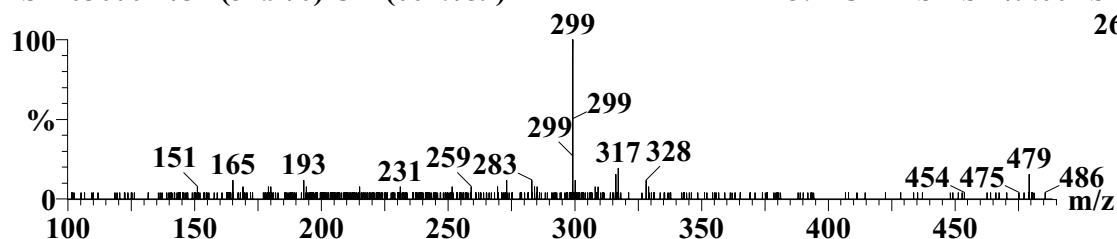


24-Mar-2007

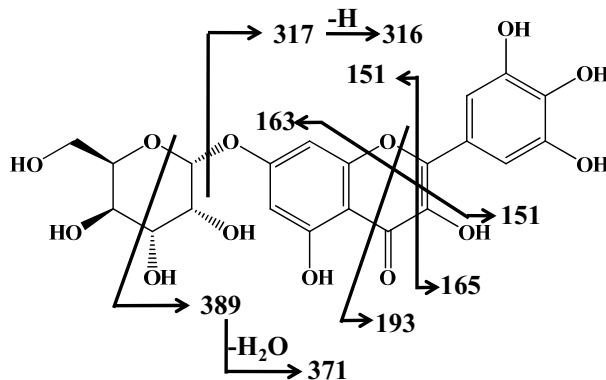
riceberry MSMS4

12:01:41

TS24030701 731 (51.970) Cm (662:759)

5: TOF MSMS 479.00ES-
26

รูป 4.57 การแตกตัวของไอออนที่สำคัญและ MSMS spectrum ของ quertagetin-7-O-glucoside (F6) ที่ได้จากการวิเคราะห์สารสกัดจากรำข้าวดำพันธุ์ไทย ของพีคที่เวลารีเทนชัน 51.9 นาที ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ negative ion mode

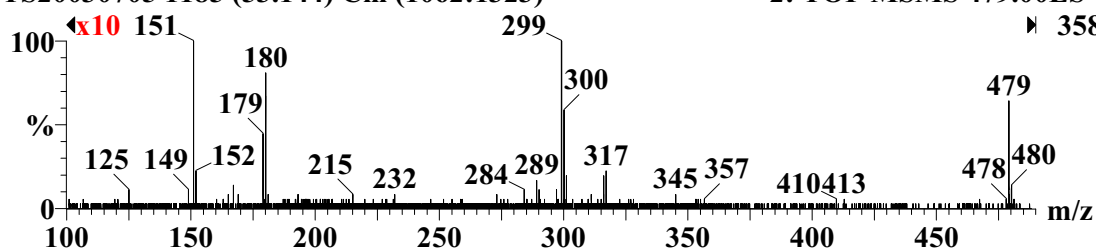


21-Mar-2007

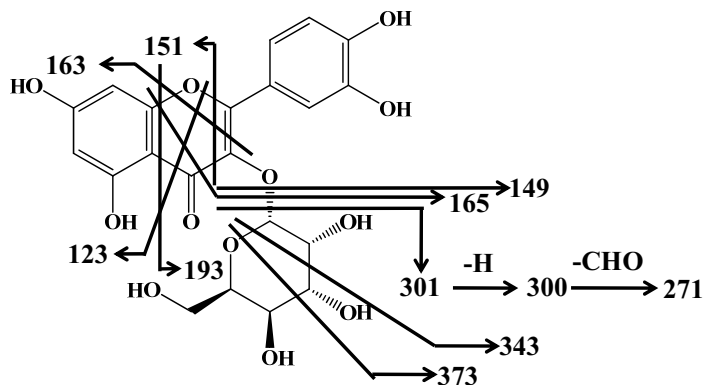
1000 Ex. new MSMS3

02:29:24

TS20030705 1185 (53.144) Cm (1062:1323)

2: TOF MSMS 479.00ES-
358

รูป 4.58 การแตกตัวของไอออนที่สำคัญและ MSMS spectrum ของ myricetin-7-O-glucoside (F7) ที่ได้จากการวิเคราะห์สารสกัดจากรำข้าวดำพันธุ์ไทย ของพีคที่เวลารีเทนชัน 53.1 นาที ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ negative ion mode



23-Mar-2007

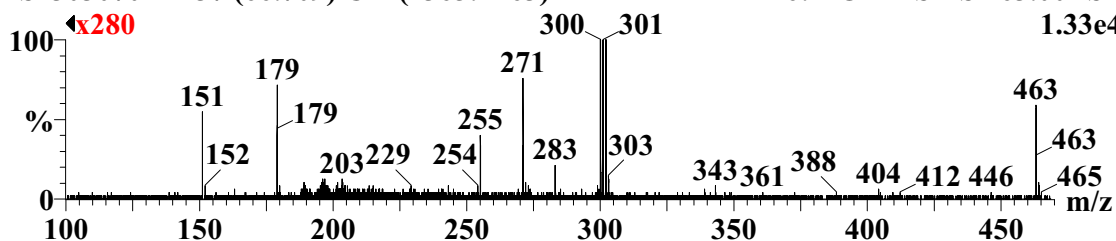
riceberry MSMS

23:28:01

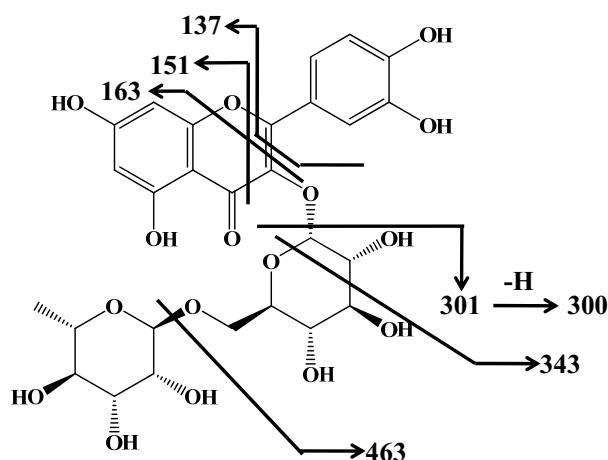
TS23030704 1437 (66.709) Cm (1365:1463)

6: TOF MSMS 463.00ES-

1.33e4



รูป 4.59 การแตกตัวของไอออนที่สำคัญและ MSMS spectrum ของ Quercetin-3-O-glucoside (F8) ที่ได้จากการวิเคราะห์สารสกัดจากรำข้าวดำพันธุ์ไทย ของพืชที่เวลาริเทนชัน 66.7 นาที ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ negative ion mode



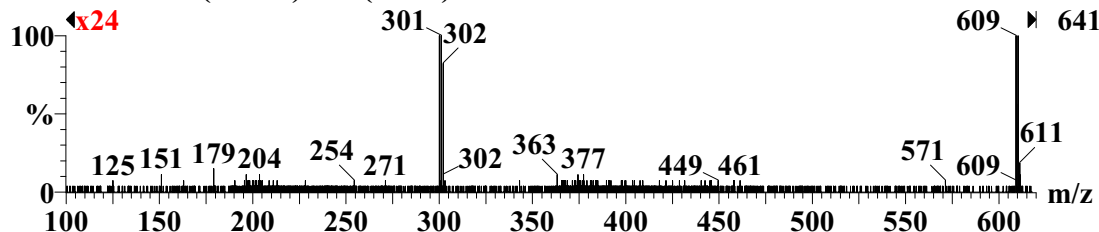
24-Mar-2007

riceberry MSMS4

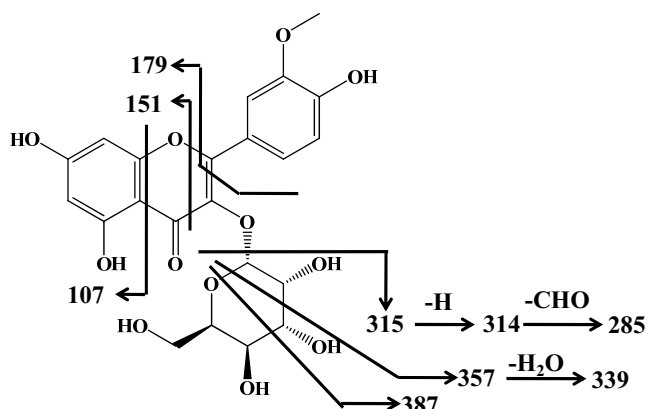
12:01:41

TS24030701 56 (67.257) Cm (41:78)

11: TOF MSMS 609.00ES-



รูป 4.60 การแตกตัวของไอออนที่สำคัญและ MSMS spectrum rutin; Quercetin-3-O-rutinoside (F9) ที่ได้จากการวิเคราะห์สารสกัดจากรำข้าวดำพันธุ์ไทย ของพืชที่เวลาริเทนชัน 67.2 นาที ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ negative ion mode



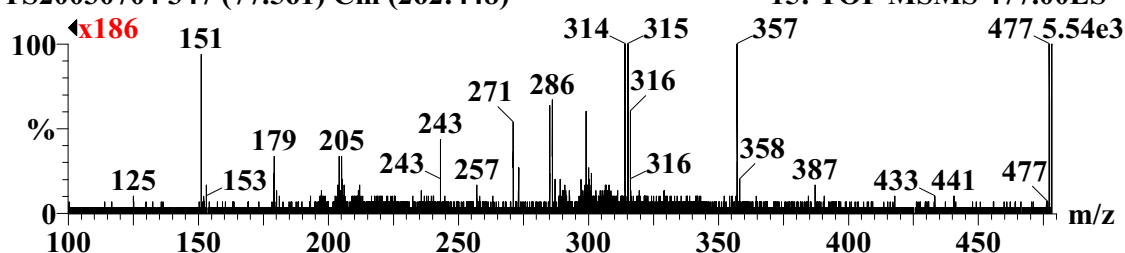
20-Mar-2007

1000 Ex. new MSMS2

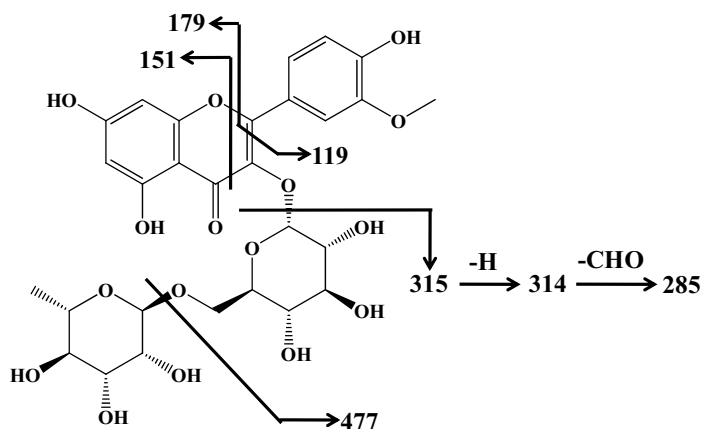
23:52:13

TS20030704 347 (77.561) Cm (262:448)

15: TOF MSMS 477.00ES-



รูป 4.61 การแตกตัวของไอออนที่สำคัญและ MSMS spectrum ของ isorhamnetin-3-O-glucoside (F10) ได้จากการวิเคราะห์สารสกัดจากรำข้าวดำพันธุ์ไทย ของพืชที่เวลาริเทนชัน 77.5 นาที ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ negative ion mode



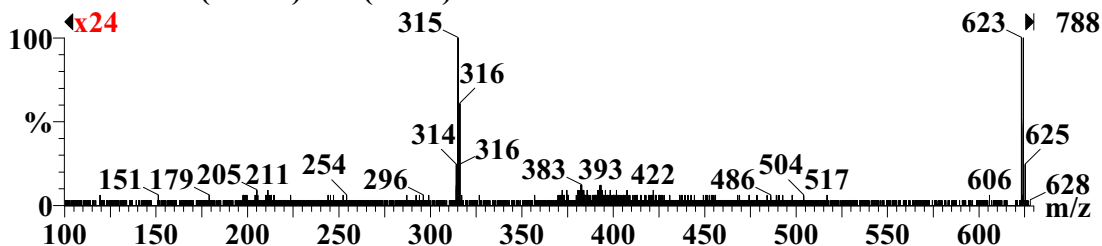
20-Mar-2007

1000 Ex. new MSMS2

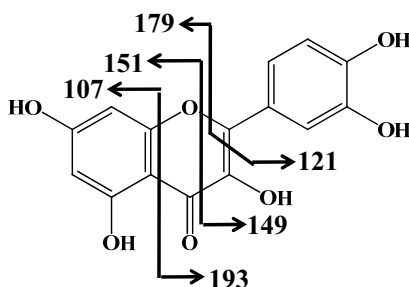
23:52:13

TS20030704 60 (79.621) Cm (1:109)

16: TOF MSMS 623.00ES-



รูป 4.62 การแตกตัวของไอออนที่สำคัญและ MSMS spectrum ของ isorhamnetin-3-O-rutinoside (F11) ที่ได้จากการวิเคราะห์สารสกัดจากรำข้าวดำพันธุ์ไทย ของพืชที่เวลาริเทนชัน 79.6 นาที ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ negative ion mode



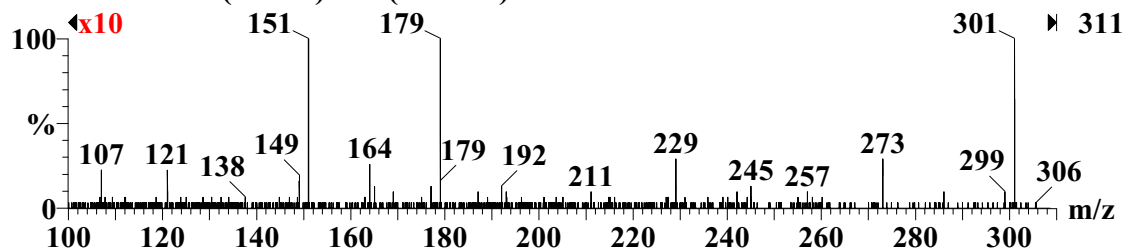
20-Feb-2007

BT

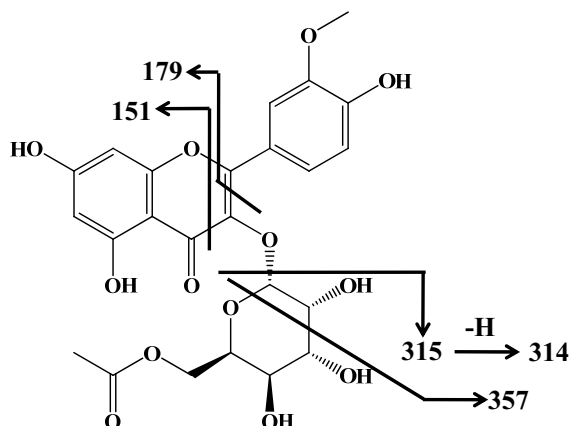
15:40:37

TS20020702 284 (68.917) Cm (232:338)

12: TOF MSMS 301.00ES-



รูป 4.63 การแตกตัวของไอออนที่สำคัญและ MSMS spectrum ของ quercetin (F12) ที่ได้จากการวิเคราะห์สารสกัดจากรำข้าวดำพันธุ์ไทย ของพีคที่เวลารีเทนชัน 68.9 นาที ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ negative ion mode



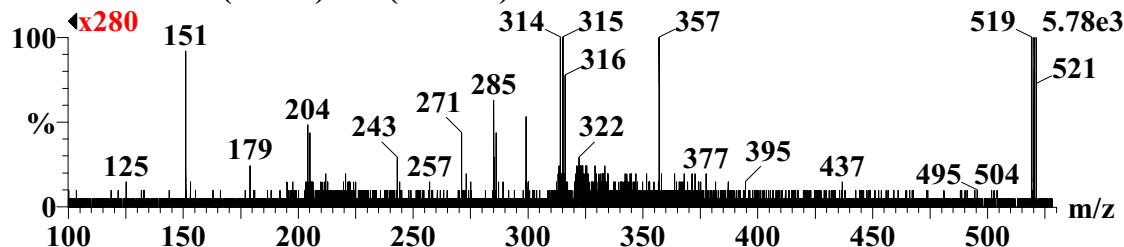
20-Mar-2007

1000 Ex. new MSMS2

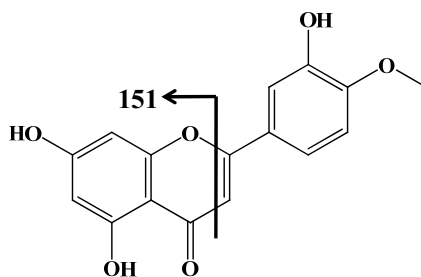
23:52:13

TS20030704 283 (87.906) Cm (174:393)

19: TOF MSMS 519.00ES-



รูป 4.64 การแตกตัวของไอออนที่สำคัญและ MSMS spectrum ของ isorhamnetin-3-O-acetyl glucoside (F13) ที่ได้จากการวิเคราะห์สารสกัดจากรำข้าวดำพันธุ์ไทย ของพีคที่เวลารีเทนชัน 87.9 นาที ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ negative ion mode

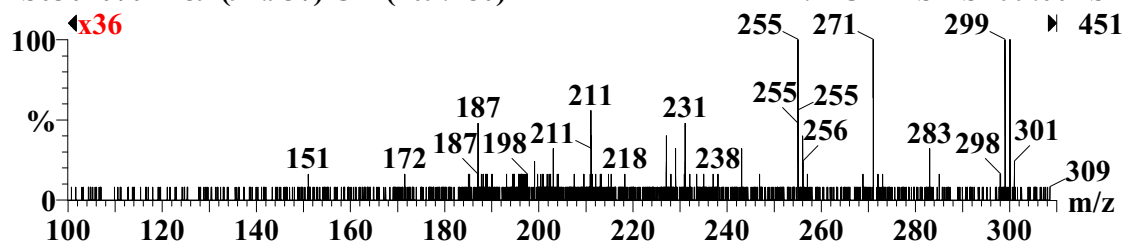


03-Apr-2007

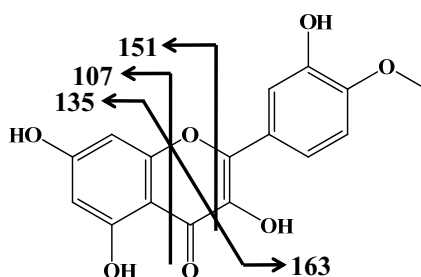
BT No3 MSMS2

16:50:31

TS03040702 189 (91.937) Cm (109:280)



รูป 4.65 การแตกตัวของไอออนที่สำคัญและ MSMS spectrum ของ 3,5,3'-trihydroxy-4'-methoxyflavone (F14) ที่ได้จากการวิเคราะห์สารสกัดจากรำข้าวดำพันธุ์ไทย ของพีคที่เวลาริเทนชัน 91.9 นาที ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ negative ion mode

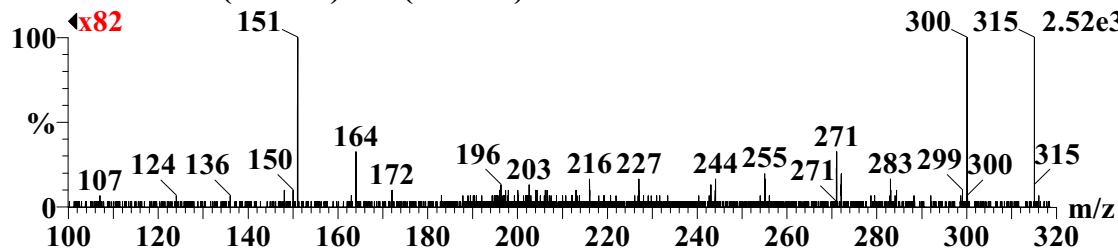


01-Mar-2007

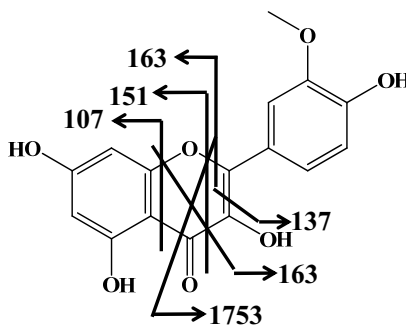
16815

11:24:49

TS01030701 142 (100.397) Cm (113:207)

15: TOF MSMS 315.00ES-
300 315 2.52e3

รูป 4.66 การแตกตัวของไอออนที่สำคัญและ MSMS spectrum ของ 3,5,7,3'-tetrahydroxy-4'-methoxyflavone (F15) ที่ได้จากการวิเคราะห์สารสกัดจากรำข้าวดำพันธุ์ไทย ของพีคที่เวลาริเทนชัน 100.3 นาที ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ negative ion mode

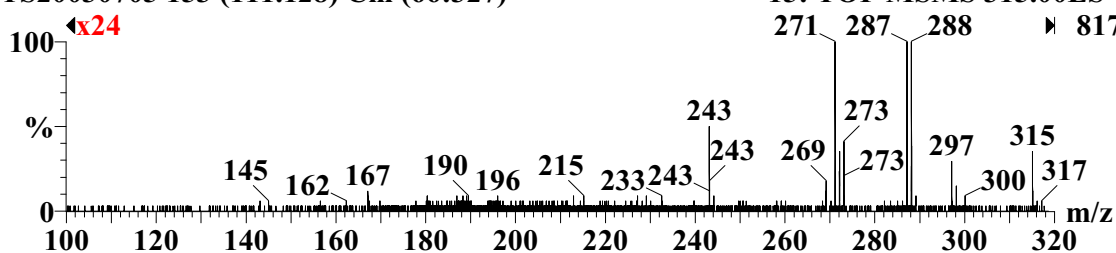


21-Mar-2007

1000 Ex. new MSMS3

02:29:24

TS20030705 153 (111.128) Cm (66:327)

15: TOF MSMS 315.00ES-
271 287 288 817

รูป 4.67 การแตกตัวของไอออนที่สำคัญและ MSMS spectrum ของ isorhamnetin (F16) ที่ได้จากการวิเคราะห์สารสกัดจากรำข้าวดำพันธุ์ไทย ของพืชที่เวลาริเทนชัน 111.1 นาที ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS แบบ negative ion mode

สาร flavonoids กลุ่ม flavanone, flavone และ flavonol ที่พบในสารสกัดจากรำข้าวดำทั้ง 7 พันธุ์คือ KHNBT No.3, rice berry, 16815, 1000-11-2-26, 49-6-6-6-10, 132-1-1-3-3-1-4-4, และ 132-1-1-4-1-1-1-3 นั้น มีปริมาณเล็กน้อยแตกต่างกันไป แบ่งเป็น 3 กลุ่มคือ flavonoids ที่พบในข้าวปริมาณสูงได้แก่ quercetin-3-*O*-glucoside, quercetin-3-*O*-rutinoside (rutin), และ isorhamnetin-3-*O*-glucoside กลุ่มที่สองพบในปริมาณน้อย ซึ่งโดยเฉลี่ยแล้วมีปริมาณน้อยกว่ากลุ่มแรกประมาณ 4-5 เท่า ได้แก่ 5,6,3',4',5'-pentahydroxyflavone-7-*O*-glucoside, taxifolin-3-*O*-glucoside, isorhamnetin-3-*O*-rutinoside, quercetin, isorhamnetin-3-*O*-acetylglucoside และ isorhamnetin aglycone และกลุ่มสุดท้ายพบในปริมาณน้อยมาก ได้แก่ 5,3',4',5'-tetrahydroxyflavone-7-*O*-glucoside, taxifolin aglycone, quertagetin-7-*O*-glucoside, myricetin-7-*O*-glucoside, 3,5,3'-trihydroxy-4'-methoxyflavone, และ 3,5,7,3'-tetrahydroxy-4'-methoxyflavone ส่วนรำของข้าวขาว KDML 105 ไม่พบ flavonoids เหล่านี้เลย รำของข้าวที่มีปริมาณรวมของฟลาโวนอยด์สูงที่สุดคือพันธุ์ 1000-11-2-26 รองลงไปก็คือ 16815 > rice berry > 132-1-1-3-3-1-4-4 > 49-6-6-6-10 > KHNBT No.3 > 132-1-1-4-1-1-1-3 ตามลำดับ

บทที่ 5

การหาโครงสร้าง ลักษณะเฉพาะ และปริมาณของฟลาโวนอยด์กลุ่ม แอนโธไซยานินในสารสกัดจากรำ ใบ และเมล็ดข้าวสาลีดำ

5.1 การวิเคราะห์ปริมาณ anthocyanin pigments ในรำข้าว

5.1.1 ตัวอย่างข้าวที่ใช้ทดลอง

รำของข้าวเจ้าสีดำ 3 พันธุ์คือ เจ้าหอมนิล BT (KHNB T), BT no. 3 (KHNB T No. 3), และ พันธุ์ 1000-11-2-26 และข้าวเหนียวดำพันธุ์ BD (KHNB D) ข้าวทั้งหมดปลูกที่มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ระหว่างปี 2548-2549

5.1.2 การสกัด anthocyanins pigments จากรำข้าว

สกัดรำข้าว 15 กรัมด้วย 0.1% formic acid ใน methanol ปริมาตร 100 mL โดยใช้วิธี sonication เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นกรองสารละลายและระเหยตัวทำละลายจนเหลือสารสกัดหยาบ ปริมาตร 2.0 mL

5.1.3 การแยกและวิเคราะห์ anthocyanins pigments ในสารสกัดจากรำข้าวด้วยเทคนิค HPLC-DAD และ HPLC-MS

สภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค HPLC

ทำการทดลองเพื่อหาสภาวะของเทคนิค HPLC-DAD และ LC-MS โดยเน้นการแยกเพื่อวิเคราะห์สารกลุ่ม anthocyanins สภาวะที่ได้แสดงดังตาราง 5.1 ซึ่งให้ผลการแยกองค์ประกอบของตัวอย่างสารสกัดจากรำข้าวสีดำพันธุ์ KHNB D แสดงในรูป 5.1

