บทที่ 2
วารสารปริทัศน์

2.1 ข้าว

ข้าวเป็นพืชตระกูลหญ้า (วงศ์ Graminea) ซึ่งจัดอยู่ในสกุลออไรซา (Genus *Oryza*) เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (monocotyledon) และมีระบบรากฝอย (fibrous root system) สามารถเจริญเติบโตได้ทั้งในเขตร้อนและเขตอบอุ่น ข้าวในสกุลออไรซามีด้วยกันทั้งหมด 23 species เป็นข้าวป่า 21 species และข้าวพันธุ์ปลูกที่สามารถบริโภคได้อีก 2 species คือ *Oryza glaberrima* มีแหล่งกำเนิดในทวีปแอฟริกา และ *Oryza sativa* L. มีแหล่งกำเนิดในทวีปเอเชีย โดยในสายพันธุ์ชนิดหลังนี้จะมีความหลากหลายของ subspecies มากกว่า *Oryza glaberrima* อีกทั้งยังมีแหล่งปลูกที่กระจายไปตามบริเวณต่างๆ ทั่วโลก จึงเป็นที่รู้จักและยอมรับกันอย่างกว้างขวาง (อรอนงค์ นัยวิกุล, 2550)

2.1.1 ข้าวหอมมะลิแดง

ข้าวหอมมะลิแดง เป็นข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่เกิดจากการกลายพันธุ์มาจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 โดยธรรมชาติ มีลักษณะเป็นข้าวเจ้าที่ไวต่อช่วงแสง มีความต้านทานโรคและแมลงสูง ลำต้นสูงประมาณ 120 – 130 cm เมล็ดข้าวมีความกว้าง ความยาว และความหนา โดยเฉลี่ย เท่ากับ 2.1 7.5 และ 1.7 mm ตามลำดับ มีปริมาณแอมิโลส 16.9 % สำหรับประเทศไทยนิยมปลูกในแถบภาคกลาง ภาคตะวันตก และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ข้าวสุกที่ได้มีลักษณะนุ่ม เหนียว และมีกลิ่นหอมเหมือนข้าวขาวดอกมะลิ 105 แต่มีลักษณะเด่นที่แตกต่างออกไป คือ เยื่อหุ้มเมล็ดข้าวกล้องมีสีแดง (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2549) จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า ข้าวพันธุ์ที่มีสีจะมีสารต้านออกซิเดชันในปริมาณที่สูง (Toyokuni และคณะ, 2002; Hu และคณะ, 2003; Nam และคณะ, 2006) จึงช่วยในการป้องกันและรักษาโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคเบาหวาน และโรคหลอดเลือดอุดตัน ได้ดีกว่าข้าวขาวทั่วไป

2.2 การปฏิบัติหลังการเก็บเกี่ยวข้าวเปลือก

2.2.1 ขั้นตอนการปฏิบัติหลังการเก็บเกี่ยวข้าวเปลือก

หลังจากเก็บเกี่ยวข้าวแล้ว จะมีการนวดข้าวเพื่อให้เมล็ดข้าวหลุดออกจากรวง ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธี เช่น นวดด้วยการฟาด การย่ำด้วยเท้าคน แต่ในปัจจุบันนิยมใช้เครื่องนวด การนวดข้าวอาจทำให้เมล็ดข้าวเกิดรอยร้าว ซึ่งมีผลต่อคุณภาพการขัดสี ทำให้มีข้าวหักมากขึ้น (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2545) นอกจากนี้ข้าวเปลือกที่ได้หลังจากการนวดยังคงมีความชื้นในเมล็ดสูง ซึ่งอาจทำให้มีการเจริญเติบโตของแมลงและเชื้อราในระหว่างการเก็บรักษา ดังนั้นหลังจากเก็บเกี่ยวและนวดแล้วจะต้องรีบลดความชื้นเมล็ดให้แห้งโดยเร็วที่สุด เพื่อลดอัตราการหายใจของเมล็ดและลดการเกิดเชื้อรา ซึ่งเป็นสาเหตุให้เมล็ดเสื่อมคุณภาพ (Brooker, Bakker-arkema และ Hall, 1975; Howell, 2003) อีกทั้งยังช่วยลดค่าใช้จ่ายในระหว่างการเก็บรักษาได้ (Inprasit และ Noomhorm, 2001)

2.2.2 วิธีการทำแห้งข้าวเปลือก

วิธีการทำแห้งเพื่อลดความชื้นข้าวเปลือกมีอยู่หลายวิธี เช่น การทำแห้งในที่ร่ม (Shade drying) การทำแห้งด้วยแสงอาทิตย์ (Sun drying) และการทำแห้งด้วยเครื่องอบแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด (Fluidized bed drying)

2.2.2.1 การทำแห้งในที่ร่ม (Shade drying)

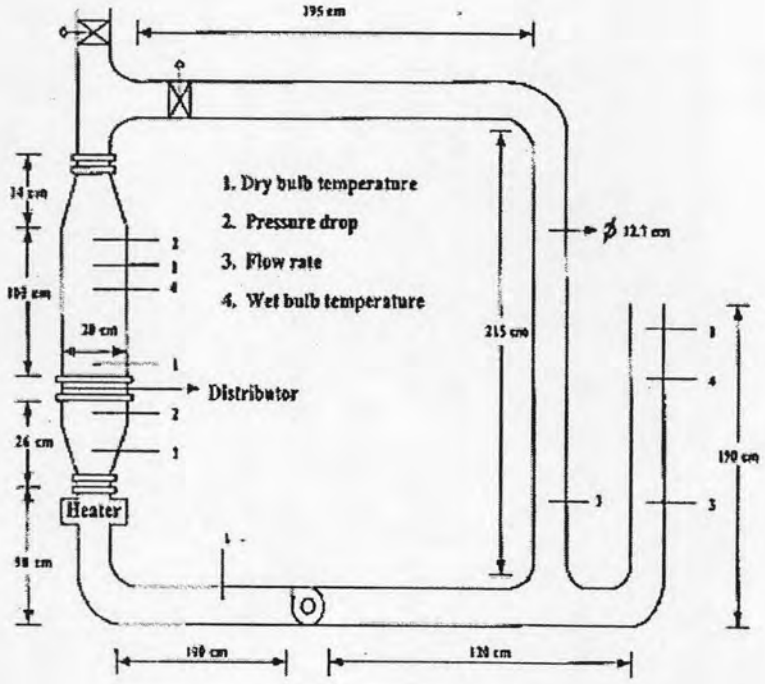
การทำแห้งในที่ร่มเป็นวิธีที่ง่าย และเสียค่าใช้จ่ายน้อย แต่มีข้อเสีย คือ ใช้เวลานาน (ประมาณ 7 วัน) ในการลดความชื้นจนได้ข้าวเปลือกที่มีความชื้นตามที่ต้องการ โดยทั่วไปแล้วการทำแห้งด้วยวิธีนี้จะนิยมใช้เป็นวิธีควบคุมเพื่อศึกษาผลของวิธีการทำแห้งต่อคุณภาพของข้าว (Inprasit และ Noomhorm, 2001)

2.2.2.2 การทำแห้งด้วยแสงอาทิตย์ (Sun drying)

การทำแห้งด้วยแสงอาทิตย์เป็นวิธีที่นิยมใช้ในแถบทวีปเอเชีย เนื่องจากทำได้ง่ายและเสียค่าใช้จ่ายน้อย วิธีนี้จะใช้แสงอาทิตย์เป็นตัวกลางในการให้ความร้อน ทำให้ความชื้นของข้าวเปลือกลดลง ควรใช้วัสดุที่สะอาดและแห้ง เช่น ผ้าใบ เสื่อ รองรับเมล็ดข้าวระหว่างการทำแห้ง ไม่ควรวางเมล็ดข้าวลงบนพื้นซีเมนต์หรือถนนโดยตรง เพราะเมล็ดจะได้รับความร้อนสูงเกินไป ทำให้เมล็ดแตกร้าวในระหว่างการสีข้าวได้ ในการทำแห้งควรให้ชั้นข้าวมีความหนาประมาณ 2-4 cm เพื่อให้มีการระบายอากาศที่ดี และควรกลับกองข้าวทุกๆ 2 ชั่วโมง จะช่วยให้ลดความชื้นได้เร็วขึ้น แต่วิธีนี้จะมีข้อจำกัดในบางกรณี เช่น ในฤดูฝน จะไม่สามารถใช้วิธีนี้ได้ และยังไม่สามารถควบคุมปริมาณความชื้นของข้าวให้มีความสม่ำเสมอทั่วถึงกันได้ (Grist, 1986; International Rice Research Institute, 2004)

