http://journal.rmutp.ac.th/

การพัฒนาวิธีสำหรับวิเคราะห์แกมมา-โอริซานอลในรำข้าวด้วยตัวทำละลายที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม

รัฐพล หงส์เกรียงไกร* อัษฎาวุธ ไชยโย เอื้อมพร ขาวคุ้ม และ อุษารัตน์ คำทับทิม

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ
2 ถนนนางลิ้นจี่ แขวงทุ่งมหาเมฆ เขตสาทร กรุงเทพมหานคร 10120

รับบทความ 9 พฤษภาคม 2561 แก้ไขบทความ 6 กันยายน 2561 ตอบรับบทความ 12 กันยายน 2561

บทคัดย่อ

โครงงานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาวิธีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณแกมมา-โอริซานอลในรำข้าวด้วยตัวทำละลายที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมโดยใช้วิธีการสกัดแบบบางส่วนด้วยตัวทำละลายเอทิลแลคเตทร่วมกับปัจจัยในการสกัดเพื่อหาปริมาณแกมมา-โอริซานอลทั้งหมดในรำข้าว สำหรับการหาสภาวะของการสกัดที่มีการวิเคราะห์ปริมาณแกมมา-โอริซานอลในรำข้าวได้สูงได้ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดแบบบางส่วน ได้แก่ น้ำหนักรำข้าว ปริมาตรตัวทำละลาย และเวลาที่ใช้ในการสกัด จากผลการทดลองพบว่าสภาวะที่มีการวิเคราะห์ปริมาณแกมมา-โอริซานอลในรำข้าวได้สูงคือ น้ำหนักรำข้าว 50 มิลลิกรัม ปริมาตรตัวทำละลาย 5 มิลลิลิตร และเวลาที่ใช้ในการสกัด 2 นาที เมื่อทำการสกัดแกมมา-โอริซานอลในรำข้าวด้วยวิธีการสกัดแบบบางส่วนโดยใช้ตัวทำละลายเอทิลแลคเตทและวิธีการสกัดแบบดั้งเดิมได้ปริมาณแกมมา-โอริซานอลทั้งหมดในรำข้าวเท่ากับ 4.23 และ 4.32 มิลลิกรัมต่อกรัมรำข้าว ตามลำดับ ปริมาณแกมมา-โอริซานอลที่ได้จากวิธีการสกัดทั้งสองวิธีมีค่าใกล้เคียงกัน เมื่อนำสารที่สกัดได้จากรำข้าวไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องแยกของเหลวแบบสมรรถนะสูงพบว่าสารที่สกัดได้มีองค์ประกอบหลักคือไซโคลอาร์ทีนิลเฟอร์รูเลต, 24-เมทิลีนไซโคลอาร์ทานิลเฟอร์รูเลต และเคมเพสทานิลเฟอร์รูเลต วิธีวิเคราะห์ปริมาณแกมมา-โอริซานอลในรำข้าวด้วยตัวทำละลายเอทิลแลคเตทที่ได้พัฒนาขึ้นนี้ เป็นวิธีการที่ง่าย อุปกรณ์ที่ใช้มีในห้องปฏิบัติการทั่วไป ค่าใช้จ่ายต่ำ ประหยัดเวลา และตัวทำละลายที่ใช้เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม

คำสำคัญ : แกมมา-โอริซานอล; รำข้าว; การสกัดแบบบางส่วน; ตัวทำละลายที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม

** ผู้นิพนธ์ประสานงาน โทร.: +668 4726 4138, ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์: rattapon.h@mail.rmutk.ac.th*

http://journal.rmutp.ac.th/

Method Development of Gamma-Oryzanol Analysis in Rice Bran with Environmental Friendly Solvent

Rattapon Hongkrengkai* Atsadawut Chaiyo Uemporn Khawkoom and Usarat Kumtabtim

Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Krungthep
2 Nanglinchi Road, Tungmahameg, Sathron, Bangkok, 10120

Received 9 May 2018; Revised 6 September 2018; Accepted 12 September 2018

Abstract

This research project aim to develop method for analysis of gamma-oryzanol in rice bran with environmental friendly solvent. The total content of gamma-oryzanol in rice bran was investigated using the combination between partial extraction method with ethyl lactate solvent and the study of factors on partial extraction. The parameters that effect the amount of gamma-oryzanol with partial extraction method consist of weight of rice bran, volume of solvent and extraction time were conducted. The result shown the maximum content of gamma-oryzanol that extracted with 50 milligrams of rice bran, 5 milliliters of ethyl lactate and 2 minutes of extraction time. The quantity of gamma-oryzanol in rice bran that observed using partial extraction method with ethyl lactate solvent and classical extraction method were 4.23 and 4.32 milligram per gram rice bran, respectively. The results from both extraction methods were well agreement. When the extracted rice bran was separated with High Performance Liquid Chromatography, the result shown the main compositions of extracted rice bran including cycloartenyl ferulate, 24-Methylene cycloartanyl ferulate and campestanyl ferulate. The develop method for analysis of gamma-oryzanol in rice bran using partial extraction with ethyl lactate solvent is easy, use only small apparatus in laboratory, cheap, short-time consuming and use environmental friendly solvent.