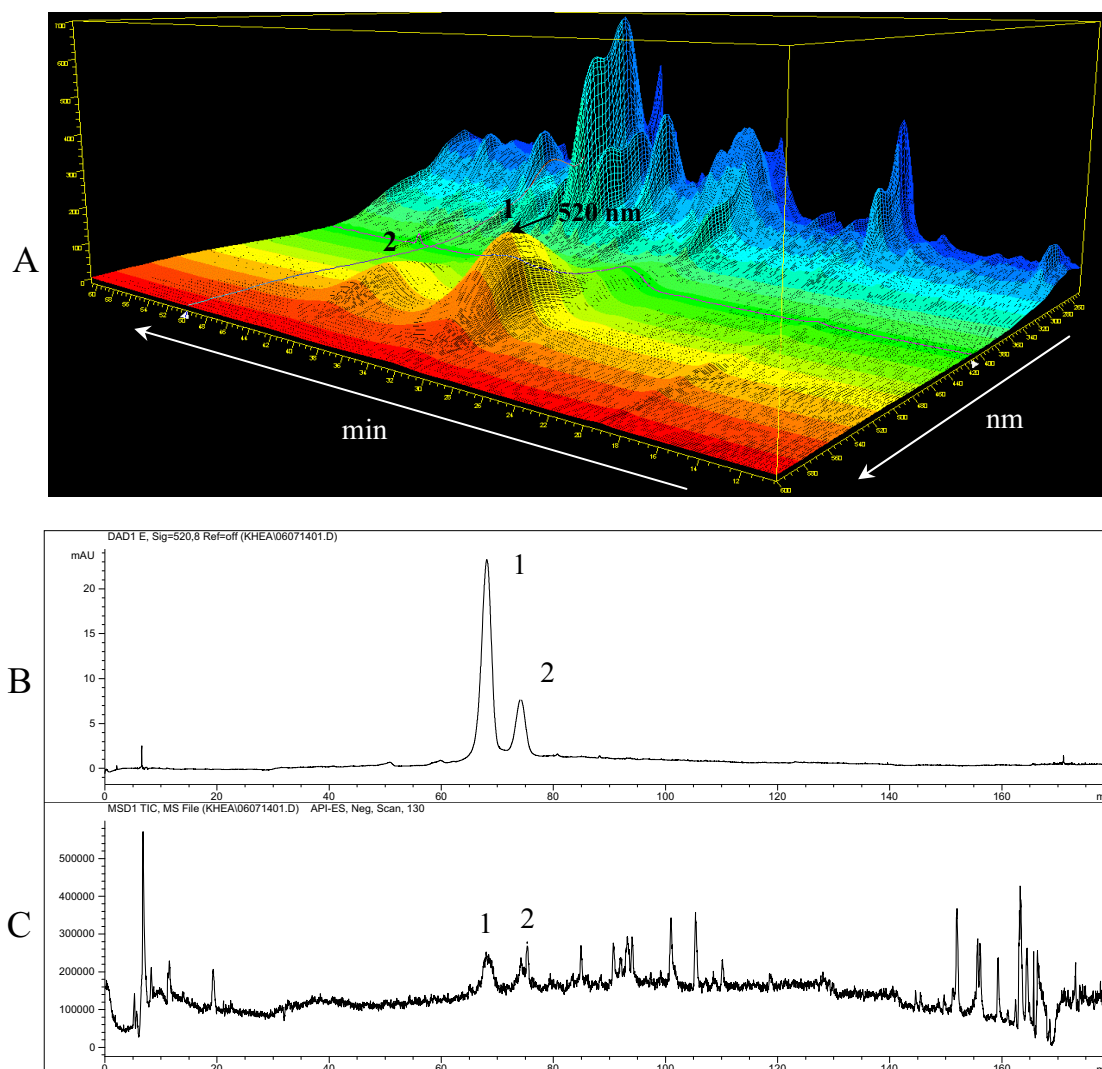
ตาราง 5.1 สภาวะที่เหมาะสมของการแยกสารกลุ่ม anthocyanins ในสารสกัดจากรำข้าวดำด้วยเทคนิค HPLC-DAD และ HPLC-MS

HPLC conditions:				
Instrument	Agilent HPLC system (Agilent Technologies, USA)			
Column	Eclipse XDB-C18, 3.5 μ m, 3.0 x 100 mm			
Mobile Phase	A:0.5% acetic acid in water B: methanol			
Gradient :	1-20	min	0	% B
	20-30	min	0-15	% B
	30-40	min	15	% B
	40-160	min	15-100	% B
	160-180	min	100	% B
Detector	PDA (wavelength 520 nm)			
Injection Volume	10 μ L			
Flow Rate	0.4 ml/min			

ตาราง 5.1 สภาวะที่เหมาะสมของการแยกสารกลุ่ม anthocyanins ในสารสกัดจากรำข้าวดำด้วยเทคนิค HPLC-DAD และ HPLC-MS (ต่อ)

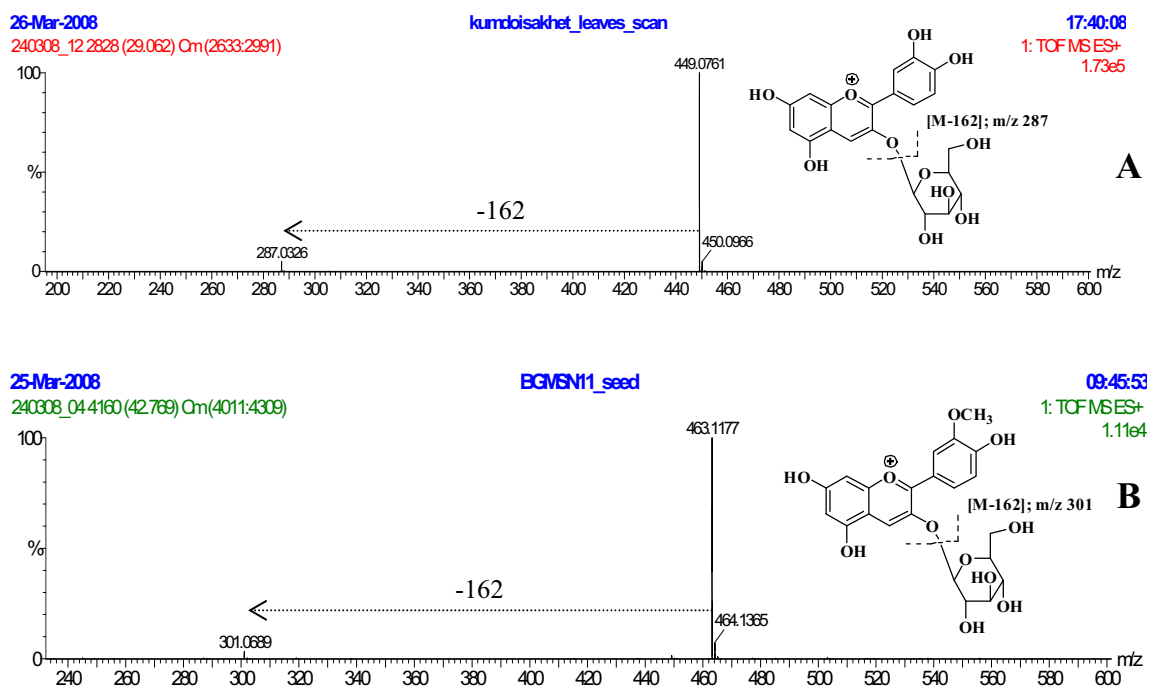
MS conditions:

Instrument	A single quadrupole mass spectrometer (Model G 1946 A, Agilent Technologies, USA)
Ionisation mode	Positive
Fragmentor voltage (V)	130
Capillary voltage (V)	4000
Nebulizer pressure (psi)	32
N ₂ Drying gas temperature (°C)	350
N ₂ Drying gas flow (L/min)	12
Collision energy (eV)	35
Mass range	50-1000



รูป 5.1 (A) HPLC-DAD chromatograms สามมิติของสารสกัดจากรำข้าวหอมนิลพันธุ์ BD ที่ scan ในช่วง 260-600 nm (B) HPLC-DAD chromatogram ที่ 520 nm และ (C) LC-MS total ion chromatogram (TIC) ของสารสกัดเดียวกัน

ผลจากการใช้ photodiode array เป็นตัวตรวจวัดของระบบ HPLC ทำให้สามารถ คาดคะเน retention times ของสารกลุ่ม anthocyanins ในสารสกัดจากรำข้าวได้ตำแหน่ง retention times 67.8 (peak 1) และ 74.2 (peak 2) นาที จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC-ESI-MS พบ mass spectrum ที่คาดคะเนว่าเป็นสาร anthocyanins (รูป 5.2) โดยให้ protonated molecular ion $[M+H]^+$ ที่ m/z 449 และ 463 ของ peak 1 และ 2 ตามลำดับ



รูป 5.2 Mass spectra ของ peak 1 (A) และ peak 2 (B) บน HPLC-MS total ion chromatogram ของสารสกัดจากรำข้าวหอมนิลพันธุ์ BD

Mass spectra ทั้งสองแสดง fragment ions ที่ m/z 287 และ 301 ซึ่งเกิดจากการสูญเสียมวลไป 162 amu เท่ากับการสูญเสีย glucose 1 โมเลกุล เนื่องจาก anthocyanidins ที่เกิดในธรรมชาติมีจำนวนไม่มากนัก และแต่ละสารมีน้ำหนักโมเลกุลเฉพาะตัว ดังนั้นไอออนที่เกิดจากการสูญเสียกลูโคส และมี m/z 287 และ 301 จึงคาดคะเนได้ว่าเป็นไอออนของ aglycone ของ cyanidin-*O*-glucoside และ peonidin-*O*-glucoside ตามลำดับ ตำแหน่งการเกิด glycylation ทำนายจากลักษณะของ mass spectrum ตามที่มีรายงานโดย Davis and Brodbelt^[55] ได้ในตำแหน่งที่ 3 ดังนั้น anthocyanins ที่พบในสารสกัดจากรำข้าวดำพันธุ์ KHNBD คือ aglycone ของ cyanidin-3-*O*-glucoside และ peonidin-3-*O*-glucoside อย่างไรก็ตามการยืนยันโครงสร้างของ anthocyanins ได้ทำการทดลองเพิ่มเติมโดยใช้เทคนิค LC-ESI-MS/MS

5.1.4 การระบุโครงสร้างของ anthocyanin pigments ในสารสกัดจากรำข้าวดำด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS

เนื่องจาก ESI-mass spectra ที่ได้ก่อนหน้านี้ มักไม่แสดงรายละเอียดของ fragmented ions มากนัก จึงไม่เป็นประโยชน์ต่อการพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสาร ดังนั้นการประยุกต์เทคนิค MS/MS เพื่อช่วยพิสูจน์โครงสร้างของสารองค์ประกอบที่สนใจ จะทำให้ผลการวิเคราะห์ที่ได้มีความถูกต้องแม่นยำยิ่งขึ้น สำหรับเครื่อง mass spectrometer ที่มี mass analyser สองตัว เช่น triple-stage quadrupole ต่อกับ time-of-flight (Q-TOF) จะสามารถให้ข้อมูล mass spectrum ลำดับที่สองที่เกิดจากการ fragmentation ของไอออนใด ๆ ที่สนใจใน fragmentation ครั้งแรก หรือ “parent ion” ได้ mass spectrum ของ daughter ions ที่มี fragment ions หลากหลายชิ้นและนำมาใช้ระบุเอกลักษณ์หรือโครงสร้างของสารที่สนใจได้ และเพื่อให้ได้ mass spectrum ของ daughter ions ที่มีรายละเอียดของ fragmented ions มากพอที่จะใช้เทียบเอกลักษณ์โครงสร้างของสารได้ การแตกตัวของไอออนที่เลือกเป็น parent ions จึงทำโดยการตกกระทบของโมเลกุลของแก๊สเฉื่อย เช่น N₂ หรือ Ar ลงบนไอออนที่ถูกเพิ่มพลังงานให้สูงขึ้น ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจึงเป็นแบบ bimolecular dissociation เรียกว่า “collision induced dissociation: CID” ดังนั้น mass spectrum ของ daughter ions จะมีรูปแบบของการแตกตัว (fragmentation pattern) ที่ต่างกัน หากพลังงานที่ให้กับ parent ion นั้นไม่เท่ากัน และหาก parent ion โครงสร้างของโมเลกุลที่เอื้อต่อการแตกพันธะจะทำให้เกิด daughter ions ขึ้นหลากหลายไอออน ซึ่งจะเป็นข้อมูล mass spectrum ที่มีประโยชน์ในการเปรียบเทียบเพื่อระบุหรือยืนยันโครงสร้างของสารได้เป็นอย่างดี

การทดลองเพื่อระบุโครงสร้างของสาร anthocyanins ในสารสกัดจากรำข้าวที่คาดว่าเป็น cyanidin-3-*O*-glucoside และ peonidin-3-*O*-glucoside นั้น ทำโดยหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดของระบบ MS/MS ของการวิเคราะห์สารแต่ละประเภท จากนั้นยืนยันโครงสร้างทางเคมีจาก fragmentation pathways ต่าง ๆ ที่เกิดใน mass spectrum ของ daughter ions สภาวะที่เหมาะสมของระบบ MS/MS มีดังนี้

Ion source (Electrospray ionization)

Capillary (kV)	3.0
Cone (eV)	30
Extractor (V)	10
RF Lens (V)	0.5
Source temperature (°C)	100
Desolvation temperature (°C)	200

MS 1 (Quadrupole)

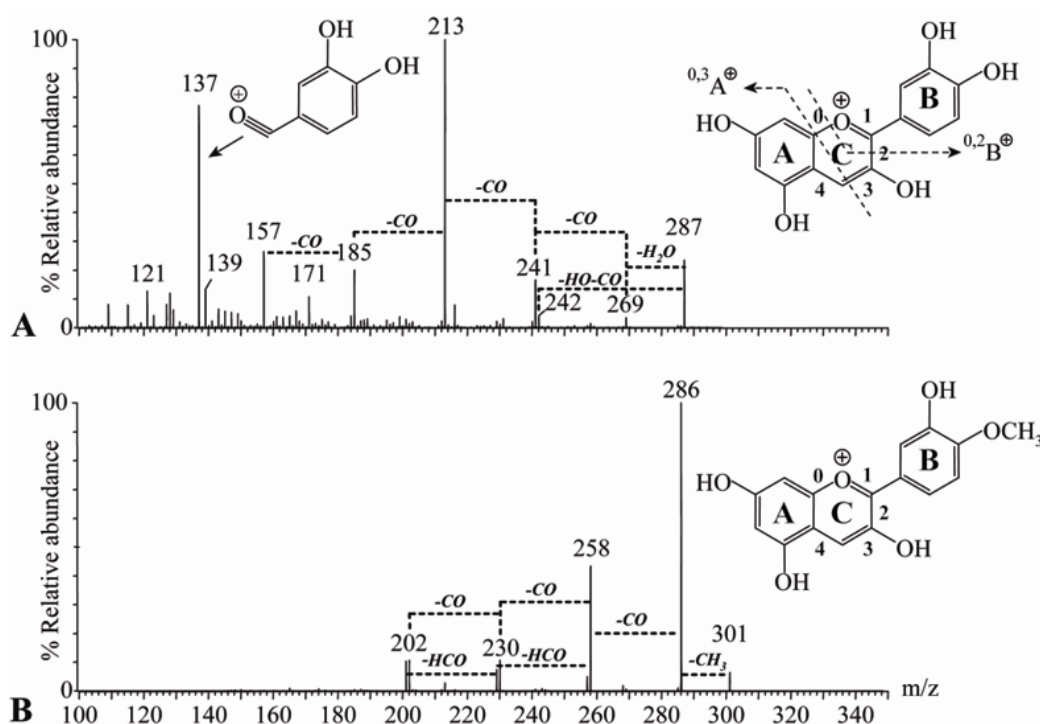
LM resolution	5.0
HM resolution	5.0
Collision energy (eV)	Varied according to the molecular ion of anthocyanins of interest
Ion energy (V)	2.0
Steering (V)	2.0

Entrance (eV)	65.0
Pre-filter (V)	5.0

MS 2 (Time-of-Fight)

Transport (V)	4.0
Aperture 2 (V)	14.6
Acceleration (V)	200
Pusher (V)	980
TOF (kV)	9.1
Reflectron	35.25
Pusher cycle time (μ s)	Auto
Pusher frequency (Hz)	16129.03
Multiplier (V)	650
MCP (V)	2000
Mass range	100-600

ผลการวิเคราะห์ได้ MS/MS spectra ของ parent ions ที่ m/z 287 และ 301 ขององค์ประกอบ anthocyanins ทั้งสององค์ประกอบในสารสกัดจากรำข้าว แสดงในรูป 5.3A และ 5.3B ตามลำดับ



รูป 5.3 Product ion mass spectra of anthocyanin aglycones ของ parent ions ที่ m/z 287 (A) และ 301 (B) วิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS (Q-TOF) โดยใช้ collision energy 35 eV

การเกิด fragmentation ของ parent ions ที่ m/z 287 พบว่าเกิดจากหลาย pathways เช่น การสูญเสียโมเลกุลของ H_2O ตามด้วย CO หรือ HCO_2 ส่วนไอออนที่ m/z 137 เกิดจาก ring cleavage ที่ตำแหน่ง 0 และ 2 ของ ring C เป็นต้น ในรูป 5.3B ซึ่งแสดง MS/MS spectrum ของ parent ions ที่ m/z 301 พบว่าเกิด fragment ions น้อยกว่าเมื่อใช้ collision energy เท่ากัน คือ 35 eV และ pathways ส่วนใหญ่เป็นการสูญเสีย neutral molecule เช่น CO และ radical เช่น HCO ค่า m/z ของ fragment ions ที่เป็นผลมาจาก fragmentation ดังกล่าวให้ผลสอดคล้องกับโครงสร้างของสาร anthocyanidins สองตัวคือ cyanidin และ peonidin ตามลำดับ และสอดคล้องกับที่ได้มีรายงานไว้^[56-57] องค์ประกอบ anthocyanins ที่พบในสารสกัดจากรำข้าวจึงยืนยันได้ว่าเป็น cyanidin-3-*O*-glucoside และ peonidin-3-*O*-glucoside

5.1.5 ปริมาณ cyanidin-3-*O*-glucoside และ peonidin-3-*O*-glucoside ในสารสกัดรำข้าว

ตัวอย่างรำข้าวปริมาณ 2.00 กรัม สกัดด้วยสารละลาย 0.1% formic acid ใน methanol ปริมาตร 25.0 mL โดยใช้วิธี sonication เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นกรองสารละลายและระเหยตัวทำละลายจนเหลือสารสกัดหยาบปริมาตร 2.0 mL

สภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค HPLC-MS ที่เน้นการตรวจวัดสารกลุ่ม anthocyanins หาโดยใช้สารมาตรฐาน cyanidin-3-*O*-glucoside ค่าที่เหมาะสมของตัวแปรต่างๆ ใน electrospray ionization source ที่มีผลต่อสภาพโวลของการตรวจวัดแสดงดังตาราง 5.2

ตาราง 5.2 สภาวะที่เหมาะสมของการแยกสารกลุ่ม anthocyanins ในสารสกัดจากรำข้าวดำด้วยเทคนิค HPLC-DAD และ HPLC-MS

HPLC conditions:				
Instrument	Agilent HPLC system (Agilent Technologies, USA)			
Column	Eclipse XDB-C18, 3.5 μ m, 3.0 x 100 mm			
Mobile Phase	A: 0.5% acetic acid in water B: methanol			
Gradient :	1-20	min	0	% B
	20-30	min	0-15	% B
	30-40	min	15	% B
	40-160	min	15-100	% B
	160-180	min	100	% B
Detector	PDA (wavelength 520 nm)			
Injection Volume	10 μ L			
Flow Rate	0.4 ml/min			

ตาราง 5.2 สภาวะที่เหมาะสมของการแยกสารกลุ่ม anthocyanins ในสารสกัดจากรำข้าวดำด้วยเทคนิค HPLC-DAD และ HPLC-MS (ต่อ)

MS conditions:	
Instrument	A single quadrupole mass spectrometer (Model G 1946 A, Agilent Technologies, USA)
Ion source	API-electrospray
Ionisation mode	Positive
Fragmentor voltage (V)	130
Capillary voltage (V)	4000
Nebulizer pressure (psi)	32
N ₂ Drying gas temperature (°C)	350
N ₂ Drying gas flow (L/min)	12
Collision gas	N ₂
Collision energy (eV)	35
Quadrupole temperature (°C)	100
Scan mode	SIM
Electron multiplier voltage (V)	2650

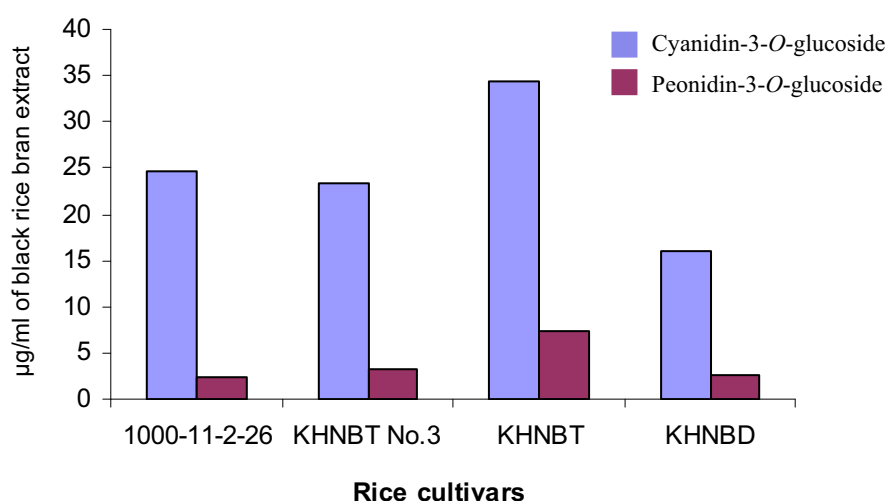
กราฟสารละลายมาตรฐานของ cyanidin-3-*O*-glucoside และ peonidin-3-*O*-glucoside ถูกสร้างขึ้นโดยเตรียมสารละลายของสารมาตรฐานดังกล่าวในช่วงความเข้มข้น 5.00-40.0 $\mu\text{g/mL}$ และวิเคราะห์ด้วย HPLC-MS ที่เก็บข้อมูลแบบ SIM mode ที่ m/z 449 และ 463 ซึ่งเป็น protonated molecular ions ($[M+H]^+$) ของ cyanidin-3-*O*-glucoside และ peonidin-3-*O*-glucoside ตามลำดับ เมื่อหาพื้นที่ใต้พีคเฉลี่ยที่แต่ละความเข้มข้น นำมาพล็อตกราฟ ได้กราฟเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นดังกล่าวของสารทั้งสอง ซึ่งมี regression equations เป็น $y = 182478x + 2E+06$ ($r^2 = 0.9983$) และ $y = 340917x + 4E+06$ ($r^2 = 0.9984$) สำหรับ cyanidin-3-*O*-glucoside และ peonidin-3-*O*-glucoside ตามลำดับ

ความเข้มข้นของ cyanidin-3-*O*-glucoside และ peonidin-3-*O*-glucoside ในสารสกัดจากรำข้าว 4 พันธุ์ หาโดยเทียบจากกราฟของสารละลายมาตรฐานทั้งสองนี้ และแสดงในตาราง 5.3 โดยได้แสดงเปรียบเทียบไว้ในกราฟรูป 5.4

ตาราง 5.3 ความเข้มข้นของ anthocyanin pigments ในสารสกัดจากรำข้าว

Black Rice Cultivar	Concentrations ($\mu\text{g/ml}$ of black rice bran extract) $\pm$ SD ^e	
	Anthocyanidin-3-glucoside	
	Cyanidin	Peonidin
1000-11-2-26	24.72 $\pm$ 1.54	2.43 $\pm$ 1.11
KHNBT No. 3	23.43 $\pm$ 2.50	3.31 $\pm$ 0.53
KHNBT	34.40 $\pm$ 2.22	7.36 $\pm$ 1.25
KHNBD	16.01 $\pm$ 0.97	2.67 $\pm$ 0.23

^e = Standard deviations of triplicate results



รูป 5.4 แสดงเปรียบเทียบปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside และ peonidin-3-O-glucoside ในสารสกัดจากรำข้าวสีดำ 4 พันธุ์

ความเข้มข้นของ cyanidin-3-O-glucoside ในสารสกัดจากรำข้าวทั้ง 4 พันธุ์ มีค่ามากกว่าความเข้มข้นของ peonidin-3-O-glucoside โดยเฉลี่ยประมาณ 6-10 เท่า สารสกัดของรำข้าวพันธุ์ KHNBT มีปริมาณของทั้ง cyanidin-3-O-glucoside และ peonidin-3-O-glucoside สูงกว่าในสารสกัดของข้าวพันธุ์อื่น รองลงมาคือพันธุ์ 1000-11-2-26 และ KHNBT No. 3 ซึ่งเป็นที่น่าสังเกตว่ารำข้าวพันธุ์ KHNBT ให้ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ความสามารถในการจับโลหะหนัก และปริมาณ total phenolics ต่ำที่สุดในบรรดาข้าวทั้ง 4 พันธุ์ (ผลในบทที่ 3) แสดงให้เห็นว่าสารทั้งสองมีบทบาทในกระบวนการดังกล่าวอย่างน้อยก็เท่ากับสารสำคัญกลุ่มอื่นที่มีในรำข้าว ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะความเข้มข้นในระดับที่ต่ำของ anthocyanin pigments ทั้งสองเทียบกับสารออกฤทธิ์กลุ่มอื่น เช่น vitamin E และ γ -oryzanol เป็นต้น

5.2 การหาโครงสร้าง ลักษณะเฉพาะ และปริมาณ anthocyanins ในสารสกัดจากใบและเมล็ดข้าวสีดํา

5.2.1 ตัวอย่างข้าวที่ใช้ทดลอง

ต้นข้าวพันธุ์ข้าวเหนียวกำปั่นเมือง 2 พันธุ์ คือ ก่ำดอยสะเก็ดและ BGMSN 11 ซึ่งมีความแตกต่างกันโดยพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ดมีกาบใบ ใบ และรวงข้าวเป็นสีม่วงเข้ม ส่วน BGMSN 11 กาบใบ ใบ และ รวงข้าวมีสีเขียว (รูป 5.5) ข้าวทั้ง 2 พันธุ์เพาะปลูกในแปลงทดลองปลูกพืช ของภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัย เชียงใหม่ ในช่วงปี 2549-2550 และ 2551 จากนั้นนำใบข้าวในระยะกล้า (seedling), ระยะแตกกอ (tillering) ระยะสร้างรวง (booting and heading) ระยะเมล็ดนํ้านม (milking) และระยะสุกแก่ทางสรีรวิทยา (mature grain) และเมล็ดข้าวในระยะเมล็ดนํ้านม ระยะเมล็ดแป้งแข็ง ระยะสุกแก่ทางสรีรวิทยา และระยะหลังเก็บเกี่ยว (ก่อนลดความชื้น) มาทำการทดลองต่อไป



(A)



(B)

รูป 5.5 ลักษณะสีของใบ กาบใบ และรวงข้าวพันธุ์ (A) BGMSN 11 และ (B) ก่ำดอยสะเก็ด

5.2.2 การสกัด anthocyanins จากใบและเมล็ดข้าว

สกัดใบหรือเมล็ดข้าวที่บดละเอียดจำนวน 10 กรัม ด้วย 0.5% formic acid ใน methanol ปริมาตร 100 mL โดยใช้วิธี sonication เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นกรองสารละลายและระเหยตัวทำละลายจนเหลือสารสกัดหยาบปริมาตร 2.0 mL

5.2.3 การแยกและวิเคราะห์ anthocyanins ในสารสกัดจากใบและเมล็ดข้าวดำด้วย

เทคนิค HPLC-DAD และ HPLC-MS

สภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค

ทำการทดลองเพื่อหาสภาวะของเทคนิค HPLC-DAD และ HPLC-MS โดยเน้นการแยกเพื่อวิเคราะห์สารกลุ่ม anthocyanins สภาวะที่ได้แสดงดังตาราง 5.4 ซึ่งให้ผลการแยกองค์ประกอบของตัวอย่างสารสกัดจากใบข้าวสีดําพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ดแสดงในรูป 5.6