2.2.2.3 การทำแห้งด้วยเครื่องอบแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด (Fluidized bed drying)

ในประเทศไทยเริ่มมีการใช้เครื่องอบแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบดระดับอุตสาหกรรมตั้งแต่ปี พ.ศ. 2538 แผนผังของเครื่องอบแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบดแสดงในรูปที่ 2.1 โดยมีหลักการ คือ เป็นกระบวนการที่ของแข็งที่มีลักษณะเป็นเม็ดหรือชิ้น สัมผัสกับอากาศร้อนที่พัดขึ้นจากด้านล่างของเครื่องและทำให้อนุภาคของแข็งนั้นเกิดการผสมและกวนอย่างรุนแรง (fluidized) อากาศจึงเป็นทั้งตัวกลางในการทำแห้งและการทำให้เกิดฟลูอิไดซ์ด้วย (วิไล รังสาดทอง, 2547) โดยความเร็วของอากาศจะต้องมากพอที่จะต้านแรงโน้มถ่วงของอนุภาคของแข็ง ทำให้อนุภาคของแข็งลอยอยู่ในอากาศจนมีคุณสมบัติคล้ายของไหล การใช้เครื่องอบแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบดมีข้อดีหลายประการ เช่น มีอัตราการอบแห้งสูงกว่าเครื่องอบแห้งชนิดอื่น เนื่องจากอนุภาคของแข็งเกิดการลอยตัวและสัมผัสกับอากาศร้อนได้มาก จึงเกิดการถ่ายเทความร้อนได้ดี อีกทั้งอนุภาคของแข็งยังเกิดการคลุกเคล้าในระหว่างการทำแห้ง ทำให้มีคุณภาพหลังการทำแห้งใกล้เคียงกัน แต่มีข้อเสีย คือ ขนาดของอนุภาคของแข็งจะมีผลต่อความเร็วลมในการทำให้เกิดฟลูอิไดซ์เบด ดังนั้นเมื่อคำนวณความเร็วลมที่เหมาะสมกับอนุภาคของแข็งแล้ว จะไม่สามารถปรับระดับความเร็วลมได้ เพราะถ้ามีความเร็วลมมากเกินไปอนุภาคของแข็งจะหลุดออกจากห้องอบแห้งได้ แต่ถ้ามีความเร็วลมน้อยเกินไปจะไม่เกิดลักษณะฟลูอิไดซ์ขึ้น (Soponronnarit, 1996)



รูปที่ 2.1 แผนผังของเครื่องอบแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด (Tirawanichakul และคณะ, 2004)

2.2.3 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพหลังการเก็บเกี่ยวข้าวเปลือก

การเปลี่ยนแปลงของข้าวสามารถเกิดขึ้นได้ตลอดเวลาตั้งแต่การเก็บเกี่ยวจนถึงมือผู้บริโภค โดยขึ้นอยู่กับภาวะการเก็บรักษา เช่น อุณหภูมิ เวลา และความชื้น รวมทั้งวิธีการทำแห้งในการลดความชื้นเมล็ดข้าว ปัจจัยเหล่านี้มีผลต่อสมบัติทางกายภาพ เคมี และคุณภาพข้าว การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นเกี่ยวข้องกับองค์ประกอบในเมล็ดข้าว ได้แก่ สตาร์ช โปรตีน และไขมัน เช่น การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโปรตีนในเมล็ดข้าว การเกิดสารเชิงซ้อนระหว่างแอมิโลสและกรดไขมันอิสระที่ได้จากกระบวนการไฮโดรไลซิสของไขมัน ทำให้เนื้อสัมผัสของข้าวสุกเปลี่ยนแปลงไป อีกทั้งไฮโดรเพอร์ออกไซด์ที่ได้จากกระบวนการออกซิเดชันของไขมันสลายตัวให้สารประกอบคาร์บอนิล จึงเกิดกลิ่นหืนในข้าวเก่า นอกจากนี้ยังพบการลดลงของปริมาณสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) ในเมล็ดข้าวระหว่างการเก็บรักษา (Juliano, 1985; Inprasit และ Noomhorm, 2001; Wongpornchai และคณะ, 2004; Tulyathan และ Leeharatanaluk, 2006)

2.3 วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

การเสื่อมเสียของอาหารจากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันหรือสารอื่น เช่น รงควัตถุ ทำให้อาหารมีลักษณะที่ไม่พึงประสงค์ ไม่ว่าจะเป็นสี กลิ่นหรือกลิ่นรสที่ผิดปกติ ตลอดจนคุณค่าทางโภชนาการของอาหารที่ลดลง จึงได้มีวิธีวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารต้านออกซิเดชัน (antioxidant) ที่มีอยู่ในอาหาร ซึ่งสามารถวิเคราะห์ได้ทั้งในระบบที่มีไขมัน (lipid system) และ ระบบที่ไม่มีไขมัน (non-lipid system)

2.3.1 ระบบที่มีไขมัน (Lipid system)

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในระบบนี้ มีความใกล้เคียงกับการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในอาหาร สามารถแบ่งวิธีการวิเคราะห์ออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ 1) การประเมินทางประสาทสัมผัส 2) การวิเคราะห์ทางเคมี เช่น การหาค่าเปอร์ออกไซด์ การทดสอบด้วยกรดไทโอบาบิทูริก และการหาปริมาณสารประกอบคาร์บอนิล เป็นต้น 3) การใช้เครื่องมือ เช่น การวิเคราะห์สารระเหยที่เกิดขึ้นในระหว่างการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ด้วยเครื่อง gas chromatrography อย่างไรก็ดี การวิเคราะห์ในลักษณะนี้มีข้อเสียหลายประการ เช่น ใช้เวลานาน และอาจใช้ภาวะเร่ง เช่น การให้อุณหภูมิสูง ซึ่งอาจมีการเสื่อมสลายของสารตั้งต้นหรือผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาออกซิเดชัน ทำให้ผลที่ได้คลาดเคลื่อนไป (Frankel, 2005) จึงได้มีการคิดค้นวิธีวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในระบบที่ไม่มีไขมัน ซึ่งใช้เวลาในการวิเคราะห์ที่สั้นกว่า โดยสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้คราวละมากๆ ในเวลาเพียงไม่กี่ชั่วโมง

2.3.2 ระบบที่ไม่มีไขมัน (Non-lipid system)

การวิเคราะห์ในระบบนี้จะมีการสกัดสารที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน เช่น สารกลุ่มฟีนอลิก โดยส่วนใหญ่แล้วสารกลุ่มฟีนอลิกในอาหารจะเป็นสารประกอบประเภท hydrophilic ที่มีความสามารถในการละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ได้สูง ดังนั้นจึงนิยมใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในการสกัด เพื่อให้สามารถทำละลายสารกลุ่มฟีนอลิกส่วนใหญ่ในอาหารได้ (Skrede และ Wrolstad, 2002) สารสกัดที่ได้จะนำมาวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ในงานวิจัยส่วนใหญ่จะใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายเพื่อวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากพืช เนื่องจากเมทานอลมีขั้วค่อนข้างสูง มีจุด

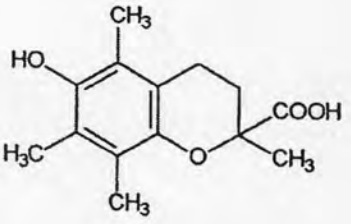
เดือดต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับตัวทำละลายชนิดอื่น และมีราคาถูก (Kamath, Chandrashekar และ Rajini, 2004; Waterhouse, 2005; Choi, Jeong และ Lee, 2007)

การวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันในระบบที่ไม่มีไขมัน สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ การวิเคราะห์ความสามารถในการถ่ายโอนไฮโดรเจนอะตอม (Hydrogen atom transfer) การวิเคราะห์ความสามารถในการถ่ายโอนอิเล็กตรอนเดี่ยว (Single electron transfer) และการวิเคราะห์ความสามารถในการถ่ายโอนทั้งไฮโดรเจนอะตอมและอิเล็กตรอนเดี่ยว (Prior, Wu และ Schaich, 2005)

2.3.2.1 **การวิเคราะห์ความสามารถในการถ่ายโอนไฮโดรเจนอะตอม (Hydrogen atom transfer)** (Prior และคณะ, 2005)