Keywords : Gamma-Oryzanol; Rice Bran; Partial Extraction; Environmental Friendly Solvent

** Corresponding Author. Tel.: +668 4726 4138 E-mail Address: rattapon.h@mail.rmutk.ac.th*

1. บทนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมที่มีข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจ โดยกระบวนการขัดสีเมล็ดข้าวจะมีปริมาณรำข้าวที่เป็นผลพลอยได้จำนวนมาก ซึ่งรำข้าวส่วนใหญ่จะนำไปใช้ประโยชน์ด้านอาหารสัตว์และการสกัดน้ำมัน จากการศึกษาองค์ประกอบของน้ำมันรำข้าวดิบพบว่าประกอบด้วยสารที่ถูกไฮโดรไลซ์ด้วยด่าง (Saponifiable Group) ประมาณร้อยละ 90-96 และสารที่ไม่ถูกไฮโดรไลซ์ด้วยด่าง (Unsaponifiable Group) ประมาณร้อยละ 4 [1] ซึ่งเป็นปริมาณที่สูงกว่าน้ำมันอื่นๆ นอกจากนี้ในน้ำมันรำข้าวยังมีสารอาหารที่สำคัญและมีประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น แกมมา–โอริซานอล (Gamma–Oryzanol) และวิตามินอี (Vitamin E)

แกมมา–โอริซานอลเป็นกลุ่มของสารที่มีโครงสร้างทางเคมีของเอสเทอร์ระหว่างกรดเฟอร์รูลิก (Ferulic Acid) และสเตอรอล (Sterol) โดยโครงสร้างส่วนแรกเป็นส่วนที่มีขั้วของกรดเฟอร์รูลิก ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ส่วนที่สองเป็นส่วนที่มีหมู่ฟังก์ชัน (Functional Group) เป็นแอลกอฮอล์ ได้แก่ สเตอรอล (Sterol) หรือไตรเทอร์พีนแอลกอฮอล์ (Triterpene Alcohol) ซึ่งโครงสร้างมีลักษณะคล้ายโคเลสเตอรอล (Cholesterol) และจากงานวิจัยได้มีการค้นพบอนุพันธ์แกมมา-โอริซานอลทั้งสิ้น 10 อนุพันธ์ [2] โดยมีอนุพันธ์ 3 ชนิดที่เป็นองค์ประกอบหลักของแกมมา-โอริซานอลคือ ไซโคลอาร์ทีนิลเฟอร์รูเลต (Cycloartenyl Ferulate), 24-เมทิลีนไซโคลอาร์ทานิลเฟอร์รูเลต (24-Methylene Cycloartanyl Ferulate) และเคมเพสทานิลเฟอร์รูเลต (Campestanyl Ferulate) เนื่องจากแกมมา–โอริซานอลมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประโยชน์หลายประการจึงได้มีการนำไปใช้ประโยชน์ทั้งด้านผลิตภัณฑ์อาหาร เครื่องสำอาง และทางการแพทย์

สำหรับกระบวนการสกัดน้ำมันออกจากรำข้าวมีหลายวิธี เช่น การสกัดด้วยตัวทำละลาย (Solvent Extraction) การสกัดด้วยของไหลเหนือจุดวิกฤต (Supercritical Fluid Extraction, SFE) และการสกัดแบบซอล์คเลต (Soxhlet Extraction) [3] ซึ่งวิธีการสกัดน้ำมันจากรำข้าวด้วยตัวทำละลายอินทรีย์เป็นวิธีที่นิยมและสามารถสกัดน้ำมันรำข้าวได้ปริมาณสูง ตัวทำละลายอินทรีย์ที่นิยมใช้ ได้แก่ ปิโตรเลียมอีเทอร์ เอทานอล ไอโซโพรพานอล เฮกเซน และเมทานอล เป็นต้น [4] แต่วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายแบบดั้งเดิมนั้นต้องใช้ตัวทำละลายปริมาณมากและเวลาที่ใช้ในการสกัดนาน อีกทั้งตัวทำละลายอินทรีย์บางชนิด เช่น เฮกเซน หากมีการปนเปื้อนในอาหาร ผลิตภัณฑ์หรือสิ่งแวดล้อม อาจเป็นพิษต่อผู้บริโภคหรือเป็นปัญหาทางด้านสิ่งแวดล้อม ซึ่งงานวิจัยในปัจจุบันได้ให้ความสำคัญเกี่ยวกับการพัฒนาวิธีการสกัดโดยใช้สารที่มีความเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมมากขึ้น [5]

เอทิลแลคเตทมีชื่อทางเคมี คือ แลคติคแอซิดเอทิลเอสเทอร์ (Lactic Acid Ethyl Ester) หรือมีชื่อทางเคมีในระบบ IUPAC คือ Ethyl-2hydroxypropanoate มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_5H_{10}O_3$ เอทิลแลคเตทเป็นผลิตผลที่ได้จากกระบวนการหมักวัตถุดิบประเภทข้าวโพดหรือคาร์โบไฮเดรต ทำให้เอทิลแลคเตทสามารถย่อยสลายได้ (Biodegradable) เป็นสารที่ไม่มีฤทธิ์กัดกร่อน (Non-Corrosive) ไม่เป็นสารที่ก่อมะเร็ง (Non-carcinogenic) เป็นสารที่ง่ายต่อการรีไซเคิลและค่าใช้จ่ายต่ำ ไม่ทำลายชั้นโอโซนและไม่ก่อให้เกิดมลพิษทางอากาศ ส่งผลให้มีการประยุกต์ใช้เอทิลแลคเตทในอุตสาหกรรมอาหาร ยา และเครื่องสำอางหลายชนิด [6]

เมื่อรำข้าวผ่านขั้นตอนการสกัดด้วยตัวทำละลายแล้วจะนำไปวิเคราะห์ปริมาณแกมมา–โอริซานอลในรำข้าวโดยเทคนิคยูวีวิสิเบิลสเปคโตรสโครปี [7] และเทคนิคการแยกของเหลวสมรรถนะสูง [8] ซึ่งขั้นตอนการวิเคราะห์ต้องสกัดแกมมา–โอริซานอลออกจากรำข้าวก่อนซึ่งใช้เวลานาน ทำให้มีงานวิจัยที่ได้นำเสนอการสกัดด้วยตัวทำละลายแบบบางส่วน (Partial Extraction) ที่ใช้เวลาในการสกัดน้อยกว่าวิธีการสกัดแบบดั้งเดิม (Classical Method) ปริมาตรตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้น้อย และใช้ตัวอย่างรำข้าวประมาณ 1 กรัมหรือน้อยกว่า โดยวิเคราะห์หาปริมาณแกมมา-โอริซานอลที่มีในสารสกัด