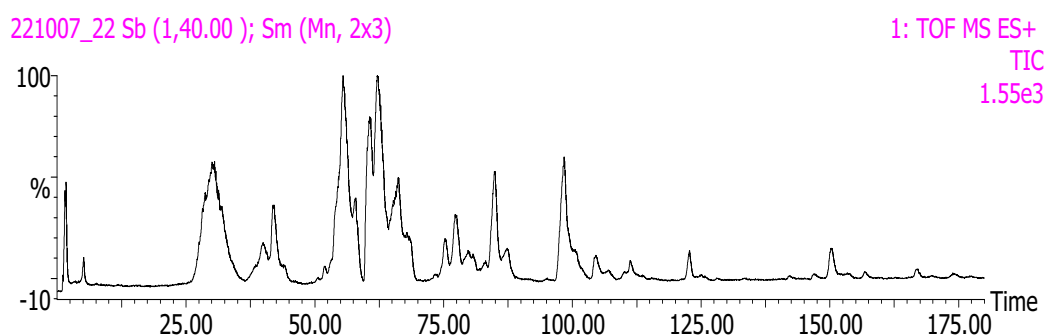
ตาราง 5.4 สภาวะที่เหมาะสมของการแยกสารกลุ่ม anthocyanins ในสารสกัดจากใบและเมล็ดข้าว
ดำด้วยเทคนิค HPLC-DAD และ HPLC-MS

HPLC conditions:

Instrument	Agilent HPLC system (Agilent Technologies, USA)
Column	Zorbax eclipse plus C ₁₈ (4×100 mm, 3 μm)
Mobile Phase	A: methanol B: 0.5 % acetic acid in water
Gradient :	90% - 55% of 0.5 % acetic acid in water : methanol
Detector	PDA (wavelength 520 nm)
Injection Volume	10 μL
Flow Rate	0.4 ml/min

MS conditions:

Instrument	A single quadrupole mass spectrometer (Model G 1946 A, Agilent Technologies, USA)
Ionisation mode	Positive
Quadrupole temperature (°C)	100
Fragmentor voltage (V)	110
Capillary voltage (V)	3500
Nebulizer pressure (psi)	30
N ₂ Drying gas temperature (°C)	350
N ₂ Drying gas flow (L/min)	12
Mass range	100-1000



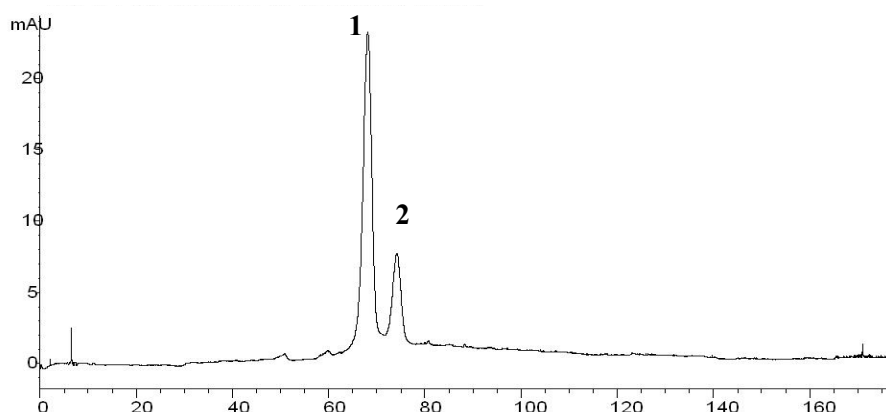
รูป 5.6 HPLC-MS chromatogram ของสารสกัดจากใบข้าวสีดำพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ด วิเคราะห์โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมดังแสดงในตาราง 5.4

สภาวะที่เหมาะสมของการแยกองค์ประกอบในสารสกัดจากใบและเมล็ดข้าวสีดำที่ได้นี้ นำมาใช้ในการทดลองต่อไปในหัวข้อการระบุโครงสร้างของ anthocyanins ด้วยเทคนิค HPLC-DAD, HPLC-ESI-MS และ HPLC-ESI-MS/MS

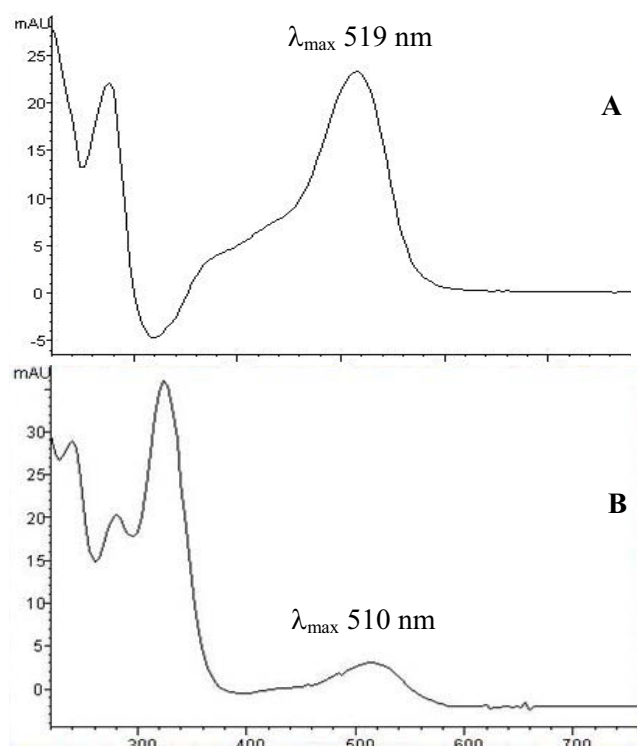
5.2.4 การระบุโครงสร้างของ anthocyanins ในสารสกัดจากใบและเมล็ดข้าวดำด้วย เทคนิค HPLC-DAD

ระบบ HPLC ที่มีตัวตรวจวัดเป็น diode-array detection (DAD) เป็นที่นิยมในการใช้ตรวจหา (screening) องค์ประกอบที่สนใจในสารสกัดหยาบ ก่อนที่จะทำการทดลองในลำดับต่อไป อย่างไรก็ตาม สารที่ตรวจหาควรมีโครงสร้างที่สามารถดูดกลืนรังสี UV-Visible และให้ spectrum ที่มีลักษณะเฉพาะตัวหรือเฉพาะกลุ่มสาร สารในกลุ่ม flavonoids ส่วนใหญ่มีโครงสร้างที่สามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ได้จาก UV-Vis spectrum ที่ได้จาก DAD ได้ดี จึงสามารถประยุกต์ HPLC-DAD ในการตรวจหาตำแหน่งของ flavonoids ใน HPLC profile ได้

การทดลองแยกองค์ประกอบในสารสกัดหยาบของเมล็ดข้าวสีพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ดด้วย HPLC-DAD และให้แสดงผล chromatogram ที่ความยาวคลื่น 254 nm พบว่าในสารสกัดมีหลายองค์ประกอบ แต่เมื่อให้แสดงผล chromatogram ที่ความยาวคลื่น 520 nm ซึ่งเป็นช่วงความยาวคลื่นเฉพาะของสารกลุ่ม anthocyanins และองค์ประกอบอื่นไม่ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นดังกล่าว ทำให้สามารถแยกแยะเฉพาะองค์ประกอบ anthocyanins ออกมาอย่างเด่นชัด และเมื่อทราบ retention times ของ anthocyanins ดังกล่าว สามารถเรียก UV-Vis spectrum ออกมาระบบเก็บข้อมูลเพื่อวิเคราะห์เทียบและพิสูจน์โครงสร้างของสารในเบื้องต้นได้ ซึ่งพบว่าเมล็ดข้าวสีดำพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ดมีสาร anthocyanins เป็นองค์ประกอบหลัก 2 สาร (รูป 5.7) และสารดังกล่าวให้ UV-Vis spectra (รูป 5.8) ที่สอดคล้องกับโครงสร้างของ anthocyanin-3-O-glucoside



รูป 5.7 HPLC-DAD chromatogram ที่ความยาวคลื่น 520 nm ของสารสกัดจากเมล็ดข้าวสีดำพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ด



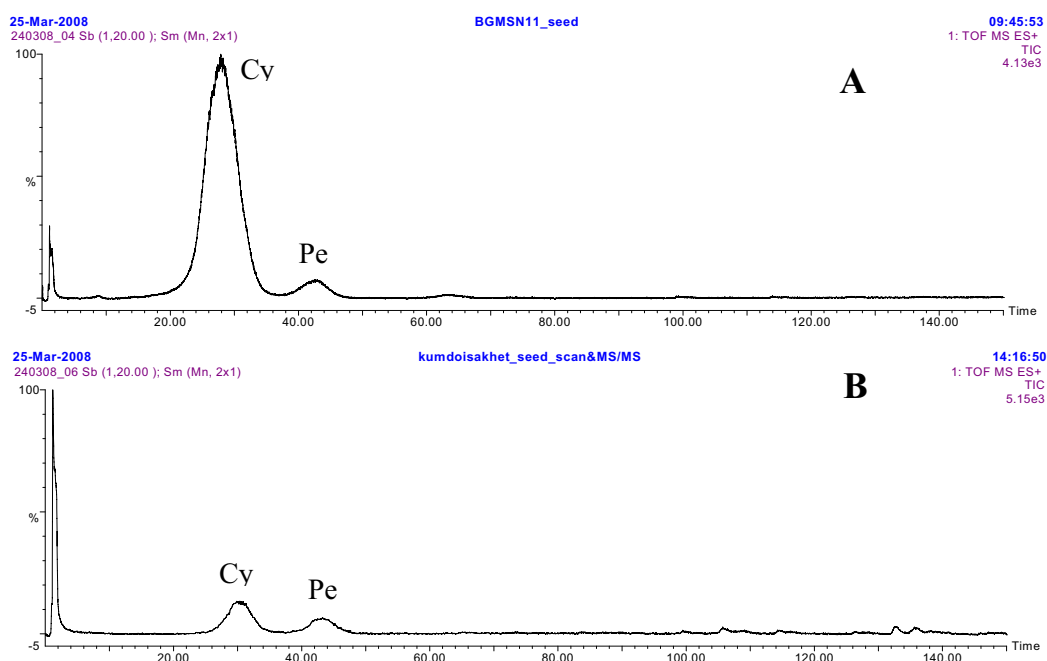
รูป 5.8 UV-Vis spectra ขององค์ประกอบใน peak 1 (A) และ peak 2 (B) บน HPLC-DAD chromatogram ที่ความยาวคลื่น 520 nm (รูปบน) ของสารสกัดจากเมล็ดข้าวสีดำพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ด

อย่างไรก็ตาม เนื่องจาก anthocyanins มีความหลากหลายของโครงสร้างขึ้นกับชนิดและตำแหน่งของน้ำตาลที่มาเกาะกับ aglycone จึงทำให้การใช้ UV-Vis spectrum อย่างเดียวไม่เพียงพอในการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางโครงสร้างหรือลักษณะเฉพาะของสารกลุ่มนี้ การทดลองต่อไปจึงได้ประยุกต์เทคนิค HPLC-ESI-MS ในการ screening ตำแหน่งของ anthocyanins และ HPLC-ESI-MS/MS เพื่อใช้ product ion mass spectrum ในการวิเคราะห์โครงสร้างของ anthocyanins ในสารสกัดหยาบของตัวอย่างใบและเมล็ดข้าวต่อไป

5.2.5 การระบุโครงสร้างของ anthocyanins ในสารสกัดจากใบและเมล็ดข้าวดำด้วยเทคนิค HPLC-ESI-MS

Anthocyanins ในเมล็ดข้าวสีดำ

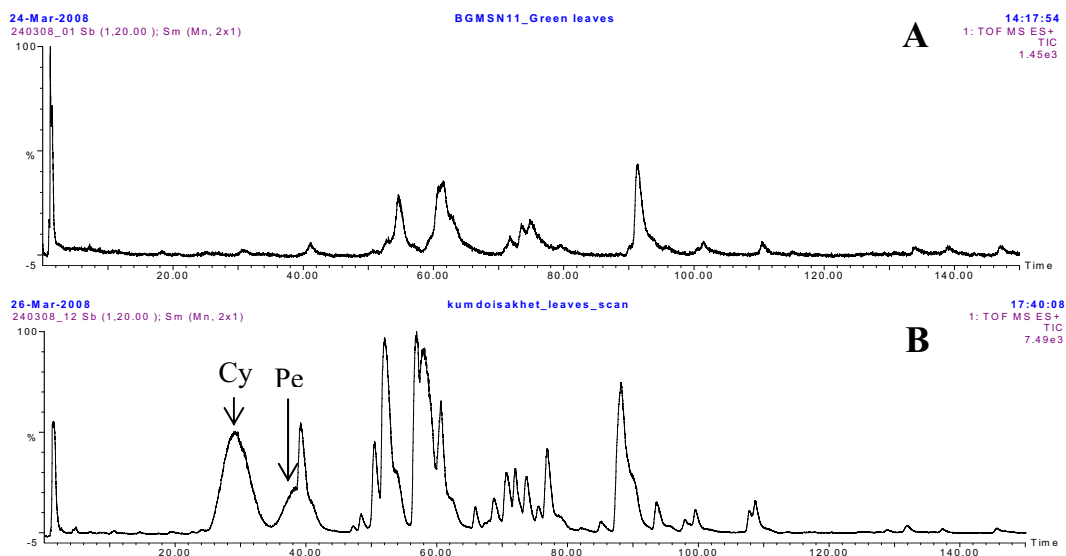
การทดลองเพื่อระบุโครงสร้างของสาร anthocyanins ในสารสกัดจากเมล็ดข้าวสีดำพันธุ์กำดอยสะเก็ด และ BGMSN 11 ด้วยเทคนิค HPLC-ESI-MS มีรายละเอียดการทดลองเช่นเดียวกับในหัวข้อ 5.1.4 ให้ Total Ion Chromatogram (TIC) แสดงในรูป 5.9 พบ anthocyanins จำนวน 2 องค์ประกอบหลักคือ cyanidin-3-*O*-glucoside และ peonidin-3-*O*-glucoside ในเมล็ดข้าวทั้งสองพันธุ์ เช่นเดียวกับที่พบในรากของข้าวดำพันธุ์ KHNBT, KHNBT No. 3, KHNBD และ 1000-11-2-26



รูป 5.9 HPLC-ESI-MS chromatogram ของสารสกัดจากเมล็ดข้าวสีดำพันธุ์ (A) BGMSN 11 และ (B) กำดอยสะเก็ด (Cy = cyanidin-3-*O*-glucoside; Pe = peonidin-3-*O*-glucoside)

Anthocyanins ในใบข้าวสีดำ

สารสกัดจากใบของข้าวสีดำพันธุ์กำดอยสะเก็ด และ BGMSN 11 วิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC-ESI-MS (Time-of-flight) โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมดังในการทดลอง 5.1.4 ให้ TIC แสดงในรูป 5.10



รูป 5.10 HPLC-ESI-MS chromatogram ของสารสกัดจากใบข้าวสีดำพันธุ์
(A) BGMSN 11 และ (B) กำดอยสะเก็ด
(Cy = cyanidin-3-*O*-glucoside; Pe = peonidin-3-*O*-glucoside)

พบ cyanidin-3-*O*-glucoside และ peonidin-3-*O*-glucoside เฉพาะในใบข้าวสีดำพันธุ์กำดอยสะเก็ด ร่วมกับองค์ประกอบอื่นๆ อีกหลายองค์ประกอบรวมทั้งองค์ประกอบที่คาดว่าจะเป็ สารกลุ่ม anthocyanins ทั้งนี้ใช้วิธีการตรวจหาโดยการวิเคราะห์ข้อมูลแบบ extracted ion chromatogram (mass chromatogram) องค์ประกอบบน TIC ของสารสกัดจากข้าวทั้งสองพันธุ์ที่ให้ ไอออนที่มี m/z เท่ากับ molecular ion ของ anthocyanins โครงสร้างต่าง ๆ แสดงในตาราง 5.5

ตาราง 5.5 พืดของสารที่เป็นองค์ประกอบของสารสกัดจากใบข้าวดำที่มีค่า m/z เท่ากับ molecular ion ของ anthocyanins

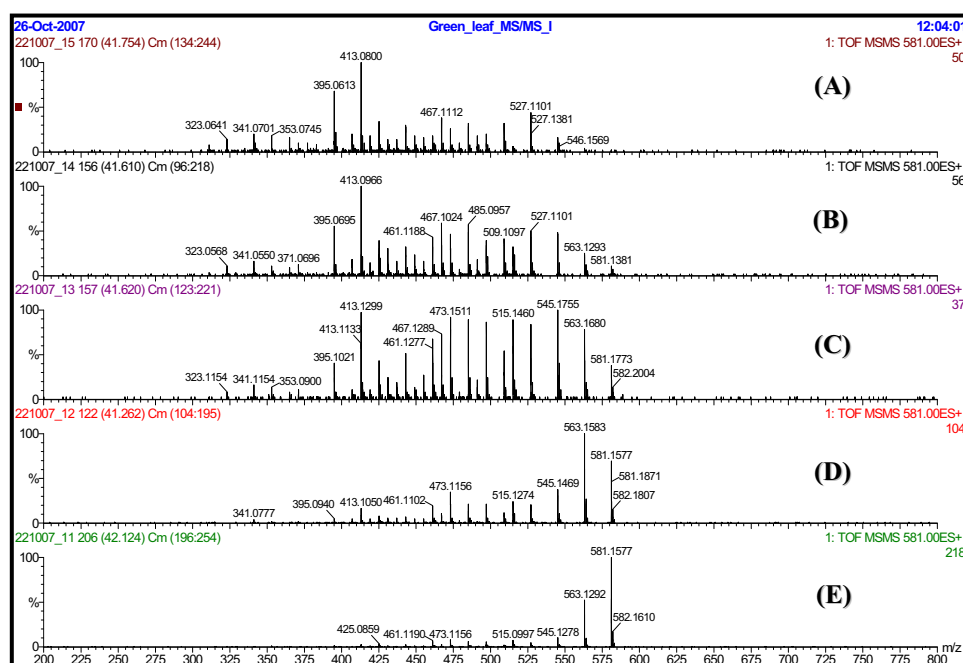
Peak no.	Retention Time (min)	$[M]^+$ (m/z)	ESI ⁽⁺⁾ MS (m/z)
1	29.062	449	449 287
2	38.839	595	595 581
3	42.769	463	463 301
4	50.526	581	581
5	52.124	581	581
6	56.925	611	611 449
7	65.939	733	733 449 287
8	72.009	757	757 449 287
9	72.202	787	787 625287
10	75.027	625	625 463 433
11	88.916	801	801 493 331
12	92.032	741	741 493 331 219

5.2.6 การระบุโครงสร้างของ anthocyanins ในสารสกัดจากใบและเมล็ดข้าวดำด้วยเทคนิค HPLC-ESI-MS/MS

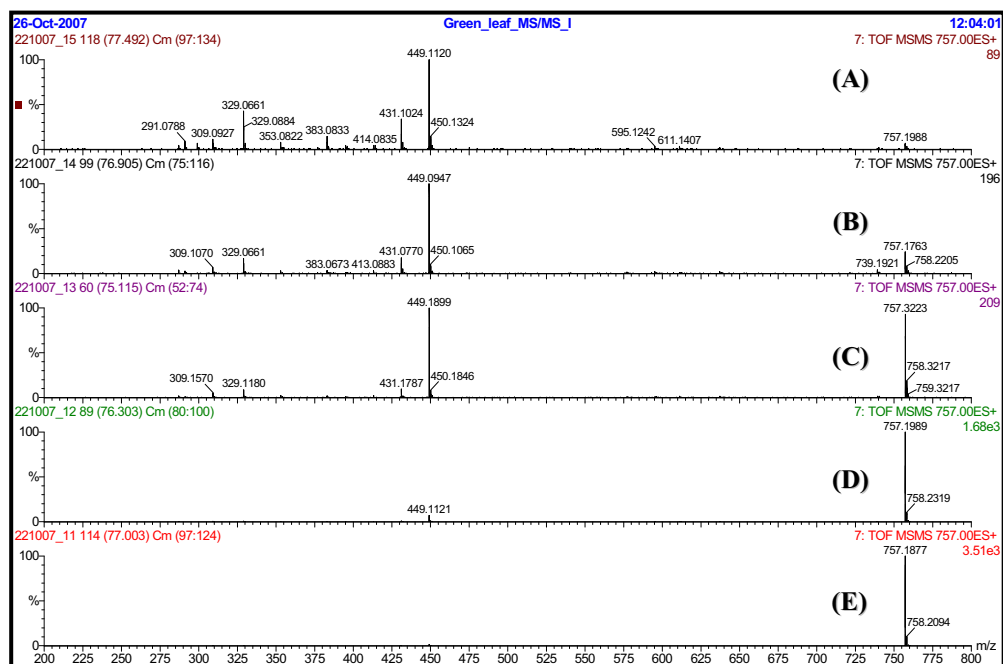
สภาวะที่เหมาะสมของการแตกไอออนด้วยเทคนิค Collision Induced Dissociation (CID)

เทคนิค MS/MS สามารถคัดเลือก molecular ion ของสารองค์ประกอบที่สนใจเพียงสารเดียวจากหลายๆ องค์ประกอบในสารสกัดโดยใช้ mass analyser ตัวแรก และทำให้เกิดการแตกเป็น fragment ions ย่อยๆ ด้วยเทคนิค CID จากนั้น fragment ions ย่อยเหล่านี้ (ซึ่งเรียกว่า product หรือ daughter ions) จะถูกนำไปยัง mass analyser ตัวที่สองเพื่อแยกและวิเคราะห์มวลของแต่ละไอออนได้ MS/MS mass spectrum ที่มีความหลากหลายของข้อมูลต่อไปนั้น เนื่องจากพลังงานของไอออนขณะเกิดการชน (collision energy) ใน CID มีผลต่อการแตกตัวของไอออน ดังนั้นการเลือกพลังงานที่เหมาะสมจะทำให้ได้คุณภาพของ MS/MS spectra ตามที่ต้องการ

การทดลองในหัวข้อนี้จึงหาค่าพลังงานการชน (collision energy) ที่เหมาะสม ของสาร anthocyanins แต่ละกลุ่ม เพื่อให้ได้ product ion mass spectrum (MS/MS spectrum) ที่มีข้อมูลเหมาะสมแก่การพิสูจน์โครงสร้างหรือหาลักษณะเฉพาะของสาร anthocyanins ทำโดยกำหนดค่า collision energy ในช่วงใดช่วงหนึ่ง และพิจารณา MS/MS spectra ที่ได้ ดังตัวอย่างที่ได้ทำการทดลองกับ cyanidin-3-*O*-xyloside glucoside และ cyanidin-3-*O*-(*p*-coumaroyl)glucoside-5-*O*-glucoside ในรูป 5.11 และ 5.12 ได้ collision energy ที่เหมาะสม คือ 20 และ 25 eV ตามลำดับ



รูป 5.11 Product ion mass spectra ของ cyanidin-3-*O*-xyloside glucoside ได้จาก ESI-MS/MS (Q-TOF) ของไอออนที่ m/z 581 ใช้ collision energy: (A) 25 V, (B) 22 V, (C) 20 V, (D) 17 V และ (E) 15 V



รูป 5.12 Product ion mass spectra ของ cyanidin-3-*O*-(*p*-coumaroyl)glucoside -5-*O*-glucoside ได้จาก ESI-MS/MS (Q-TOF) ของไอออนที่ m/z 757 ใช้ collision energy: (A) 25 V, (B) 22 V, (C) 20 V, (D) 17 V และ (E) 15 V

ผลของค่า collision energy ที่เหมาะสมของสาร anthocyanins แต่ละกลุ่มโครงสร้างแสดงดังตาราง 5.6

ตาราง 5.6 ค่า collision energy ที่เหมาะสมของ anthocyanins แต่ละกลุ่มโครงสร้าง

Group type of anthocyanins	Optimal collision energy (eV)
anthocyanin-3- <i>O</i> -glucoside (monoglucoside)	15
anthocyanin-3- <i>O</i> -diglucoside	20
anthocyanin-3- <i>O</i> -diglucoside-5- <i>O</i> -glucoside and anthocyanin-3- <i>O</i> -acylate-glucoside	25

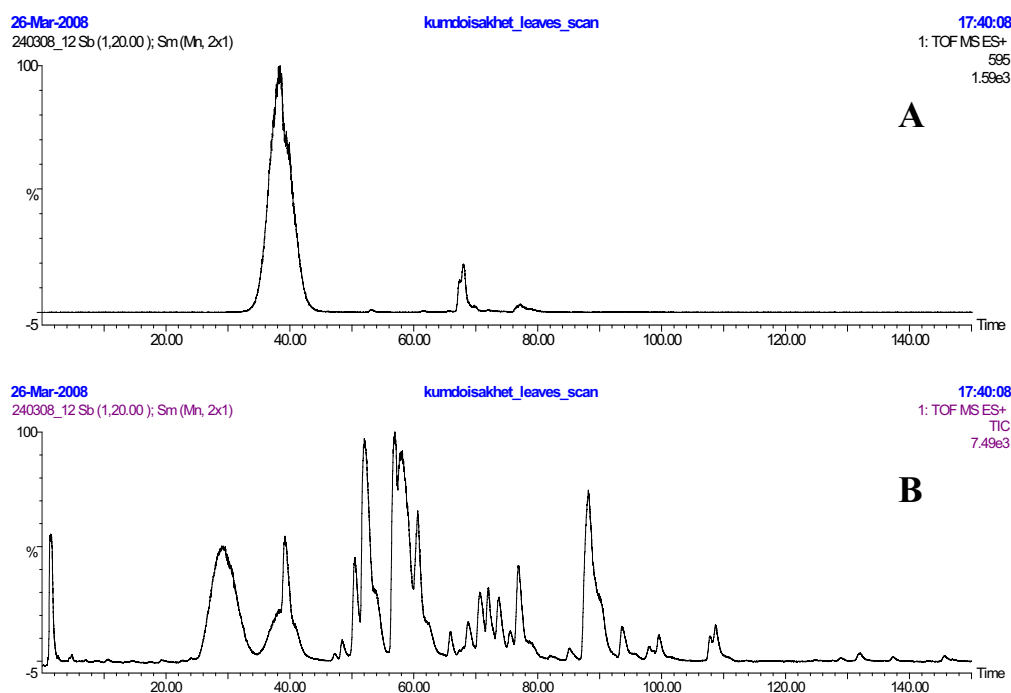
การระบุโครงสร้างของ anthocyanin ที่มี $[M]^+$ 595:

Cyanidin-3-*O*-glucoside-5-*O*-rhamnoside

องค์ประกอบในสารสกัดของข้าวพันธุ้เก่าดอยสะเก็ดที่ให้ molecular ion ที่ m/z 595 เมื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC-ESI-MS พบที่ตำแหน่ง retention time 38.83 min (รูป 5.13) ซึ่งคาดว่าจะเป็นสาร cyanidin glucoside rhamnoside ที่มีน้ำหนักโมเลกุล (MW) 595 จากการทำ CID ของ

parent ion ที่ m/z 595 พบว่าให้ MS/MS spectrum ดังรูป 5.14 ซึ่งประกอบด้วยไอออน m/z 287 และ 449 ซึ่งได้พิสูจน์โครงสร้างแล้วคือ cyanidin aglycone และ cyanidin glucoside ผลต่างระหว่างไอออนที่ m/z 449 และ 595 ให้ค่าเท่ากับน้ำหนักโมเลกุลของ rhamnose ดังนั้น anthocyanin นี้จึงมีโครงสร้างประกอบด้วย cyanidin aglycone + glucose + rhamnose