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันตามกลไกนี้จะใช้เวลาสั้น อีกทั้งปฏิกิริยาที่เกิดจะไม่ขึ้นกับชนิดของตัวทำละลายและค่า pH ของสารสกัด ตัวอย่างของวิธีวิเคราะห์ในกลุ่มนี้ที่นิยมใช้กันมากคือ Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay (ORAC) เป็นการวัดความสามารถในการจับอนุมูลอิสระในรูป peroxyl radicals ตามกลไกดังนี้ peroxyl radicals ทำปฏิกิริยากับสารเรืองแสง (fluorescent probe) ที่มีอยู่ในระบบ ทำให้ไม่เกิดการเรืองแสง หากปริมาณอนุมูลอิสระในระบบลดลงเนื่องจากประสิทธิภาพของสารต้านออกซิเดชัน จะเป็นผลให้สารเรืองแสงมีความเข้มเพิ่มขึ้น ดังนั้นจึงสามารถติดตามผลการลดลงของอนุมูลอิสระโดยติดตามการเพิ่มขึ้นของสารเรืองแสง โดยทั่วไปจะบันทึกผลเมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปตั้งแต่ 30 นาทีขึ้นไป และรายงานเป็นค่า Trolox equivalents (TE) ซึ่ง Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid; รูปที่ 2.2) เป็นสารกลุ่มฟีนอลิกที่นิยมใช้เป็นสารอ้างอิงสำหรับการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้จาก ORAC และวิธีอื่นๆ สารเรืองแสงที่นิยมใช้ในปัจจุบัน คือ fluorescein หรือ dichlorofluorescein ซึ่งมีความเสถียร และไม่ทำปฏิกิริยากับสารต้านออกซิเดชันในตัวอย่าง

ข้อดีของวิธีนี้คือ วัดความสามารถของสารต้านออกซิเดชันในการจับ peroxyl radicals ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่พบได้ในระบบร่างกาย และสามารถวิเคราะห์สารต้านออกซิเดชันที่เป็นทั้ง hydrophilic และ lipophilic อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีข้อเสียคือ ต้องใช้ fluorometers วัดปริมาณสารเรืองแสง ซึ่งเป็นเครื่องมือเฉพาะที่ไม่ค่อยมีการใช้ทั่วไปและใช้เวลาในการวิเคราะห์ค่อนข้างนาน

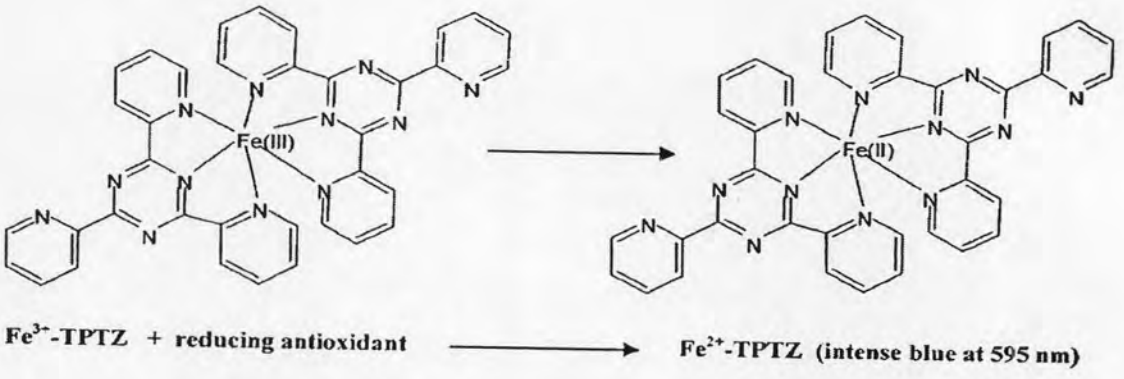


รูปที่ 2.2 สูตรโครงสร้างของ Trolox (Pannala และคณะ, 1998)

2.3.2.2 **การวิเคราะห์ความสามารถในการถ่ายโอนอิเล็กตรอนเดี่ยว** (Single electron transfer) (Prior และคณะ, 2005)

วิธีนี้จะใช้เวลาค่อนข้างนานกว่าจะเกิดปฏิกิริยาโดยสมบูรณ์ (เข้าสู่ steady state) จึงมักแสดงผลในรูปของเปอร์เซ็นต์การลดลงของอนุมูลอิสระ และปฏิกิริยาที่เกิดจะขึ้นอยู่กับ pH ของระบบ ตัวอย่างของวิธีวิเคราะห์ในกลุ่มนี้ที่นิยมใช้คือ Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) โดยมีหลักการ คือ วัดความสามารถในการเป็นสารรีดิวซิ่ง (reducing power) ของสารต้านออกซิเดชันในสารละลายที่เป็นกรด เพื่อรักษาความสามารถในการละลายของเหล็กไว้ อีกทั้งการเกิดปฏิกิริยาที่ pH ต่ำนั้นจะลดค่า ionization potential ทำให้อิเล็กตรอนเกิดการเคลื่อนที่ ติดตามผลโดยดูการเปลี่ยนสีของสารประกอบ ferric-tripyridyltriazine (Fe^{3+}-TPTZ) ซึ่งเป็นสารประกอบที่ไม่มีสีไปเป็นสารประกอบ ferrous-tripyridyltriazine (Fe^{2+}-TPTZ) ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีสี (รูปที่ 2.3) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm ที่เวลา 4 นาที แสดงผลวิเคราะห์ในรูปของ TE อย่างไรก็ตามเวลาในการวัดการเกิดปฏิกิริยาอาจไม่เท่ากัน ขึ้นอยู่กับลักษณะของตัวอย่างที่วิเคราะห์ (Pulido, Bravo และ Saura-Calixo, 2000)

วิธีนี้มีข้อดีคือ ไม่ยุ่งยาก ใช้เวลาวิเคราะห์สั้น และไม่ต้องใช้เครื่องมือที่มีความจำเพาะในการวิเคราะห์เหมือนกับวิธี ORAC แต่ก็มีข้อเสีย คือ ไม่สามารถวิเคราะห์สารต้านออกซิเดชันที่มีกลไกการยับยั้งอนุมูลอิสระโดยการถ่ายโอนไฮโดรเจนอะตอมได้ รวมทั้งโปรตีน และ thiols เช่น glutathione ทำให้การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในซีรัมมีค่าต่ำกว่าความเป็นจริง



รูปที่ 2.3 ปฏิกิริยารีดอกซ์ที่เกิดขึ้นระหว่างการวิเคราะห์ด้วยวิธี Ferric Reducing Antioxidant Power (Prior และคณะ, 2005)

2.3.2.3 **การวิเคราะห์ความสามารถในการถ่ายโอนทั้งไฮโดรเจนอะตอมและอิเล็กตรอนเดี่ยว** (Prior และคณะ, 2005)

โดยทั่วไปแล้ววิธี 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) และ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) มักถูกจัดอยู่ในกลุ่มที่มีกลไกในการถ่ายโอนอิเล็กตรอน แต่ในความเป็นจริงแล้วในทั้ง 2 วิธีดังกล่าว อนุมูลอิสระอาจถูกรีดิวซ์โดยการถ่ายโอนอิเล็กตรอน หรือเกิดการยับยั้งอนุมูลอิสระโดยการถ่ายโอนไฮโดรเจนอะตอมก็ได้

(1) Trolox Equipvalent Antioxidant Capacity Assay (TEAC)

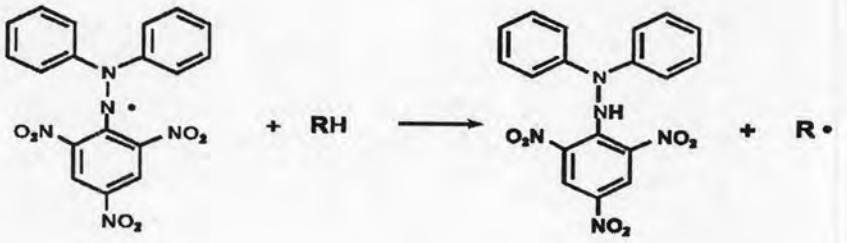
วิธีนี้มีหลักการคือ วัดความสามารถของสารต้านออกซิเดชันในการจับอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ ที่ให้สีน้ำเงิน โดยอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ จะเปลี่ยนรูปมาจาก ABTS ที่ถูกออกซิไดซ์ด้วย peroxyl radicals หรือสารออกซิไดซ์ชนิดอื่นๆ ติดตามการลดลงของอนุมูลอิสระโดยดูการลดลงของสีน้ำเงินในตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 734 nm ที่เวลา 4-6 นาที แสดงผลวิเคราะห์ในรูปของ TE

ข้อดีของวิธีนี้คือ ไม่ซับซ้อน อีกทั้งอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ สามารถละลายได้ทั้งในตัวทำละลายอินทรีย์และน้ำ และไม่ขึ้นกับค่า pH ของสารสกัด จึงสามารถวิเคราะห์สาร