จากรำข้าวด้วยเครื่องยูวีวิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ซึ่งเป็นเครื่องมือที่มีอยู่ทั่วไปในห้องปฏิบัติการ [9]

การสกัดด้วยตัวทำละลายแบบบางส่วน เป็นเทคนิคการสกัดสารที่สนใจออกจากของแข็งด้วยตัวทำละลายอินทรีย์แล้วคำนวณหาปริมาณสารที่สนใจทั้งหมดในตัวอย่าง โดยอาศัยค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัว (Distribution Coefficient) หรือค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับ (Adsorption Coefficient) ใช้ตัวย่อว่า K ร่วมกับการแก้สมการคณิตศาสตร์ [9]

ความสัมพันธ์ระหว่างค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับ ความเข้มข้นของตัวถูกละลายในตัวทำละลายอินทรีย์และในของแข็ง เป็นดังนี้

$$K = \frac{C_m}{A_s} \quad = \text{ค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับ} \qquad (1)$$

$$K = \left(\frac{M_m}{V_m}\right)\left(\frac{g_s}{M_s}\right) \qquad (2)$$

โดยที่

K = ค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับ

C_m = ความเข้มข้นของสารในชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์

A_s = ปริมาณของสารที่กระจายอยู่ในชั้นของของแข็งต่อหน่วยน้ำหนัก

M_m = ปริมาณของตัวถูกละลายในชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์

M_s = ปริมาณของตัวถูกละลายในชั้นของของแข็ง

V_m = ปริมาตรของตัวทำละลายอินทรีย์

g_s = น้ำหนักของของแข็ง

ในกรณีที่สกัดสารตัวอย่าง 2 ชุดด้วยปริมาณเท่ากัน โดยให้ปริมาตรของตัวทำละลายในชุดที่ 2 เป็นสองเท่าของตัวทำละลายในชุดที่ 1 โดยกำหนดให้

Y = ปริมาณสารทั้งหมดในของแข็ง

X_1 = ปริมาณตัวถูกละลายในวัฏภาคของตัวทำละลายที่สกัดได้ในชุดที่ 1

X_2 = ปริมาณตัวถูกละลายในวัฏภาคของตัวทำละลายที่สกัดจากการใช้ปริมาตรของตัวทำละลายเป็น 2 เท่า ในการสกัดชุดที่ 2

จากสมการ (2)

$$K = \left(\frac{M_m}{V_m}\right)\left(\frac{g_s}{M_s}\right)$$

การสกัดในชุดที่ 1

$$K_1 = \left(\frac{X_1}{V_1}\right)\left(\frac{1}{Y - X_1}\right)$$

การสกัดในชุดที่ 2

$$K_2 = \left(\frac{X_2}{V_2}\right)\left(\frac{1}{Y - X_2}\right)$$

แต่ $K_1 = K_2$ และ $V_2 = 2V_1$

$$\left(\frac{X_1}{V_1(Y - X_1)}\right) = \left(\frac{X_2}{V_2(Y - X_2)}\right)$$

เมื่อแก้สมการทางคณิตศาสตร์ จะได้

$$Y = \left(\frac{X_1 X_2}{2X_1 - X_2}\right)$$

สำหรับการสกัดด้วยตัวทำละลายแบบบางส่วนมีการรายงานผลการวิจัยโดยใช้ตัวทำละลายในขั้นตอนการสกัดหลายชนิดเช่น เฮกเซน เอทิลอะซิเตท ไอโซโพรพิลอีเทอร์ ไอโซโพรพานอล และเอทานอล เป็นต้น [9] แต่อย่างไรก็ตามในขั้นตอนการสกัดด้วยตัวทำละลายควรเลือกใช้ตัวทำละลายที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมและมีความปลอดภัยกับผู้ปฏิบัติการวิเคราะห์ทดสอบ รวมถึงไม่เป็นอันตรายหากมีการตกค้างในผลิตภัณฑ์

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะสำหรับการวิเคราะห์แกมมา-โอริซานอลในรำข้าวแบบ

สกัดบางส่วนด้วยตัวทำละลายเอทิลแลคเตท ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม เพื่อให้ได้วิธีวิเคราะห์แกมมา–โอริซานอลในรำข้าวที่ง่าย ขั้นตอนไม่ซับซ้อน ประหยัดเวลา ราคาถูก อุปกรณ์ที่ใช้หาง่ายในห้องปฏิบัติการ และตัวทำละลายที่ใช้เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม

2. ระเบียบวิธีวิจัย

2.1 ขั้นตอนการวิจัย

2.1.1 สารเคมี

2.1.1.1 แกมมา–โอริซานอล (AR Grade, Merck KGaH)

2.1.1.2 นอร์มัล-เฮกเซน (AR Grade, Ajax Finechem)

2.1.1.3 ไอโซโพรพานอล (AR Grade, Fisher Chemical)

2.1.1.4 เอทิลแลคเตท (AR Grade, Merck KGaH)

2.1.1.5 ปิโตรเลียมอีเทอร์ (AR Grade, Merck KGaH)

2.1.1.6 เมทานอล (HPLC Grade, Chromasolv)

2.1.1.7 อะซิโตไนไทรล์ (HPLC Grade, RCI Labscan)

2.1.1.8 กรดอะซิติก (Acetic Acid, HPLC Grade, BDH)

2.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

2.1.2.1 เครื่องยูวีวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (รุ่น V650, ยี่ห้อ Jasco)

2.1.2.2 เครื่องแยกของเหลวสมรรถนะสูง (รุ่น 717 Autosampler, ยี่ห้อ Water)

2.1.2.3 เครื่อง Vortex Mixer (รุ่น G560-E, ยี่ห้อ Vortex Genie 2)