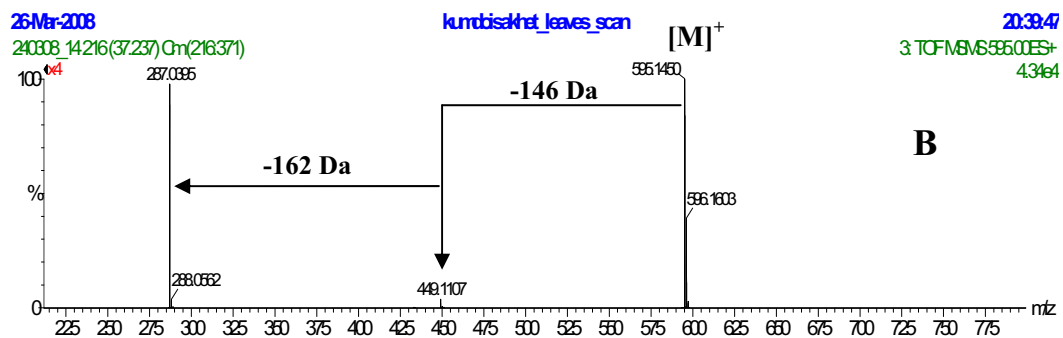
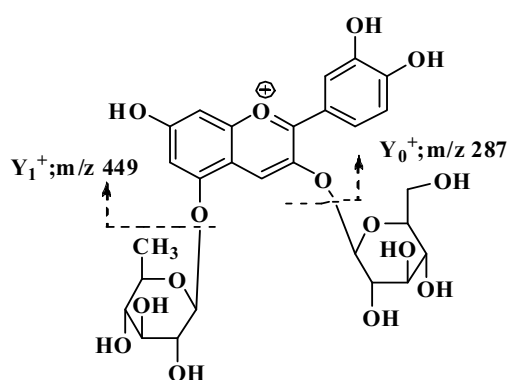
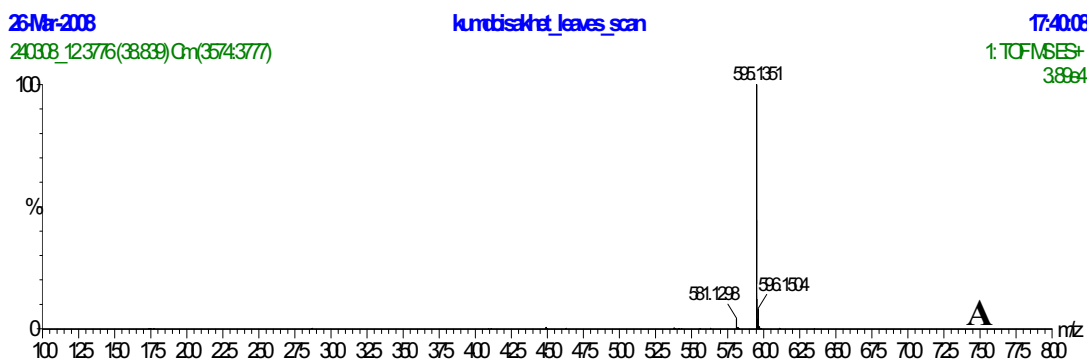
เนื่องจากไม่พบ fragmentation ในโมเลกุลของน้ำตาลซึ่งจะให้ไอออนที่ [M-90] และ [M-120] และเป็นลักษณะของ C-glycosidic linkage ดังนั้น จึงสรุปได้ว่า cyanidin และ glucose ต่อกันด้วย O-glycosidic linkage เช่นเดียวกับ cyanidin และ rhamnose โดยธรรมชาติพบว่า anthocyanins ส่วนใหญ่น้ำตาล glucose ต่อที่ตำแหน่งที่ 3 และหาก anthocyanins เป็นประเภท di-monoglycoside น้ำตาลตัวที่สองจะต่อเข้าที่ตำแหน่งที่ 5 โดยที่ตำแหน่งทั้งสองนี้จะไม่เอื้อให้เกิด fragmentation ภายในโมเลกุลของน้ำตาลทั้งสอง ทำให้ไม่เห็น fragment ion ย่อยๆ ซึ่ง MS/MS spectrum ที่ได้ของ anthocyanin นี้ให้ผลสอดคล้องกัน ดังนั้น anthocyanin นี้จึงมีโครงสร้างเป็น cyanidin-3-*O*-glucoside-5-*O*-rhamnoside



รูป 5.13 HPLC-ESI-MS chromatogram ของสารสกัดจากใบข้าวสาลีดำพันธุ์เก่าดอยสะเก็ด

(A) mass chromatogram; m/z 595 แสดงตำแหน่งของ peak ที่ 38.83 min

(B) Total ion chromatogram

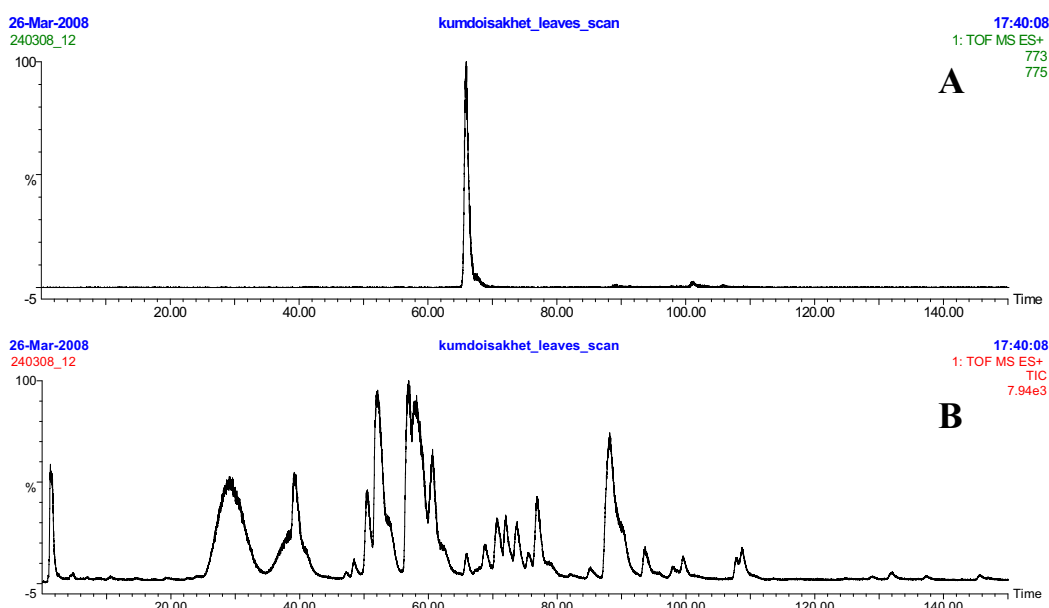


รูป 5.14 ESI-MS (A) และ ESI-MS/MS (B) mass spectra ของ peak ที่ 38.83 min บน chromatogram ของสารสกัดจากใบข้าวสาลีดำพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ด

การระบุโครงสร้างของ anthocyanin ที่มี $[M]^+$ 773:
Cyanidin-3-*O*-diglucoside-5-*O*-glucoside

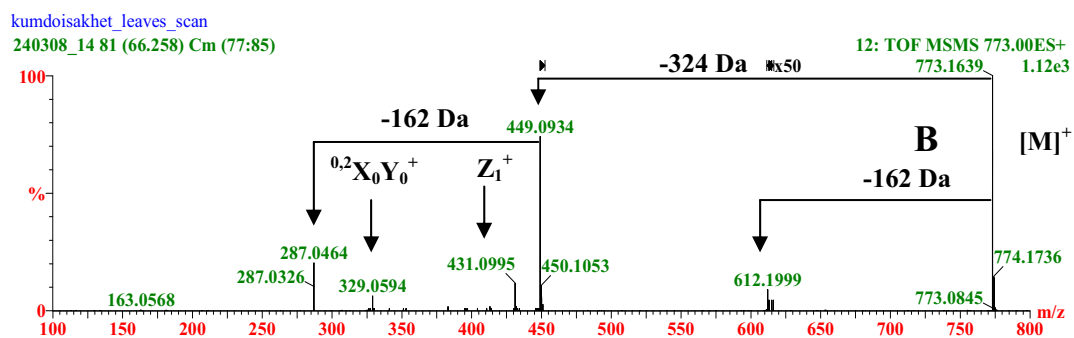
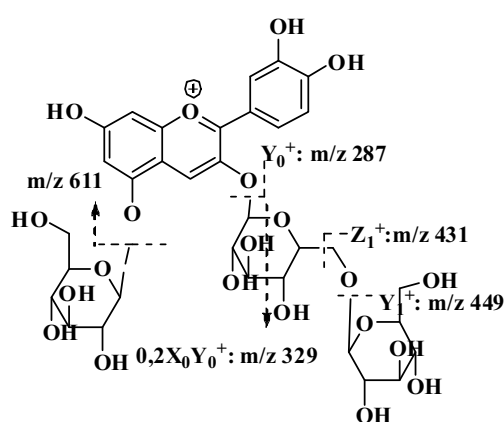
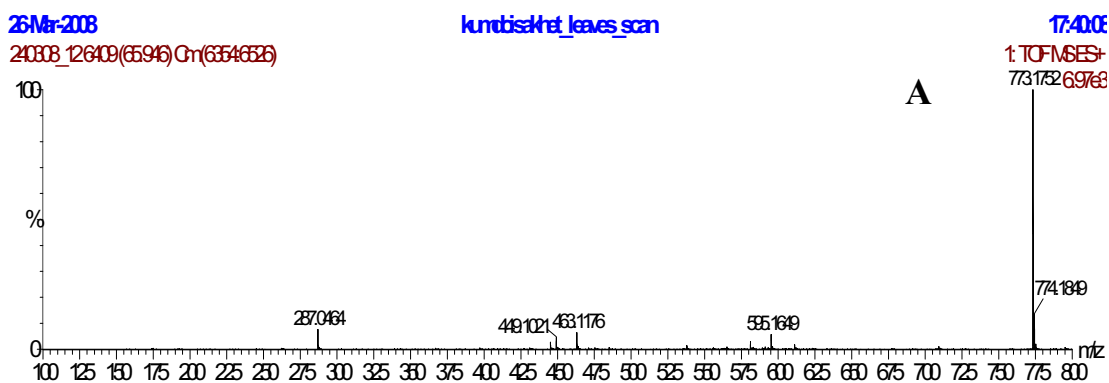
องค์ประกอบในสารสกัดของข้าวพันธุ์เก่าดอยสะเก็ดที่ให้ molecular ion ที่ m/z 773 เมื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC-ESI-MS พบที่ตำแหน่ง retention time 65.93 min (รูป 5.15) นอกจากนี้พบไอออนที่ 449 และ 287 จึงคาดว่าน่าจะเป็นสาร cyanidin triglucoside ที่มีน้ำหนักโมเลกุล (MW) 773 จากการทำ CID ของ parent ion ที่ m/z 773 พบว่าให้ MS/MS spectrum ดังรูป 5.16 ซึ่งประกอบด้วยไอออน m/z 773, 612, 449, 431, 329, และ 287 ไอออน 449 และ 287 พิสูจน์โครงสร้างแล้วคือ cyanidin glucoside และ cyanidin aglycone ผลต่างระหว่างไอออนที่ m/z 449, 612 และ 773 ให้ค่าเท่ากับน้ำหนักโมเลกุลของ glucose + glucose ตามลำดับ ดังนั้น anthocyanin นี้จึงมีโครงสร้างประกอบด้วย cyanidin aglycone + 3 glucoses

เนื่องจากไม่พบ fragmentation ในโมเลกุลของน้ำตาลซึ่งจะให้ไอออนที่ $[M-90]$ และ $[M-120]$ และเป็นลักษณะของ C-glycosidic linkage ดังนั้น จึงสรุปได้ว่า cyanidin และ glucose ต่อกันด้วย O-glycosidic linkage น้ำตาล glucose 2 ตัวต่อกับ cyaniding ที่ตำแหน่งที่ 3 และ 5 โดยที่ตำแหน่งทั้งสองนี้จะไม่เอื้อให้เกิด fragmentation ภายในโมเลกุลของน้ำตาลทั้งสอง จึงไม่เห็นไอออนย่อยระหว่างไอออนที่ m/z 449-612 และ 612-773 ส่วน glucose อีกโมเลกุลหนึ่งต่อเข้ากับ 3-*O*-glucose เป็นโครงสร้างของ mono-diglucoside ทำให้เห็น fragment ion ย่อยๆ ที่ m/z 431 (Z_1^+) และ 329 ($^{0,2}X_0Y_1^+$) สอดคล้องกับที่รายงานโดย Cuyckens และ Claeys^[64] ดังนั้น anthocyanin นี้จึงมีโครงสร้างเป็น cyanidin-3-*O*-diglucoside-5-*O*-glucoside



รูป 5.15 HPLC-ESI-MS chromatogram ของสารสกัดจากใบข้าวสีดำพันธุ์เก่าดอยสะเก็ด
(A) mass chromatogram; m/z 773 แสดงตำแหน่งของ peak ที่ 65.93 min

(B) Total ion chromatogram



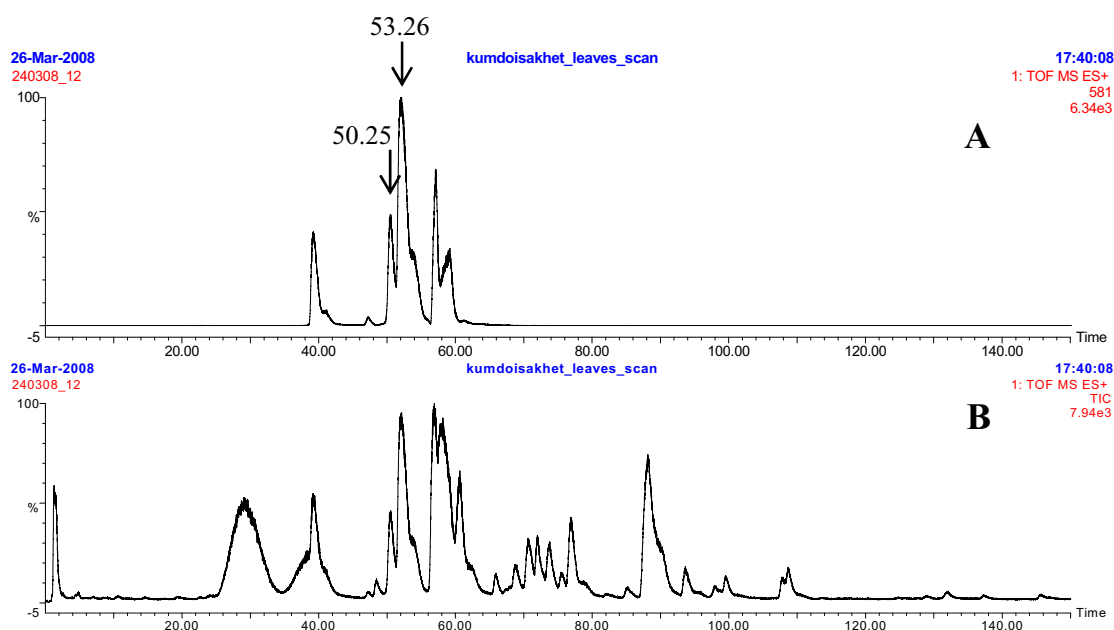
รูป 5.16 ESI-MS (A) และ ESI-MS/MS (B) mass spectra ของ peak ที่ 65.93 min บน chromatogram ของสารสกัดจากใบข้าวสาคูดำพันธุ์กุ่มดอยสะแก

การระบุโครงสร้างของ anthocyanin ที่มี $[M]^+$ 581:

Cyanidin-3-*O*-xyloside glucoside

องค์ประกอบในสารสกัดของข้าวพันธุ์เก่าโดยสะกัดที่ให้ molecular ion ที่ m/z 581 เมื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC-ESI-MS พบที่ตำแหน่ง retention time 50.25 และ 53.26 min (รูป 5.17) ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นสาร cyanidin-3-*O*-xyloside glucoside จำนวน 2 ไอโซเมอร์ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันคือ 581 MS/MS spectra ของทั้งสองไอโซเมอร์ โดยแตก parent ion ที่ m/z 581 ที่ตำแหน่ง retention times ทั้งสองพบว่าให้ mass spectra คล้ายคลึงกันมาก (รูป 5.18) โดยเฉพาะ m/z ของแต่ละ fragment ions ต่างกันที่ความสมบูรณ์สัมพัทธ์ (relative abundance) ของแต่ละไอออน ไอออนเหล่านี้ได้แก่ m/z 545, 527, 516, 473, 461 และ 433 ไอออนที่ m/z 287 พบที่ความสมบูรณ์ต่ำมากซึ่งได้พิสูจน์โครงสร้างแล้วคือ cyanidin aglycone

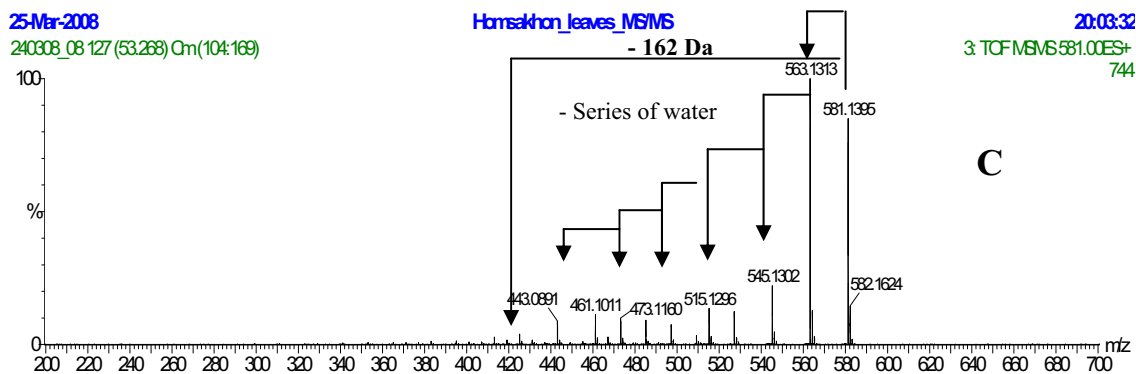
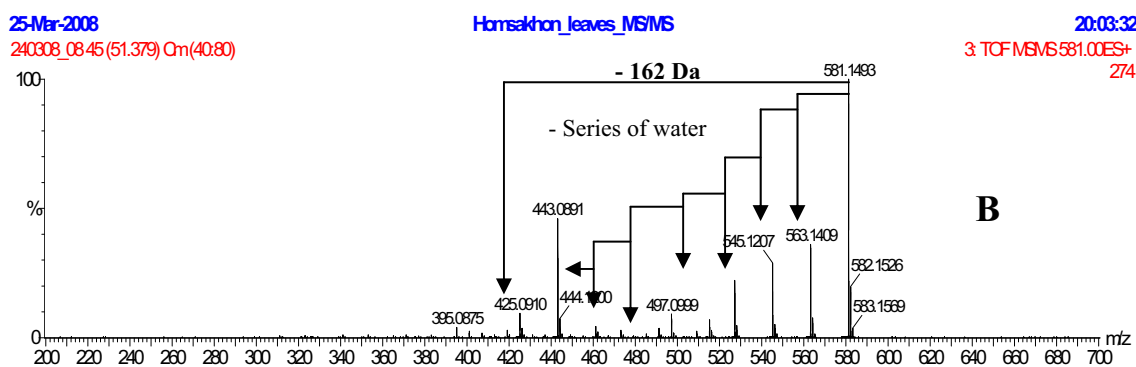
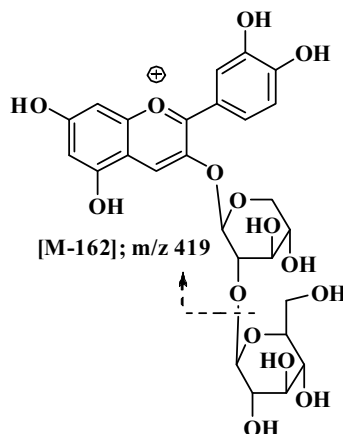
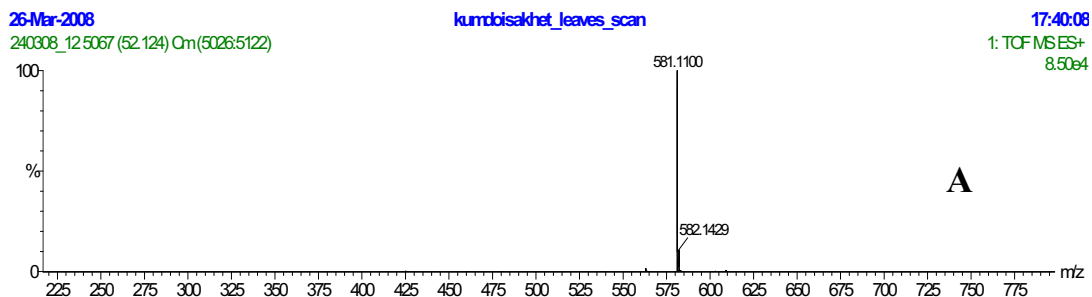
Base peak ที่ m/z 563 และไอออน 545 และ 527 คือการ loss โมเลกุลของน้ำ $[M-H_2O]^+$, $[M-2H_2O]^+$ และ $[M-3H_2O]^+$ ตามลำดับ เช่นเดียวกับไอออนที่ m/z 515, 473, 461 และ 433 การ loss ของน้ำในโมเลกุลของน้ำตาลแสดงว่า น้ำตาลทั้งสองมีโครงสร้างแบบ mono-diglucoside และ link กันด้วย *O*-glycosidic bond พบไอออนที่ m/z 419 $[M-162]$ ที่ความสมบูรณ์ต่ำมาก ซึ่งแสดงถึงการ loss โมเลกุลของ glucose ดังนั้นน้ำตาลที่เหลือเป็น xylose ซึ่งพันธะอยู่กับ cyanidin aglycone การพิสูจน์โครงสร้าง anthocyanin isomers ทั้งสองจาก MS/MS spectra จึงพบว่าสอดคล้องกับโครงสร้างของ cyanidin-3-*O*-xyloside glucoside ความแตกต่างระหว่างทั้งสองไอโซเมอร์น่าจะอยู่ที่ตำแหน่งของ *O*-glycosidic bond ระหว่างโมเลกุลของน้ำตาลทั้งสอง



รูป 5.17 HPLC-ESI-MS chromatogram ของสารสกัดจากใบข้าวสีกาพันธุ์เก่าโดยสะกัด

(A) mass chromatogram; m/z 581 แสดงตำแหน่งของ peak ที่ 50.25 และ 53.26 min

(B) Total ion chromatogram

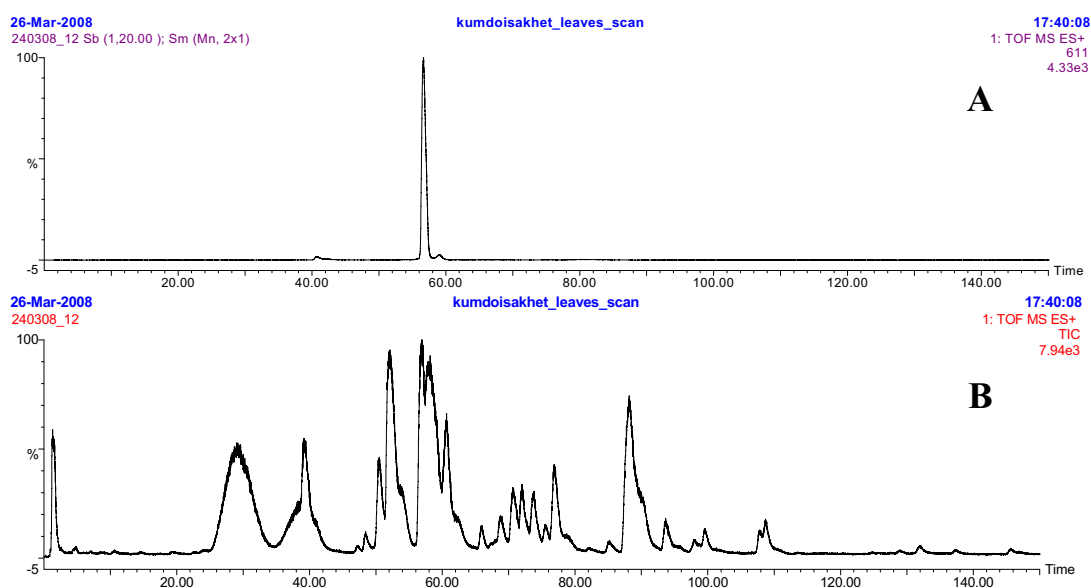


รูป 5.18 ESI-MS (A) และ ESI-MS/MS mass spectra ของ peak ที่ 50.25 (B) และ 53.26 (C) min บน chromatogram ของสารสกัดจากใบข้าวสาลีดำพันธุ์เก่าโดยสะกัด

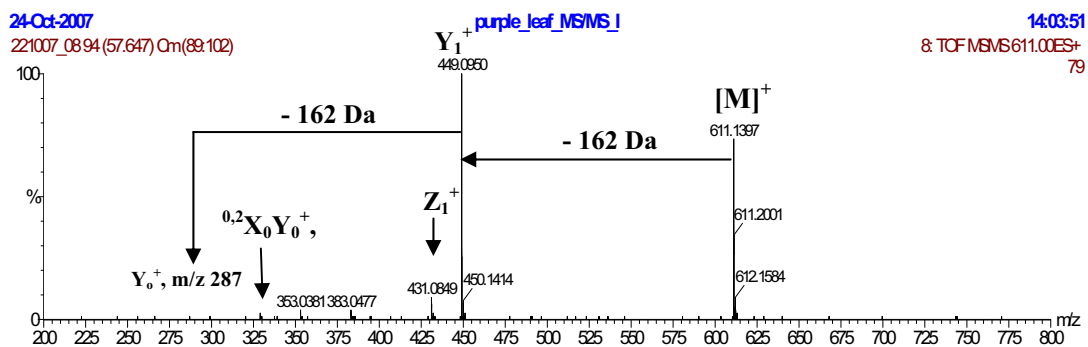
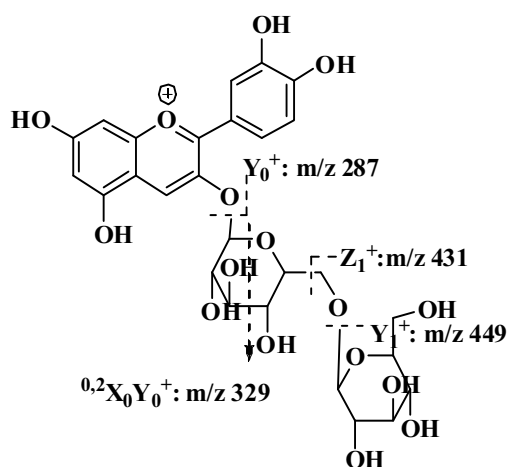
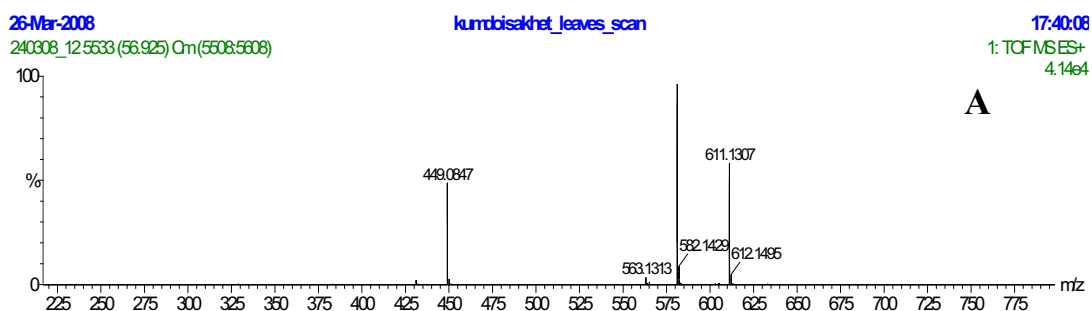
การระบุโครงสร้างของ anthocyanin ที่มี $[M]^+ 611$:
Cyanidin-3-*O*-diglucoside