ต้านออกซิเดชันที่เป็น hydrophilic และ lipophilic ได้ รวมทั้งสามารถศึกษาผลของค่า pH ต่อกลไกของสารต้านออกซิเดชันด้วย แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีข้อเสียคือ เวลาที่ใช้วัดการเกิดปฏิกิริยาค่อนข้างสั้น ตัวอย่างบางชนิดยังเกิดปฏิกิริยาไม่สมบูรณ์ ผลที่ได้อาจมีค่าต่ำ จึงไม่เหมาะในการวิเคราะห์ปริมาณของสารต้านออกซิเดชัน แต่สามารถใช้ได้ในเชิงเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของตัวอย่างต่างๆ กัน

(2) 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Assay

วิธีนี้มีหลักการคือ วัดความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระชนิด DPPH ของสารต้านออกซิเดชัน (รูปที่ 2.4) ติดตามการลดลงของอนุมูลอิสระโดยติดตามการเปลี่ยนแปลงของสีในตัวอย่างจากสีม่วงน้ำเงินเป็นสีเหลืองอ่อน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 nm ภายในเวลา 30 นาที หรือจนกว่าจะเกิดปฏิกิริยาโดยสมบูรณ์ สามารถแสดงผลวิเคราะห์ได้ในรูปของ EC_{50} (ความเข้มข้นของสารต้านออกซิเดชันที่ทำให้ปริมาณอนุมูลอิสระลดลง 50%) และ TE กลไกในการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารต้านออกซิเดชันกับอนุมูลอิสระ DPPH จะขึ้นอยู่กับโครงสร้างของสารต้านออกซิเดชัน เช่น สารต้านออกซิเดชันที่มีจำนวนของหมู่ไฮดรอกซิลมาก จะมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ได้เร็ว และมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูง (Bondet, Brand-Williams และ Berset, 1997)



รูปที่ 2.4 ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างการวิเคราะห์ด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl RH คือ สารต้านออกซิเดชัน (Prakash, Rigelhof และ Miller, 2001)

วิธีนี้มีข้อดีคือ ไม่ยุ่งยาก ใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้น ไม่ต้องใช้เครื่องมือที่มีความเฉพาะ ใช้เพียงเครื่อง spectrophotometer ในการวัดค่าการดูดกลืนแสง แต่มี

ข้อเสียคือ ถ้าในตัวอย่างมีสารประกอบที่มีค่าการดูดกลืนแสงใกล้เคียงกับอนุมูลอิสระ DPPH (ที่ 515 nm) ผลที่ได้จะไม่ตรงกับความเป็นจริง เช่น ในตัวอย่างที่มีแอนโทไซยานินเป็นรงควัตถุ ซึ่งมีเฉดสีม่วงใกล้เคียงกับสีของอนุมูลอิสระ DPPH ทำให้มีการรบกวนสีของระบบ การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในตัวอย่างจึงอาจคลาดเคลื่อนได้ (Choi และคณะ, 2007) แต่ทั้งนี้อาจใช้วิธีการเจือจางตัวอย่างเพื่อให้เฉดสีของตัวอย่างจางลง ทำให้ไปรบกวนสีของระบบน้อยลงได้

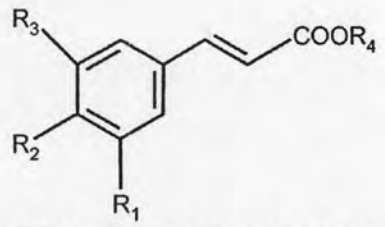
2.4 สารกลุ่มฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากธัญพืช

สารกลุ่มฟีนอลิกเป็นผลิตผลที่ได้จากกระบวนการสันดาบ (metabolism) ของพืช (Naczk และ Shahidi, 2006) มีโครงสร้างเป็นวงแหวนเบนซีนที่มีหมู่ไฮดรอกซิลอย่างน้อย 1 หมู่ แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ ได้แก่ กรดฟีนอลิก (Phenolic acids) ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) และแทนนิน (Tannins) (Waterhouse, 2005) สารกลุ่มฟีนอลิกที่พบในธัญพืชนั้นส่วนใหญ่จะอยู่ที่บริเวณเยื่อหุ้มเมล็ด (pericarp) (Dykes และ Rooney, 2007)

2.4.1 กรดฟีนอลิก (Phenolic acids)

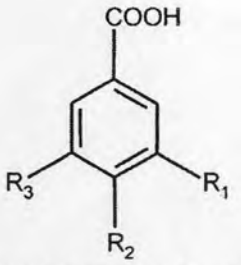
กรดฟีนอลิกเป็นอนุพันธ์ของ cinnamic acids และ benzoic acids จึงสามารถแบ่งกรดฟีนอลิกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ Hydroxycinnamic acids เช่น *p*-coumaric acid caffeic acid ferulic acid และ sinapic acid เป็นต้น และ Hydroxybenzoic acids เช่น vanillic acid gallic acid protocatechuic acid และ syringic acid เป็นต้น (รูปที่ 2.5) กรดฟีนอลิกชนิดที่พบในปริมาณมากในธัญพืช คือ ferulic acid และ *p*-coumaric acid ตามลำดับ (Sosulski และคณะ 1982; Gallardo, Jiménez และ García-Conesa, 2006) สำหรับกรดฟีนอลิกในธัญพืชสามารถพบได้ทั้งในรูปอิสระ (free forms) รูป soluble conjugated และในรูปที่ถูกตรึง (bound forms) กรดฟีนอลิกในรูปอิสระจะอยู่ที่บริเวณเยื่อหุ้มเมล็ดชั้นนอก สามารถสกัดโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เมทานอล และอะซีโตนได้ ส่วนกรดฟีนอลิกในรูปที่ถูกตรึงจะสร้างพันธะเอสเทอร์กับองค์ประกอบของผนังเซลล์ (เช่น ลิกนิน และสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ เป็นต้น) ต้องสกัดโดยใช้กรดหรือด่างเพื่อทำลายพันธะเอสเทอร์และปลดปล่อยกรดฟีนอลิกในรูปที่ถูกตรึงออกจากผนังเซลล์ (Subba Rao และ Muralikrishna, 2002; Bonoli และคณะ, 2004)

a)



Caffeic acid: R_1=OH, R_2=OH, R_3=OH, R_4=H
p-Coumaric acid: R_1=H, R_2=OH, R_3=H, R_4=H
Ferulic acid: R_1=OCH_3, R_2=OH, R_3=H, R_4=H
Sinapinic acid: R_1=OCH_3, R_2=OH, R_3=OCH_3, R_4=H
Chlorogenic acid: R_1=OH, R_2=OH, R_3=H, R_4=quinate

b)

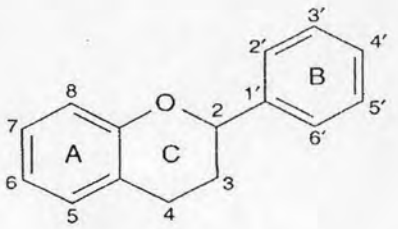


Protocatechuic acid: R_1=H, R_2=OH, R_3=OH
Hydroxybenzoic acid: R_1=H, R_2=OH, R_3=H
Vanillic acid: R_1=H, R_2=OH, R_3=OCH_3
Syringic acid: R_1=OCH_3, R_2=OH, R_3=OCH_3

รูปที่ 2.5 สูตรโครงสร้างของกรดฟีนอลิก a) Hydroxycinnamic acids และ b) Hydroxybenzoic acids (Tian, Nakamura และ Kayahara, 2004)

2.4.2 **ฟลาโวนอยด์** (Flavonoids)