2.1.2.4 ชุดอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

2.1.2.5 ชุดอุปกรณ์สกัดแบบซอล์คเลต (Soxhlet Extraction Apparatus)

2.1.2.6 ตู้อบความร้อน (ยี่ห้อ Memmert)

2.1.2.7 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (รุ่น BP110S, ยี่ห้อ Startorius)

2.1.2.8 ไมโครปิเปต (ยี่ห้อ Eppendorf Research)

2.1.3 แหล่งที่มาของตัวอย่างรำข้าว

รำข้าวที่ใช้ในการทดลองนำมาจาก โรงสีข้าวนำชัย เลขที่ 54 หมู่ 8 ถนนสุรินทร์-สังขะ ตำบลเทนมีย์ อำเภอเมือง จังหวัดสุรินทร์

2.1.4 การเตรียมตัวอย่างรำข้าว

นำตัวอย่างรำข้าวมาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสจนกระทั่งน้ำหนักคงที่ แล้วเก็บตัวอย่างรำข้าวที่อบแล้วไว้ในขวดเก็บตัวอย่างสีชา แล้วเก็บไว้ในโถดูดความชื้น (Desiccator)

2.2 การหาสภาวะสำหรับการวิเคราะห์แกมมา-โอริซานอลแบบสกัดบางส่วนด้วยตัวทำละลายเอทิลแลคเตท

2.2.1 ศึกษาผลของน้ำหนักรำข้าว

ชั่งตัวอย่างรำข้าว 50 มิลลิกรัม ใส่หลอดทดลองที่มีฝาปิดจำนวน 4 หลอด และเติมตัวทำละลายเอทิลแลคเตท ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำทั้ง 4 หลอดมาเขย่าด้วยเครื่อง Vortex Mixer เป็นเวลา 2 นาที แล้วนำหลอดทดลองไปแช่ในอ่างควบคุมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที หลังจากนั้นแยกสารละลายที่สกัดได้และรำข้าวออกจากกันด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) นำเฉพาะส่วนที่เป็นสารละลายไปวิเคราะห์หาปริมาณแกมมา-โอริซานอลด้วยเครื่องยูวีวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ และทำการทดลองซ้ำโดยเปลี่ยนน้ำหนักของรำข้าวจาก 50 มิลลิกรัม เป็น 100, 150 และ 200 มิลลิกรัม ตามลำดับ (แต่ละสภาวะทำการทดลองซ้ำ 4 ครั้ง, n=4)

2.2.2 ศึกษาผลของปริมาตรตัวทำละลาย

ชั่งตัวอย่างรำข้าว 50 มิลลิกรัม ใส่หลอดทดลองที่มีฝาปิดจำนวน 4 หลอด และเติมเอทิลแลคเตท ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.2.1 แล้วนำเฉพาะส่วนที่เป็นสารละลายไปวิเคราะห์หาปริมาณแกมมา-โอริซานอลด้วยเครื่องยูวีวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ และทำการทดลองซ้ำโดยเปลี่ยนปริมาตรจาก 5 มิลลิลิตร เป็น 7.5, 10.0 และ 12.5 มิลลิลิตร ตามลำดับ (แต่ละสภาวะทำการทดลองซ้ำ 4 ครั้ง, n=4)

2.2.3 ศึกษาผลของเวลาที่ใช้ในการสกัด

ชั่งตัวอย่างรำข้าว 50 มิลลิกรัม ใส่หลอดทดลองที่มีฝาปิดจำนวน 4 หลอด แล้วเติมเอทิลแลคเตท 5 มิลลิลิตร จากนั้นเขย่าหลอดทดลองด้วยเครื่อง Vortex Mixer เป็นเวลา 2 นาที แล้วนำหลอดทดลองไปแช่ในอ่างควบคุมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที หลังจากนั้นแยกสารละลายที่สกัดได้และรำข้าวออกจากกันด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง นำเฉพาะส่วนที่เป็นสารละลายไปวิเคราะห์หาปริมาณแกมมา-โอริซานอลด้วยเครื่องยูวีวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ และทำการทดลองซ้ำโดยเปลี่ยนเวลาที่ใช้ในการสกัดจาก 2 นาที เป็น 4, 6, 8 และ 10 นาที ตามลำดับ (แต่ละสภาวะทำการทดลองซ้ำ 4 ครั้ง, n=4)

2.3 การวิเคราะห์ปริมาณแกมมา-โอริซานอลในรำข้าวด้วยวิธีการสกัดแบบดั้งเดิมและวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายแบบบางส่วน

2.3.1 วิธีการสกัดแบบดั้งเดิม

ชั่งตัวอย่างรำข้าว 3 กรัมด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง แล้วบรรจุรำข้าวในหลอดกระดาษกรองสำหรับการสกัด (Extraction Thimble) แล้วจัดชุดอุปกรณ์ซอล์คเลตในตู้ดูดควัน และทำการสกัดด้วยตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดนำสารละลายที่สกัดได้ไประเหยตัวทำละลายออกในตู้ดูดควัน หลังจากนั้นเจือจางสารที่สกัดได้ด้วยเฮกเซนและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุดที่ 315 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวีวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ และคำนวณหาปริมาณแกมมา–โอริซานอลในรำข้าวโดยการเทียบกับกราฟมาตรฐาน