องค์ประกอบในสารสกัดของข้าวพันธุ้เก่าดอยสะเก็ดที่ให้ molecular ion ที่ m/z 611 เมื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC-ESI-MS พบที่ตำแหน่ง retention time 56.92 min (รูป 5.19) ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นสาร cyanidin-3-*O*-diglucoside ที่มีน้ำหนักโมเลกุล (MW) 611 เนื่องจากให้ fragment ion ที่ m/z 449 ซึ่งพิสูจน์โครงสร้างทราบว่าเป็น cyanidin-3-*O*-glucoside จากการทำ CID ของ parent ion ที่ m/z 611 พบว่าให้ MS/MS spectrum ดังรูป 5.20 ซึ่งประกอบด้วยไอออนหลักคือ m/z 611 และ 449 ส่วน ion ที่ m/z 287 มีความสมบูรณ์สัมพันธ์ต่ำมาก

เนื่องจากไม่พบ fragmentation ในโมเลกุลของน้ำตาลที่ $[M-90]$ และ $[M-120]$ จึงสรุปได้ว่า cyanidin และ glucose ต่อกันด้วย *O*-glycosidic linkage ที่ตำแหน่งที่ 3 บนโมเลกุลของ aglycone ส่วนน้ำตาล glucose 2 โมเลกุลต่อกันเป็นแบบ mono-diglucoside เนื่องจากพบ fragmentation ภายในโมเลกุลของน้ำตาลระหว่างไอออนที่ m/z 449 $[M-162]$ และ 287 $[M-162-162]$ คือไอออนที่ m/z 431 และ 329 ซึ่งเป็นไอออนที่เป็นลักษณะเฉพาะ (characteristic fragment ions) ชนิด (Z_1^+) และ ($^{0,2}X_0Y_1^+$) ตามลำดับ ซึ่งทั้งสองไอออนนี้บ่งบอกว่าน้ำตาลทั้งสองโมเลกุลต่อกันด้วย 1-2 interglycosidic linkage ดังนั้น anthocyanin นี้จึงมีโครงสร้างเป็น cyanidin-3-*O*-diglucoside



รูป 5.19 HPLC-ESI-MS chromatogram ของสารสกัดจากใบข้าวสีกาพันธุ้เก่าดอยสะเก็ด
(A) mass chromatogram; m/z 611 แสดงตำแหน่งของ peak ที่ 56.92 min
(B) Total ion chromatogram



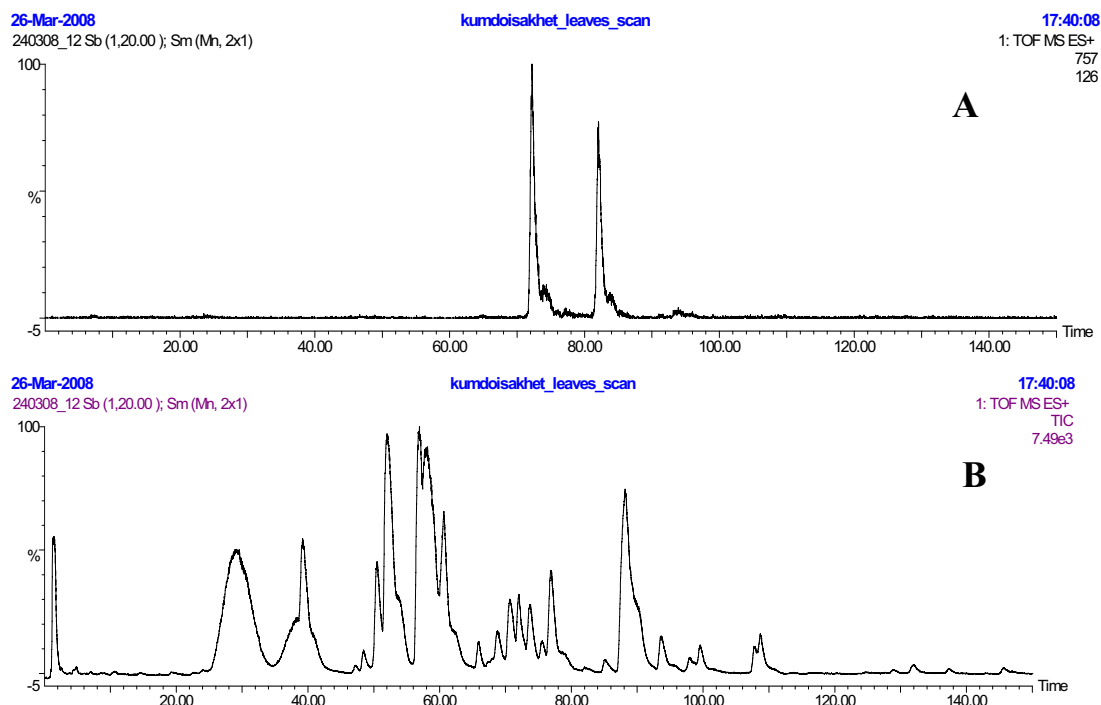
รูป 5.20 ESI-MS (A) และ ESI-MS/MS (B) mass spectra ของ peak ที่ 56.92 min บน chromatogram ของสารสกัดจากใบข้าวสาลีดำพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ด

การระบุโครงสร้างของ anthocyanin ที่มี $[M]^+$ 757:

Cyanidin-3-*O*-(*p*-coumaroyl)glucoside-5-*O*-glucoside

องค์ประกอบในสารสกัดของข้าวพันธุ์เก่าดอยสะเก็ดที่ให้ molecular ion ที่ m/z 757 และพบบน HPLC-ESI-MS chromatogram ที่ตำแหน่ง retention time 72.00 min (รูป 5.21) คาดว่าน่าจะเป็นสาร cyanidin-3-*O*-(*p*-coumaroyl)glucoside-5-*O*-glucoside ที่มีน้ำหนักโมเลกุล (MW) 757 (ส่วน peak ที่ retention time 82.20 min เมื่อพิจารณาจาก mass spectrum พบว่าไอออนที่ m/z 757 ไม่ใช่ molecular ion จึงไม่ได้พิสูจน์โครงสร้างของสารประกอบที่ peak นี้)

จากการทำ CID ของ parent ion ที่ m/z 757 พบว่าให้ MS/MS spectrum ดังรูป 5.22 ซึ่งประกอบด้วยไอออนหลักคือ m/z 757 และ 449 ซึ่งไอออนที่ m/z 449 พิสูจน์โครงสร้างแล้วพบว่าเป็น cyanidin-3-*O*-glucoside ส่วนไอออนที่ m/z 287 มีความสมบูรณ์สัมพันธ์ต่ำมาก และเนื่องจากไม่พบ fragmentation ในโมเลกุลของน้ำตาลที่ [M-90] และ [M-120] จึงสรุปได้ว่า cyanidin และ glucose ต่อกันด้วย *O*-glycosidic linkage ที่ตำแหน่งที่ 3 บนโมเลกุลของ aglycone ไอออนที่ m/z 449 เป็นผลมาจากการ loss มวล 308 ซึ่งเป็นผลรวมที่ลงตัวของ glucose + coumaroyl group (MW 146) เนื่องจากไม่พบ fragmentation ภายในโมเลกุลของน้ำตาล glucose + coumaroyl unit แสดงว่าน้ำตาล glucose อีกโมเลกุลหนึ่งต่อเข้ากับ cyanidin aglycone ที่ตำแหน่งอื่น และตำแหน่งที่มักพบในธรรมชาติคือ ตำแหน่งที่ 5 บนโมเลกุลของ cyanidin aglycone

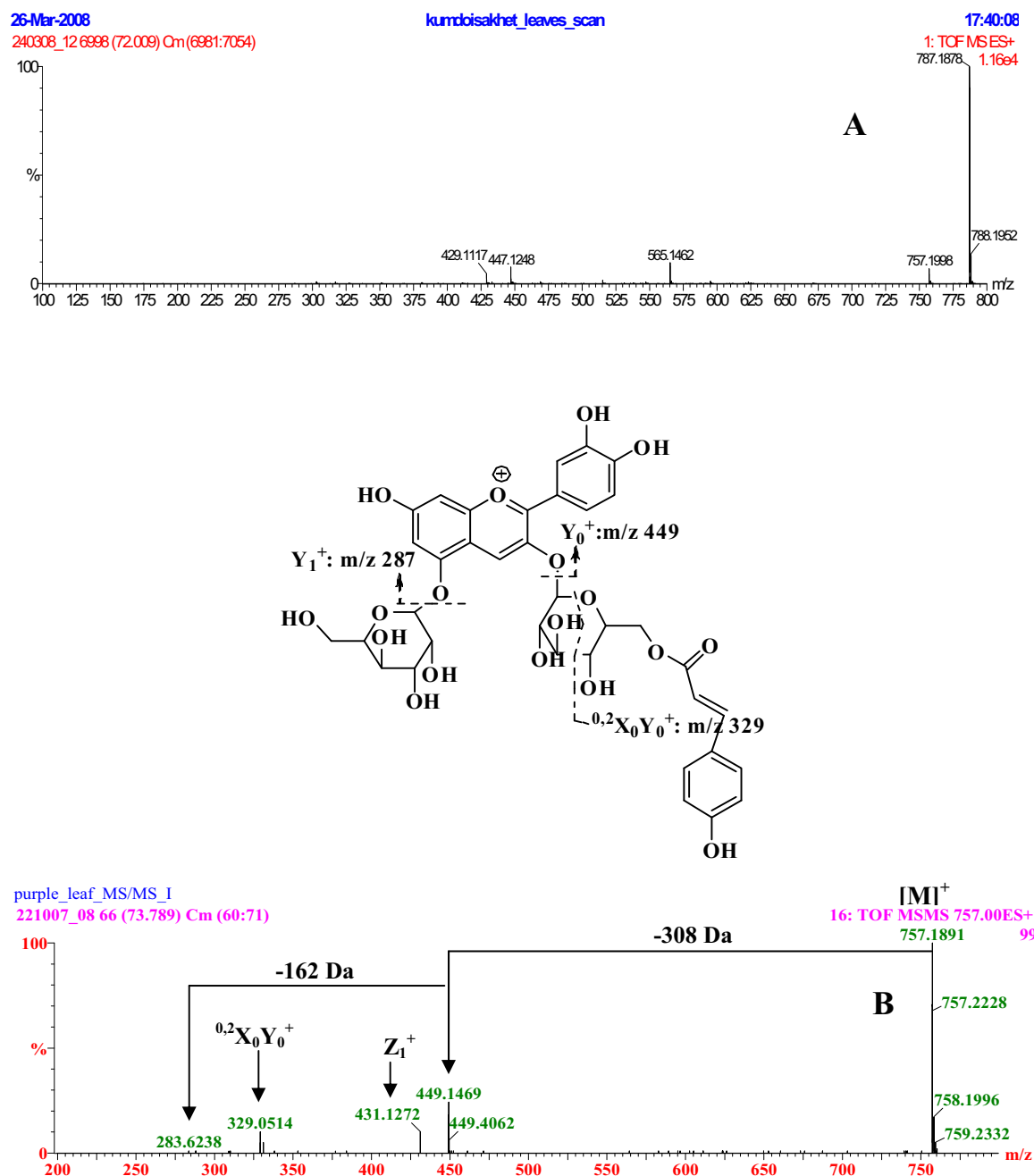


รูป 5.21 HPLC-ESI-MS chromatogram ของสารสกัดจากใบข้าวสีดำพันธุ์เก่าดอยสะเก็ด

(A) mass chromatogram; m/z 757 แสดงตำแหน่งของ peak ที่ 72.00 min

(B) Total ion chromatogram

นอกจากนี้พบ fragmentation ภายในโมเลกุลของน้ำตาลระหว่างไอออนที่ m/z 449 [$M-308$] และ 287 [$M-308-162$] คือไอออนที่ m/z 431 และ 329 ซึ่งเป็นไอออนที่เป็น characteristic fragment ions ชนิด (Z_1^+) และ ($^{0,2}X_0Y_1^+$) ตามลำดับ บ่งบอกว่า coumaroyl group ต่อเข้ากับน้ำตาล glucose ที่อยู่บนตำแหน่ง 3-*O*-glucoside ของ cyanidin aglycone ดังนั้น anthocyanin นี้จึงมีโครงสร้างเป็น cyanidin-3-*O*-(*p*-coumaroyl)glucoside-5-*O*-glucoside

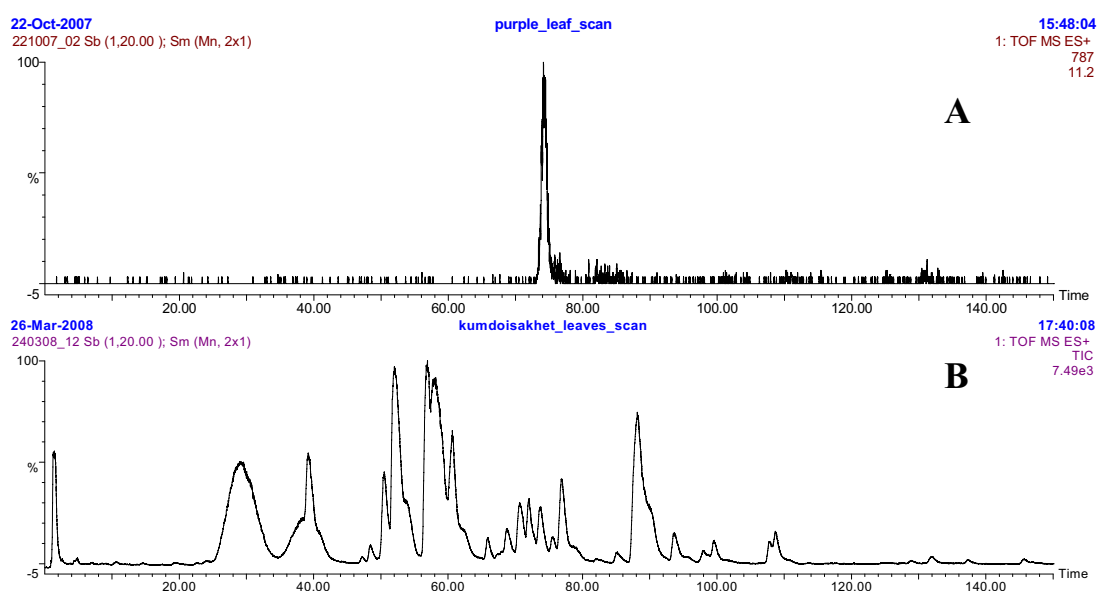


รูป 5.22 ESI-MS (A) และ ESI-MS/MS (B) mass spectra ของ peak ที่ 72.00 min บน chromatogram ของสารสกัดจากใบข้าวสาลีดำพันธุ์เก่าตอยสะเก็ด

การระบุโครงสร้างของ anthocyanin ที่มี $[M]^+$ 787:
Cyanidin-3-*O*-(feruloyl)glucoside-5-*O*-glucoside

องค์ประกอบในสารสกัดของข้าวพันธุ์เก่าโดยสะกัดที่ให้ molecular ion ที่ m/z 787 เมื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC-ESI-MS พบที่ตำแหน่ง retention time 72.20 min (รูป 5.23) บ่งบอกถึงสารที่มีน้ำหนักโมเลกุล (MW) 787 และพบ fragment ion เดียวที่ m/z 625 ซึ่งเกิดจากการ loss โมเลกุลของ glucose $[M-162]$ ค่ามวล 625 คาดได้ว่าเป็นผลรวมของ cyanidin (287) + glucose (161: loss 1H) + feruloyl group (177: loss OH) จึงทำนายว่าโครงสร้างในเบื้องต้นคือ cyanidin-feruloyl-diglucoside ส่วนไอออนที่ไม่ได้ระบุค่า m/z คือไอออนรบกวนจาก matrix

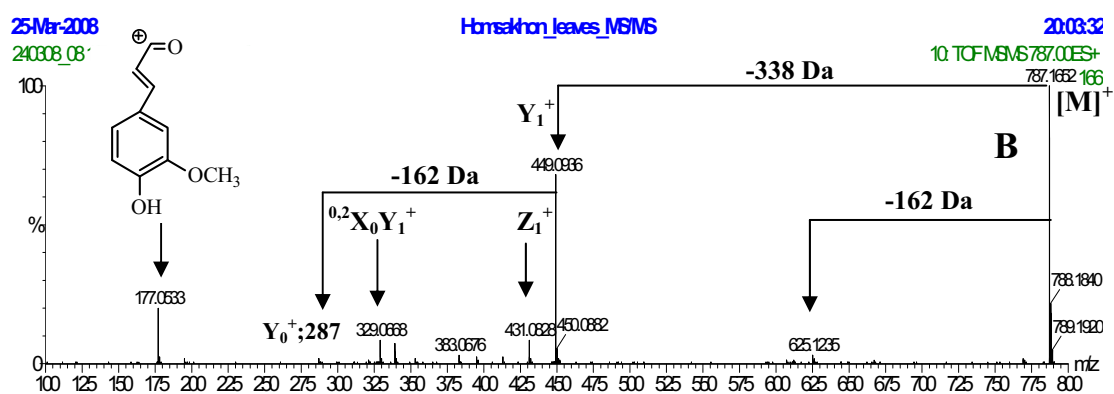
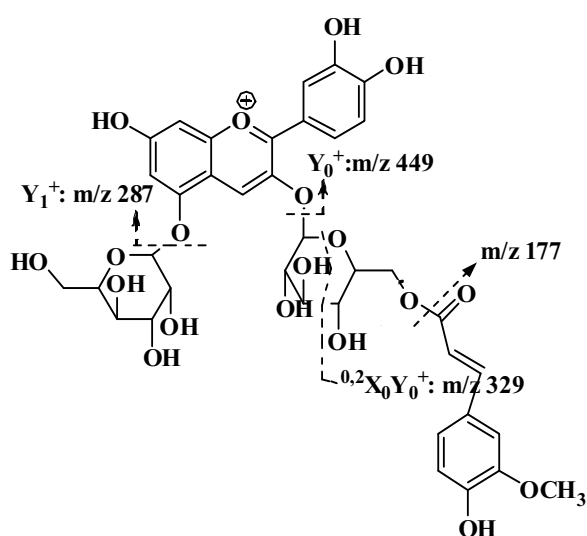
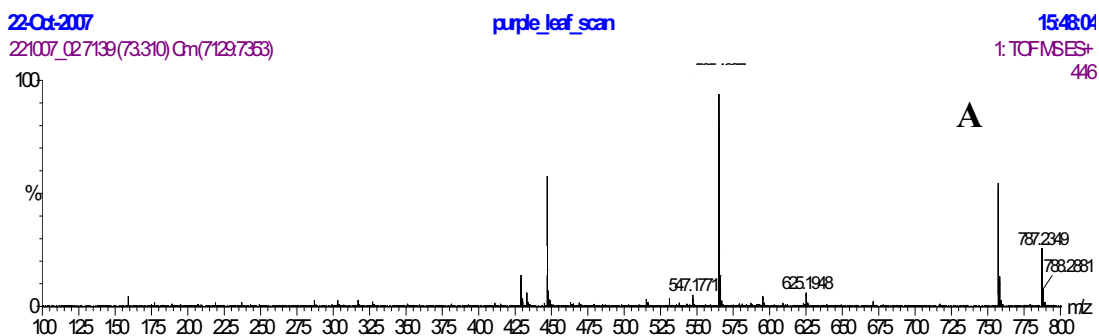
MS/MS spectrum ของ parent ion ที่ m/z 787 ได้จาก CID ดังรูป 5.24 พบว่าให้ไอออนที่ m/z 177, 287, 329, 431, 449 และ 625 ไอออนที่ m/z 287 $[M-(\text{glucose};162)-(\text{glucose};161)-(\text{feruloyl};177)]$ 449 $[M-(\text{glucose};161)-(\text{feruloyl};177)]$ และ 625 $[M-(\text{glucose};162)]$ คือส่วนของ cyanidin, cyanidin-5-*O*-glucoside และ cyanidin-3,5-*O*-diglucoside ตามลำดับ ส่วน fragment ions ที่แสดง fragmentation ในโมเลกุลของน้ำตาลที่ตำแหน่งที่ 3 โดยการ loss โมเลกุลของน้ำ ได้แก่ m/z 415 $[Y_1^+ - 2H_2O]^+$, 397 $[Y_1^+ - 3H_2O]^+$ และ 355 $[Y_1^+ - 2H_2O - 60]^+$ และ characteristic fragment ion ที่ m/z 329 ($^{0,2}X_0^+Y_1^+$) เป็นการบ่งบอกว่า feruloyl group พันธะเข้ากับโมเลกุลของน้ำตาล ซึ่งในธรรมชาติพบเกิดกับน้ำตาลที่เป็น 3-*O*-glucoside ดังนั้น anthocyanin นี้พบว่ามีโครงสร้างส่วนหนึ่งคือ cyanidin-3-*O*-(feruloyl)glucoside รวมกับน้ำตาล glucose อีกหนึ่งโมเลกุลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 บน cyanidin จึงสรุปโครงสร้างรวมได้คือ cyanidin-3-*O*-(feruloyl)glucoside-5-*O*-glucoside



รูป 5.23 HPLC-ESI-MS chromatogram ของสารสกัดจากใบข้าวสีดำพันธุ์เก่าโดยสะกัด

(A) mass chromatogram; m/z 787 แสดงตำแหน่งของ peak ที่ 72.20 min

(B) Total ion chromatogram



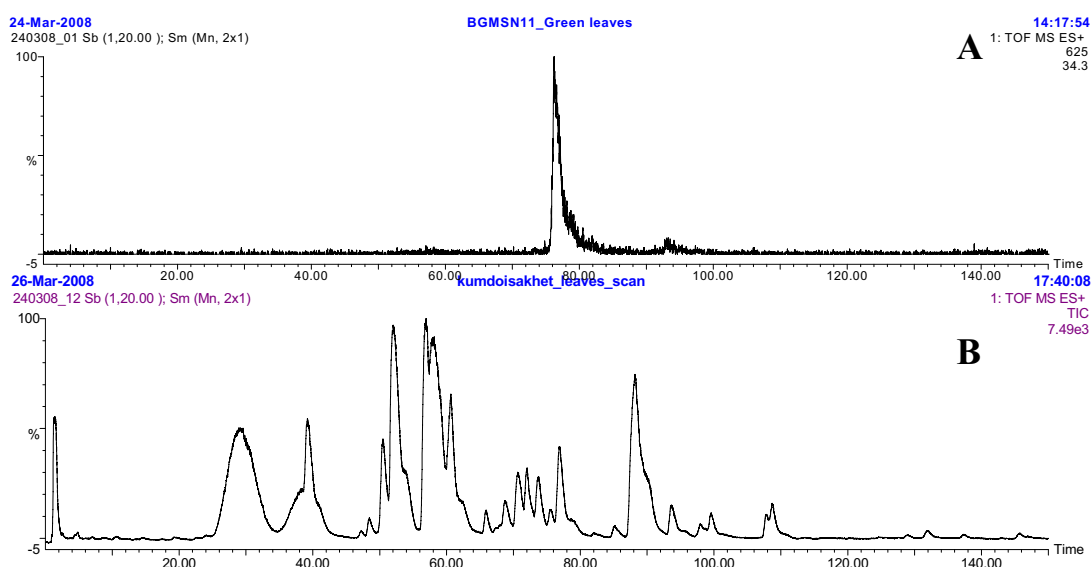
รูป 5.24 ESI-MS (A) และ ESI-MS/MS (B) mass spectra ของ peak ที่ 72.20 min บน chromatogram ของสารสกัดจากใบข้าวสาลีดำพันธุ์กาดอยสะเกิด

การระบุโครงสร้างของ anthocyanin ที่มี $[M]^+$ 625:

Peonidin-3-*O*-diglucoside

องค์ประกอบในสารสกัดของข้าวพันธุ์เก่าโดยสะกัดที่ให้ molecular ion ที่ m/z 625 เมื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC-ESI-MS พบที่ตำแหน่ง retention time 75.02 min (รูป 5.25) ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นสาร peonidin-3-*O*-diglucoside ที่มีน้ำหนักโมเลกุล (MW) 625 เนื่องจากให้ fragment ion ที่ m/z 463 ซึ่งคาดคะเนว่าเป็นโครงสร้างของ peonidin-3-*O*-glucoside (peonidin: 301+glucose: 162) แต่เนื่องจากองค์ประกอบนี้ปริมาณน้อยมาก ESI-MS mass spectrum ที่ได้จึงมี peak ของไอออนที่สำคัญมี abundance ต่ำ และเห็นไอออนของ matrix หลายไอออน (ไอออนที่ไม่ได้ให้ค่า m/z) แต่ไม่พบไอออนของ peonidin aglycone ที่ m/z 301