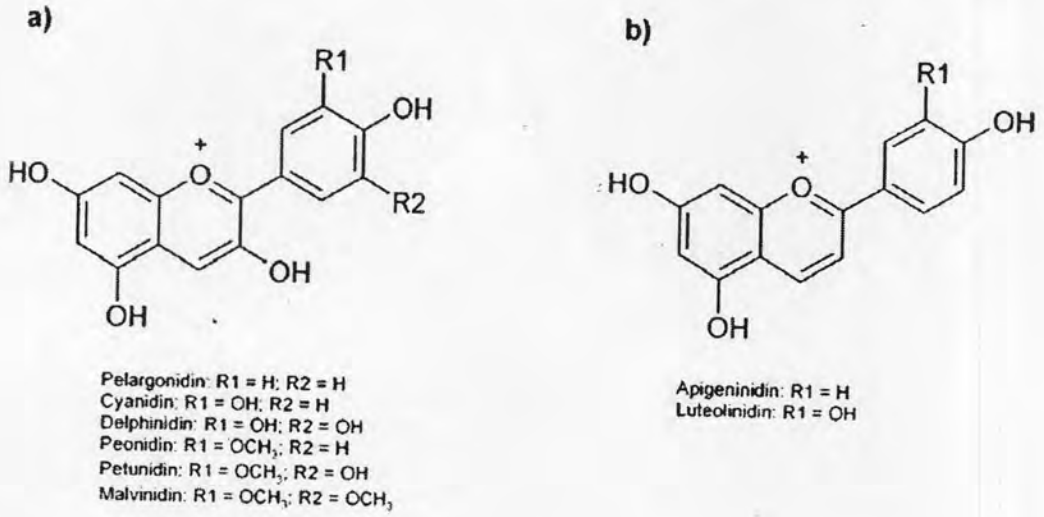
ฟลาโวนอยด์มีโครงสร้างพื้นฐานเป็น diphenylpropane (C6-C3-C6) ที่ประกอบด้วยวงแหวนอะโรมาติก 2 วงเชื่อมต่อกันด้วย oxygenated heterocyclic ring ที่มีคาร์บอน 3 ตัว (รูปที่ 2.6) ฟลาโวนอยด์ในธัญพืชสามารถแบ่งออกได้เป็น 5 กลุ่ม คือ Anthocyanidins Flavones Flavonols Flavanones Flavanols โดยจะพบฟลาโวนอยด์ที่บริเวณเยื่อหุ้มเมล็ดของธัญพืช (Dykes และ Rooney, 2007)



รูปที่ 2.6 สูตรโครงสร้างแกนของฟลาโวนอยด์ แต่ละตำแหน่งบนวงแหวน (1'-6' และ 2-8) อาจปรากฏหมู่ไฮโดรเจน (H) และ/หรือ ไฮดรอกซิล (OH) (Waterhouse, 2005)

แอนโทไซยานิน (Anthocyanins) เป็นฟลาโวนอยด์ที่นิยมศึกษาในธัญพืช โดยเฉพาะในธัญพืชที่มีสี แอนโทไซยานินเป็นรงควัตถุที่ละลายได้ในน้ำ ให้เฉดสีแดงถึงเฉดสีม่วง แอนโทไซยานินทั่วไปที่สามารถพบได้ในธรรมชาติจะมีอยู่ 6 ชนิด ซึ่งเรียกชื่อต่างกันตามตำแหน่งของการมีหมู่

ไฮดรอกซิล (hydroxyl : OH) และเมทอกซิล (methoxyl : OCH_3) ได้แก่ cyanidin delphinidin malvindin pelargonidin petunidin และ peonidin (von Elbe และ Schwartz, 1996) โดยในธัญพืชที่มีสีส่วนใหญ่ประกอบด้วยแอนโทไซยานินชนิด cyanidin 3-glucoside และ peonidin 3-glucoside มากที่สุด ตามลำดับ (Escribano-Bailon, Santos-Buelga และ Rivas-Gonzalo, 2004; Abdel-Aal, Young และ Rabalski, 2006) แต่ในธัญพืชที่มีสีบางชนิดอาจประกอบด้วยแอนโทไซยานินชนิดอื่นๆ เช่น ในข้าวฟ่างประกอบด้วยแอนโทไซยานินชนิด apigeninidin และ luteolinidin มากที่สุด โดยแอนโทไซยานินชนิด apigeninidin และ luteolinidin จัดอยู่ในกลุ่ม 3-deoxyanthocyanidins ซึ่งมีลักษณะโครงสร้างแตกต่างจากแอนโทไซยานินทั่วไป คือ ไม่มีหมู่ไฮดรอกซิลอยู่ในตำแหน่งที่ 3 ของวงแหวน C (รูปที่ 2.7) (Awika, Rooney และ Waniska, 2004; Dykes และ Rooney, 2007)



รูปที่ 2.7 สูตรโครงสร้างของแอนโทไซยานิน a) แอนโทไซยานินทั่วไปที่พบในธัญพืช, b) 3-deoxyanthocyanidins ที่พบในข้าวฟ่าง (Dykes และ Rooney, 2007)

2.4.3 แทนนิน (Tannins)

แทนนินเป็นสารกลุ่มฟีนอลิกที่มีขนาดโมเลกุลค่อนข้างใหญ่ สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ condensed tannins (มีชื่อเรียกอีกอย่างว่า procyanidins หรือ proanthocyanidins) hydrolysable tannins และ phlorotannins แทนนินมีสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชันเช่นเดียวกับสารกลุ่มฟีนอลิกอีก 2 กลุ่ม แต่เนื่องจากแทนนินสามารถเกิดอันตรกิริยากับโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และ

วิตามินได้ จึงทำให้คุณค่าทางโภชนาการที่ร่างกายควรได้รับจากสารเหล่านี้ลดลง (Dykes และ Rooney, 2007)

2.4.4 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารกลุ่มฟีนอลิก

ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารกลุ่มฟีนอลิก เป็นผลมาจากการมีวงแหวนเบนซีนที่มีหมู่ไฮดรอกซิลเป็นโครงสร้าง กลไกหลักของสารกลุ่มฟีนอลิกที่ทำหน้าที่เป็นสารต้านออกซิเดชัน คือ การถ่ายโอนไฮโดรเจนอะตอม (hydrogen atom donor) การกำจัดโลหะ (metal chelators) และการกำจัด singlet oxygen (singlet oxygen quenchers) นอกจากนี้อนุมูลอิสระของสารกลุ่มฟีนอลิกยังมีความเสถียร เนื่องจากการเกิด resonance delocalization และโครงสร้างที่ไม่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับออกซิเจน (Rice-Evans, Miller และ Paganga, 1997; Fardet, Rock และ Rémésy, 2008)

2.4.5 งานวิจัยเกี่ยวกับการวิเคราะห์สารกลุ่มฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากธัญพืช

สารกลุ่มฟีนอลิกในธัญพืชมีอยู่ด้วยกันหลายชนิดในปริมาณที่แตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของธัญพืชนั้นๆ ประพันธ์ ปิ่นศิโรดม (2545) ศึกษาปริมาณสารประกอบพอลิฟีนอลทั้งหมดและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากข้าวกลุ่มที่มีสีอ่อน (ข้าวขัดขาวและข้าวกล้อง) และข้าวกลุ่มที่มีสีเข้ม (ข้าวมันปู ข้าวสีนิล และข้าวเหนียวดำ) จากตัวอย่างข้าวทั้งหมด 12 ตัวอย่าง สกัดสารกลุ่มฟีนอลิกด้วยเอทานอล 95% ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบพอลิฟีนอลทั้งหมด ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu และวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picryhydrazyl (DPPH) ในรูป EC_{50} ซึ่งหมายถึงความเข้มข้นของสารต้านออกซิเดชันที่ทำให้ปริมาณอนุมูลอิสระลดลง 50% มีหน่วยเป็นกรัมของตัวอย่างข้าวต่อกรัมของ DPPH นอกจากนี้ได้มีการวัดสีของตัวอย่าง และคำนวณค่า ΔL^* (ความแตกต่างของค่าความสว่าง) และ ΔE^* (ความแตกต่างของค่าสี) จากการทดลองพบว่า ข้าวกลุ่มที่มีสีเข้มมีปริมาณสารประกอบพอลิฟีนอลทั้งหมดและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงกว่าข้าวกลุ่มที่มีสีอ่อน โดยปริมาณสารประกอบพอลิฟีนอลทั้งหมดของข้าวกลุ่มที่มีสีเข้มและสีอ่อนมีค่า 72-187 mg/100 g ตัวอย่าง และ 9-41 mg/100 g ตัวอย่าง ตามลำดับ สำหรับค่า EC_{50} ของข้าวกลุ่มที่มีสีเข้มและสีอ่อนมีค่า 46-383 g ตัวอย่าง/g DPPH และ 770-1588 g ตัวอย่าง/g DPPH ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Nam และคณะ

(2006) ที่รายงานว่า รำข้าวที่มีสีจะให้ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงกว่ารำข้าวที่ไม่มีสี อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อพิจารณาปริมาณสารประกอบพอลิฟีนอลทั้งหมดและค่า log EC_{50} พบว่ามีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงแบบแปรผกผัน ($r = -0.9494$) กล่าวคือ ตัวอย่างข้าวที่มีปริมาณสารประกอบพอลิฟีนอลทั้งหมดสูงจะมีค่า EC_{50} ต่ำ หรือมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูง สอดคล้องกับงานวิจัยของ Awika และคณะ (2004) ที่พบความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงแบบแปรผันตรงระหว่างปริมาณแอนโทไซยานินและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของรำข้าวฟ่างสีดำ นอกจากนี้ปริมาณสารประกอบพอลิฟีนอลทั้งหมดมีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงแบบแปรผกผันกับค่า ΔL^* ($r = -0.7295$) แต่มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงแบบแปรผันตรงกับค่า ΔE^* ($r = 0.7428$) ในขณะที่ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันมีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงแบบแปรผันตรงกับค่า ΔL^* ($r = 0.9110$) แต่มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงแบบแปรผกผันกับค่า ΔE^* ($r = -0.9336$)