2.3.2 วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายแบบบางส่วน

ทำการสกัดแกมมา-โอริซานอลในตัวอย่างรำข้าวโดยใช้สภาวะที่ให้ปริมาณแกมมา-โอริซานอลในรำข้าวสูงสุด (จากผลการศึกษาตามข้อ 2.2) ในการทดลองชั่งตัวอย่างรำข้าว 50 มิลลิกรัม ใส่หลอดทดลองที่มีฝาปิดจำนวน 8 หลอด โดยแบ่งหลอดทดลองเป็น 2 ชุด ชุดละ 4 หลอด ซึ่งหลอดทดลองชุดแรกเติมเอทิลแลคเตท ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ส่วนชุดที่สองเติมเอทิลแลคเตท 10 มิลลิลิตร จากนั้นเขย่าหลอดทดลองด้วยเครื่อง Vortex Mixer เป็นเวลา 2 นาที แล้วนำหลอดทดลองไปแช่ในอ่างควบคุมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที หลังจากนั้นแยกสารละลายที่สกัดได้และรำข้าวออกจากกันด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง นำเฉพาะส่วนที่เป็นสารละลายไปวิเคราะห์หาปริมาณแกมมา-โอริซานอลด้วยเครื่องยูวีวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ และทำการทดลองซ้ำโดยเปลี่ยนจากตัวทำละลายเอทิลเลตเตทเป็นตัวทำละลายไอโซโพรพานอล แล้วนำผลการทดลองที่ได้มาคำนวณหาปริมาณแกมมา-โอริซานอลทั้งหมดในตัวอย่างรำข้าว (แต่ละสภาวะทำการทดลองซ้ำ 4 ครั้ง, n=4)

2.4 การวิเคราะห์แกมมา–โอริซานอลที่สกัดได้ด้วยเครื่องแยกของเหลวสมรรถนะสูง

การวิเคราะห์แกมมา-โอริซานอลที่สกัดจากรำข้าวด้วยเครื่องแยกของเหลวสมรรถนะสูงในงานวิจัยนี้ ใช้คอลัมม์ Nova-Pak C18 ขนาด 3.9 x 150 นาโนเมตร ระบบการวิเคราะห์แยกเป็นแบบ Gradient Elution โดยเฟสเคลื่อนที่ (Mobile Phase) ที่ใช้คือ

อะซิโตไนไทรล์:เมทานอล:ไอโซโพรพานอล:สารละลายร้อยละ 1 กรดอะซิติก ในอัตราส่วน 45:45:5:5 ตัวตรวจวัดเป็น UV Detector ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 325 นาโนเมตร ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานแกมมา–โอริซานอลที่ใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานเท่ากับ 10, 20, 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

สำหรับการเตรียมตัวอย่าง เตรียมโดยชั่งสารที่สกัดได้จากรำข้าว 30 มิลลิกรัม ละลายด้วยตัวทำละลายที่เป็นเฟสเคลื่อนที่แล้วปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตรโดยใช้ขวดวัดปริมาตร แล้วนำสารละลายที่ได้ไปกรองด้วย Syringe Filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องแยกของเหลวสมรรถนะสูง

3. ผลการศึกษาและอภิปรายผล

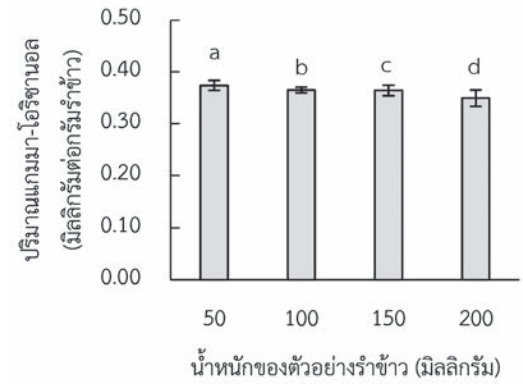
3.1 การหาสภาวะสำหรับการวิเคราะห์แกมมา-โอริซานอลแบบสกัดบางส่วนด้วยตัวทำละลายเอทิลเลตเตท

3.1.1 ผลของน้ำหนักรำข้าว

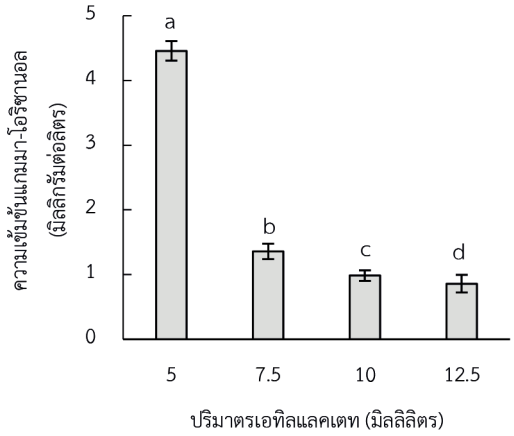
การหาสภาวะสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณแกมมา-โอริซานอลในตัวอย่างรำข้าวด้วยวิธีการสกัดแบบบางส่วน โดยศึกษาผลของน้ำหนักรำข้าวที่มีต่อการสกัดแบบบางส่วน ในการทดลองใช้น้ำหนักรำข้าวตัวอย่างเท่ากับ 50, 100, 150 และ 200 มิลลิกรัม จากการทดลองพบว่าปริมาณแกมมา-โอริซานอลในรำข้าวที่สกัดได้เป็น 0.37, 0.36, 0.36 และ 0.34 มิลลิกรัมต่อกรัมรำข้าว ตามลำดับ ดังรูปที่ 1 ซึ่งปริมาณของแกมมา-โอริซานอลที่สกัดได้ต่อกรัมรำข้าวมีค่าใกล้เคียงกัน ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงใช้น้ำหนักรำข้าวเท่ากับ 50 มิลลิกรัม เป็นน้ำหนักรำข้าวที่เหมาะสมสำหรับการสกัดแบบบางส่วนด้วยตัวทำละลายเอทิลแลคเตท