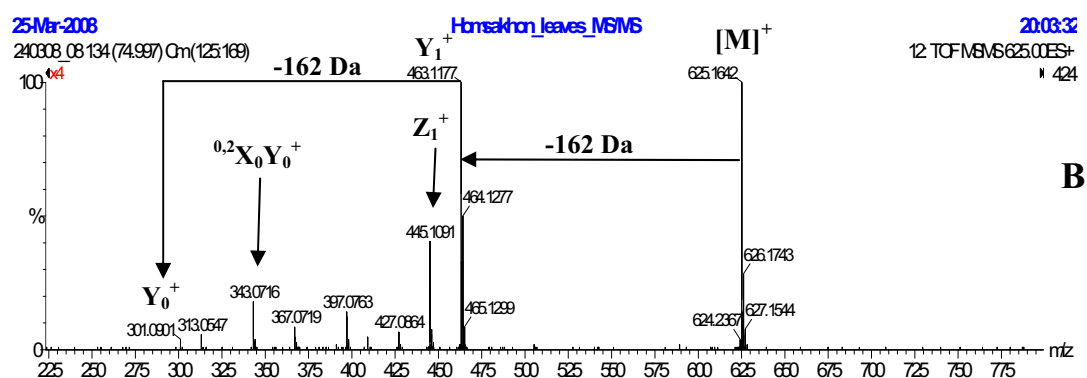
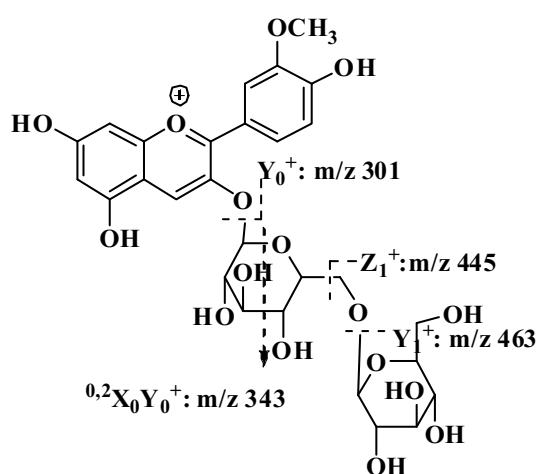
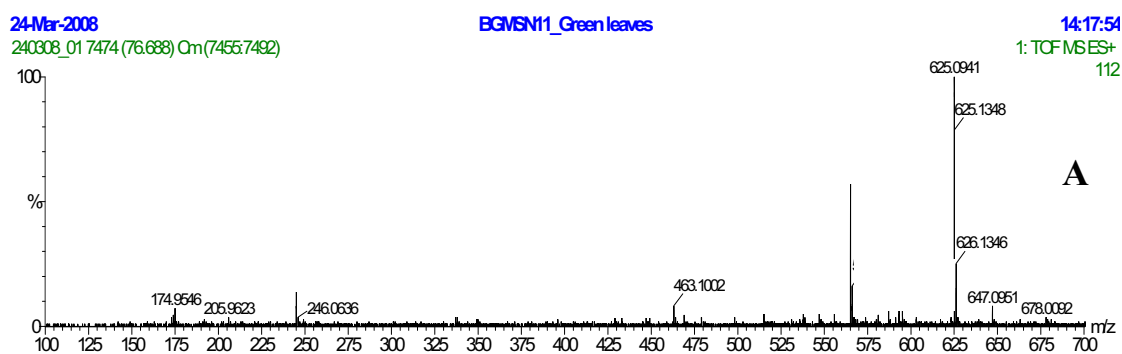
จากการทำ CID ของ parent ion ที่ m/z 625 พบว่าให้ MS/MS spectrum ดังรูป 5.26 ซึ่งประกอบด้วยไอออนหลักคือ m/z 301, 367, 397, 427, 445 และ 463 การพบไอออนที่ m/z 301 เป็นการยืนยันว่า aglycone ของ anthocyanin นี้คือ peonidin ไอออนที่ m/z 445 (Z_1^+) เป็น characteristic ion ที่บ่งบอกว่าน้ำตาลโมเลกุลที่สองเชื่อมต่อกันกับน้ำตาลโมเลกุลแรก (*O*-diglucosyl flavonoids) ไม่ได้ต่อเข้ากับส่วนของ peonidin aglycone รวมถึงไอออนที่เกิดจากการ loss โมเลกุลของน้ำและ neutral species อื่นๆ เช่น m/z 367 [$Y_1^+ - 2H_2O - 60$], 397 [$Y_1^+ - 2H_2O - 30$] และ 427 [$Y_1^+ - 2H_2O$] เป็นไอออนที่สนับสนุนว่า น้ำตาลทั้งสองโมเลกุลมีโครงสร้างแบบ *O*-diglycoside ไม่ใช่ di-*O*-glycoside ส่วนไอออนที่ m/z 343 ($^{0,2}X_0Y_1^+$) เป็น characteristic ion เช่นกัน ซึ่งจะบ่งบอกว่าน้ำตาลทั้งสองโมเลกุลต่อกันด้วย 1-2 interglycosidic linkage จากข้อมูลดังกล่าวมาจึงสามารถสรุปได้ว่า anthocyanin นี้จึงมีโครงสร้างเป็น peonidin-3-*O*-diglucoside



รูป 5.25 HPLC-ESI-MS chromatogram ของสารสกัดจากใบข้าวสีดำพันธุ์เก่าโดยสะกัด

(A) mass chromatogram; m/z 625 แสดงตำแหน่งของ peak ที่ 75.02 min

(B) Total ion chromatogram



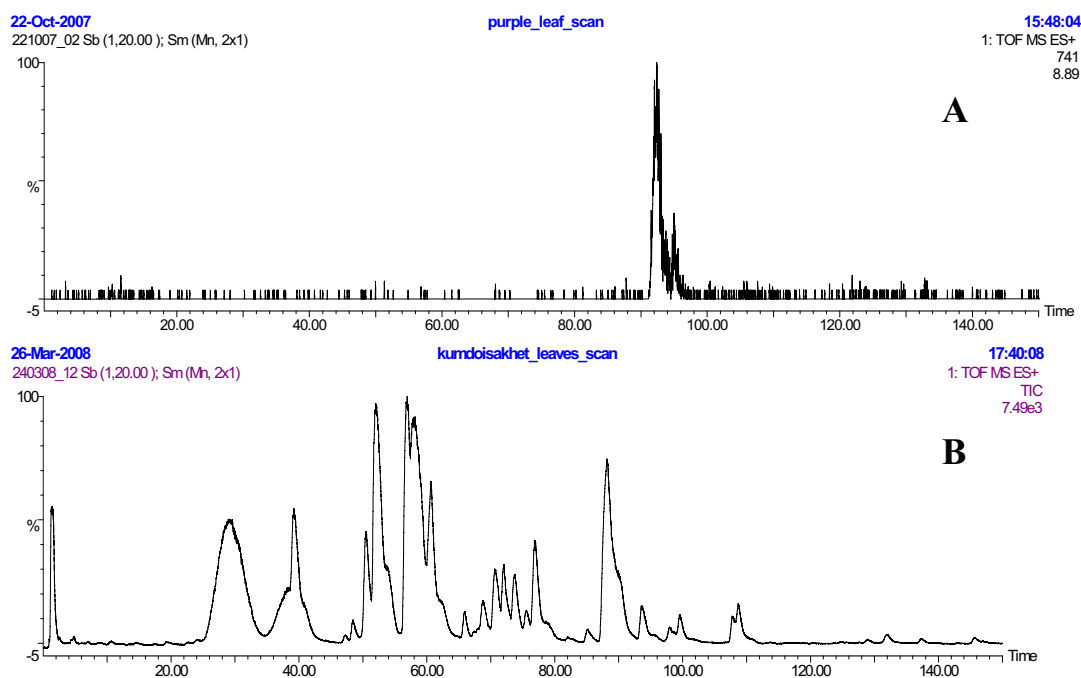
รูป 5.26 ESI-MS (A) และ ESI-MS/MS (B) mass spectra ของ peak ที่ 75.02 min บน chromatogram ของสารสกัดจากใบข้าวสาลีดำพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ด

การระบุโครงสร้างของ anthocyanin ที่มี $[M]^+$ 741:

Peonidin-3-*O*-(*p*-coumaroyl)glucoside-5-*O*-xyloside

องค์ประกอบในสารสกัดของข้าวพันธุ้ก่ำดอยสะเก็ดที่ให้ molecular ion ที่ m/z 741 เมื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC-ESI-MS พบที่ตำแหน่ง retention time 88.91 min (รูป 5.27) บ่งบอกถึงสารที่มีน้ำหนักโมเลกุล (MW) 741 แต่เนื่องจากองค์ประกอบนี้ปริมาณน้อยมาก ESI-MS mass spectrum ที่ได้จึงไม่มี peak ของไอออนอื่นๆ ที่สำคัญ อย่างไรก็ตามผลจากการทำ CID ของ parent ion ที่ m/z 741 ซึ่งให้ MS/MS spectrum ดังรูป 5.28 พบว่าให้ไอออนที่ m/z 301, 313, 403, 415 และ 433

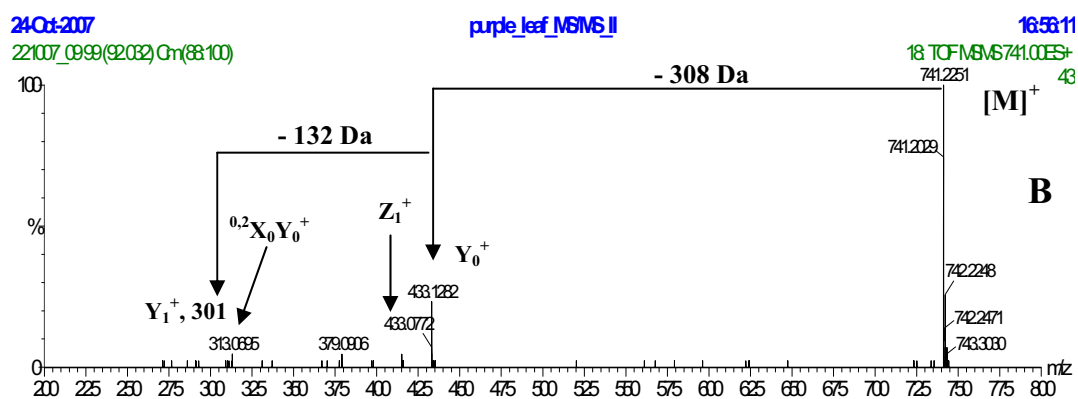
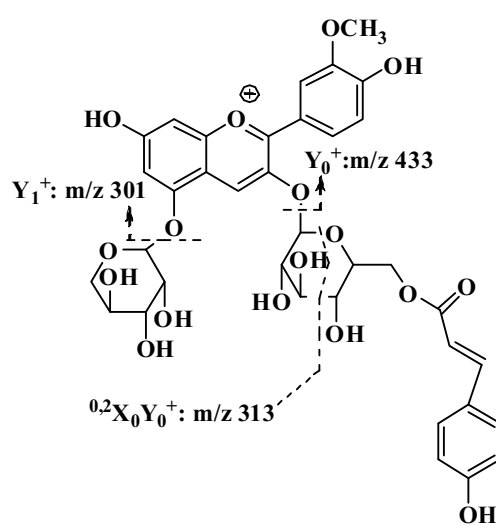
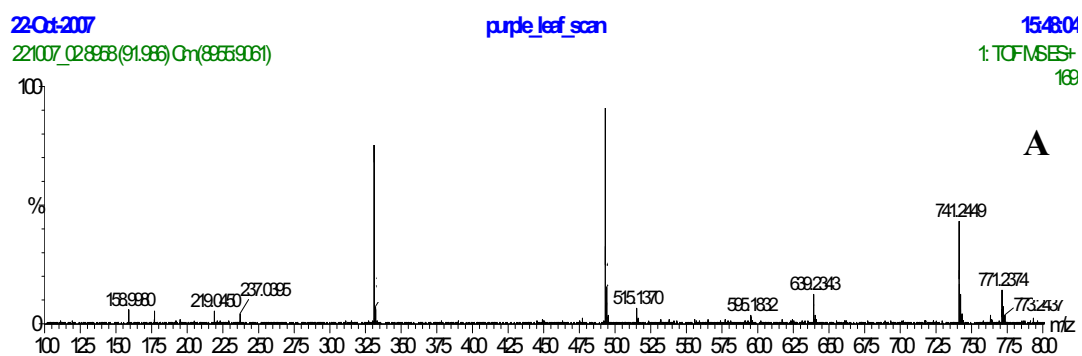
ไอออนที่ m/z 301 $[M-(xylose;132)-(glucose;161)-(coumaroyl;146)]$ และ 433 $[M-(glucose;161)-(coumaroyl;146)]$ คือส่วนของ peonidin และ peonidin-5-*O*-xyloside ตามลำดับ ส่วนไอออนที่แสดงการพันธะระหว่าง *p*-coumaroyl group กับ glucose ที่เป็น 3-*O*-glucoside คือ characteristic fragment ion ที่ m/z 313 ($^{0,2}X_0^+Y_1^+$) ดังนั้น anthocyanin นี้พบว่ามีโครงสร้างส่วนหนึ่งคือ peonidin-3-*O*-(coumaroyl)glucoside รวมกับน้ำตาล xylose อีกหนึ่งโมเลกุลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 บน peonidin จึงสรุปโครงสร้างรวมได้คือ peonidin-3-*O*-(*p*-coumaroyl)glucoside-5-*O*-xyloside



รูป 5.27 HPLC-ESI-MS chromatogram ของสารสกัดจากใบข้าวสีดำพันธุ้ก่ำดอยสะเก็ด

(A) mass chromatogram; m/z 741 แสดงตำแหน่งของ peak ที่ 88.91 min

(B) Total ion chromatogram

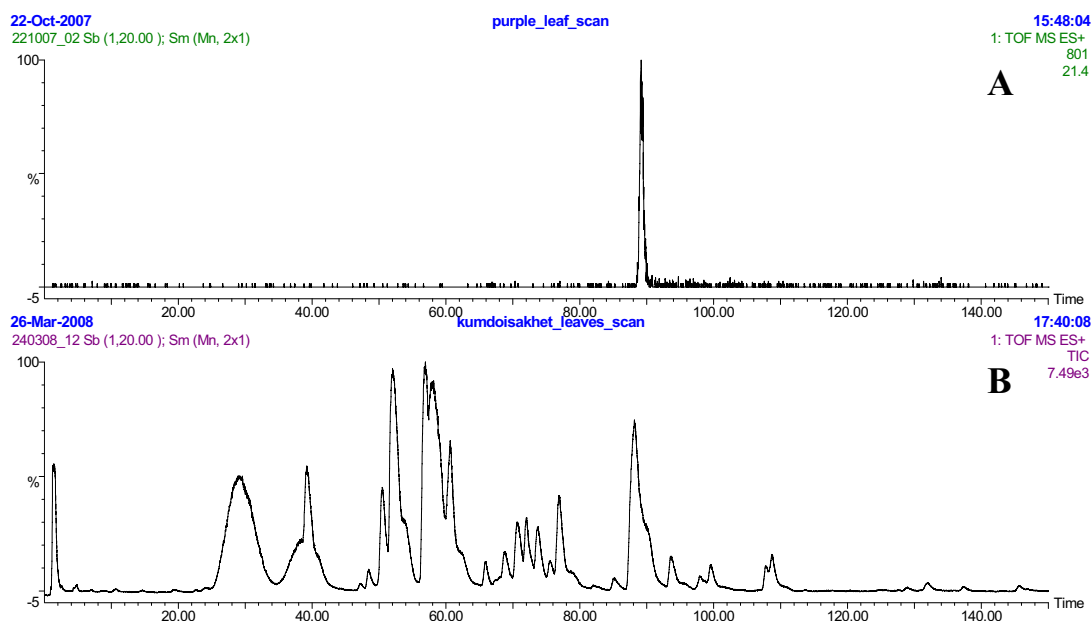


รูป 5.28 ESI-MS (A) และ ESI-MS/MS (B) mass spectra ของ peak ที่ 88.91 min บน chromatogram ของสารสกัดจากใบข้าวสาลีดำพันธุ์เก่าตอยสะเก็ด

การระบุโครงสร้างของ anthocyanin ที่มี $[M]^+$ 801:

Mavidin-3-*O*-(*p*-coumaroyl) glucoside-5-*O*-glucoside

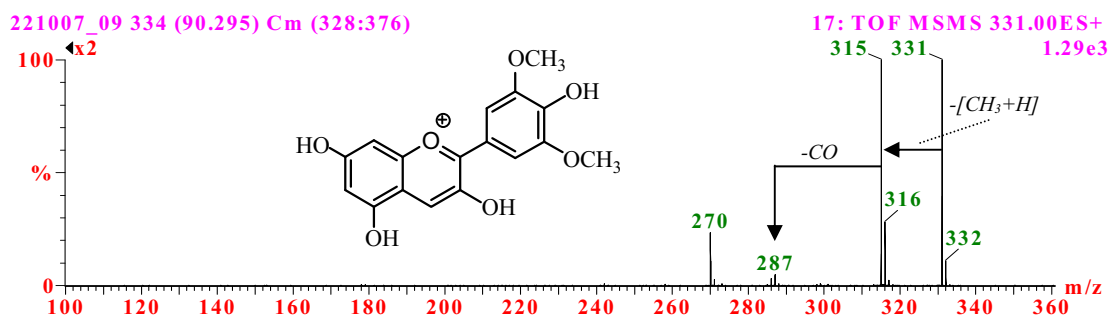
องค์ประกอบในสารสกัดของข้าวพันธุ์เก่าดอยสะเก็ดที่ให้ molecular ion ที่ m/z 801 เมื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC-ESI-MS พบที่ตำแหน่ง retention time 89.42 min (รูป 5.29) บ่งบอกถึงสารที่มีน้ำหนักโมเลกุล (MW) 801 แต่เนื่องจากองค์ประกอบนี้ปริมาณน้อยมาก ESI-MS mass spectrum ที่ได้จึงไม่มี peak ของไอออนอื่นๆ ที่สำคัญ อย่างไรก็ตามผลจากการทำ CID ของ parent ion ที่ m/z 801 ซึ่งให้ MS/MS spectrum ดังรูป 5.30 พบว่าให้ไอออนสำคัญที่ m/z 331 และ 493 และ CID ของไอออนที่ m/z 331 (รูป 5.31) แสดงว่า aglycone ของ anthocyanin นี้คือ mavidin (MW 331) ส่วนไอออนที่ m/z 493 คือ malvidin-5-*O*-glucoside ผลต่างของไอออนนี้จาก molecular ion แสดงการ loss 308 mass unit ซึ่งเป็นผลรวมของ fraction ของ glucose (162) + *p*-coumaroyl group (146) และไม่พบ characteristic fragment ion ที่แสดงการพันธะระหว่าง *p*-coumaroyl group กับ glucose อย่างไรก็ตามสามารถคาดคะเนโครงสร้างของ anthocyanin นี้ได้คือ mavidin-3-*O*-(*p*-coumaroyl) glucoside-5-*O*-glucoside



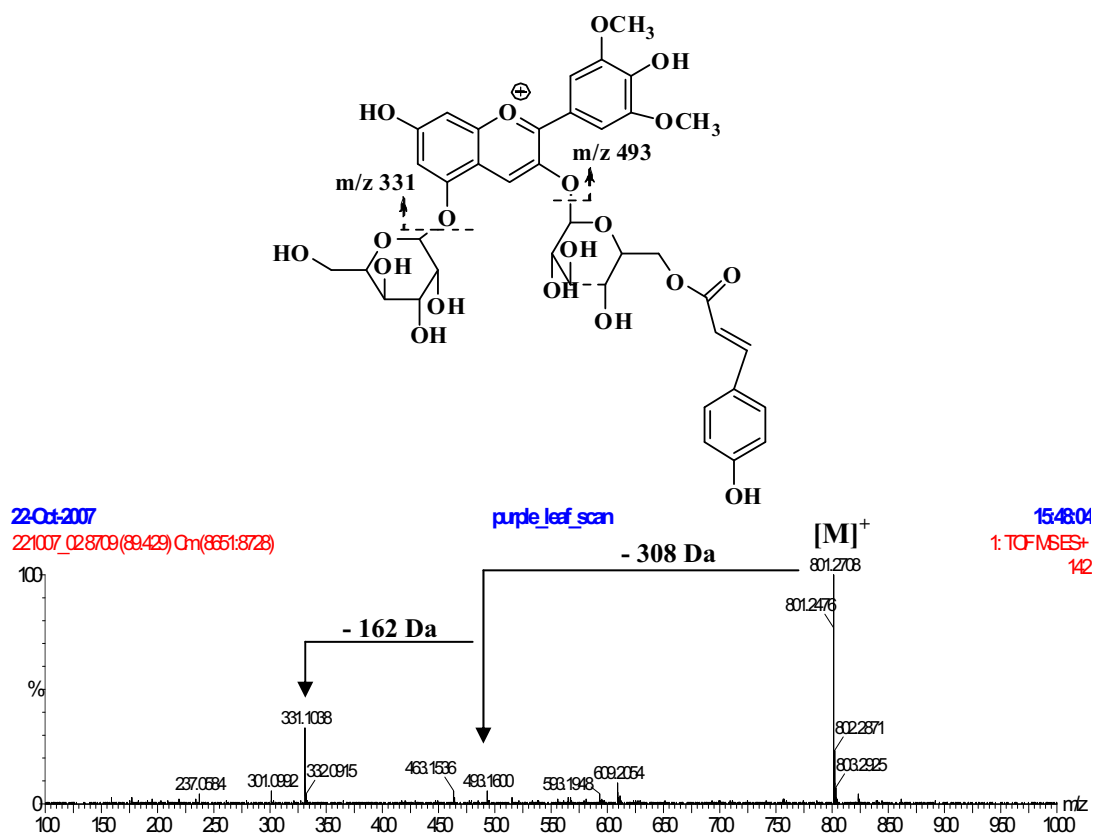
รูป 5.29 HPLC-ESI-MS chromatogram ของสารสกัดจากใบข้าวสีดำพันธุ์เก่าดอยสะเก็ด

(A) mass chromatogram; m/z 801 แสดงตำแหน่งของ peak ที่ 89.42 min

(B) Total ion chromatogram



รูป 5.30 ESI-MS/MS spectrum ของ parent ion ที่ m/z 331 ของ peak ที่ 89.42 min บน chromatogram ของสารสกัดจากใบข้าวสาลีดำพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ด



รูป 5.31 ESI-MS/MS spectrum ของ parent ion ที่ m/z 801 ของ peak ที่ 89.42 min บน chromatogram ของสารสกัดจากใบข้าวสาลีดำพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ด

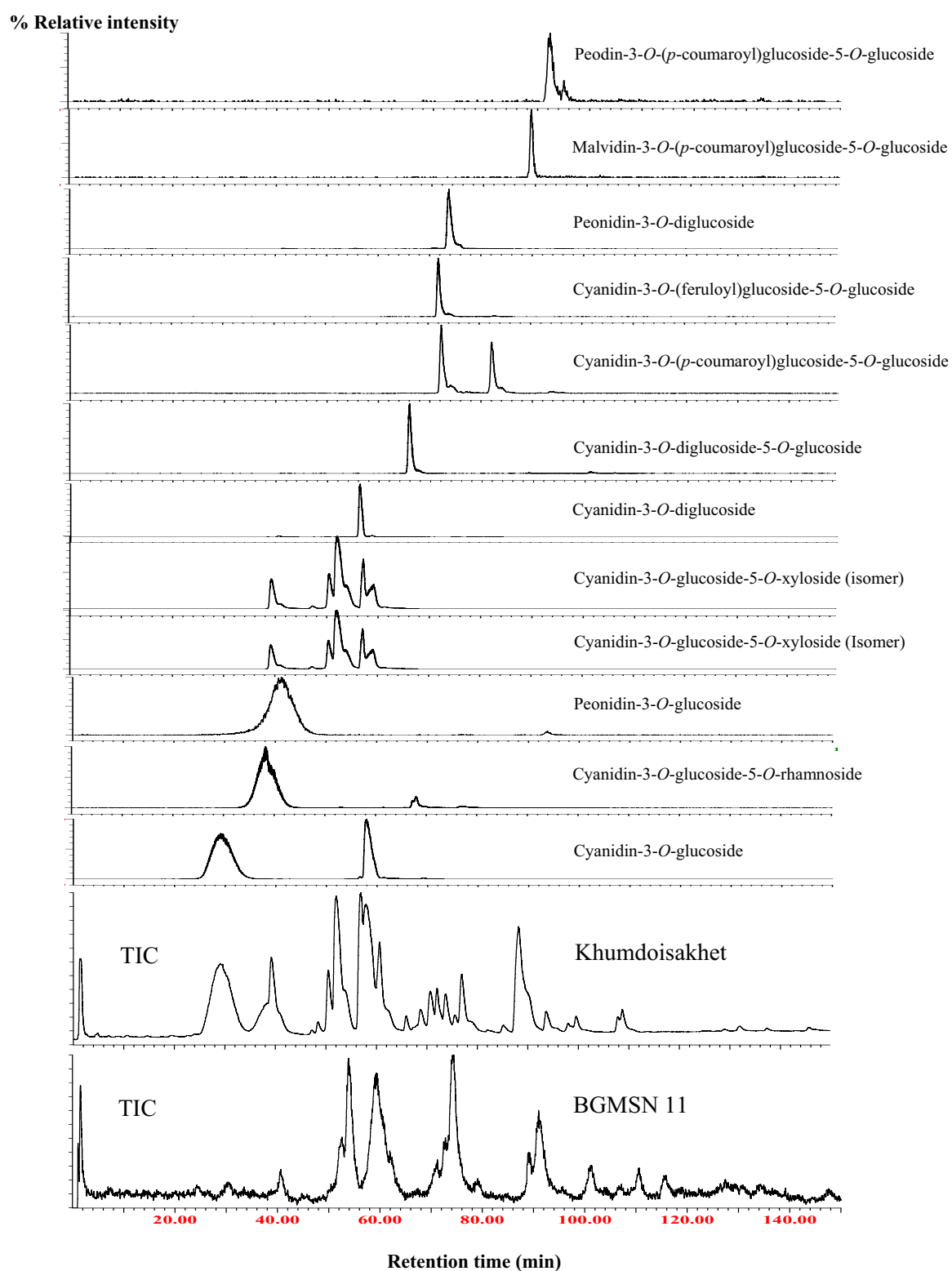
สรุปผลการวิเคราะห์สารกลุ่ม anthocyanins ในสารสกัดหยาบของใบและเมล็ดของข้าว ก่ำพันธุ์ BGMSN 11 และก่ำดอยสะเก็ด ด้วยเทคนิค HPLC-ESI-MS/MS พบ anthocyanins ทั้งหมดรวม 12 โครงสร้าง ดังแสดงในตาราง 5.7-5.8 และ รูป 5.32-5.33

ตาราง 5.7 Anthocyanins ที่พบในสารสกัดจากใบของข้าวท้าวพันธุ์ BGMSN 11 และกำหนดยสะเกิด