Adom และ Liu (2002) ศึกษาชนิดและปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกในข้าวโพด ข้าวโอ๊ต ข้าวสาลีและข้าวเจ้าทั้งเมล็ดที่ไม่ได้ผ่านการขัดสี โดยหาปริมาณของ ferulic acid ปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ในรูปอิสระ (free forms) รูป soluble conjugated (เฉพาะ ferulic acid) และในรูปที่ถูกตรึง (insoluble bound forms) และศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของธัญพืชดังกล่าว สำหรับวิธีการสกัดของสารกลุ่มฟีนอลิกทั้ง 3 รูปแบบ จะแตกต่างกัน โดยการสกัดสารกลุ่มฟีนอลิกในรูปอิสระใช้การสกัดตัวอย่างด้วยเอทานอล 80% (chilled ethanol) เป็นเวลา 20 นาที ส่วนการสกัดสารกลุ่มฟีนอลิกในรูป soluble conjugated ทำได้โดยนำสารสกัดเอทานอลที่ได้ในครั้งแรกมาย่อยด้วยด่าง (NaOH เข้มข้น 2 M) ภายใต้ก๊าซไนโตรเจน เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง และการสกัดสารกลุ่มฟีนอลิกในรูปที่ถูกตรึงจะใช้กากที่เหลือจากการสกัดด้วยเอทานอล โดยนำไปสกัดด้วยด่างตามภาวะที่กล่าวมาข้างต้น จากนั้นนำสารสกัดทั้ง 3 ส่วนมาวิเคราะห์ปริมาณ ferulic acid ด้วย reversed phase-high performance liquid chromatography (RP-HPLC) วิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกทั้งหมด ด้วยวิธี Folin-Ciocalteau วิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดด้วยวิธี Colorimetry และวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ด้วยวิธี Total oxyradical scavenging capacity (TOSC) จากการทดลองพบว่า ปริมาณ ferulic acid ปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด มีค่าสูงที่สุดในข้าวโพด รองลงมาคือ ข้าวสาลี ข้าวโอ๊ต และข้าวเจ้า นอกจากนี้ยังพบสารกลุ่มฟีนอลิกในรูปที่ถูกตรึงมากกว่าในรูปอิสระในทุกตัวอย่างที่ทดสอบ โดยมีอัตราส่วนของ ferulic acid ในรูปอิสระต่อรูป soluble conjugated ต่อรูปที่ถูกตรึง เท่ากับ 0.1:1:100 และพบความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงแบบแปรผันตรงระหว่างฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน และปริมาณ ferulic

acid ทั้งหมดในรูปที่ถูกตรึง ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในรูปที่ถูกตรึง และปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในรูปที่ถูกตรึง (R^2 มีค่า 0.999 0.991 และ 0.872 ตามลำดับ) อย่างไรก็ดี ผู้วิจัยไม่พบความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและสารแต่ละกลุ่มในรูปอิสระ

Awika และคณะ (2004) ศึกษาชนิดและปริมาณของแอนโทไซยานินและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากรำข้าวฟ่างสีดำและข้าวฟ่างสีดำทั้งเมล็ดที่ไม่ได้ผ่านการขัดสี และเปรียบเทียบผลการสกัดของตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ เมทานอลในภาวะกรด (1% HCl ในเมทานอล) และอะซีโตน 70% (aq.) โดยมีการสกัดทั้งหมด 3 รอบ ใช้เวลาสกัดรวมทั้งสิ้น 14 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินด้วย RP-HPLC และวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 210-750 nm ที่ pH 1 (เฉพาะการวัดค่าการดูดกลืนแสง) วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) จากการศึกษาพบว่ารำข้าวฟ่างสีดำมีปริมาณแอนโทไซยานินมากกว่าข้าวฟ่างสีดำทั้งเมล็ดประมาณ 3-4 เท่า โดยในข้าวฟ่างสีดำพบแอนโทไซยานินชนิด apigeninidin และ luteolinidin มากที่สุด ซึ่งพบประมาณ 50% ของแอนโทไซยานินทั้งหมด เมื่อพิจารณาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันพบว่า สารสกัดจากรำข้าวฟ่างสีดำและข้าวฟ่างสีดำทั้งเมล็ด มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่สูงมาก (52-400 μmol TE/g) เมื่อเทียบกับสารสกัดจากผักผลไม้ และธัญพืชชนิดอื่นๆ ที่มีแอนโทไซยานินเป็นรงควัตถุ (< 0.1-34 mg TE/g) โดยสารสกัดจากเมทานอลในภาวะกรด จะให้ปริมาณแอนโทไซยานินและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงกว่าสารสกัดจากอะซีโตน 70% (aq.) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) อีกทั้งยังพบความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงแบบแปรผันตรงระหว่างปริมาณแอนโทไซยานินและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของข้าวฟ่างสีดำอีกด้วย (R^2 มีค่า 0.94)

Abdel-Aal และคณะ (2006) ศึกษาชนิดและปริมาณของแอนโทไซยานินในธัญพืชที่มีสี คือ ข้าว (สีดำ สีแดง) ข้าวป่า ข้าวสาลี (สีน้ำเงิน สีม่วง สีแดง สีขาว) ข้าวบาร์เลย์ (สีน้ำเงิน) และข้าวโพด (สีน้ำเงิน สีชมพู สีม่วง สีแดงและคละสี) สกัดแอนโทไซยานินด้วยเมทานอลในภาวะกรด (1.0 N HCl ในเมทานอล อัตราส่วน 15:85 v/v) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปรับสารละลายที่ได้ให้มีค่า pH เท่ากับ 1 วิเคราะห์ปริมาณของแอนโทไซยานินในสารสกัดโดยวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 535 nm และระบุชนิดของแอนโทไซยานินที่มีอยู่ในตัวอย่างด้วย liquid chromatography-ultraviolet-visible (LC-UV-vis) และ liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) จากการทดลองวัดค่าการดูดกลืนแสงพบว่า ข้าวสีดำมีปริมาณแอนโทไซยานินสูงที่สุด (3276 μg/g) รองลงมาคือ ข้าวโพดสีม่วง (1277 μg/g) และข้าวสาลีสีน้ำเงิน (212

μg/g) สำหรับธัญพืชในกลุ่มเดียวกันพบว่า ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดของธัญพืชต่างสายพันธุ์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) อนึ่งปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดที่ได้จากวิธี colorimetry ให้ค่าสูงกว่าวิธี HPLC ทั้งนี้อาจเป็นเพราะมีรงควัตถุชนิดอื่นๆ ในธัญพืชที่มีค่าการดูดกลืนแสงในช่วงเดียวกับแอนโทไซยานิน (คือ 535 nm) จึงทำให้ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดที่ได้จากวิธี colorimetry มีค่าสูงกว่า เมื่อพิจารณาชนิดของแอนโทไซยานินในธัญพืชแต่ละกลุ่มพบว่า ข้าวสีดำและสีแดง มีแอนโทไซยานินชนิด cyanidin 3-glucoside มากที่สุด (88% และ 67% ของปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด ตามลำดับ) รองลงมาคือ peonidin 3-glucoside และ cyanidin diglucoside ตามลำดับ ส่วนในกลุ่มข้าวสาลีพบว่า ข้าวสาลีสีน้ำเงิน มีแอนโทไซยานินชนิด delphinidin 3-glucoside และ delphinidin 3-rutinoside มากเป็นอันดับ 1 และ 2 (37% และ 32% ของปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด ตามลำดับ) ซึ่งแตกต่างจากข้าวสาลีสีม่วงที่พบแอนโทไซยานินชนิด cyanidin 3-glucoside มากที่สุด ส่วนในกลุ่มข้าวโพดพบว่า ข้าวโพดสีแดง สีน้ำเงิน คละสีและสีม่วง พบแอนโทไซยานินชนิด cyanidin 3-glucoside มากที่สุด (51% 49% 47% และ 31% ของปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด ตามลำดับ) แต่ในข้าวโพดสีชมพูพบแอนโทไซยานินชนิด pelargonidin 3-glucoside มากที่สุด (43% ของปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด) สำหรับข้าวป่า ข้าวสาลีสีแดงและสีขาว และข้าวบาร์เลย์สีน้ำเงินมีปริมาณแอนโทไซยานินน้อยมาก จึงไม่สามารถระบุชนิดของแอนโทไซยานินที่เป็นองค์ประกอบได้