3.1.2 ผลของปริมาตรตัวทำละลาย

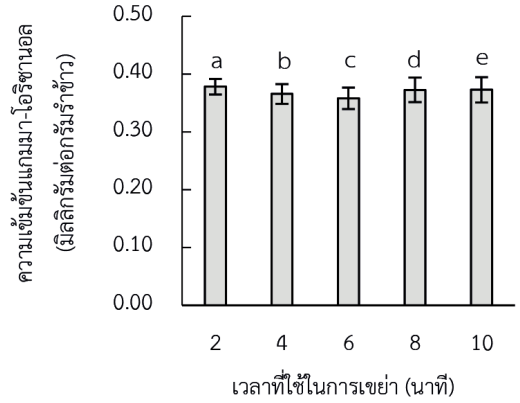
การศึกษาผลของปริมาตรตัวทำละลายที่มีต่อการสกัดแบบบางส่วน โดยการใช้เอทิลแลคเตทเป็นตัวทำละลาย จากผลการทดลองพบว่าเมื่อใช้ปริมาตรของตัวทำละลายเพิ่มมากขึ้น ความเข้มข้นของแกมมา-โอริซานอลในสารละลายที่สกัดได้จะน้อยลง เนื่องจากน้ำหนักรำข้าวที่ใช้ในการสกัดเท่ากันทุกสภาวะ (น้ำหนักรำข้าว 50 มิลลิกรัม) แต่ปริมาตรของตัวทำละลายไม่เท่ากัน ดังนั้นเมื่อใช้ตัวทำละลายปริมาตรมากขึ้นความเข้มข้นของแกมมา-โอริซานอลในสารละลายจึงน้อยลงดังรูปที่ 2 โดยเมื่อใช้ปริมาตรเอทิลแลคเตทเป็น 5.0, 7.5, 10.0 และ 12.5 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นของแกมมา-โอริซานอลในสารละลายเท่ากับ 4.4, 1.35, 0.98 และ 0.85 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงใช้ปริมาตรของเอทิลแลคเตทเท่ากับ 5.0 มิลลิลิตร เนื่องจากมีความเข้มข้นของแกมมา-โอริซานอลในสารที่สกัดได้มากที่สุด



รูปที่ 1 ผลของน้ำหนักรำข้าวต่อปริมาณแกมมา-โอริซานอลที่สกัดได้จากรำข้าวด้วยตัวทำละลายเอทิลแลคเตท



รูปที่ 2 ผลของปริมาตรตัวทำละลายเอทิลแลคเตทต่อปริมาณแกมมา-โอริซานอลที่สกัดได้จากรำข้าว



รูปที่ 3 ผลของเวลาที่ใช้ในการสกัดต่อปริมาณแกมมา-โอริซานอลที่สกัดได้จากรำข้าว

3.1.3 ผลของเวลาที่ใช้ในการสกัดแบบบางส่วน

ในการทดลองใช้เอทิลแลคเตทเป็นตัวทำละลายปริมาตร 5 มิลลิลิตร น้ำหนักตัวอย่างรำข้าว 50 มิลลิกรัม และใช้เวลาในการสกัดเป็น 2, 4, 6, 8 และ 10 นาที จากการทดลองพบว่าได้ปริมาณแกมมา-โอริซานอลที่เป็น 0.37, 0.36, 0.35, 0.37 และ 0.37 มิลลิกรัมต่อกรัมรำข้าว ตามลำดับ ดังรูปที่ 3 ซึ่งปริมาณของแกมมา-โอริซานอลที่สกัดได้มีค่าใกล้เคียงกัน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงใช้เวลาในการสกัดเท่ากับ 2 นาทีเป็นเวลาในการสกัดที่เหมาะสม เพราะสามารถสกัดแกมมา-โอริซานอลได้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกับเมื่อใช้เวลาในการสกัดที่เพิ่มมากขึ้น เพื่อเป็นการประหยัดเวลา

3.2 การวิเคราะห์ปริมาณแกมมา-โอริซานอลในรำข้าวด้วยวิธีการสกัดแบบดั้งเดิมและวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายแบบบางส่วน

สำหรับวิธีการสกัดแบบดั้งเดิมได้ทำการสกัดตัวอย่างรำข้าวด้วยตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ซึ่งใช้เวลาในขั้นตอนการสกัดค่อนข้างนาน หลังจากนั้นระเหยตัวทำละลายออก แล้ววิเคราะห์หาปริมาณแกมมา-โอริซานอลในตัวอย่างรำข้าว โดยชั่งน้ำหนักที่แน่นอนของสารสกัดที่ได้จากตัวอย่างรำข้าว แล้วละลายในตัวทำละลายเฮกเซน หลังจากนั้นนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยด้วยเครื่องยูวีวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 313.6 นาโนเมตร แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ คำนวณหาความเข้มข้นแกมมา-โอริซานอลในสารสกัดโดยคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานแกมมา-โอริซานอล จากผลการทดลองพบว่าตัวอย่างรำข้าวที่ใช้ในการทดลองนี้มีปริมาณแกมมา-โอริซานอลเท่ากับ 4.32 มิลลิกรัมต่อกรัมรำข้าวแห้ง ซึ่งผลการทดลองที่ได้มีความสอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Cholticha Tangprawat [10] ที่วิเคราะห์ปริมาณไขมันทั้งหมดและแกมมา-โอริซานอลในรำข้าวแล้วพบว่ามีปริมาณแกมมา-โอริซานอลอยู่ในช่วง 1.95–3.07 มิลลิกรัมต่อกรัมรำข้าวแห้ง ซึ่งปริมาณของแกมมา-โอริซานอลในตัวอย่างรำข้าวที่มีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย [11] เช่น สายพันธุ์ของข้าว ระยะเวลาในการเจริญเติบโต วิธีการบด วิธีการขัดสีเมล็ดข้าว และวิธีการเก็บเกี่ยว เป็นต้น

สำหรับวิธีการสกัดตัวอย่างรำข้าวด้วยตัวทำละลายแบบบางส่วน โดยทำการสกัดรำข้าว 2 ชุด

ด้วยน้ำหนักรำข้าวที่เท่ากัน โดยใช้ปริมาตรของตัวทำละลายในชุดที่ 2 เป็นสองเท่าของตัวทำละลายในชุดที่ 1 ซึ่งวิธีการสกัดแบบบางส่วนนั้นใช้เวลาในการสกัดเพียง 2 นาที หลังจากนั้นหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกรำข้าวและสารละลายออกจากกัน นำเฉพาะส่วนที่เป็นสารละลายไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยด้วยเครื่องยูวีวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้คำนวณหาความเข้มข้นแกมมา-โอริซานอลในสารสกัด โดยคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานแกมมา-โอริซานอล หลังจากนั้นคำนวณหาปริมาณแกมมา-โอริซานอลทั้งหมดในรำข้าว (คำนวณโดยใช้ความสัมพันธ์ตามสมการที่ 6)

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณแกมมา-โอริซานอลที่ได้จากวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายแบบดั้งเดิมกับวิธีการสกัดแบบบางส่วน จากผลการทดลองพบว่าปริมาณแกมมา-โอริซานอลทั้งหมดในตัวอย่างรำข้าวที่ได้จากทั้งสองวิธีมีค่าใกล้เคียงกัน ดังตารางที่ 1 เมื่อพิจารณาปริมาณของแกมมา-โอริซานอลที่ได้จากวิธีการสกัดแบบบางส่วนด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ พบว่าเมื่อทำการสกัดด้วยไอโซโพรพานอล ได้ปริมาณของแกมมา-โอริซานอลมากกว่าเมื่อใช้ตัวทำละลายเอทิลแลคเตท ทั้งนี้เนื่องจากสภาพความมีขั้วของตัวทำละลายแต่ละชนิดไม่เท่ากัน จึงมีความสามารถในการสกัดแกมมา-โอริซานอลในรำข้าวได้แตกต่างกัน โดยที่ไอโซโพรพานอลมีสภาพความมีขั้วสูงและมีหมู่ไฮดรอกซิลในโครงสร้าง (-OH) จึงสามารถสกัดแกมมา-โอริซานอลที่อยู่ในตัวอย่างรำข้าวได้ดี ซึ่งผลการทดลองจากโครงงานวิจัยนี้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chen และ Bergman ที่ได้รายงานการวิจัยว่าไอโซโพรพานอลและเมทานอลสามารถสกัดแกมมา-โอริซานอลออกจากตัวอย่างรำข้าวได้ดี เนื่องจากในโครงสร้างของเฟอร์รูเลตเอสเทอร์ (Ferulate Ester) มีหมู่ไฮดรอกซิลบนวงแหวนเบนซินทำให้มีความสามารถในการละลายได้ดีในสารประเภทแอลกอฮอล์ [12]

สำหรับปริมาณแกมมา-โอริซานอลที่สกัดแบบบางส่วนด้วยตัวทำละลายเอทิลแลคเตทซึ่งเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมที่ใช้ในงานวิจัยนี้ มีค่าน้อยกว่าตัวทำละลายไอโซโพรพานอลเล็กน้อย แต่อย่างไรก็ตามปริมาณแกมมา-โอริซานอลที่สกัดได้มีค่าใกล้เคียงกับวิธีการสกัดแบบดั้งเดิม ดังนั้นตัวทำละลายเอทิล-แลคเตทจึงสามารถใช้เป็นตัวทำละลายสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณแกมมา-โอริซานอลในตัวอย่างรำข้าวด้วยวิธีการสกัดแบบบางส่วนได้ นอกจากนี้เมื่อพิจารณาถึงจุดเดือดของตัวทำละลาย ยังพบว่าตัวทำละลายเอทิลเลตเตทเป็นสารที่มีจุดเดือดสูง ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่เหมาะสมสำหรับการเป็นตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด

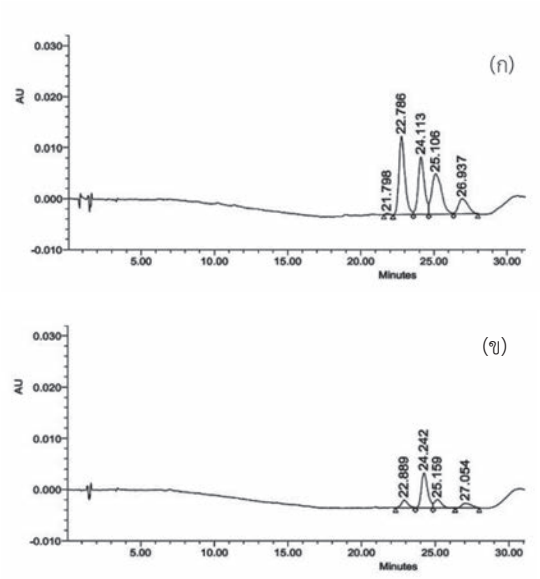
สำหรับการหาปริมาณแกมมา-โอริซานอลในรำข้าวด้วยวิธีการสกัดแบบดั้งเดิมนั้น จะต้องทำการสกัดน้ำมันออกจากรำข้าวก่อนโดยใช้เวลาในการสกัดนานและต้องใช้ปริมาตรของตัวทำละลายจำนวนมาก ส่วนวิธีการสกัดแบบบางส่วนนั้นเป็นวิธีที่สะดวก ขั้นตอนง่าย รวดเร็ว ใช้ปริมาตรของตัวทำละลายจำนวนน้อยและประหยัดเวลากว่าวิธีการสกัดแบบดั้งเดิม

ตารางที่ 1 ปริมาณแกมมา-โอริซานอลทั้งหมดในตัวอย่างรำข้าว ที่ได้จากวิธีการสกัดแบบดั้งเดิมและวิธีการสกัดแบบบางส่วน

วิธีการสกัด	ปริมาณแกมมา-โอริซานอล (มิลลิกรัมต่อกรัมรำข้าวแห้ง)	จุดเดือดของตัวทำละลาย (องศาเซลเซียส)
1. วิธีการสกัดแบบดั้งเดิม (Classical method)		
ปิโตรเลียมอีเทอร์	4.32	42-62
2. วิธีการสกัดแบบบางส่วน (Partial extraction method)		
เอทิลแลคเตท	4.23	151-154
ไอโซโพรพานอล	4.95	82

3.3 ผลการวิเคราะห์แกมมา-โอริซานอลที่สกัดจากรำข้าวด้วยเครื่องแยกของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

จากผลการทดลองพบว่าเมื่อวิเคราะห์แยกสารสกัดในรำข้าวด้วยเครื่องแยกของเหลวแบบสมรรถนะสูง จะได้พีค (Peak) ที่เวลาของการแยก (Retention Time) เท่ากับ 22.8, 24.2 และ 25.1 นาที ซึ่งเป็นอนุพันธ์ที่เป็นองค์ประกอบหลักของแกมมา-โอริซานอล 3 อนุพันธ์ คือ ไซโคลอาร์ทินิลเฟอร์รูเลต (Cycloartenyl Ferulate), 24-เมทิลินไซโคลอาร์ทานิลเฟอร์รูเลต (24-Methylene Cycloartanyl Ferulate), และเคมเพสทีริลเฟอร์รูเลต (Campesteryl Ferulate) ซึ่งผลการทดลองในงานวิจัยนี้มีความสอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Chen และ Bergman ซึ่งรายงานผลการวิจัยว่า ได้พีคของแกมมา-โอริซานอลในช่วง Retention Time ตั้งแต่ 18-24 นาที [12]



รูปที่ 4 (ก) โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานแกมมา-โอริซานอล และ (ข) แกมมา-โอริซานอลที่สกัดได้จากรำข้าว

4. สรุป

สภาวะสำหรับการวิเคราะห์แกมมา-โอริซานอลในรำข้าวแบบสกัดบางส่วนด้วยตัวทำละลายเอทิลแลคเตทซึ่งเป็นตัวทำละลายที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมคือ น้ำหนักรำข้าว 50 มิลลิกรัม ปริมาตรเอทิลแลคเตท 5 มิลลิลิตร เวลาในการสกัด 2 นาที ผลการวิเคราะห์แกมมา-โอริซานอลที่วิเคราะห์ด้วยวิธีการสกัดแบบบางส่วนมีค่าใกล้เคียงกับการวิเคราะห์ด้วยวิธีแบบดั้งเดิม ซึ่งการวิเคราะห์แกมมา–โอริซานอลในรำข้าวด้วยการสกัดแบบบางส่วนด้วยเอทิลเลตเตทเป็นวิธีที่ง่าย ขั้นตอนไม่ซับซ้อน ประหยัดเวลา ราคาถูก อุปกรณ์ที่ใช้หาง่ายในห้องปฏิบัติการ และตัวทำละลายที่ใช้เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม

5. กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุน สารเคมี อุปกรณ์วิทยาศาสตร์และเครื่องมือวิเคราะห์จากสาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ

6. เอกสารอ้างอิง

[1] F. Orthoefer, “Rice bran oil: Healthy lipid source,” *Food Technol.*, vol. 50, pp. 62–64, Dec. 1996.

[2] M. Patel and S. Naik, “Gamma-Oryzanol from rice bran oil-A review,” *J. Sci. Ind. Res.*, vol. 63, pp. 569–578, Jul. 2004.

[3] P. Kumar *et al.*, “Comparative study on conventional, ultrasonication and microwave assisted extraction of g-oryzanol from rice bran,” *J. Food Sci. Technol.*, vol. 53, no. 4, pp. 2047–2053, Apr. 2016.

[4] A. Proctor and D. J. Bowen, “Ambient-temperature extraction of rice bran oil with hexane and isopropanol,” *J. Am. Oil*

Chem. Soc., vol. 73, no. 6, pp. 811–813, Jun. 1996.

[5] W. Hu, J. H. Wells, T.-S. Shin and J. S. Godber, "Comparison of isopropanol and hexane for extraction of vitamin E and oryzanols from stabilized rice bran," *J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 73, no. 12, pp. 1653–1656, Dec. 1996.

[6] C. S. M. Pereira, V. M. T. M. Silva and A. E. Rodrigues, "Ethyl lactate as a solvent: Properties, applications and production processes – a review," *Green Chem.*, vol. 13, no. 10, pp. 2658–2671, Jan. 2011.

[7] R. Bucci, A. D. Magrì, A. L. Magrì and F. Marini, "Comparison of three spectrophotometric methods for the determination of g-oryzanol in rice bran oil," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 375, no. 8, pp. 1254–1259, Apr. 2003.

[8] B. Shammugasamy, Y. Ramakrishnan, F. Manan and K. Muhammad, "Rapid Reversed-Phase Chromatographic Method for Determination of Eight Vitamin E Isomers and g-Oryzanols in Rice Bran and Rice Bran Oil," *Food Anal. Methods*, vol. 8, no. 3, pp. 649–655, Mar. 2015.

[9] S. Lilitchan, C. Tangprawat, K. Aryusuk, S. Krisnangkura, S. Chokmoh and K. Krisnangkura, "Partial extraction method for the rapid analysis of total lipids and g-oryzanol contents in rice bran," *Food Chem.*, vol. 106, no. 2, pp. 752–759, 2008.

[10] C. Tangprawat, "Determination of total lipid content and gamma-oryzanol in rice bran," Mahidol University, 2006.

[11] S. Iqbal, M. I. Bhanger and F. Anwar, "Antioxidant properties and components of some commercially available varieties of rice bran in Pakistan," *Food Chem.*, vol. 93, no. 2, pp. 265–272, Nov. 2005.

[12] M.-H. Chen and C. J. Bergman, "A rapid procedure for analysing rice bran tocopherol, tocotrienol and g-oryzanol contents," *J. Food Compos. Anal.*, vol. 18, no. 2–3, pp. 139–151, 2005.