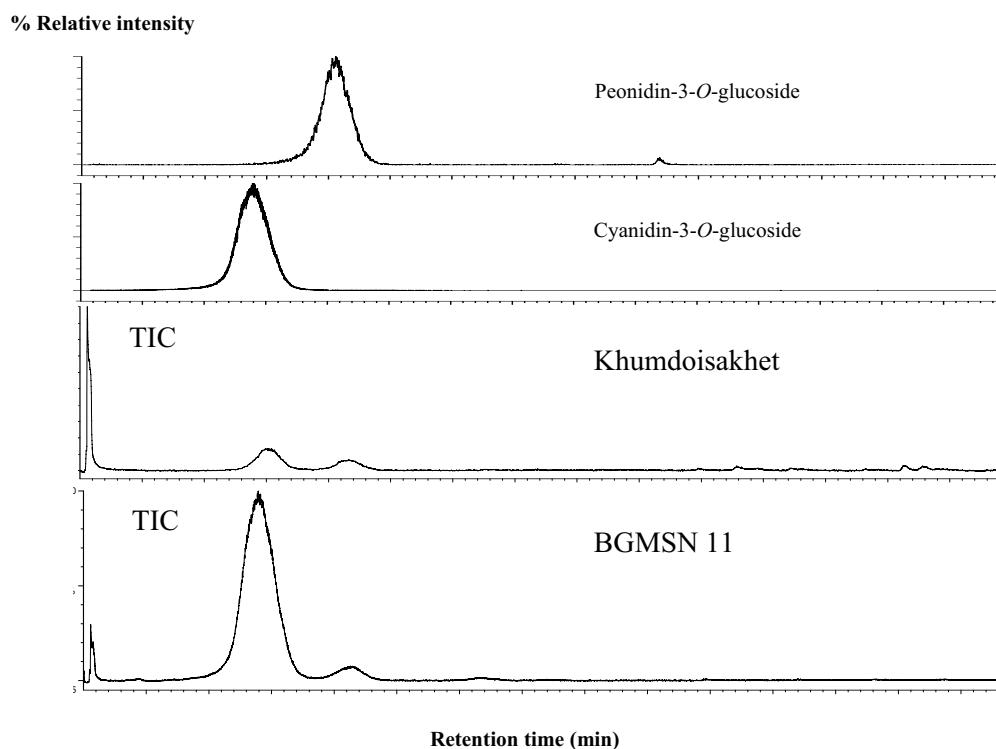
Peak no.	Retention Time [min]	[M] ⁺ [m/z]	ESI ⁽⁺⁾ MS [m/z]	ESI ⁽⁺⁾ MS/MS [m/z]	Anthocyanin assignment
1	29.062	449	449 287	449 287	Cyanidin-3- <i>O</i> -glucoside
2	38.839	595	595 581	595 449 287	Cyanidin-3- <i>O</i> -glucoside-5- <i>O</i> -rhamnoside
3	42.769	463	463 301	463 301	Peonidin-3- <i>O</i> -glucoside
4	50.526	581	581	581 563 545 524 516 433	Cyanidin-3- <i>O</i> -xyloside glucoside
5	52.124	581	581	581 563 545 515 473 461	Cyanidin-3- <i>O</i> -xyloside glucoside (isomer)
6	56.925	611	611 449	611 449 287	Cyanidin-3- <i>O</i> -diglucoside
7	65.939	733	733 449 287	773 449 287	Cyanidin-3- <i>O</i> -diglucoside-5- <i>O</i> -glucoside
8	72.009	757	757 449 287	757 611 449 287	Cyanidin-3- <i>O</i> -(<i>p</i> -coumaroyl)glucoside-5- <i>O</i> -glucoside
9	72.202	787	787 625 287	787 625 433 287	Cyanidin-3- <i>O</i> -(feruloyl)glucoside-5- <i>O</i> -glucoside
10	75.027	625	625 463 433	625 463 445 343 301	Peonidin-3- <i>O</i> -diglucoside
11	88.916	801	801 493 331	-	Mavadin-3- <i>O</i> -(<i>p</i> -coumaroyl)glucoside-5- <i>O</i> -glucoside
12	92.032	741	741 493 331 219	741 463 301	Peonidin-3- <i>O</i> -(<i>p</i> -coumaroyl)glucoside-5- <i>O</i> -xyloside

ตาราง 5.8 Anthocyanins ที่พบในสารสกัดจากเมล็ดของข้าวกล้อง BGM SN 11 และก่าคัดยสะเก็ด

Peak no.	Retention Time [min]	MW	ESI ⁽⁺⁾ MS [m/z]	ESI ⁽⁺⁾ MS/MS [m/z]	Anthocyanin assignment
1	29.062	449	449 287	449 287	Cyanidin-3-O-glucoside
2	42.769	463	463 301	463 301	Peonidin-3-O-glucoside



รูป 5.32 ตำแหน่งของ anthocyanins ที่พบบน HPLC profiles ของสารสกัดจากใบของข้าวกล้าพันธุ์ BGMSN 11 และก้ามดอยสะเก็ด



รูป 5.33 ตำแหน่งของ anthocyanins ที่พบบน HPLC profiles ของสารสกัดจากเมล็ดของข้าวดำพันธุ์ BGMSN 11 และก่ำดอยสะเก็ด

ตำแหน่งของสาร anthocyanins บนโครมาโทแกรมของการแยกสารสกัดหยาบจากตัวอย่างข้าว นำไปสู่การพิสูจน์โครงสร้างของ anthocyanins ได้ 10 โครงสร้าง ได้แก่ cyanidin-3-O-glucoside, cyanidin-3-O-glucoside-5-O-rhamnoside, peonidin-3-O-glucoside, cyanidin-3-O-diglucoside, cyanidin-3-O-diglucoside-5-O-glucoside, cyanidin-3-O-(*p*-coumaroyl)glucoside-5-O-glucoside, cyanidin-3-O-(feruloyl)glucoside-5-O-glucoside, peonidin-3-O-diglucoside, malvidin-3-O-(*p*-coumaroyl)glucoside-5-O-glucoside, และ peonidin-3-O-(*p*-coumaroyl)glucoside-5-O-xyloside ส่วนอีก 2 โครงสร้างยังไม่สามารถระบุเอกลักษณ์ได้แน่นอนคือ cyanidin-3-O-xyloside glucoside และ ไอโซเมอร์ของ cyanidin-3-O-xyloside-glucoside โดย cyanidin-3-O-diglucoside-5-O-glucoside, cyanidin-3-O-(*p*-coumaroyl)glucoside-5-O-glucoside, cyanidin-3-O-(feruloyl)glucoside-5-O-glucoside, peonidin-3-O-diglucoside, peonidin-3-O-(*p*-coumaroyl)glucoside-5-O-xyloside, และ malvidin-3-O-(*p*-coumaroyl)glucoside-5-O-glucoside พบในใบและเมล็ดของข้าวสีดำเป็นครั้งแรกในการศึกษานี้

5.2.7 ปริมาณสัมพัทธ์ของ anthocyanins ในสารสกัดจากใบและเมล็ดข้าวดำ

การหาปริมาณสัมพัทธ์ของ anthocyanins ที่พิสูจน์โครงสร้างได้จำนวน 12 สาร ใช้เทคนิค HPLC-ESI-MS และวิเคราะห์ข้อมูลแบบ extraction ion chromatogram ที่ค่ามวลที่เท่ากับ molecular ions ของแต่ละ anthocyanin พื้นที่ใต้พีคที่ได้หารด้วยพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐานภายใน neutral red ที่เติมลงไปในการละลายที่ใช้สกัดตัวอย่างข้าวให้ค่าปริมาณสัมพัทธ์ของแต่ละ anthocyanins ในสารสกัด ทำการทดลองกับตัวอย่างใบข้าวในแต่ละระยะการเจริญเติบโต คือ ระยะกล้า (seedling), ระยะแตกกอ (tillering) ระยะสร้างรวง (booting and heading) ระยะเมล็ดนํ้านม (milking) และระยะสุกแก่ทางสรีรวิทยา (mature grain) และเมล็ดข้าวในระยะเมล็ดนํ้านม ระยะเมล็ดแป้งแข็ง ระยะสุกแก่ทางสรีรวิทยา และระยะหลังเก็บเกี่ยว พบว่าได้กราฟความสัมพันธ์ดังรูป 5.34 โดยเทคนิค HPLC-ESI-MS มีสภาวะดังนี้

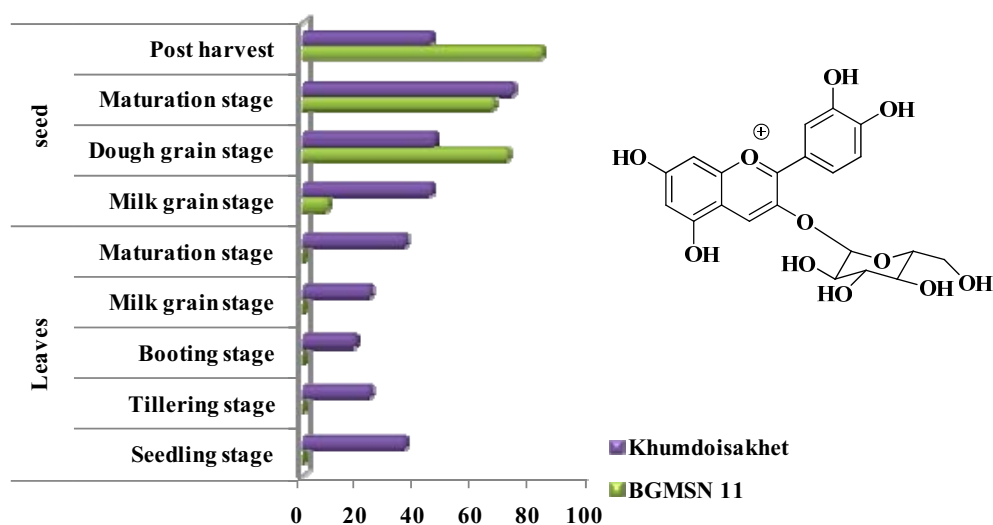
HPLC conditions:

Instrument	Agilent HPLC system (Agilent Technologies, USA)		
Column	Zorbax eclipse plus C ₁₈ (4×100 mm, 3 μm)		
Mobile Phase	A: methanol B: 0.5 % acetic acid in water		
Gradient :	1-10 min	10 % A	
	10-150 min	10-45 % A	
Detector	PDA (wavelength 520 nm)		
Injection Volume	20 μL		
Flow Rate	0.4 ml/min		

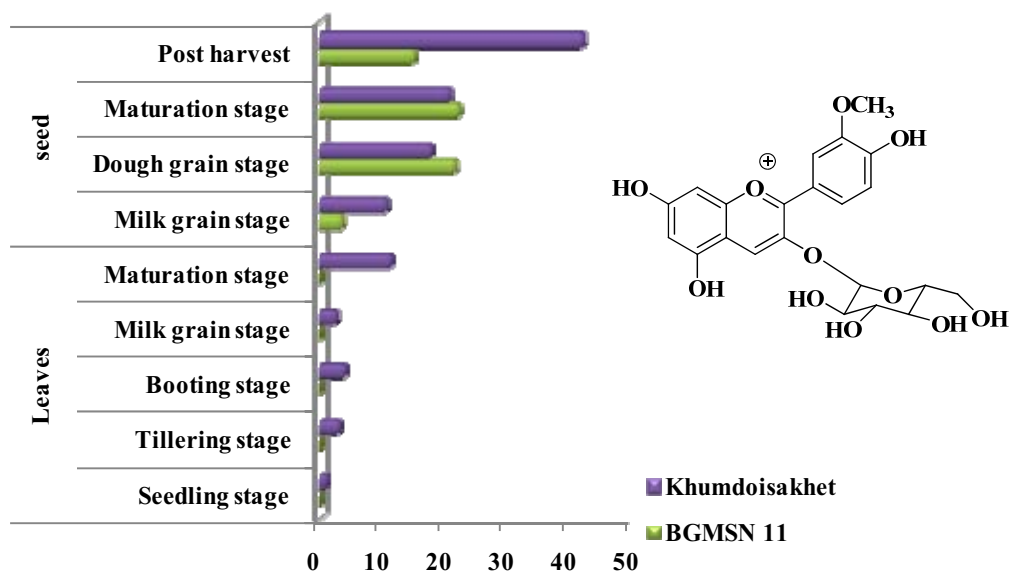
MS conditions:

Instrument	A single quadrupole mass spectrometer (Model G 1946 A, Agilent Technologies, USA)		
Ionisation mode	Positive		
Quadrupole temperature (°C)	100		
Fragmentor voltage (V)	110		
Capillary voltage (V)	3500		
Nebulizer pressure (psi)	30		
N ₂ Drying gas temperature (°C)	330		
N ₂ Drying gas flow (L/min)	12		
Mass range (amu)	100-1000		

Cyanidin-3-*O*-glucoside

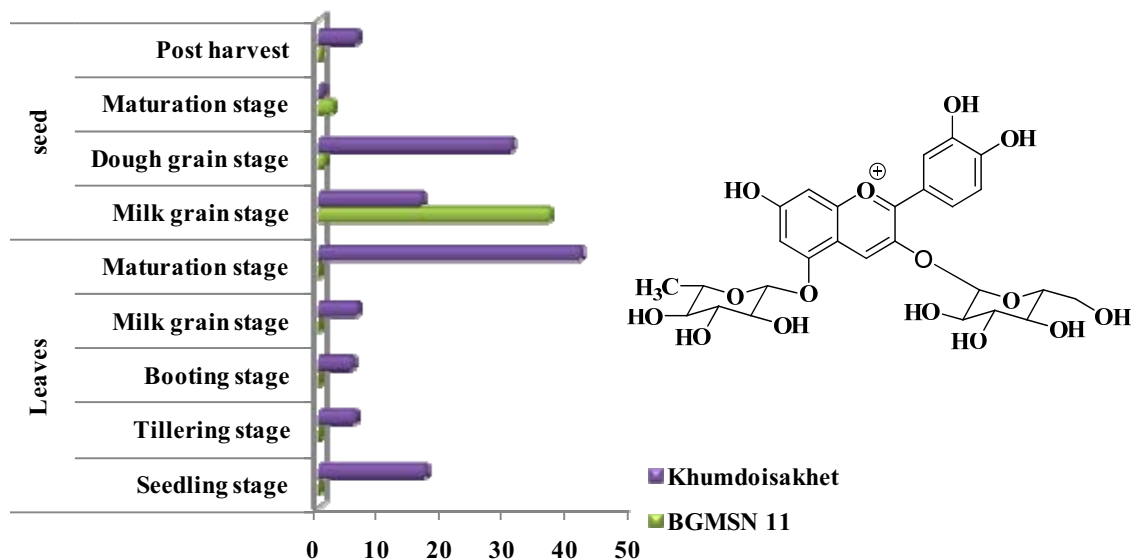


Peonidin-3-*O*-glucoside

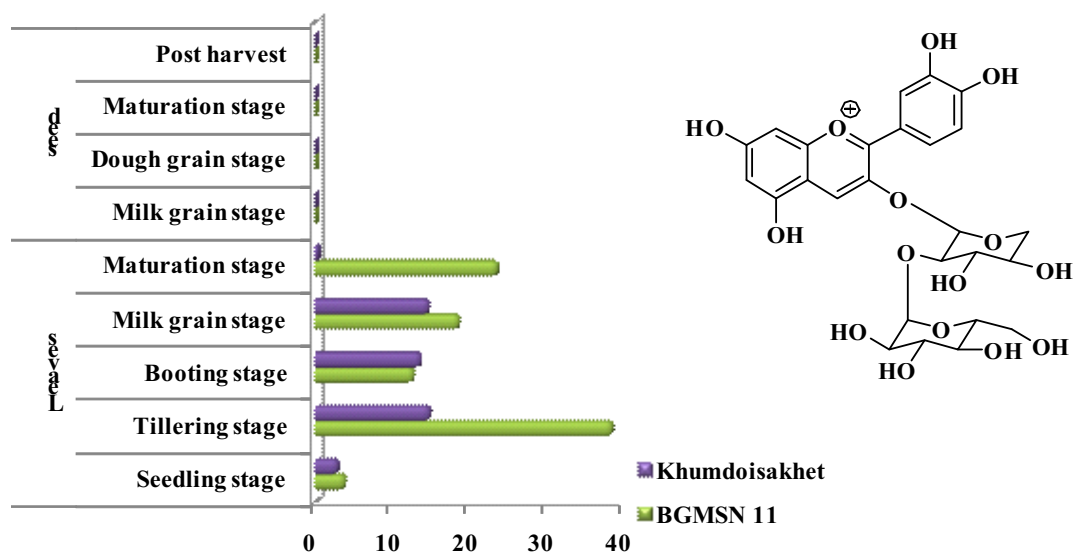


รูป 5.34 Relative contents ของ anthocyanins ในสารสกัดจากใบและเมล็ดข้าวพันธุกำดอย สะเก็ดและ BGMSN 11 ที่แต่ละระยะการเจริญเติบโต วิเคราะห์โดย HPLC-ESI-MS

Cyanidin-3-*O*-glucoside-5-*O*-rhamnoside

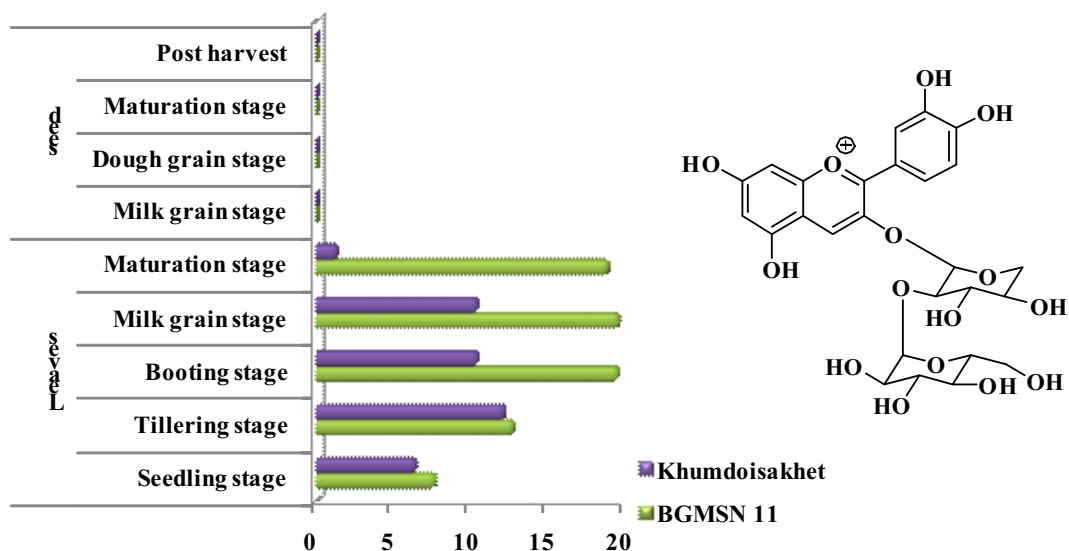


Cyanidin-3-*O*-xyloside glucoside

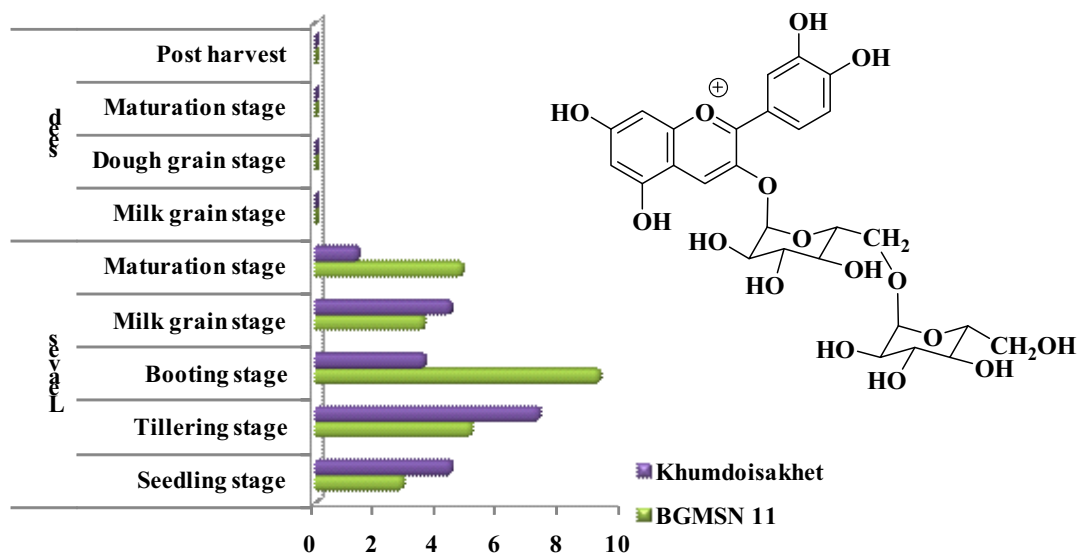


รูป 5.34 Relative contents ของ anthocyanins ในสารสกัดจากใบและเมล็ดข้าวพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ดและ BGMSN 11 ที่แต่ละระยะการเจริญเติบโต วิเคราะห์โดย HPLC-ESI-MS (ต่อ)

Cyanidin-3-*O*-xyloside glucoside (isomer)

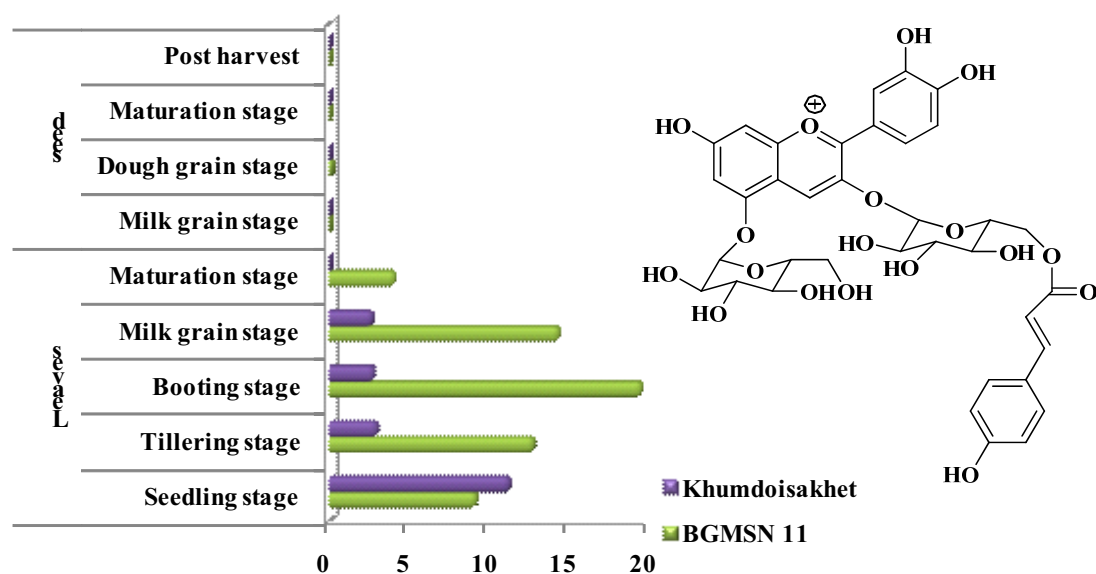


Cyanidin-3-*O*-diglucoside

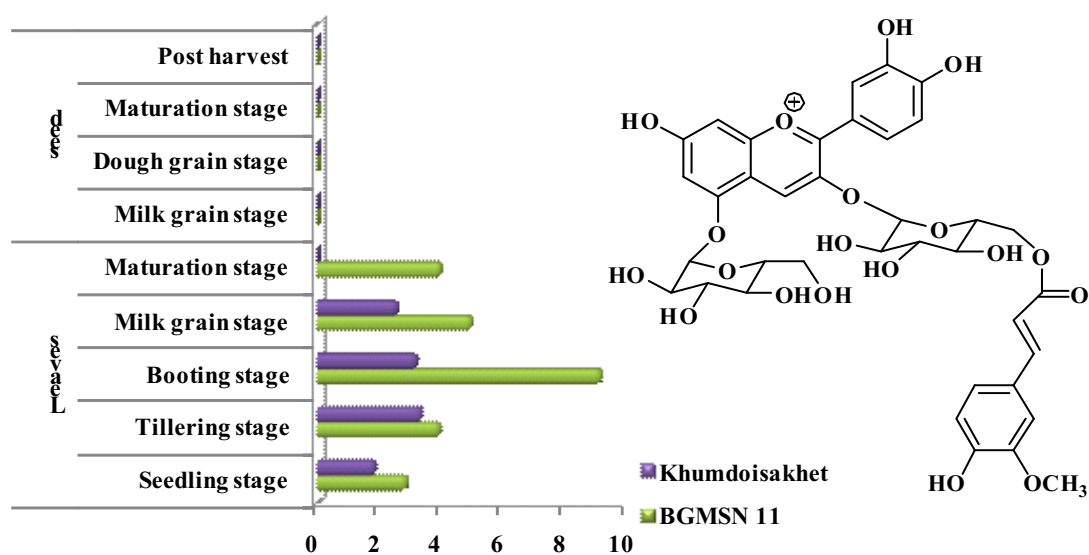


รูป 5.34 Relative contents ของ anthocyanins ในสารสกัดจากใบและเมล็ดข้าวพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ดและ BGMSN 11 ที่แต่ละระยะการเจริญเติบโต วิเคราะห์โดย HPLC-ESI-MS (ต่อ)

Cyanidin-3-*O*-(*p*-coumaroyl)glucoside-5-*O*-glucoside

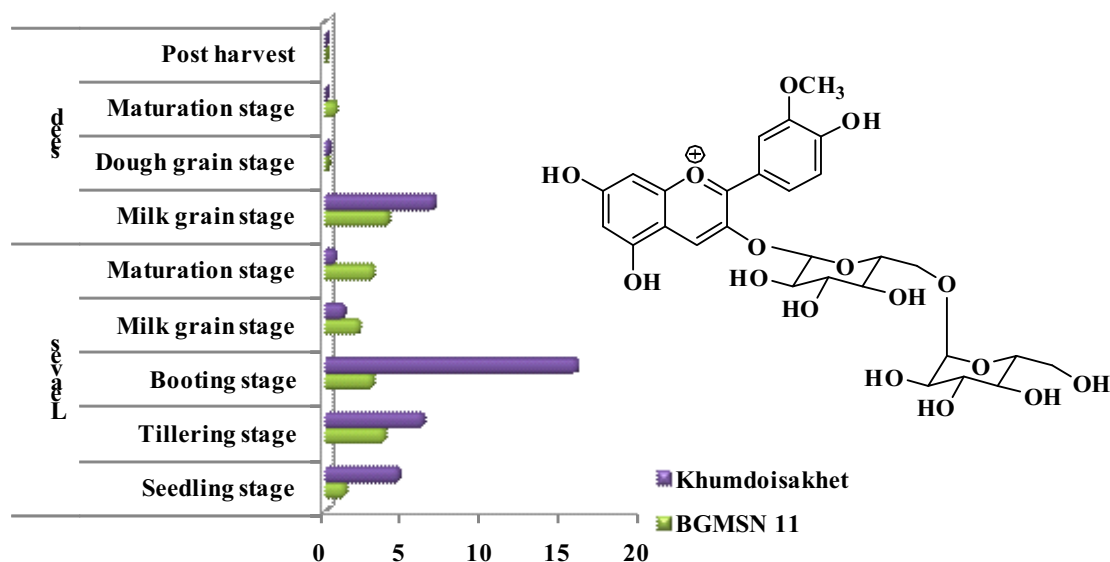


Cyanidin-3-*O*-(feruloyl)glucoside-5-*O*-glucoside

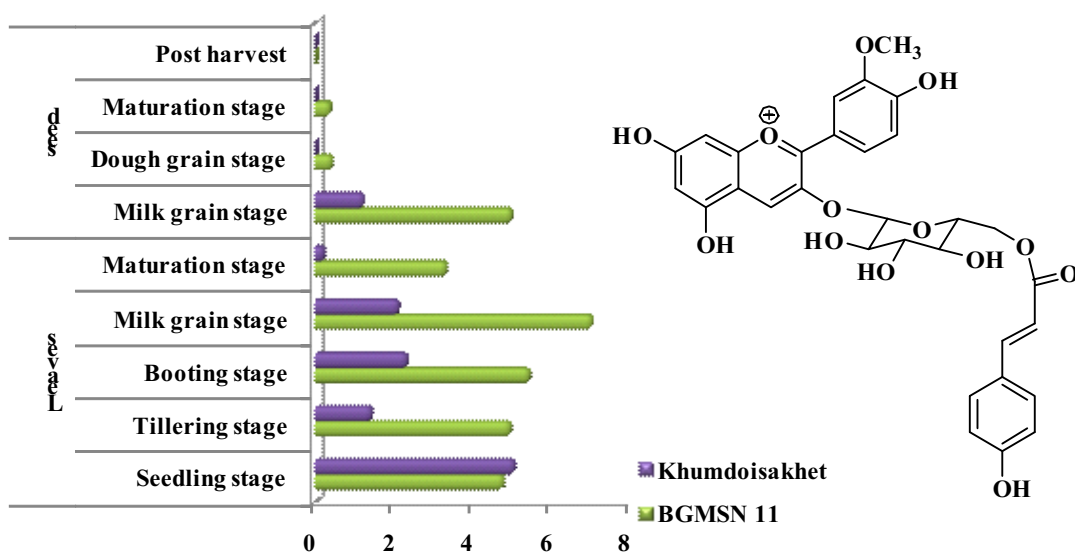


รูป 5.34 Relative contents ของ anthocyanins ในสารสกัดจากใบและเมล็ดข้าวพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ดและ BGMSN 11 ที่แต่ละระยะการเจริญเติบโต วิเคราะห์โดย HPLC-ESI-MS (ต่อ)