Choi และคณะ (2007) ศึกษาปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด ปริมาณวิตามินอี และฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากข้าวขาว ข้าวกล้อง ข้าวสีดำ ข้าวฟ่างสีแดง ข้าวบาร์เลย์ ถั่วเขียว foxtail millet prosomillet และ adlay สกัดตัวอย่างด้วยเมทานอล ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกทั้งหมด ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu วิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดโดยวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 450 nm วิเคราะห์ปริมาณวิตามินอีด้วย HPLC และวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน 5 วิธีด้วยกันคือ radical scavenging activities โดยใช้ DPPH radical cation scavenging activities โดยใช้ ABTS reducing power chelating activity และประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดลิปิดเพอร์ออกซิเดชัน ด้วยวิธี ferric thiocyanate จากการทดลองพบว่า ข้าวฟ่างสีแดงมีปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด ในขณะที่ถั่วเขียวมีปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดและปริมาณวิตามินอีสูงที่สุด เมื่อพิจารณาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันพบว่า ข้าวฟ่างสีแดงแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงที่สุด ยกเว้นวิธี chelating activity ที่ให้ผลการทดลองว่า ถั่วเขียวแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงที่สุด สำหรับการยับยั้งการเกิดลิปิดเพอร์ออกซิเดชัน

สารสกัดจากพืชทุกชนิดยกเว้นข้าวขาวและ adlay มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกัน นอกจากนี้ยังพบความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงแบบแปรผันตรงอย่างมีนัยสำคัญระหว่างปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี ABTS และ reducing power (R^2 มีค่า 0.9973, $p < 0.01$ และ 0.9075, $p < 0.05$ ตามลำดับ) ในขณะที่ไม่พบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญระหว่างฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในทุกวิธีวิเคราะห์และปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดหรือปริมาณวิตามินอี

จากงานวิจัยข้างต้นจะเห็นได้ว่าปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันอาจมีความสัมพันธ์กันในลักษณะเชิงเส้นตรงแบบแปรผันตรงกล่าวคือ ตัวอย่างที่มีปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกทั้งหมดสูงมีแนวโน้มที่จะมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงเช่นกัน ทั้งนี้การพิจารณาความสัมพันธ์ดังกล่าวยังขึ้นอยู่กับรูปแบบของสารกลุ่มฟีนอลิกที่วิเคราะห์ได้และเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วย

2.5 ผลของกระบวนการแปรรูปและภาวะการเก็บรักษาต่อปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากธัญพืช

2.5.1 ผลของกระบวนการแปรรูปต่อปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากธัญพืช

Zieliński และคณะ (2001) ศึกษาชนิดและปริมาณกรดฟีนอลิกของสารสกัดจากธัญพืช คือ ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ ข้าวไรย์ และข้าวโอ๊ต ทั้งในรูปอิสระและในรูป soluble conjugated เมื่อผ่านกระบวนการแปรรูปด้วยวิธีเอ็กซ์ทรูชัน (อุณหภูมิในแต่ละส่วนของเครื่องเอ็กซ์ทรูเดอร์ คือ 120-160-200°C) สกัดตัวอย่างด้วยเมทานอล 80% (aq.) ที่ 35°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำสารสกัดเมทานอลที่ได้มาสกัดอีกครั้งด้วย diethyl ether ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำสารสกัดในชั้น diethyl ether ไปวิเคราะห์กรดฟีนอลิกในรูปอิสระ ด้วย RP-HPLC สำหรับสารสกัดในชั้นน้ำที่เหลือจากการสกัดด้วย diethyl ether จะนำมาย่อยอีกครั้งด้วยด่าง (NaOH เข้มข้น 2 M) ภายใต้ก๊าซไนโตรเจน เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง นำไปวิเคราะห์กรดฟีนอลิกในรูปที่ถูกตรึงด้วย RP-HPLC จากการทดลองพบว่า กรดฟีนอลิกที่พบมากในข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ และข้าวไรย์ คือ ferulic acid ในขณะที่ข้าวโอ๊ตมีปริมาณ coumaric acid มากที่สุด เมื่อพิจารณาผลของกระบวนการเอ็กซ์ทรูชัน

พบว่า ปริมาณกรดฟีนอลิกทั้งในรูปอิสระและในรูป soluble conjugated มีค่าเพิ่มขึ้น ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการทำลายพันธะเอสเทอร์ระหว่างกรดฟีนอลิกกับองค์ประกอบของผนังเซลล์ด้วยความร้อน

Pérez-Jiménez และ Saura-Calixto (2005) ศึกษาปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากธัญพืชและผลิตภัณฑ์จากธัญพืช คือ ข้าวดิบ ข้าวสุก แป้งสาลี และขนมปังฝรั่งเศส สำหรับข้าวสุกและขนมปังฝรั่งเศสจะนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze-dried) ก่อนนำไปบดให้มีขนาดเล็กกว่า 0.5 mm เช่นเดียวกับตัวอย่างแห้งอื่นๆ โดยใช้วิธีการสกัดตัวอย่างด้วยตัวทำละลายอินทรีย์และการใช้เอนไซม์ในการย่อย วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์จะสกัดครั้งแรกด้วยเมทานอล 50% (v/v, aq.) ในภาวะกรด (pH 2) และสกัดกากซ้ำอีกครั้งด้วยอะซีโตน 70% (aq.) สำหรับวิธีการย่อยตัวอย่างด้วยเอนไซม์มีหลายขั้นตอนคือ ขั้นแรกใช้สารละลายเอนไซม์ pepsin ย่อยตัวอย่างที่ 40°C 1 ชั่วโมง ที่ pH 1.5 แล้วจึงย่อยตัวอย่างต่อด้วยสารละลายเอนไซม์ pancreatin ที่ 37°C 16 ชั่วโมง ที่ pH 7.5 สารละลายเอนไซม์ α-amylase ที่ 37°C 16 ชั่วโมง ที่ pH 6.9 และสารละลายเอนไซม์ amyloglucosidase ที่ 60°C เป็นเวลา 45 นาที ตามลำดับ แล้วจึงนำสารสกัดที่ได้จากการสกัดทั้ง 2 วิธี ไปวิเคราะห์หาปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกทั้งหมด ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu และศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี FRAP จากการทดลองพบว่า วิธีการสกัดทั้ง 2 วิธี ให้ผลไปในทางเดียวกัน คือ รำข้าวสาลีมีปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุดและมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันมากที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าขนมปังฝรั่งเศสมีปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกน้อยกว่าแป้งสาลี ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการสลายตัวของสารกลุ่มฟีนอลิกเนื่องจากความร้อนที่ใช้ในการอบขนมปัง (250°C) แต่เมื่อพิจารณาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันพบว่า ขนมปังฝรั่งเศสมีประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชันสูงกว่าแป้งสาลี ซึ่งฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่เพิ่มขึ้นนี้ อาจเกิดจากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาเมลลาร์ดในระหว่างการอบ เช่น Amadori products และ Melanoidins เป็นต้น สำหรับข้าวดิบและข้าวสุกพบว่า การหุงต้มข้าวทำให้ปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกทั้งหมดในข้าวมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) คือ มีค่าลดลง 84.16% แต่มีผลต่อฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของข้าวเพียงเล็กน้อย ซึ่งอาจเป็นผลมาจากสารกลุ่ม nonphenolic ที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (เช่น กรดอะมิโน เป็นต้น) ละลายออกมาในระหว่างการหุงข้าว จึงทำให้ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของข้าวสุกมีค่าไม่แตกต่างจากข้าวดิบมากนัก สำหรับวิธีการย่อยตัวอย่างด้วยเอนไซม์ที่มีการเลียนแบบภาวะการย่อยตัวอย่างในระบบทางเดินอาหารพบว่าปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในทุกตัวอย่างมีปริมาณสูงกว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากสารกลุ่มฟีนอลิกเกิดการไฮโดรไลซิส ทำให้สตาร์ชและโปรตีนถูกปลดปล่อยออกมา สารกลุ่มฟีนอลิกจึงอยู่ในรูปอิสระมากขึ้น