Peonidin-3-*O*-diglucoside



Peonidin-3-*O*-(*p*-coumaroyl)glucoside-5-*O*-xyloside



รูป 5.34 Relative contents ของ anthocyanins ในสารสกัดจากใบและเมล็ดข้าวพันธุกำดอย สะเก็ดและ BGMSN 11 ที่แต่ละระยะการเจริญเติบโต วิเคราะห์โดย HPLC-ESI-MS (ต่อ)

ในจำนวน anthocyanins ที่พิสูจน์โครงสร้างได้ในสารสกัดจากใบและช่อดอกข้าวทั้งสองพันธุ์ ก่อให้เกิด และ BGMSN 11 นั้น พบ cyanidin-3-*O*-glucoside, peonidin-3-*O*-glucoside และ cyanidin-3-*O*-rutinoside เฉพาะในส่วนของเมล็ดของข้าวทั้งสองพันธุ์ โดยพบว่ามีความสัมพันธ์ในใบเพิ่มขึ้นจากระยะ milk grain, dough grain จนถึง maturation ยกเว้น cyanidin-3-*O*-rutinoside ซึ่งพบมีปริมาณมากที่สุดที่ระยะ maturation stage สาร anthocyanins monoglucoside เหล่านี้ โดยเฉพาะ cyanidin-3-*O*-glucoside และ peonidin-3-*O*-glucoside เป็นสารให้สีในพืช (phyto pigments) ซึ่งมีสีแดงและม่วงแดงตามลำดับ สาร anthocyanins เหล่านี้จึงมีบทบาทสำคัญต่อสีของเมล็ดข้าวทั้งสองพันธุ์ ดังนั้นการพบ cyanidin-3-*O*-glucoside และ peonidin-3-*O*-glucoside เฉพาะในใบของต้นข้าวพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ดซึ่งมีใบสีม่วงเข้ม และไม่พบในใบของพันธุ์ BGMSN 11 ซึ่งมีใบสีเขียวจึงเป็นการยืนยันว่าสีม่วงเข้มของใบข้าวก่ำนั้นคือสีของ anthocyanin pigments ทั้งสองนี้

สาร anthocyanins ที่มีโมเลกุลของน้ำตาลหรือ acylate groups มาพันธะด้วยจำนวน 2-3 โมเลกุล เช่น cyanidin-3-*O*-xyloside glucosides, cyanidin-3-*O*-diglucoside, cyanidin-3-*O*-(*p*-coumaroyl)glucoside-5-*O*-glucoside และ cyanidin-3-*O*-(feruloyl)glucoside-5-*O*-glucoside ไม่พบมีการสะสมในเมล็ดของข้าวก่ำทั้งสองพันธุ์ ปริมาณของ anthocyanins เหล่านี้แตกต่างกันไปในแต่ละระยะการเติบโตของต้นข้าว แต่พบว่ามีรูปแบบคล้ายคลึงกัน กล่าวคือมีปริมาณสูงขึ้นจากระยะ seedling ถึง booting และลดลงจากระยะ milk grain ถึง maturation stage การลดลงของสาร anthocyanins ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงเหล่านี้เมื่อเริ่มเข้าระยะที่ข้าวเริ่มผลิตเมล็ด แสดงให้เห็นว่าในระหว่างที่สารเหล่านี้เคลื่อนที่จากใบ (translocation) ไปสะสมในเมล็ดข้าว จะเกิดการสูญเสียโมเลกุลของน้ำตาลออกไป

อย่างไรก็ตามอาจพบ anthocyanins ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงบางตัว เช่น peonidin-3-*O*-diglucoside และ peonidin-3-*O*-(*p*-coumaroyl)glucoside-5-*O*-xyloside ทั้งในใบและเมล็ดของข้าวทั้งสองพันธุ์ โดยสารทั้งสองมีปริมาณสัมพันธ์สูงสุดในเมล็ดในระยะ milk grain สำหรับ anthocyanins ที่มีโมเลกุลของน้ำตาลหรือ acylate groups มาพันธะด้วยจำนวน 2-3 โมเลกุลเมื่อพิจารณาในส่วน of anthocyanin aglycone ทั้ง 2 โครงสร้าง ที่พบในใบและเมล็ดข้าวทั้งสองพันธุ์ ได้แก่ cyanidin และ peonidin นั้น จะเห็นว่า anthocyanins น้ำหนักโมเลกุลสูงที่มี aglycone เป็น cyanidinin พบในส่วน of ใบเท่านั้น ส่วนที่มี aglycone เป็น peonidin พบทั้งในส่วน of ใบและเมล็ด อย่างไรก็ตามไม่พบความสัมพันธ์ที่เด่นชัดระหว่างโครงสร้างหรือปริมาณของ anthocyanins กับระยะการเจริญเติบโตของข้าวก่ำทั้งสองพันธุ์

บทที่ 6

บทสรุป

การวิเคราะห์สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ในข้าวสีพันธุ์ไทย ได้ทำการทดลองแบ่งออกเป็น 3 ตอน คือ ในเบื้องต้นทดลองหาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของรำข้าวสีดำกลุ่มข้าวเจ้าหอมนิลโดยใช้เทคนิคต่างกัน ควบคู่ไปกับการหาปริมาณ anthocyanins ที่เป็น pigments ที่สำคัญ 2 สารคือ cyanindin-3-O-glucoside และ peonidin-3-O-glucoside พบว่าฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่หาโดยวิธีต่างกันนั้ให้ผลสอดคล้องกัน แต่ไม่สอดคล้องกับผลของปริมาณ anthocyanin pigments ทั้งสอง การทดลองในส่วนต่อมาได้ทำการประยุกต์เทคนิคควบ HPLC-DAD, HPLC-ESI-MS และ HPLC-ESI-MS/MS เพื่อวิเคราะห์พิสูจน์โครงสร้างหรือหาลักษณะเฉพาะของสารกลุ่ม flavonoids ซึ่งทำการทดลองแบ่งเป็น 2 กลุ่ม (การทดลองตอนที่ 2 และ 3 ตามลำดับ) คือ กลุ่ม flavanone, flavone และ flavonol และกลุ่มที่สองคือสาร anthocyanins จากการวิจัยนี้ พบ flavonoids ที่สามารถพิสูจน์โครงสร้างได้รวม 24 สาร และเป็นสารที่ไม่เคยมีรายงานมาก่อนในต้นหรือเมล็ดข้าวสี จำนวน 10 สาร รายละเอียดข้อสรุปของการทดลองแต่ละตอนมีดังนี้

ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของรำข้าวหาในข้าวเจ้าดำสามพันธุ์คือ พันธุ์ KHNBT, KHNBT No. 3, and 1000-11-2-26 และรำข้าวเหนียวดำหนึ่งพันธุ์คือ พันธุ์ KHNBD ซึ่งเป็นพันธุ์แม่ ให้ผลเรียงลำดับจากมากไปน้อยดังนี้ 1000-11-2-26 > KHNBT No. 3 > KHNBD > KHNBT ผลดังกล่าวนี้สอดคล้องกันได้จากการใช้วิธีไทโอไซยาเนต ระบบดักจับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ด้วยการเรืองแสง (XYZ system) วิธีคอปเปอร์ทูโอออนต่อบาโรคลูโพรอิน คัลเลอริมิเตอร์ (PAO) ประสิทธิภาพในการจับประจุของอออนโลหะ และการเกิดปฏิกิริยาการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่อ DPPH อย่างไรก็ดีตามปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากรำข้าวทั้งสี่พันธุ์ให้ลำดับค่าแตกต่างไปดังนี้ พันธุ์ 1000-11-2-26 > KHNBD > KHNBT No. 3 > KHNBT และปริมาณสารสีกลุ่มแอนโทโรไซยานิน 2 สาร คือ cyanindin-3-O-glucoside และ peonidin-3-O-glucoside ในสารสกัดจากตัวอย่างรำข้าวสีดำพันธุ์ พันธุ์ 1000-11-2-26, KHNBD, KHNBT No. 3 และ KHNBT ด้วยเทคนิค HPLC-ESI-MS พบว่าให้ค่าไม่สอดคล้องกับค่าของฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัด แสดงว่าฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากรำข้าวดำไม่ได้ขึ้นตรงกับปริมาณสารสีแอนโทโรไซยานินดังกล่าว

ในส่วนการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารฟลาโวนอยด์ที่สะสมในใบ เมล็ด และรำข้าวสีดำทำได้โดยการวิเคราะห์สารสกัดหยาบด้วย HPLC-DAD และ HPLC-ESI-MS โดยวิธี screening จาก characteristic ions ของ flavonoids ในข้อมูล mass spectrum และวิเคราะห์เพื่อยืนยันโครงสร้างทางเคมีของสารฟลาโวนอยด์แต่ละตัวด้วยเทคนิค HPLC-ESI-MS/MS โดยใช้พื้นฐานรูปแบบ

การแตกตัว (fragmentation pattern) ที่ได้จากสาร flavonoids มาตรฐาน 17 สาร และศึกษาอิทธิพลของค่า collision energy ต่อทั้งรูปแบบการแตกตัวและค่า relative ion signal intensity พบโครงสร้างสารฟลาโวนอยด์กลุ่ม flavanone, flavone และ flavonol ในสารสกัดจากรำข้าวพันธุ์ KHNBT No.3, rice berry, 16815, 1000-11-2-26, 49-6-6-6-10, 132-1-1-3-3-1-4-4, 132-1-1-4-1-1-1-3 และ KDML จำนวน 12 สารคือ 5,3',4',5'-tetrahydroxyflavone-7-*O*-glucoside, 5,3',4',5'-tetrahydroxy flavanone-7-*O*-glucoside, 5,6,3',4',5'-pentahydroxyflavone-7-*O*-glucoside, taxifolin-3-*O*-glucoside, taxifolin, quertagetin-7-*O*-glucoside, myricetin-7-*O*-glucoside, quercetin-3-*O*-glucoside, rutin, isorhamnetin-3-*O*-glucoside, isorhamnetin-3-*O*-rutinoside, quercetin, isorhamnetin-3-*O*-acetylglucoside, 3,5,3'-trihydroxy-4'-methoxyflavone, 3,5,7,3'-tetrahydroxy-4'-methoxyflavone และ isorhamnetin โดยร่วของข้าวพันธุ์ 1000-11-2-26 มีปริมาณรวมของฟลาโวนอยด์สูงที่สุด รองลงไปก็คือ 16815 > rice berry > 132-1-1-3-3-1-4-4 > 49-6-6-6-10 > KHNBT No.3 > 132-1-1-4-1-1-3 ตามลำดับ

การพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารฟลาโวนอยด์ในกลุ่มแอนโทราไซยานิน ได้ทำการทดลองทั้งในส่วนของใบและเมล็ดข้าวข้าว จากข้าวเหนียวดำ 2 พันธุ์ คือพันธุ์เก่าดอยสะเก็ดและ BGMSN 11 ซึ่งข้าวทั้งสองพันธุ์มีสีของต้นและใบต่างกัน โดยพันธุ์เก่าดอยสะเก็ดมีต้นและใบสีม่วงดำ ส่วน BGMSN 11 มีต้นและใบสีเขียว สาร anthocyanins ที่พบมีทั้งสิ้น 12 สาร ได้แก่ cyanidin-3-*O*-glucoside, cyanidin-3-*O*-glucoside-5-*O*-rhamnoside, peonidin-3-*O*-glucoside, cyanidin-3-*O*-diglucoside, cyanidin-3-*O*-diglucoside-5-*O*-glucoside, cyanidin-3-*O*-(*p*-coumaroyl)glucoside-5-*O*-glucoside, cyanidin-3-*O*-(feruloyl)glucoside-5-*O*-glucoside, peonidin-3-*O*-diglucoside, malvidin-3-*O*-(*p*-coumaroyl)glucoside-5-*O*-glucoside, และ peonidin-3-*O*-(*p*-coumaroyl)glucoside-5-*O*-xyloside, cyanidin-3-*O*-xyloside glucoside และไอโซเมอร์ของ cyanidin-3-*O*-xyloside-glucoside โดยมีสารแอนโทราไซยานิน 6 สารที่พบในใบและเมล็ดของข้าวสีดำเป็นครั้งแรกในการศึกษานี้ คือ cyanidin-3-*O*-diglucoside-5-*O*-glucoside, cyanidin-3-*O*-(*p*-coumaroyl)glucoside-5-*O*-glucoside, cyanidin-3-*O*-(feruloyl)glucoside-5-*O*-glucoside, peonidin-3-*O*-diglucoside, peonidin-3-*O*-(*p*-coumaroyl)glucoside-5-*O*-xyloside, และ malvidin-3-*O*-(*p*-coumaroyl)glucoside-5-*O*-glucoside

การวิเคราะห์เชิงปริมาณของสาร antocyanins แต่ละตัวที่หาโครงสร้างได้นี้ทำการทดลองเพื่อศึกษาการกระจายตัวของ antocyanins ในใบและเมล็ดข้าวสีดำทั้งสองพันธุ์ และที่ระยะการเจริญเติบโตต่างกัน ได้แก่ ระยะที่เป็นต้นกล้า ระยะแตกกอ ระยะตั้งท้อง ระยะนํ้านม ระยะแป้งอ่อน ระยะแก่ของเมล็ด และระยะหลังการเก็บเกี่ยว พบว่าในจำนวน anthocyanins ที่พิสูจน์โครงสร้างได้

ในสารสกัดจากใบและเมล็ดข้าวกล้าพันธุ์เก่าดอยสะเก็ด และ BGMSN 11 นั้น anthocyanin pigments ได้แก่ cyanidin-3-*O*-glucoside, peonidin-3-*O*-glucoside และ cyanidin-3-*O*-rutinoside พบเฉพาะในส่วนของเมล็ดของข้าวทั้งสองพันธุ์ โดยมีปริมาณสัมพันธ์ในใบเพิ่มขึ้นจากระยะ milk grain, dough grain จนถึง maturation ยกเว้น cyanidin-3-*O*-rutinoside ซึ่งพบมีปริมาณมากที่สุดที่ระยะ maturation stage สาร anthocyanins เหล่านี้เป็น monoglucoside (มีน้ำตาล 1 โมเลกุล) และมักเป็นสารให้สีในพืช (phyto pigments) โดยเฉพาะ cyanidin-3-*O*-glucoside และ peonidin-3-*O*-glucoside ซึ่งมีสีแดงและม่วงแดงตามลำดับ สาร anthocyanins เหล่านี้จึงมีบทบาทสำคัญต่อสีของเมล็ดข้าวทั้งสองพันธุ์ ดังนั้นการพบ cyanidin-3-*O*-glucoside และ peonidin-3-*O*-glucoside เฉพาะในใบของต้นข้าวพันธุ์เก่าดอยสะเก็ดซึ่งมีใบสีม่วงเข้ม และไม่พบในใบของพันธุ์ BGMSN 11 ซึ่งมีใบสีเขียวจึงเป็นการยืนยันว่าสีม่วงเข้มของใบข้าวกล้าพันธุ์เก่าคือสีของ anthocyanin pigments ทั้งสองนี้

สาร anthocyanins ที่มีโมเลกุลของน้ำตาลหรือ acylate groups มาพันธะด้วยจำนวน 2-3 โมเลกุล ไม่พบมีการสะสมในส่วนของเมล็ดของข้าวกล้าทั้งสองพันธุ์ ปริมาณของ anthocyanins เหล่านี้แตกต่างกันไปในแต่ละระยะการเติบโตของต้นข้าว แต่พบว่ามีความคล้ายคลึงกัน กล่าวคือมีปริมาณสูงขึ้นจากระยะ seedling ถึง booting และลดลงจากระยะ milk grain ถึง maturation stage การลดลงของสาร anthocyanins ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงเหล่านี้เมื่อเริ่มเข้าระยะที่ข้าวเริ่มผลิตเมล็ดแสดงให้เห็นว่าในระหว่างที่สารเหล่านี้เคลื่อนที่จากใบ (translocation) ไปสะสมในเมล็ดข้าว จะเกิดการสูญเสียโมเลกุลของน้ำตาลออกไป

อย่างไรก็ตามอาจพบ anthocyanins ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงบางตัวทั้งในใบและเมล็ดของข้าวทั้งสองพันธุ์ โดยสารทั้งสองมีปริมาณสัมพันธ์สูงสุดในเมล็ดในระยะ milk grain สำหรับ anthocyanins ที่มีโมเลกุลของน้ำตาลหรือ acylate groups มาพันธะด้วยจำนวน 2-3 โมเลกุลเมื่อพิจารณาในส่วนของ anthocyanin aglycone ทั้ง 2 โครงสร้าง ที่พบในใบและเมล็ดข้าวทั้งสองพันธุ์ ได้แก่ cyanidin และ peonidin นั้น จะเห็นว่า anthocyanins น้ำหนักโมเลกุลสูงที่มี aglycone เป็น cyanidin พบในส่วนของใบเท่านั้น ส่วนที่มี aglycone เป็น peonidin พบทั้งในส่วนของใบและเมล็ด อย่างไรก็ตามไม่พบความสัมพันธ์ที่เด่นชัดระหว่างโครงสร้างหรือปริมาณของ anthocyanins กับระยะการเจริญเติบโตของข้าวกล้าทั้งสองพันธุ์

เอกสารอ้างอิง

1. <http://en.wikipedia.org/wiki/Rice>
2. <http://www.botanical.com/butanical/mgmh/r/rice--15.html>
3. ชาญ มงคล. เรื่องข้าว. กรุงเทพฯ : หน่วยศึกษานิเทศก์ กรมการฝึกหัดครู 2536.
4. http://e-service.agri.cmu.ac.th/project/view_project_show.asp?id=115
5. <http://www.sininrice.com/SininFile/information>
6. สุกัญญา วงศ์พรชัย. แมสสเปกโตรเมตรีในทางเคมีอินทรีย์. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ISBN 974-656-811-6. 2004.
7. Agilent Technologies, *LC/MSD Software Operation Course Number H1180A*, Volume 1, California : California Analytical Division, Agilent Technologies, 1998.
8. E. De Hoffmann, J. Charette, V. Stroombant, *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. Paris : Masson éditeur, 1996.
9. K.L. Busch, G.L. Glish, S.A. McLuckey, *Mass Spectrometry/Mass Spectrometry: Techniques and Applications of Tandem Mass Spectrometry*. New York: VCH Publishers, Inc., 1988.
10. J. Wang, X. Wang, Y. Wang, *Shipin Kexue (Beijing, China)*, **1993**, 162, 13-17.
11. S-K. Oh, H-C. Choi, M-Y. Cho and S-U. Kim. *J. Korean Agricul. Chem. and Biotech.*, **1996**, 39, 327-331.
12. Q. Zhang, *Qingdao Daxue Xuebao, Gongcheng Jishuban*, **2000**, 15, 24-26.
13. H-J. Chung, and S-T. Lim., *J. Food Sci. Nutr.*, **1994**, 4, 231-235.
14. Q. Zhang, L. Yong, B. Jin., *Abstract. Shipin Kexue (Beijing)*, **1999**, 20, 12-16.
15. L. Sun, M-W. Zhang, J-W. Chi, L-Z. Lai, X-Q. Zhang, *Abstract. Yingyang Xuebao*, **2000**, 22, 246-249.
16. W. H. Ling, Q. X. Chen, W. T. Jing, *J. Nutr.*, **2001**, 131, 1421-1426.
17. W.H. Ling, L. L. Wang, J. Ma, *J. Nutr.*, **2002**, 131, 1421-1426.
18. T. Itani, H. Tatemoto, F. Mitsuyoshi, K. Fujii, N. Muto, *Abstract. Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi*, **2002**, 49, 540-543.
19. C. Hu, J. Zawistowski, W. Ling, D.D. Kitts, *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 51, 5271-5277.
20. N. Ramarathnam, T. Osawa, M. Namiki, S. Kawakishi, *J. Agric. Food Chem.*, **1989**, 37, 316-319.
21. R. J. Grayer, J. B. Harborne, F. M. Kimmins, P. C. Stevenson, H. N. P. Wijayagunasekera, *Acta Hort.*, **1994**, 381, 691-694.
22. V. M. Dillon, J. Overton, R. J. Grayer, J. B. Jeffrey, *Phytochemistry*, **1997**, 44, 599-603.

23. A. Padmavati, N. Sakthivel, K. V. Thara, A. R. Reddy, *Phytochemistry*, **1997**, *46*, 499-502.
24. R. Rakwal, G. K. Agrawal, M. Yonekura, O. Kodama, *Plant Sci.*, **2000**, *155*, 213-221.
25. P. Mattila, J. Astola, J. Kumpulainen, *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, *48*, 5834-5841.
26. H.M. Merken, G. R. Beecher, *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, *48*: 578-599.
27. H. Sakakibara, Y. Honda, S. Nakagawa, H. Ashida, K. Kanazawa, *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, *51*, 571-581.
28. M. Satterfield, J. S. Brodbelt, *Anal. Chem.*, **2000**, *72*, 5898-5906.
29. F. Cuyckens, M. Claeys, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2002**, *16*, 2341-2348.
30. de Rijke, E. H. Zappey, F. Ariese, C. Gooijer, U. A. Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A*, **2003**, *984*, 45-58.
31. U. Justesen, *J. Mass Spectrom.*, **2001**, *36*, 169-178.
32. E. Hvattum, D. Ekeberg, *J. Mass Spectrom.*, **2003**, *38*, 43-49.
33. R. J. Hughes, T. R. Croley, C. D. Metcalfe, R. E. March, *Int. J. Mass Spectrom.*, **2001**, *210/211*, 371-385.
34. C. Caristi, E. Bellocco, V. Panzera, G. Toscano, R. Vadala, U. Leuzzi, *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, *51*, 3528-3534.
35. L.-Z. Lin, X.-G. He, M. Lindenmaier, G. Nolan, J. Yang, M. Cleary, S.-X. Qiu and G. A. Cordell, *J. Chromatogr. A*, **2000**, *876*, 87-95.
36. Q. Tian, D. Li, B. S. Patil, *Phytochem. Anal.*, **2002**, *13*, 251-256.
37. M. Chen, F. Song, M. Guo, Z. Liu, S. Liu, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2002**, *16*, 264-271.
38. E. Hvattum, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2002**, *16*, 655-662.
39. M. A. Aramendia, I. Garcia, F. Lafont, J. M. Marinas, *J. Chromatogr. A*, **1995**, *707*, 327-33.
40. M. A. Aramendia, V. Borau, I. Garcia, C. Jimenez, F. Lafont, J. M. Marinas, A. Porras, F. J. Urbano, *J. Mass Spectrom.*, **1995**, (*Spec. Issue*), S153-S157.
41. A. Ferina, A. Doldo, V. Cotichini, M. Rejevic, M. G. Quaglia, N. Mulinacci, F. F. Vincieri, *J. Pharmac. Biomed. Anal.*, **1995**, *14*, 203-211.
42. P. Bridle, C. G. Viguera, *Food Chem.*, **1996**, *55*, 111-113.
43. J. Bakker, P. Bridle, T. Honda, H. Kuwano, N. Saito, N. Terhara, C. F. Timberlake, *Phytochemistry*, **1997**, *44*, 1375-1382.
44. R. Norbaek, T. Kondo, *Phytochemistry*, **1998**, *47*, 861-864.
45. K. Torskangerpoll, T. Fossen, E.M. Andersen, *Phytochemistry*, **1999**, *52*, 1686-1692.
46. M.S. Narayan, L.V. Venkataraman, *Food Chem.*, **2000**, *70*, 361-363.
47. P. Dugo. Giuffrida, G. Dugo, L. Mondello, *J. Chromatog. A*, **2001**, *1189*, 196-206.

48. T. Fossen, R. Slimestad, D.O. Ovstedal, O.M. Andersen, *Biochem. Syst. Ecol.*, **2002**, *30*, 855–864.
49. T. Fossen, D. O. vstedal, *Phytochemistry*, **2003**, *63*, 783–787.
50. A. De Villiersa, G. Vanhoenackerb, P. Majekc, P. Sandraa, *J. Chromatog. A*, **2004**, *1054*, 195–204.
51. Q. Tian, I. Konczak, S. Schwartz, *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, *53*, 6503–6509.
52. L. Longo, G. Vasapollo, *Food Chem.*, **2006**, *94*, 226–231.
53. L. Longo, A. Scardino, and G. Vasapollo, *Inno. Food Sci. Emerg. Technol.*, **2007**, *8*, 360–364.
54. M. Duenas, J. J. Perez-Alonso, C. Santos-Buelga, T. Escribano-Bailon, *J. Food Comp. Anal.*, **2008**, *21*, 107–115.
55. T. Osawa, M. Namiki, *Agri. Bio.Chem.*, **1981**, *45*, 735–739.
56. T. Tsuda, Y. Makino, H. Kato, T. Osawa, S. Kawakishi, *J. Biotechnol. Biochem.*, **1993**, *57*, 1606–1608.
57. K. Okubo, Y. Yoshiki, *Bio. Factors*, **2000**, *13*, 219–223.
58. Y. Yoshiki, T. Iida, Y. Akiyama, K. Okubo, H. Matsumoto, M. Sato, *Luminescence*, **2001**, *16*, 327–335.
59. R. Amarowicz, R.B. Pegg, P. Rahimi-Moghaddam, B. Barl, J. Weil, *Food Chem.*, **2004**, *84*, 551–562.
60. S.H. Nam, S.P. Choi, M.Y. Kang, N. Kozukue, M. Friedman, *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, *53*, 816–822.
61. B.D. Davis, J.S. Brodbelt, *J Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2004**, *21*, 1287–1299
62. C.T. Costa, D. Horton, S.A. Margolis, *J. Chromatogr. A.*, **2000**, *881*, 403
63. M.C. Oliveira, P. Esperanca, M.A. Almoester Ferreira, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2001**, *15*, 1525–1532