Şensoy และคณะ (2006) ศึกษาปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกทั้งหมดหรือฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจาก buckwheat คือ แป้ง buckwheat สีดำ (BB) และสีขาว (BW) และแป้ง buckwheat สีดำผสมสตาร์ชแอมิโลเพกทินสูง (high amylopectin starch) (BBAM) ที่ผ่านกระบวนการแปรรูปด้วยวิธีการอบ (roasting) ที่อุณหภูมิ 200°C เป็นเวลา 10 นาที และที่แปรรูปด้วยวิธีเอ็กซ์ทรูชัน (extrusion) สกัดตัวอย่างด้วยตัวทำละลาย 2 ครั้ง คือ สกัดครั้งแรกด้วยเมทานอล และสกัดกากซ้ำอีกครั้งด้วย ethyl acetate ใช้เวลาในการสกัดแต่ละครั้งประมาณ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง วิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกทั้งหมด ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu สำหรับตัวอย่าง BB และ BW ก่อนและหลังการอบ และวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ด้วยวิธี DPPH สำหรับตัวอย่าง BBAM ก่อนและหลังการอบและการเอ็กซ์ทรูชัน จากการทดลองพบว่า ปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกทั้งหมดใน BB และ BW ก่อนและหลังการอบมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) แสดงว่าการอบไม่มีผลต่อปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกทั้งหมดในตัวอย่าง ส่วนตัวอย่าง BBAM ที่ผ่านการอบมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ซึ่งอาจเป็นผลมาจากความร้อนที่ใช้ในการอบสูงถึง 200°C และใช้เวลานานถึง 10 นาที ในขณะที่กระบวนการเอ็กซ์ทรูชันไม่มีผลต่อฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของตัวอย่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการที่ตัวอย่างได้รับความร้อนสูงในระยะเวลาสั้นๆ (ประมาณ 10 วินาที) แม้อุณหภูมิที่ใช้ในกระบวนการเอ็กซ์ทรูชันจะมีอุณหภูมิสูงที่สุดประมาณ 170°C

จากงานวิจัยที่ศึกษามาจะเห็นได้ว่ากระบวนการแปรรูปมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในตัวอย่าง โดยอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่าแบบเพิ่มขึ้น และ/หรือลดลง ขึ้นอยู่กับภาวะในกระบวนการแปรรูป เช่น อุณหภูมิ และเวลาในการให้ความร้อนแก่ตัวอย่าง รวมทั้งรูปแบบของสารกลุ่มฟีนอลิกที่วิเคราะห์และเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วย

2.5.2 ผลของภาวะการเก็บรักษาต่อปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากธัญพืช

Sosulski และคณะ (1982) ศึกษาผลของการเก็บรักษาต่อปริมาณกรดฟีนอลิกของแป้งสาลี ทั้งในรูปอิสระ (free forms) รูป soluble conjugated และในรูปที่ถูกตรึง (bound forms) โดยเก็บตัวอย่างเป็นเวลา 6 เดือน ที่อุณหภูมิห้อง สกัดตัวอย่างด้วยเมทานอล/อะซีโตน/น้ำ (7/7/6,

v/v/v) ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำสารสกัดเมทานอล/อะซีโตน/น้ำ ที่ได้มาสกัดอีกครั้งด้วย diethyl ether/ethyl acetate (1/1) นำสารสกัดในชั้น diethyl ether/ethyl acetate ไปวิเคราะห์กรดฟีนอลิกในรูปอิสระ สำหรับสารสกัดในชั้นน้ำที่แยกจากการสกัดด้วย diethyl ether/ethyl acetate จะนำมาย่อยอีกครั้งด้วยด่าง (NaOH เข้มข้น 4 N) ภายใต้ก๊าซไนโตรเจน เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง และสกัดตัวอย่างซ้ำอีกครั้งด้วย diethyl ether/ethyl acetate แล้วจึงนำสารสกัดในชั้น diethyl ether/ethyl acetate ไปวิเคราะห์กรดฟีนอลิกในรูป soluble conjugated สำหรับการสกัดสารกลุ่มฟีนอลิกในรูปที่ถูกตรึงจะใช้กากที่เหลือจากการสกัดด้วยเมทานอล/อะซีโตน/น้ำ โดยนำไปสกัดด้วยด่าง (NaOH เข้มข้น 2 N) และ diethyl ether/ethyl acetate ดังภาวะที่กล่าวมาข้างต้น แล้วนำสารสกัดในชั้น diethyl ether/ethyl acetate ไปวิเคราะห์กรดฟีนอลิกในรูปที่ถูกตรึง วิเคราะห์กรดฟีนอลิกทั้ง 3 รูปแบบด้วย gas-liquid chromatography (GLC) และ gas-liquid chromatography-mass spectroscopy (GLC-MS) จากการทดลองพบว่า ปริมาณกรดฟีนอลิกของแป้งสาลีที่ผ่านการเก็บรักษามีค่าลดลง โดยมีปริมาณเพียง 1 ใน 3 ของแป้งสาลีที่ไม่ได้ผ่านการเก็บรักษา ซึ่งให้ผลไปในทางเดียวกันในกรดฟีนอลิกทั้ง 3 รูปแบบ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของเมล็ดข้าวในระหว่างการเก็บรักษา

Zhou และคณะ (2004) ได้ศึกษาชนิดและปริมาณกรดฟีนอลิกในรูปที่ถูกตรึงและปริมาณกรดฟีนอลิกทั้งหมด ในข้าว 3 สายพันธุ์ คือ Koshihikari Kyeema และ Doongara ทั้งในรูปของข้าวขาวและข้าวกล้อง และพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดฟีนอลิกระหว่างการเก็บโดยเก็บข้าวไว้ในขวดแก้วปิดสนิท (ในที่มืด) ที่อุณหภูมิ 4°C และ 37°C เป็นเวลา 6 เดือน สกัดกรดฟีนอลิกในรูปที่ถูกตรึงด้วยเมทานอล/อะซีโตน/น้ำ (7/7/6, v/v/v) ภายใต้ก๊าซไนโตรเจน ที่ 4°C เป็นเวลา 1 วัน กากที่เหลือจากการสกัดด้วยเมทานอล/อะซีโตน/น้ำ จะนำมาย่อยด้วยสารละลายเอนไซม์ α-amylase อีกครั้ง ส่วนกรดฟีนอลิกทั้งหมดจะมีการสกัดหลายขั้นตอนคือ ย่อยด้วยสารละลายเอนไซม์ α-amylase แล้วตามด้วยด่าง (NaOH เข้มข้น 4 M) ethyl acetate และเมทานอล 50% (v/v, aq.) ตามลำดับ ซึ่งใช้เวลาสกัดรวมทั้งสิ้นประมาณ 2 วัน นำสารสกัดที่ได้ทั้ง 2 รูปแบบ ไปวิเคราะห์ด้วย RP-HPLC จากการศึกษาพบว่า ในข้าวทั้ง 3 สายพันธุ์ มีปริมาณของกรดฟีนอลิกแต่ละชนิดใกล้เคียงกัน กรดฟีนอลิก ชนิดที่พบในปริมาณมากในข้าวทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ ferulic acid และ *p*-coumaric acid แต่ในข้าวกล้องมีปริมาณ ferulic acid มากกว่าในข้าวขาว คือ 255-362 mg/kg และ 61-84 mg/kg ตามลำดับ กรดฟีนอลิกส่วนใหญ่จะพบในรูปที่ถูกตรึงมากกว่าในรูปอิสระ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Adom และ Liu (2002) สำหรับผลของการเก็บรักษาต่อปริมาณของกรด

ฟีนอลิกพบว่า ในข้าวขาวและข้าวกล้องทุกสายพันธุ์ที่เก็บเป็นเวลา 6 เดือน มีปริมาณกรดฟีนอลิกในรูปอิสระเพิ่มขึ้น แต่ปริมาณกรดฟีนอลิกในรูปที่ถูกตรึงมีค่าลดลง ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการเกิด enzymatic และ non-enzymatic hydrolysis ของกรดฟีนอลิกในรูปที่ถูกตรึง (Tsugita, Ohta และ Kato, 1983) สำหรับปริมาณกรดฟีนอลิกทั้งหมดนั้นพบว่ามีค่าลดลง ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในเมล็ดข้าวทำให้ปริมาณกรดฟีนอลิกทั้งหมดลดลง โดยการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 37°C ทำให้ปริมาณกรดฟีนอลิกในข้าวมีค่าลดลงมากกว่าการเก็บรักษาที่ 4°C อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

จากงานวิจัยข้างต้นจะเห็นได้ว่าภาวะการเก็บรักษา ได้แก่ อุณหภูมิและระยะเวลาในการเก็บรักษา มีผลต่อปริมาณกรดฟีนอลิกทั้งหมดในตัวอย่าง ซึ่งโดยทั่วไปจะนิยมศึกษาผลของภาวะการเก็บรักษาต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณของกรดฟีนอลิกมากกว่าการศึกษาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด