รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งเอนไซม์ collagenase ของสารสกัดจากข้าวเหนียวสังข์หยด

Studies of antioxidant and anti-collagenase activities of extracts from Sung Yod Sticky Rice

ผศ.ดร. ปริญญาพร หนูอุไร

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2560A10802175
สัญญาเลขที่ 135/2560

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งเอนไซม์ collagenase ของสารสกัดจากข้าวเหนียวสังข์หยด

Studies of antioxidant and anti-collagenase activities of extracts from Sung Yod Sticky Rice

ผศ.ดร. ปริญญาพร หนูอุไร
คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ตุลาคม 2561

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	1
บทคัดย่อภาษาไทย	2
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	3
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	4
บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหา	6
วัตถุประสงค์	7
ขอบเขตของการวิจัย	7
วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุปทฤษฎี และ/หรือ แนวทางความคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย	7
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	8
การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง	8
วิธีดำเนินการวิจัย	13
ผลการวิจัย	16
อภิปรายและวิจารณ์ผลการวิจัย	24
สรุปผลการวิจัย	26
ผลผลิต	26
รายงานสรุปการเงิน	27
เอกสารอ้างอิง	29
ภาคผนวก	34
ประวัติคณะนักวิจัย	35

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 แสดง dilution factor ที่เหมาะสมในการนำสารสกัดจากเมล็ดข้าวเหนียวสังข์หยดไปวัดปริมาณแอนโทไซยานิน ที่ความยาวคลื่นแสง 510 นาโนเมตร **17**

ภาพที่ 2 แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid **18**

ภาพที่ 3 แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของสารสกัดจากเมล็ดข้าวเหนียวสังข์หยดที่ความเข้มข้นต่างๆ **18**

ภาพที่ 4 แสดงความสามารถของสารละลายมาตรฐาน Ascorbic acid ในการกำจัดอนุมูลอิสระได้ 50% (IC_{50}) ของอนุมูลอิสระเริ่มต้น **19**

ภาพที่ 5 แสดงความสามารถของสารสกัดจากเมล็ดข้าวเหนียวสังข์หยดในการกำจัดอนุมูลอิสระได้ 50% (IC_{50}) ของอนุมูลอิสระเริ่มต้น **20**

ภาพที่ 6 แสดง IC_{50} ของสารละลายมาตรฐาน Ascorbic acid เปรียบเทียบกับสารสกัดจากเมล็ดข้าวเหนียวสังข์หยด ดอกจันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) **20**

ภาพที่ 7 แสดงกราฟมาตรฐานของ Ascorbic acid ความเข้มข้นต่างๆ ในการรีดิวซ์เหล็ก **21**

ภาพที่ 8 แสดงความสามารถในการรีดิวซ์เหล็ก ของสารสกัดจากเมล็ดข้าวเหนียวสังข์หยดที่ความเข้มข้นต่างๆ **21**

ภาพที่ 9 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Ascorbic acid และค่าเฉลี่ยร้อยละของความสามารถในการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และค่า IC_{50} **22**

ภาพที่ 10 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดข้าวกล้องข้าวเหนียวสังข์หยดและค่าเฉลี่ยร้อยละของความสามารถในการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และค่า IC_{50} **23**

ภาพที่ 11 แสดงร้อยละของความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสของสารสกัดข้าวกล้องข้าวเหนียวสังข์หยดที่ความเข้มข้นต่างๆ ในช่วงเวลา 4 และ 8 นาที **24**

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 มหาวิทยาลัยบูรพาผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 135/2560 และขอขอบคุณคณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่สนับสนุนครุภัณฑ์ในการทำการวิจัยให้ลุล่วงและสำเร็จได้ด้วยดี

บทคัดย่อ

ข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย มีหลายสายพันธุ์และมีแหล่งเพาะปลูกอยู่ทั่วภูมิภาคของประเทศ ในเมล็ดข้าวสีดำและแดงมีสารต้านอนุมูลอิสระที่ช่วยในการรักษาโรคเรื้อรังและมีฤทธิ์ยับยั้งการรุกรานของเซลล์มะเร็งโดยการไปยับยั้งเอนไซม์คอลลาจิเนส ปัจจุบันจึงมีการพัฒนางานวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในข้าวที่มีสีเป็นจำนวนมาก ดังนั้นผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาข้าวเหนียวสังข์หยดหรือที่ชาวบ้านเรียกว่าข้าวเหนียวแดงซึ่งเป็นหนึ่งในสายพันธุ์ข้าวพื้นเมืองภาคใต้ที่มีการเพาะปลูกอยู่เฉพาะพื้นที่ในเขตจังหวัดสงขลา โดยทำการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดข้าวกล้องข้าวเหนียวสังข์หยดและทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจิเนส โดยนำข้าวกล้องข้าวเหนียวสังข์หยดมาสกัดด้วย 75% เอทิลแอลกอฮอล์ จากนั้นหาปริมาณแอนโทไซยานินและสารประกอบฟีนอลรวมด้วยวิธี pH differential และ Follin Ciocalteu reagent assay ตามลำดับ ทำการทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กด้วยวิธีการ Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay จากนั้นทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระด้วยวิธี Diphenyl-2-picryl-hydrazyl radical (DPPH) assay และ hydrogen peroxide assay และทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ collagenase ด้วยวิธี collagenase assay การทดลองพบว่าสารสกัดจากข้าวกล้องเหนียวสังข์หยดมีปริมาณแอนโทไซยานินและสารประกอบฟีนอลรวมเฉลี่ย 19.566 ไมโครกรัม และ 0.295 มิลิกรัมต่อน้ำหนักแห้งของผงข้าวเหนียวสังข์หยด 1 กรัม มีความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฉลี่ย 1.761 ± 0.121 มิลิกรัมต่อน้ำหนักแห้งของผงข้าวเหนียวสังข์หยด 1 กรัมและมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระชนิดต่างๆ ได้แตกต่างกันเมื่อเทียบกับสารละลายมาตรฐาน ascorbic acid จากการศึกษาความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส พบว่าสารสกัดข้าวกล้องข้าวเหนียวสังข์หยดที่ความเข้มข้น 6 mg/mL มีค่าเฉลี่ยของการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสสูงสุดคือร้อยละ 49.31 และ 28.08 ในช่วงเวลา 4 และ 8 นาที ตามลำดับ ข้อมูลจากการศึกษาครั้งนี้อาจนำไปศึกษาสารออกฤทธิ์ที่สำคัญและพัฒนาผลิตภัณฑ์เช่นอาหารเสริมหรือผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์ที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันโรคที่เกิดจากความเสื่อมของผิวหนังต่อไป

คำสำคัญ: ข้าวเหนียวสังข์หยด, สารต้านอนุมูลอิสระ, เอนไซม์คอลลาจีเนส

Abstract

Rice is a major economic crop of Thailand. There are many varieties of rice which are agriculture in various part of the country. Several studied in pigmented rice such as black and red rice have shown that they contain antioxidant substances which can prevent the chronic disease and inhibit the collagenase for the cancer invasion. Sung-Yod sticky rice (*Oryza sativa* L.) is a local red colored-sticky rice found in the South of Thailand, particularly, Songkhla province. However, the roles of Sung Yod sticky rice in antioxidant and anti-collagenase remain not clarified. We investigated the antioxidant and anti-collagenase potential of SungYod sticky rice extract. Unpolished Sung-Yod sticky rice was extracted with 75% of ethanol. The Total anthocyanin and phenolic contents were determined by pH differential method and Follin Ciocalteu reagent assay, respectively. The potential of Ferric reduction was analyzed by Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay. The percentage of antioxidant activities was assessed by DPPH scavenging assay and Hydrogen peroxide scavenging assay. The percentage of collagenase inhibition was determined by colorimetric collagenase assay. The mean total anthocyanin and total phenolic compounds were 19.566 µg/g dry weights and 0.295 mg/g dry weight, respectively. The 1.761 ± 0.121 mg/g rice of Sung-Yod sticky rice extract had been a potential to reduce the ferric. The half maximal inhibitory concentration of the Sung-Yod sticky rice extract was different in each type of the method compared with standard ascorbic acid ($p < 0.05$). The maximum percentages of collagenase inhibition of Sung-Yod sticky rice extract at the concentration of 6 mg/ml were 49.31 and 28.08 during the 4 and 8 min, respectively. These findings demonstrated that the Sung-Yod sticky rice extract has the antioxidant and anti-collagenase effect which could be beneficial in preventing the skin degenerative disease.

Keywords: Sung-Yod sticky rice, Antioxidant**,** anti-collagenase

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

ANOVA	one-way analysis of variance
C3G	cyanidin-3-glucoside
D	dilution factor
DPPH	Diphenyl-2-picryl-hydrazyl radical
EGCG	epigallocatechin gallate
FALGPA	N-3-(2-Furyl)acryloyl-L-leucyl-gly-cyl-L-prolyl-L-alanine
FRAP	Ferric reducing antioxidant power
GAE	gallic acid equivalent
H_2O_2	Hydrogen peroxide
HDL	High Density Lipoprotien
HRP	Horseradish peroxidase
IC	Inhibition concentration
KH_2PO_4	Potassium phosphate
µg	microgram
M	Molar
mg	milligram
ml	mililiter
MMP	Matrix Metalloproteinase
MW	molecular weight
MUFA	Monounsaturated Fatty Acid

nm	nanometer
P3G	penonidin-3-glucoside
PBS	Phosphate buffer saline
PUFA	Polyunsaturated Fatty Acid
ROS	Reactive oxygen species
rpm	round per minute

บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของโลกรวมทั้งประเทศไทย สามารถแบ่งชนิดของข้าวตามแหล่งที่ปลูกได้เป็น ข้าวอินดิกา (Indica) มีลักษณะเมล็ดยาวรี ต้นสูง, ข้าวจาปอนิกา (Japonica) เมล็ดป้อม กลมรี ต้นเตี้ย และข้าวจาวานิกา (Javanica) เมล็ดป้อมใหญ่ สำหรับข้าวที่ปลูกในไทยนั้นเป็นข้าวอินดิกา (กรมเจรจาการค้าระหว่างประเทศ, 2556) นอกจากนี้ข้าวยังแบ่งออกเป็นข้าวเจ้าและข้าวเหนียว ซึ่งมีความแตกต่างกันที่เมล็ดข้าวเจ้าประกอบด้วยแป้ง amylose ประมาณร้อยละ 15-30 เมล็ดข้าวเหนียวประกอบด้วยแป้ง amylopectin เป็นส่วนใหญ่และมีแป้ง amylose เพียงประมาณร้อยละ 5-7

ข้าวเหนียว (*Oryza sativa* var. *glutinosa*) มีลักษณะเด่น คือ เมล็ดข้าวที่สุกแล้วจะติดกันเหมือนกาว ให้ความเหนียว ความมัน มีรสชาติที่น่ารับประทาน เป็นที่นิยมบริโภคอย่างกว้างขวาง ปลูกมากทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ข้าวเหนียวสามารถแปรรูปเป็นอาหารได้หลายประเภท นอกจากการบริโภคโดยตรงแล้วยังมีการนำข้าวเหนียวมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตสุราพื้นเมือง การผลิตแป้งข้าวเหนียวเพื่ออุตสาหกรรมอาหาร และขนมขบเคี้ยว ข้าวเหนียวสามารถแบ่งย่อยตามสีของเมล็ด ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ ข้าวเหนียวขาว และข้าวเหนียวที่มีสี เช่น ข้าวเหนียวดำ (Black sticky rice) ข้าวที่มีสีโดยเฉพาะข้าวเหนียวดำจะมีสารอาหารที่เป็นประโยชน์มากกว่าข้าวเหนียวขาว จากการศึกษาพบว่าเมล็ดข้าวเหนียวดำมีสารอาหารต่าง ๆ ได้แก่ โปรตีน (Feri and Becker, 2005) ธาตุเหล็ก (Gregorio, 2002) สังกะสี วิตามินเอ วิตามินอี (tocopherol) วิตามินบี 1 (thiamine) วิตามินบี 2 (riboflavin) และวิตามินบี 6 (pyridoxine) นอกจากนี้ในเมล็ดข้าวเหนียวดำยังมีสารสำคัญ คือ แกมมา-ออไรซานอล (γ-oryzanol) ซึ่งมีคุณสมบัติในการต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (antioxidant) สามารถลด cholesterol, triglyceride และเพิ่มระดับของ high density lipoprotein (HDL) ในเลือด มีผลต่อการทำงานของต่อมใต้สมอง ยับยั้งการหลั่งกรดในกระเพาะอาหาร (ข้าวคู่ครัวคนไทย, 2556) และสารสำคัญตัวที่สอง คือ แอนโทไซยานิน (anthocyanin) ซึ่งมีคุณสมบัติในการต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้เช่นกัน โดยเฉพาะ cyanindin 3-glucoside ที่พบในข้าวสีม่วงกลุ่มอินดิก้า ซึ่งรวมถึงข้าวเหนียวดำของไทย นอกจากนี้ สารดังกล่าวยังช่วยลดความเสี่ยงจากโรคมะเร็ง และโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน (ศูนย์สารสนเทศวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักหอสมุดและศูนย์สารสนเทศวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, กรมวิทยาศาสตร์บริการ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 2553)

จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารอาหารและแร่ธาตุที่สำคัญในเมล็ดข้าว พบว่าเมล็ดข้าวสีดำและแดงมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูงมากเมื่อเทียบกับเมล็ดข้าวสีขาว โดยเชื่อว่าประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระขึ้นอยู่กับปริมาณสารประกอบฟีนอล และปริมาณสาร anthocyanin ในเมล็ดข้าว (Suttajit et al, 2556) ดังนั้นปัจจุบันจึงมีการพัฒนางานวิจัยเกี่ยวกับข้าวที่มีสีเป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะสารที่สกัดจากเยื่อหุ้มเมล็ดหรือรำข้าว ในการศึกษาความสามารถในการเป็น antioxidant ของสารสกัดต่าง ๆ ที่กล่าวมาข้างต้นส่วนมากจะศึกษาในด้านปริมาณของ monomeric anthocyanin, total phenolic compound และ Ferric reducing นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดที่มีฤทธิ์ antioxidant ยังมีประสิทธิในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ collagenase ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่มของ matrix metalloproteinases (MMPs) ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสลายโครงสร้างของ

extracellular matrix โดยเฉพาะเส้นใยคอลลาเจน (collagen) ที่เป็นส่วนประกอบของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในชั้น dermis ของผิวหนัง (Thring et al., 2009) มีการศึกษาผลของสารสกัดชนิดต่าง ๆ ต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ collagenase เช่นการศึกษาของ Iswarua และคณะ (2014) ได้นำสารสกัดจากพืชในประเทศอินเดีย จำนวน 11 ชนิดไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ collagenase ด้วยวิธี simple plate และ gelatin zymography พบว่าสารสกัดจากพืช 3 ชนิดคือ *Erythrina indica*, *Nyctanthes arbortris-tis* และ *Acorus calamus* จะให้ผลการยับยั้งเอนไซม์ collagenase มากที่สุด นอกจากนี้มีรายงานการศึกษาสารสกัด polyphenol จากชาเขียว มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ collagenase โดยไปมีผลเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์ collagenase (Madhan et al., 2007)

อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันยังไม่มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ดังกล่าวในข้าวเหนียวสังข์หยด เนื่องจากข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย มีหลายสายพันธุ์และมีแหล่งเพาะปลูกอยู่ทั่วภูมิภาคของประเทศ ดังนั้นผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาข้าวเหนียวสังข์หยดหรือที่ชาวบ้านเรียกว่าข้าวเหนียวแดงซึ่งเป็นหนึ่งในสายพันธุ์ข้าวพื้นเมืองภาคใต้ที่มีการเพาะปลูกอยู่เฉพาะพื้นที่ในเขตจังหวัดสงขลา ดังนั้นข้อมูลการวิจัยนี้อาจนำไปสู่การพัฒนาสายพันธุ์ข้าวชนิดนี้ต่อไปในอนาคต และเป็นการส่งเสริมการเพาะปลูกข้าวชนิดนี้มากขึ้น อีกทั้งข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้สามารถนำไปต่อยอดองค์ความรู้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์และสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับข้าว เป็นการสร้างรายได้ให้กับเกษตรกรอีกทางหนึ่ง

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากข้าวเหนียวสังข์หยดต่อการต้านอนุมูลอิสระ
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากข้าวเหนียวสังข์หยดต่อการทำงานของเอนไซม์ collagenase

ขอบเขตของการวิจัย

โครงการวิจัยนี้เป็นการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากข้าวเหนียวสังข์หยดในการต้านอนุมูลอิสระและการทำงานของเอนไซม์ collagenase การศึกษาเริ่มต้นโดยการสกัดสารสำคัญจากข้าวเหนียวสังข์หยด จากนั้นนำสารสกัดหยาบไปทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ดังนี้ 1) การหาปริมาณแอนโทไซยานินโดยวิธี pH differential method 2) การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu reagent assay 3) การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Diphenyl-2-picryl-hydrazyl radical (DPPH) assay 4) การทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กด้วยวิธีการ Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay 5) การทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ hydrogen peroxide และ 6) ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ collagenase ด้วยวิธี collagenase assay จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี one-way analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับ $p<0.05$ ถือว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุปทฤษฎี และ/หรือ แนวทางความคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย

การศึกษาในครั้งนี้มีจุดมุ่งหมายหลัก คือ มุ่งเน้นศึกษาสารสกัดหยาบจากข้าวเหนียวสังข์หยดต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและการลดหรือยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ collagenase ซึ่งสามารถนำข้อมูลไปพัฒนาคุณสมบัติทางเคมีหรือฤทธิ์ทางชีววิทยาของสารสกัดเพื่อใช้ในการรักษาหรืออาจพัฒนาเป็นอาหารเสริมบำรุงร่างกายต่อไปในอนาคต

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ผลการวิจัยที่ได้ในครั้งนี้จะเป็นผลการศึกษาครั้งแรกในประเทศไทยในการนำสารสกัดจากข้าวเหนียวสังข์หยดมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งเอนไซม์ collagenase ซึ่งถ้าหากการวิจัยแล้วเสร็จ จะสามารถตีพิมพ์ผลงานวิจัยได้อย่างน้อย 1 เรื่อง และสามารถนำองค์ความรู้ดังกล่าวไปเผยแพร่ให้กับหน่วยงานที่เกี่ยวข้องเช่นกรมวิชาการเกษตรเพื่อพัฒนาสายพันธุ์ข้าวดังกล่าวให้เหมาะแก่การเพาะปลูก และเป็นข้อมูลวิจัยอ้างอิงในการส่งเสริมการเพาะปลูกข้าวชนิดนี้มากขึ้น นอกจากนี้ข้อมูลการวิจัยนี้อาจนำไปสู่การศึกษาพัฒนาสารสกัดในด้านต่างๆ เช่น การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี ความคงตัวทางเคมีและฤทธิ์ทางชีววิทยาของสารสกัดในการป้องกันและรักษาโรค เช่นการศึกษาผลของสารสกัดต่อกลไกในการยับยั้งการสร้างเอนไซม์ collagenase หรือเอนไซม์ elastase ที่ส่งผลให้เกิดการทำลายโครงสร้างเนื้อเยื่อผิวหนังในสัตว์ทดลอง หรืออาจนำข้อมูลการวิจัยที่ได้ไปทำวิจัยร่วมกับหน่วยงานภายนอกเช่น องค์การเภสัชกรรม เพื่อทำการพัฒนาสารสกัดข้าวเหนียวสังข์หยดให้เป็นผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์ ในการรักษาหรือลด ริ้วรอยและภาวะการแก่ก่อนวัยของผิวหนัง หรืออาจนำสารสกัดจากข้าวเหนียวสังข์หยดไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เกี่ยวกับความงาม ได้แก่ สบู่ ครีมทาผิว หรือผงขัดผิว ฯ โดยการร่วมมือกับองค์กรปกครองส่วนท้องถิ่นในการพัฒนาเป็นสินค้า OTOP ของชุมชน ซึ่งเป็นการเพิ่มมูลค่าของสินค้าเกษตรและเป็นการสร้างรายได้เพิ่มให้กับชุมชนและประเทศในอนาคต

การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง

ข้าวจัดเป็นพืชล้มลุกตระกูลหญ้า สกุล *Oryza* สามารถเจริญเติบโตได้ในพื้นที่ที่มีระดับน้ำสูงกว่า 4 เมตร หรือไม่ต้องมีน้ำขัง ข้าวที่ปลูกในประเทศไทยส่วนใหญ่เป็นชนิด *Oryza sativa* ชนิดย่อย indica เมล็ดข้าวประกอบด้วย

1. เปลือกหุ้มเมล็ดหรือแกลบ (Husk) คือ เปลือกส่วนภายนอกสุดที่ห่อหุ้มเมล็ดข้าว ประกอบไปด้วย โปรตีน ไขมัน เส้นใย คาร์โบไฮเดรต เถ้า สารซิลิกา แคลเซียม ฟอสฟอรัส ลิกนิน เซลลูโลส เพนโตแซน เฮมิเซลลูโลส และอื่นๆ

2. เมล็ดข้าวกล้อง ประกอบด้วย จมูกข้าว (Embryo หรือ Germ) รำข้าว และเมล็ดข้าวสาร (Endosperm) เมื่อนำข้าวกล้องมาขัดเอาผิวออกจะได้รำหยาบและจมูกข้าว (5–8%), รำละเอียดและจมูกข้าว (2–3%) และเมล็ดข้าวสาร (60-73%)

เมล็ดข้าวมีองค์ประกอบหลักดังนี้

1. คาร์โบไฮเดรตหรือแป้งข้าว (Starch) ข้าวจะมีแป้งอยู่ 90% ของน้ำหนักแห้ง

2. โปรตีน เมล็ดข้าวมีส่วนประกอบของโปรตีนอยู่ประมาณ 9.5% เป็นอันดับสองรองจากแป้ง ปริมาณโปรตีนที่พบในเมล็ดข้าวมีความแปรปรวนขึ้นอยู่กับสถานที่ปลูก และสภาพแวดล้อม โปรตีนในเมล็ดข้าวสามารถแบ่งเป็น 4 ชนิดตามคุณสมบัติในการละลายได้แก่ 1. อัลบลูมิน (Alblumin) มีคุณสมบัติละลายได้ในน้ำ (Water soluble protein) 2. โกลบูลิน (Globulin) มีคุณสมบัติละลายได้ในน้ำเกลือ (Salt soluble protein) 3. โปรลามิน (Prolamin) มีคุณสมบัติละลายได้ในแอลกอฮอล์ (Alcohol soluble protein) 4. กลูเตลลิน (Glutelin) มีคุณสมบัติละลายได้ในกรดหรือด่าง (Acid or alkali soluble protein)

3. ไขมัน ไขมันที่อยู่ในเมล็ดข้าวมักจะอยู่ในสภาพเป็นหยดไขมันเล็ก ๆ ขนาดเล็กกว่า 1.5 ไมครอนอยู่บริเวณเยื่อหุ้มผิวเมล็ด (รำหยาบและรำละเอียด) และจมูกข้าว เมล็ดข้าวมีไขมัน 1.6–2.8 % ไขมันที่ได้จากข้าวเป็นไขมันชนิดที่มีคุณภาพดี มีกรดไขมันอิ่มตัว 18% กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (Monounsaturated Fatty Acid:

MUFA) 45% กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (Polyunsaturated Fatty Acid: PUFA) 37% น้ำมันรำข้าวเหมาะสำหรับผู้ที่ต้องการลดคอเลสเตอรอลที่ไม่ดี (LDL-C) เพราะมีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (Linoleic acid,Oleic acid และ Palmitic acid) มีสาร γ-oryzanol ช่วยในการควบคุมระดับคอเลสเตอรอลในเส้นเลือด

4. สารต้านอนุมูลอิสระสำคัญที่อยู่ในเมล็ดข้าว ได้แก่ γ-oryzanol โทโคฟีรอล (Tocopherol) โทโคไตรอีนอล (Tocotrienol) และ anthocyanin

จากการวิจัยเปรียบเทียบคุณค่าทางโภชนาการของข้าว พบว่า ข้าวเหนียวดำมีปริมาณโปรตีนสูงที่สุด แต่มีปริมาณไขมันต่ำที่สุด ข้าวจ้าวสังข์หยดพัทลุงมีปริมาณสังกะสีสูงที่สุด และให้พลังงานต่ำที่สุด (ผาณิต รุจิรพิสิฐ และคณะ, 2555)

ชนิดของข้าว

ข้าวสามารถแบ่งตามองค์ประกอบทางเคมีในเมล็ดข้าวสารได้ 2 ชนิด (ธัญพืช, 2543) คือ **1. ข้าวจ้าว** ประกอบด้วยแป้งประมาณ 90 เปอร์เซ็น ซึ่งแป้งมีองค์ประกอบสองส่วนคือ amylose เป็นโพลิเมอร์ของ D-glucose ที่ต่อกันเป็น linear chain และ amylopectin เป็นโพลิเมอร์ของ D-glucose ที่ต่อกันเป็น branch chian โดยในข้าวเจ้าจะมี amylose ประมาณ 20-30 เปอร์เซ็นต์ และ amylopectin ประมาณ 70-80 เปอร์เซ็นต์ **2. ข้าวเหนียว** ประกอบด้วย amylopectin สูงประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์ และมี amylose น้อยมาก ซึ่งข้าวเหนียวมีอยู่ด้วยกันหลายสายพันธุ์ แต่ที่คนส่วนใหญ่รู้จักและนิยมบริโภคมีอยู่สองสี คือ ข้าวเหนียวที่มีสีขาว และข้าวเหนียวดำ ประโยชน์ของข้าวเหนียวนอกจากจะมีประโยชน์ทางด้านอาหารแล้ว ยังมีประโยชน์ต่อร่างกายด้วย เช่น บำรุงร่างกาย ช่วยขับลมในร่างกาย สร้างสารอาหาร เสริมสมรรถภาพกระเพาะอาหาร และบำรุงผิวพรรณ (คุณค่าของข้าวเหนียว, 2554)

การศึกษางานวิจัยเกี่ยวกับข้าว

ข้าวที่มีสารอาหารอยู่ครบถ้วนต้องเป็นข้าวกล้องที่มีจมูกข้าวและรำข้าวติดอยู่รอบเมล็ดในปริมาณที่มาก มีรายงานการวิจัยฤทธิ์การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของข้าวขาว ข้าวกล้อง และข้าวกล้องงอกในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 2 พบว่าข้าวกล้องและข้าวกล้องงอกสามารถปรับระดับของภาวะน้ำตาลในเลือดสูง ภาวะ serum creatinine และมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าในข้าวขาว (Imam et al., 2012) จากการศึกษาของไมตรี สุทธจิตต์ และคณะ (คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา, 2555) ได้ทำการศึกษาผลิตภัณฑ์ข้าวกล้องสูตรอาร์ซีชนิดผง ซึ่งประกอบด้วย ข้าวกล้อง ข้าวกล้องเหนียว และข้าวมันปู อย่างละ 16.67% และข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่าง ข้าวสาลี ลูกเดือย ลูกบัว และข้าวโอ๊ต อย่างละ 8.34% โดยให้ผู้ป่วยเบาหวานทานโดยการชง 4 ช้อนโต๊ะ ต่อน้ำร้อนประมาณ 250 ซีซี ต่อการบริโภค 1 ครั้ง ทานก่อนอาหาร 3 มื้อ ทุกวัน รวมระยะเวลา 2 เดือน พบว่าข้าวกล้องอาร์ซี ช่วยให้ผู้ป่วยเบาหวานสามารถควบคุมน้ำตาลได้ 55.6% ควบคุมระดับ cholesterol ได้ 94.4**%** ควบคุมระดับ triglyceride ได้ 77.8% ควบคุมระดับของตัวส่งไขมันชนิด LDL-cholesterol ได้ 44.4% และควบคุมระดับของตัวส่งไขมันชนิด HDL-cholesterol ได้ 66.7% นอกจากนั้นยังพบว่าผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตและสุขภาพที่ดีขึ้น นอกจากนี้ข้าวกล้องยังมีสรรพคุณในการเสริมสร้างพลังงาน ต้านอนุมูลอิสระจึงทำให้ระบบการเผาผลาญทำงานเป็นปกติ ช่วยลดน้ำหนัก ลดความเสี่ยงต่อการเป็นเบาหวานชนิดที่ 2 ต้านมะเร็ง ลดความเสี่ยงต่อการเป็นนิ่วในถุงน้ำดี และโรคหอบหืด

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาที่พบว่าเมล็ดข้าวมีปริมาณสารประกอบฟีนอล ฟลาโวนอยด์ และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูง ซึ่งปริมาณความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอล แอลฟา-ไรโอซานอล โทโคฟีรอล นั้นจะพบ

ในปริมาณมากบริเวณส่วนชั้นนอกของเมล็ดข้าว คือ รำข้าว และแกลบ ซึ่งมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากกว่าในส่วนของแป้ง (เมล็ดข้าวที่ผ่านการขัดขาว) (Butsat and Siriamornpun, 2011) ซึ่งในเม็ดสีของข้าวยังเป็นแหล่งสำคัญของสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ แอนโทไซยานิน แสดงให้เห็นว่าข้าวมีสีที่มีสารแอนโทไซยานิน จะมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าข้าวที่ไม่มีสี ซึ่งจากการศึกษาแอลฟา-ไรโอซานอลจากรำข้าว พบว่าสามารถจำกัดอนุมูลอิสระ ปกป้องโปรตีนจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน และ lipid peroxidation ในเซลล์ แบบ *ex vivo* ได้ (Shao et al., 2011)

1. ข้าวเหนียวดำ (Black sticky rice)

ข้าวเหนียวดำ คือข้าวเหนียวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงแดงจนถึงสีดำรวมทั้งการที่มีรงควัตถุที่ปรากฏในส่วนต่าง ๆ ของต้นข้าว ซึ่งเป็นลักษณะประจำพันธุ์ของข้าวชนิดนี้ รงควัตถุที่มีสีส่วนใหญ่พบในส่วนของลำต้น ใบ และเกือบทุกส่วนของช่อดอก ยกเว้น embryo หรือ endosperm ลักษณะเด่นของข้าวเหนียวดำ คือการติดกันเหมือนกาวของเมล็ดข้าวที่สุกแล้ว และมีสารอาหารที่เป็นประโยชน์มากกว่าข้าวเหนียวขาว องค์ประกอบ และคุณค่าทางโภชนาการของข้าวเหนียวดำ (ประโยชน์ของข้าวเหนียวดำ และข้าวกล้อง, 2012) มีดังนี้

1. Omega-3 (Linolenic Acid) เป็นกรดไขมันที่ช่วยบำรุงสุขภาพ ช่วยควบคุมการขนส่งสารอาหารต่าง ๆ ไปทั่วร่างกาย จำเป็นต่อการป้องกันและรักษาโรคต่าง ๆ เช่น โรคหัวใจ และอัมพาต ลดการอักเสบของโรคไขข้อเสื่อมรูมาตอยด์ ลดอาการปวดหัวไมเกรน และปวดประจำเดือน เพิ่มภูมิคุ้มกันร่างกาย และลดอาการของโรคภูมิแพ้ ลดระดับ cholesterol ลดระดับ triglyceride และเพิ่ม HDL ในเลือด บำรุงสมอง ทำให้เกล็ดเลือดไม่แข็งตัวง่าย

2. Omega-6 (Linoleic Acid) ช่วยป้องกันการเกิดโรคหัวใจ ลดการแข็งตัวของเลือด ลดอัตราการเกิดโรคความดันโลหิตสูง ลดการขยายตัวของเซลล์มะเร็ง ช่วยบำรุงตับ ป้องกันโรคสมองเสื่อมหรือโรคอัลไซเมอร์ ลดระดับ cholesterol และ triglyceride แต่เพิ่มระดับ HDL ในเลือด

3. Omega-9 (Oleic Acid) หรือ lecitin มีหน้าที่สำคัญคือ ลด cholesterol โดยรวม ทำให้เส้นเลือดไม่อุดตัน ไม่เป็นโรคหัวใจ บำรุงสมอง ช่วยให้ความจำดี ไม่เป็นโรคสมองเสื่อม ไม่เป็นโรคพาร์กินสัน และยังช่วยลดความอ้วนได้ดีด้วย

4. Niacin (วิตามินบี 3 หรือ Nicotinic Acid) มีความจำเป็นใน lipid metabolism, tissue respiration และ glycogenolysis ดังนั้น Nicotinic Acid ในปริมาณสูง ๆ จึงสามารถลดระดับ cholesterol ในเลือดได้

5. Vitamin E (Alpha-Tocopherol) Tocopherol และ Tocotrienol เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ จึงช่วยลดภาวะเสี่ยงต่อการเป็นโรคมะเร็งได้ และยังช่วยลด cholesterol ที่อุดตันในเส้นเลือด ในกลุ่มเส้นเลือดไปเลี้ยงไต กรดไขมัน ยูริกในเลือดลดลง ลดเลือดคั่งตามเท้า

6. γ-oryzanol มีประสิทธิภาพในการลดระดับ cholesterol และ triglyceride ทั้งในเลือดและในอวัยวะต่าง ๆ ทำให้หลอดเลือดไม่มีไขมันอุดตัน ไม่เป็นโรคหัวใจ โรคสมองเสื่อม โรคอัมพฤกษ์ และโรคชาตามมือ ตามเท้า รวมทั้งโรคหย่อนสมรรถภาพทางเพศในชายและหญิงด้วย

7. Phytate คือเกลือของ phytic acid หรือ hexainositol phosphoric acid โดยธรรมชาติกรดไฟติกจะมีความสามารถในการจับกับสังกะสี และธาตุเหล็กสูง

8. ธาตุเหล็ก ป้องกันโรคโลหิตจาง มีความจำเป็นมากสำหรับเด็กที่กำลังเจริญเติบโต และสตรีมีครรภ์ เด็กที่ขาดธาตุเหล็กจะมีพัฒนาการทางร่างกายลดลง สมาธิและสติปัญญาในการเรียนรู้ต่ำ การจัดระดับปริมาณธาตุเหล็ก

ที่วิเคราะห์ได้จากเมล็ดข้าว ถ้ามีธาตุเหล็กต่ำกว่า 10 ppm จัดว่าอยู่ในระดับต่ำ 10-20 ppm ระดับปานกลาง และมากกว่า 20 ppm คือ ระดับสูง

9. Anthocyanin เป็นสารประกอบกลุ่ม flavonoid ที่ประกอบไปด้วยสาร cyanidin มีสีม่วงเข้ม และสาร peonidin ซึ่งมีสีชมพูอ่อน พบว่าสาร anthocyanin สามารถช่วยลดการอักเสบของเนื้อเยื่อ ช่วยลดไขมันอุดตันในเส้นเลือดที่หัวใจและสมอง บรรเทาโรคเบาหวาน ช่วยบำรุงสายตา เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการมองเห็นเวลามองตอนกลางคืน สาร cyanidin มีประสิทธิภาพในการ antioxidation ได้ดีกว่าวิตามินอี และยับยั้งการเจริญเติบโตของ epidermal growth factor receptor ในเซลล์มะเร็ง

การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับข้าวเหนียวดำ

เนื่องจากข้าวกล้องของข้าวเหนียวดำมีปริมาณสาร γ-oryzanol และสามารถสังเคราะห์สาร anthocyanin ได้มากกว่าข้าวขาว ในทางการแพทย์จึงได้มีการนำคุณสมบัตินี้มาใช้ประโยชน์โดย พบว่าสาร γ-oryzanol จะช่วยกระตุ้น growth Hormone ทำให้ร่างกายทำงานได้มีประสิทธิภาพมากขึ้น ร่างกายจึงสร้างภูมิต้านทานต่อโรคต่าง ๆ หรือบำบัดอาการของโรคเรื้อรังต่าง ๆ ด้วยตัวเอง โดยเฉพาะโรคที่เกี่ยวกับความเสื่อม ต้านมะเร็ง อัมพฤกษ์ โรคหัวใจ ความดันโลหิต ลด cholesterol เส้นเลือดตีบ โรคเก๊าท์ ไมเกรน ลดความเครียด ช่วยให้นอนหลับ แก้ปัญหาวัยทอง ปวดประจำเดือน และสมรรถภาพเพศชาย (ธวัชชัย แถวถาทำ, 2547) ในต่างประเทศได้มีการนำสาร GABA ที่พบในข้าวกล้องงอกของข้าวเหนียวดำมาใช้ในวงการแพทย์เพื่อรักษาโรคเกี่ยวกับประสาท เช่น โรควิตกกังวล โรคนอนไม่หลับ และโรคลมชัก เพราะสาร GABA จัดอยู่ในกลุ่มกรดโปรตีนที่ช่วยบำรุงเซลล์ประสาท ทำให้สมองเกิดการผ่อนคลายป้องกันการทำลายสมอง ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคสูญเสียความทรงจำหรืออัลไซเมอร์ และสาร anthocyanin ชนิด cyanindin-3-glucoside ที่พบในข้าวเหนียวดำ ยังมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปอด สารสกัดในข้าวเหนียวดำยังมีคุณสมบัติช่วยสร้างเม็ดเลือดแดง สร้าง villi ในผนังลำไส้เล็กทำให้ร่างกายสามารถดูดซึมสารอาหารได้มากขึ้น ส่งผลให้ร่างกายเจริญเติบโตและแข็งแรงยิ่งขึ้น (วรนุช ศรีเจษฎารักข์, 2550)

2. ข้าวสังข์หยด

ข้าวสังข์หยดเป็นข้าวเจ้าพันธุ์พื้นเมืองภาคใต้ ปลูกเฉพาะในจังหวัดพัทลุง ลักษณะต้นสูง 140 เซนติเมตร ไวต่อแสง ทรงกอตั้งใบเขียว รวงแน่น คอรวงยาว ลักษณะเมล็ดเรียวยาว อายุเบา ปริมาณ amylose ต่ำประมาณ 14.25% มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงข้าวจากรวงเดียวกันเมื่อขัดสีแล้วบางเมล็ดมีสีขาวใสแต่ส่วนใหญ่มีลักษณะขาวขุ่น เยื่อหุ้มเมล็ดจะมีสีแดงถึงแดงเข้ม เมื่อหุงสุกแล้วเมล็ดข้าวจะนุ่ม ยังคงนุ่มอยู่เมื่อเย็นตัวลง และจับตัวกันคล้ายข้าวเหนียว นิยมบริโภคในรูปแบบข้าวซ้อมมือ จมูกข้าว (จังหวัดพัทลุง, 2556) ข้าวสังข์หยดเป็นข้าวที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง (ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี, 2007) ช่วยป้องกันโรคเหน็บชา โรคโลหิตจาง มีกากใยอาหารสูงกว่าข้าวพันธุ์อื่น ๆ จึงมีประโยชน์ต่อระบบขับถ่าย มีวิตามินอีสูง ช่วยชะลอความแก่ของเซลล์ร่างกาย มีโปรตีน ฟอสฟอรัส ธาตุเหล็กสูง จึงมีประโยชน์ในการบำรุงร่างกายให้แข็งแรงและป้องกันโรคความจำเสื่อม มีวิตามินไนอาซินสูง ซึ่งมีความสำคัญต่อระบบผิวหนัง และยังพบสาร anthocyanin ซึ่งมีประโยชน์ในการส่งเสริมสุขภาพ ภาวะเครียดจากออกซิเดทีฟ มีบทบาทสำคัญต่อพยาธิสภาพของโรคความเสื่อมของร่างกายที่มีสาเหตุจากสารอนุมูลอิสระ เช่น โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคลมปัจจุบัน โรคมะเร็ง และความชรา (อมรรัตน์ ถนนแก้ว, 2552)

การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับข้าวสีแดง

จากการศึกษาพันธุ์ข้าวของจีนที่มีเมล็ดสีแดง พบว่ามีปริมาณธาตุเหล็กสูงสุดถึง 64 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (Kennedy and Burlingame, 2003) และมีการศึกษาผลของข้าวสีแดงต่อการอุดตันของไขมันในเส้นเลือดกระต่าย โดยเปรียบเทียบกับข้าวขัดขาว พบว่าภาวะการอุดตันของเส้นเลือดของกระต่ายที่กินข้าวสีแดงมีค่าน้อยกว่ากระต่ายที่กินข้าวขัดขาวถึงร้อยละ 50 นอกจากนี้ยังพบว่าระดับของ reactive oxygen species และ malondialdehyde (ผลผลิตของการเกิด lipid peroxidation) ที่อยู่ในตับของกระต่ายที่กินข้าวสีแดงมีการสะสมในปริมาณน้อย ในขณะเดียวกันมีกิจกรรมการต่อต้านอนุมูลอิสระและ superoxide dismutase activity เพิ่มสูงขึ้น และยังพบว่าข้าวแดงช่วยให้มีการสะสมของ HDL ในเลือดกระต่ายอีกด้วย ดังนั้นจึงเห็นได้ว่าการบริโภคข้าวที่มีรงควัตถุสีแดงมีประโยชน์มากต่อการรักษาระดับการต้านอนุมูลอิสระภายในสิ่งมีชีวิต (วาริช ศรีละออง, 2001) และจากการศึกษาสารสกัดข้าวเปลือกสีแดงพันธุ์ Jakwangchalbyeo ซึ่งพบว่าสามารถยับยั้งไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ซึ่งเป็นสารที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดอนุมูลอิสระในเซลล์ H4IIE ได้ดีกว่าในเมล็ดข้าวเปลือกสีขาว (Chi et al., 2007)

การศึกษาสารสกัดจากข้าว

จากการศึกษาเกี่ยวกับสาร anthocyanin โดยสกัดจากข้าวกล้องงอกข้าวเหนียวดำและข้าวหอมนิลที่แกะเปลือกและไม่แกะเปลือก แล้วสกัดด้วยเมทานอล พบว่าข้าวกล้องงอกที่ไม่แกะเปลือกมีปริมาณ anthocyanin มากกว่าที่แกะเปลือก และข้าวเหนียวดำมี anthocyanin มากกว่าข้าวหอมนิลและมากกว่าข้าวที่ไม่มีสี (ข้าวพิษณุโลก) (Sutharut, and Sudarat, 2012) และจากการศึกษาสารสกัดจากรำข้าวของข้าวเหนียวดำและข้าวสีแดงที่สกัดด้วยเมทานอล พบว่าสารกัดจากรำข้าวสีดำมีปริมาณ anthocyanin มากกว่าแต่ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าข้าวสีแดง และพบว่าขนมปังที่ทำจากข้าวสีดำมีปริมาณ anthocyanin มาก แต่ไม่พบสาร anthocyanin ในขนมปังที่ทำจากข้าวสีแดง (Thunnop et al., 2011) นอกจากนี้มีการรายงานว่าข้าวสีดำมีปริมาณ anthocyanin และสารประกอบฟีนอลจำนวนมากเมื่อเทียบกับข้าวขาว (Zhang et al., 2006) และสูงสุดเมื่อเทียบกับข้าวพันธุ์อื่น ๆ (Sompong et al., 2011)

การศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของสารสกัดข้าวสีขาว สีแดง และสีม่วงที่สกัดด้วยเมทานอล (Plaitho et al., 2012) พบว่าสารสกัดจากข้าวสีม่วงมีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมมากกว่าข้าวสีแดง และมากกว่าข้าวสีขาว และการวิจัยของ Muntana และ Prasong (2010) พบว่าสารสกัดรำข้าวของข้าวเหนียวดำที่สกัดด้วยเมทานอลมีสารประกอบฟีนอลรวมสูงเมื่อเทียบเท่ากับข้าวแดง ส่วนข้าวขาวมีสารประกอบฟีนอลรวมและการออกฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระน้อยที่สุด นอกจากนี้ยังมีการศึกษาสารสกัดจากข้าวกล้องงอกข้าวเหนียวดำและข้าวหอมนิล ที่แกะเปลือกและไม่แกะเปลือก แล้วสกัดด้วยเมทานอล พบว่าข้าวกล้องงอกที่ไม่แกะเปลือกมีปริมาณสารประกอบฟีนอลมากกว่าที่แกะเปลือก และในข้าวเหนียวดำมีมากกว่าข้าวหอมนิล และมากกว่าข้าวที่ไม่มีสี (ข้าวพิษณุโลก) (Sutharut and Sudarat, 2012) จากการศึกษาสารสกัดจากข้าวกล้องงอกข้าวเหนียวดำและข้าวหอมนิล ที่สกัดด้วยเมทานอล พบว่าความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กของข้าวเหนียวดำมีมากกว่าข้าวหอมนิล และมากกว่าข้าวที่ไม่มีสี (Sutharut and Sudarat, 2012) และการศึกษาของ Suwannalert และ Rattanachitthawat (2011) พบว่าความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กของข้าวเหนียวดำมากกว่าข้าวสังข์หยด

การศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ Diphenyl-2-picryl-hydrazyl radical (DPPH) จากงานวิจัยของ Hyun และคณะ (2012) ในรำข้าวของข้าวสีดำ สีแดง สีเขียว และสีน้ำตาล ที่สกัดด้วยอะซิโตน เมทานอล และเอทานอล พบว่าสารสกัดจากรำข้าวสีแดงที่สกัดด้วย 40% อะซิโตนมีเปอร์เซ็นต์ DPPH scavenging

activity ใกล้เคียงกับค่าของสารสกัดจากรำข้าวสีดำ แต่สารสกัดจากรำข้าวสีแดงมีเปอร์เซ็นต์ DPPH scavenging activity สูงกว่าเล็กน้อยและสูงที่สุดเมื่อเทียบกับรำข้าวสีอื่น และยังได้วิเคราะห์ค่า IC_{50} ซึ่งเป็นความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้อนุมูล DPPH ลดลงครึ่งหนึ่งของความเข้มข้นเริ่มต้น พบว่าสารสกัดจากรำข้าวสีแดงที่สกัดด้วย 40% อะซิโตน มีค่า IC_{50} ของ เปอร์เซ็นต์ DPPH scavenging activity (112. ± 6 0.4) ต่ำกว่าของสารสกัดจากรำข้าวสีดำ (195.1± 1.3) และข้าวสีอื่น ๆ (Butsat and Siriamornpun, 2011)

ในด้านการป้องกันและรักษาโรค มีการรายงานว่าสารสกัดรำข้าวที่มีสีที่ศึกษาใน *in vivo* มีผลในการลดปฏิกิริยาภูมิแพ้ (Choi et al., 2007) ในขณะที่ anthocyanin สามารถช่วยป้องกันการทำลายดีเอ็นเอและการทำให้ลดระดับ LDL ใน *in vivo* (Muntana and Prasong, 2010) ส่งผลในการลดระดับ cholesterol ในร่างกาย (Lee et al., 2008) และผลของ peonidin, peonidin-3-glucoside และ cyanidin-3-glucoside ที่เป็นอนุพันธ์ที่สำคัญของแอนโทไซยานินที่สกัดได้จากข้าวสีดำ มีผลในการยับยั้งการรุกรานของเซลล์มะเร็งหลายชนิด (Chen et al., 2006) นอกจากนี้มีการรายงานเกี่ยวกับสารประกอบฟีนอลที่พบในอาหาร มีประโยชน์ต่อสุขภาพและมีความสัมพันธ์กับการลดความเสี่ยงต่อการเป็นโรคเรื้อรัง (Liu, 2007) และโรคหลอดเลือดหัวใจ (Liu, 2004)

การศึกษาความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ collagenase มีรายงานการศึกษาของ Sin และ Kim (2005) พบว่าสารสกัดในกลุ่ม flavonoids โดยเฉพาะอย่างยิ่ง สารประเภท flavonol มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ collagenase ได้ดี ในผิวหนังที่มีการอักเสบ และผิวหนังที่ได้รับแสงแดดเป็นเวลานาน นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาสารสกัดจากข้าว *O. sativa* L. ซึ่งสกัดด้วย ethanol แล้วสกัดซ้ำด้วย hexane หรือdichloromethane (DCM) สามารถยับยั้งการลุกลามของเซลล์มะเร็งแบบ *in vitro* โดยไปมีผลยับยั้งการหลั่งเอนไซม์ collagenase และ พบว่าองค์ประกอบในสารสกัดที่มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ collagenase ได้ดี คือ γ-oryzanol และ γ-tocotrienol (Pintha et al., 2014)

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การสกัด water soluble material จากข้าวเหนียวสังข์หยด

นำเมล็ดข้าวเหนียวสังข์หยดที่ปลูกที่ตำบลคลองหลา อำเภอคลองหอยโข่ง จังหลัดสงขลา มาแกะเปลือกบดให้ละเอียด แล้วร่อนผ่านตะแกรงขนาด 60 mesh และนำไปสกัดตามวิธีของ Sangkitikomol (2010) โดยนำผงข้าวเหนียว 100 กรัม ผสมกับ 75% เอธิลแอลกอฮอล์ ปริมาตร 2 ลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 75-78°C นาน 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปเขย่าใน ultrasonic bath นาน 30 นาทีแล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน และ centrifuge ที่ 3000 rpm นาน 15 นาที แล้วนำ supernatant ไประเหยแอลกอฮอล์ออกด้วย rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และทำให้แห้งด้วย freeze dryer แล้วเก็บสารสกัดที่ได้ที่ -80 องศาเซลเซียส

2. การศึกษาความสามารถในการเป็น antioxidant ของสารสกัด

2.1 การหาปริมาณ anthocyanin

การหาปริมาณ anthocyanin โดยวิธี pH differential method (spectrometric method) นำสารสกัดมาหา dilution factor โดยนำสารสกัดที่ dilution ต่าง ๆ ผสมกับ 0.025 M potassium chloride buffer pH 1.0 และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 nm แล้วเลือกค่า dilution ที่อยู่ใน linear range (OD520 ประมาณ 0.2 – 1.4) มาศึกษาต่อไป

นำสารสกัดตาม dilution ที่ได้ผสมกับ 0.025 M potassium chloride buffer pH 1.0 และ 0.4 M sodium acetate pH 4.5 แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 nm โดยใช้น้ำกลั่นเป็น control (การวัดค่าการดูดกลืนแสงควรวัดภายใน 20-50 นาที) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงไปหาค่า total anthocyanin content ที่แสดงในรูปของ cyanidin-3-glucoside equivalent ซึ่งคำนวณได้จากสมการ

Anthocyanin content (cyanidin-3-glucoside equivalents, mg/L) = $A \times MW \times DF \times 10^3 / \varepsilon \times l$

A = (A520-A700) pH 1.0 – (A520-A700) pH 4.5

DF = dilution factor

MW (molecular weight) = 449.2 g/mol สำหรับ cyanidin-3-glucoside (cyd-3-glu)

l = pathlength in cm

ε = 26 900 molar extinction coefficient, in L x mol^{-1} x cm^{-1}, for cyd-3-glu

10^3 = factor for conversion from g to mg.

2.2 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมทำได้โดยการทำปฏิกิริยากับ Folin-Ciocalteu reagent และใช้ Gallic acid ที่ความเข้มข้น 0.01-0.1 mg/ml เป็น standard โดยนำ Folin-Ciocalteu reagent มาละลายในน้ำ อัตราส่วน 1:10 แล้วนำมา 5 ml ผสมกับสารสกัดที่ละลายใน 100% เมธิลแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 1 ml ผสมให้เข้ากัน แล้วเติม 20% sodium bicarbonate ปริมาตร 2 ml น้ำกลั่น 2 ml เขย่าให้เข้ากัน แล้ว incubate ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสดงด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 760 nm โดยปริมาณของ total phenolic compound ที่พบในสารสกัดจะแสดงในรูปของ mg ของ gallic acid equivalent (mg GAE/ 100g dry weight ของสารสกัด) การทดลองทำซ้ำ 2 ครั้ง

2.3 การทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ

โดยอ้างอิงตามวิธีการของ Kuo และคณะ (2002) โดยนำ 1,1- Diphenyl-2-picryl-hydrazyl radical (DPPH) มาละลายใน 100% เมธิลแอลกอฮอล์ ให้ได้ความเข้มข้น 400 µM หลังจากนั้นนำสารสกัด 50 µl (ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1-1 mg/ml) ผสมกับสารละลาย DPPH ที่ละลายในเมธิลแอลกอฮอล์ ปริมาตร 150 µl ใน microtiter plate หลังจากนั้นเก็บไว้ในที่มืดนาน 90 นาที แล้วนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm ด้วย microtiter plate reader โดยใช้สารสกัดที่ผสมกับเมธิลแอลกอฮอล์ทเป็น blank และใช้เมธิลแอลกอฮอล์ที่ผสมกับ DPPH เป็น negative control และใช้ ascorbic acid ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็น standard ทำซ้ำทั้งหมด 4 ครั้งแล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย นำค่า OD เฉลี่ยที่ได้มาคำนวณหา % inhibition ดังสมการ

% inhibition = (Ac-As/Ac) x 100

Ac = ค่าการดูดกลืนแสง (OD517) ของ negative control

As = ค่าการดูดกลืนแสง (OD517) ของสกัด

นำค่า % inhibition มา plot กราฟต่อความเข้มข้นของสารสกัด (อย่างน้อย 5 ความเข้มข้น) และนำมาหาค่า IC50 ซึ่งแสดงถึง Molar ratio ของ antioxidant ในสารสกัดที่สามารถลด DPPH radical ได้ 50% จากความเข้มข้นของ DPPH radical เริ่มต้น

2.4 การทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์เหล็ก

การทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กด้วยวิธีการ Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay โดยศึกษาตาม วิธีการของ Oyaizu (1986) ดังนี้ นำสารสกัดที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.2 -1.4 mg/ml ผสมกับ 2 M phosphate buffer pH 6.6 ปริมาตร 5 ml และ 1% potassium ferricyanide ปริมาตร 5 ml ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไป incubate ที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นเติม 10 trichloro acetic acid ปริมาตร 5 ml และนำไป centrifuge ที่ 650 xg เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำส่วน solution ด้านบน ปริมาตร 5 ml ไปผสมกับน้ำกลั่น ปริมาตร 5 ml และ 0.1% ferric chloride ปริมาตร 1 ml ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 nm ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ย นำค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงไป plot กราฟต่อค่าความเข้มข้นของสารสกัด โดยใช้ ascorbic acid ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็น standard ค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นแสดงถึงการเพิ่มขึ้นของ reducing power

2.5 Hydrogen peroxide scavenging activity

การตรวจหา hydrogen peroxide ทำได้โดยใช้ horseradish peroxidase assay โดยนำสารสกัดที่ความเข้มข้น 2, 4, 6, 8, 10, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 40 และ 100 mg/mL แล้วนำมาความเข้มข้นละ 100 µL ผสมกับPhenol red solution 60 µL (7.5 mM Phenol red, HRP 0.05 mg ที่ละลายใน 0.1 M KH_2PO_4 และ 100 mM PBS) และ 4 mM H_2O_2 ปริมาตร 40 µL ผสมให้เข้ากันแล้ว incubate เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 610 nm ด้วยเครื่อง Microplate Reader ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จะเป็น ปริมาณของ H_2O_2 ที่เหลือ และใช้ตัวทำละลายของสารสกัดผสมกับสารต่าง ๆ ในการทำปฏิกิริยาดังข้างต้นเป็น control แล้วนำไปคำนวณหา %scavenging effect ดังสมการ

% Scavenging effect = 1 – (OD610 ของสารสกัด / OD610 ของ control) x 100

นำ % scavenging effect ที่ได้จากการคำนวณของสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มา plot กราฟแล้วหาค่า IC_{50} โดยใช้ Ascorbic acid ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 mg/mL เป็น positive control ซึ่งค่า IC_{50} แสดงถึง Molar ratio ของ antioxidant ในสารสกัดที่สามารถลดปริมาณ H_2O_2 ได้ 50% จากความเข้มข้นของ H_2O_2 เริ่มต้น

3. การศึกษาความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสของสารสกัด

การทดสอบผลของสารสกัดต่อการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส โดยใช้ชุดตรวจสอบ Collagenase Activity Assay Kit (Colorimetric) โดยมีวิธีการดังนี้

1. ทำการเตรียมสารละลาย โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 4 กลุ่มรายละเอียดดังนี้

1) กลุ่มทดลองทำการผสมสารละลายที่ประกอบด้วย สารสกัดที่ความเข้มข้น 2, 4, 6, 8 และ 10 mg/mL ความเข้มข้นละ 10 µL จากนั้นเติมสารละลาย assay buffer 80 µL และ collagenase 10 µL

2) กลุ่มควบคุมโดยการเติมเอนไซม์ collagenase 10 µL และสารละลาย assay buffer 90 µL

3) กลุ่มควบคุมโดยการเติมสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ collagenase คือ 1,10-Phenanthroline โดยการเติม 1,10-Phenanthroline 2 µL collagenase 10 µL และ assay buffer 88 µL

4) กลุ่มควบคุมเชิงลบที่เป็น Reagent background well ประกอบด้วยสารละลาย assay buffer 100 µL

2. ทำการเตรียม collagenase reaction mix ปริมาตร 100 µL ประกอบไปด้วย assay buffer ปริมาตร 60 µL ผสมกับ collagenase substrate 40 µL หลังจากนั้นนำ collagenase reaction mix ปริมาตร 100 µL มาผสมกับ reaction wells ต่อ 1 well โดยแต่ละ well จะมีปริมาตรรวมทั้งหมด 200 µL และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 345 nm โดยวัดทุก ๆ 2 นาที ตั้งแต่ 0-10 นาที แล้วนำค่า OD ที่ได้มาคำนวณหาการทำงานของเอนไซม์ (Collagenase Activity ; U/mL) ตามสูตร

$$\text{Collagenase Activity} = \frac{\left(\frac{\Delta ODc}{\Delta T}\right)\times 0.2\times D}{0.53\times V}$$

ΔDOc = ค่า OD ช่วงเวลา T_2 - T_1 โดยมาจาก $A_2 - A_1$ (ค่า OD ของสารในแต่ละช่วงเวลาลบค่า OD ของ background)

ΔT = ช่วงเวลาT_2 - T_1 (นาที)

0.2 = reaction volume (mL)

D = sample dilution factor

0.53 = ค่าสัมประสิทธิ์ของ FALGPA

V = ปริมาตรของสารในแต่ละ well (mL)

- ช่วงเวลาในการทดสอบคือ 0-10 นาที เมื่อนำค่า OD มา plot กราฟระหว่างค่า OD และเวลาพบว่าช่วงเวลาที่สารสกัดสามารถทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ได้ดี คือจะดูลักษณะของกราฟที่เป็นเส้นตรง linear จึงเลือกช่วงเวลานั้นมาคำนวณ ซึ่งจะอยู่ในช่วงเวลา 4 และ 8 นาที

จากนั้นนำค่า collagenase activity ที่ได้แล้วนำมาคำนวณ %Inhibition ตามสูตรดังนี้

$$\%\ \text{Inhibition} = \frac{\text{Activity (Enzyme)} - \text{Activity (Inhibitor)}}{\text{Activity (Enzyme)}} \times 100$$

4. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลการทดสอบมาคำนวณหาค่า Mean±SD และเปรียบเทียบทางสถิติโดยใช้ multiple comparison ด้วยวิธี one-way analysis of variance (ANOVA) โดยใช้การทดสอบของ Turkey-HSD multiple comparison tests โดยกำหนดที่ระดับ $p<0.05$ ถือว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการวิจัย

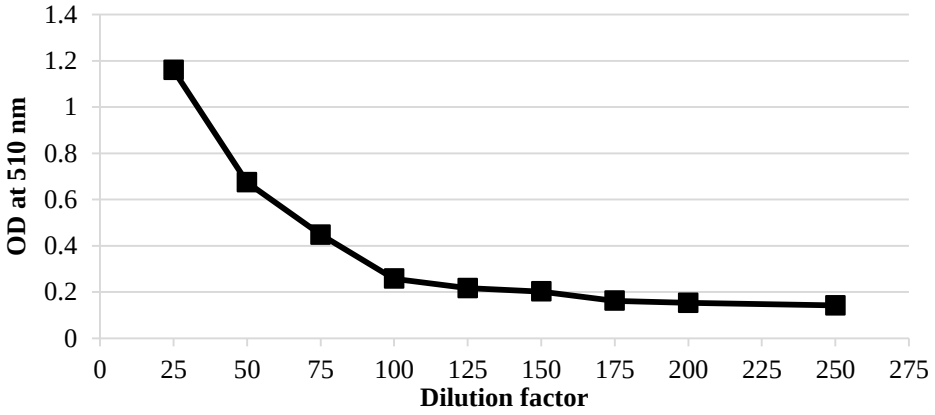
1. การสกัด water soluble material จากข้าวเหนียวสังข์หยด

จากการสกัดเมล็ดข้าวเหนียวสังข์หยดบดละเอียด 425 กรัม ด้วย 75% เอทานอล พบว่าหลังการระเหยแห้งได้สารสกัดลักษณะเป็นผงสีน้ำตาลเหลืองน้ำหนัก 2.504 กรัม สามารถคำนวณร้อยละของการสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดเมล็ดข้าวเหนียวสังข์หยดได้เท่ากับ 0.589

2. การศึกษาความสามารถในการเป็น antioxidant ของสารสกัด

2.1 การหาปริมาณแอนโทไซยานิน

นำสารสกัดหยาบของเมล็ดข้าวเหนียวสังข์หยดมาทำการศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระแอนโทไซยานิน โดยวิธี pH differential method จากการเจือจางสารสกัดจากเมล็ดข้าวเหนียวสังข์หยดเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมก่อนการนำไปวัดปริมาณแอนโทไซยานินพบว่า dilution factor ที่เหมาะสมของสารสกัดคือ 1:75 (ภาพที่ 1) จากนั้น ทำการเจือจางสารสกัดและนำไปวัดปริมาณแอนโทไซยานินที่ความยาวคลื่น 510 nm ผลการคำนวณหาปริมาณแอนโทไซยานินพบว่าสารสกัดจากเมล็ดข้าวเหนียวสังข์หยดมีปริมาณแอนโทไซยานินต่อน้ำหนักแห้งของผงข้าวเหนียวสังข์หยด 1 กรัม เฉลี่ย 19.566 ± 1.269 ไมโครกรัม (µg/g rice)

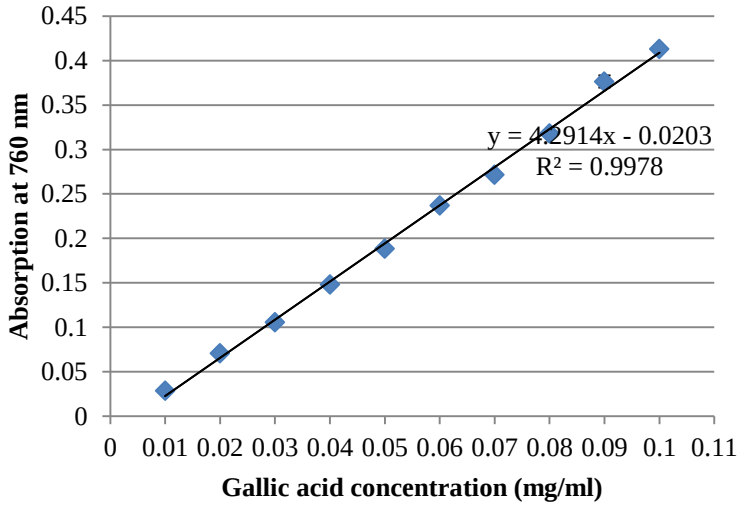


ภาพที่ 1 แสดง dilution factor ที่เหมาะสมในการนำสารสกัดจากเมล็ดข้าวเหนียวสังข์หยดไปวัดปริมาณแอนโทไซยานิน ที่ความยาวคลื่นแสง 510 นาโนเมตร

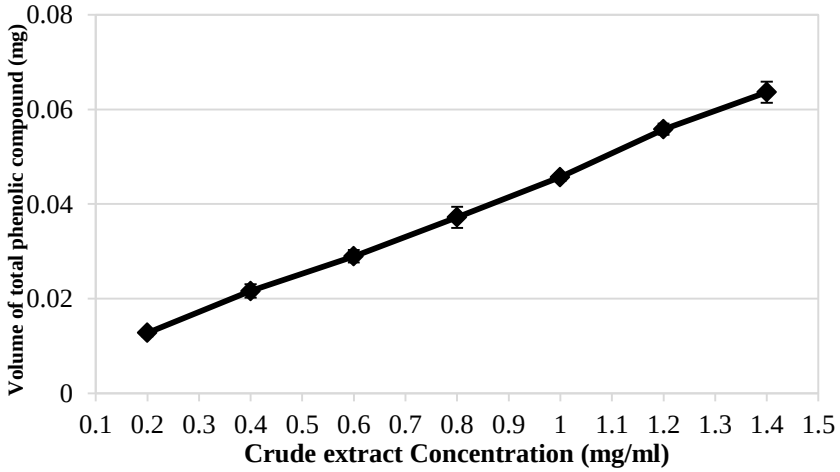
2.2 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม

ทำการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมซึ่งเป็นสารประกอบที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเช่นเดียวกับแอนโทไซยานิน โดยใช้วิธี Follin Ciocalteu reagent assay เริ่มจากการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid ความเข้มข้น 0.01 ถึง 0.10 mg/ml วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 nm ได้ค่า R^2 = 0.9978 และได้สมการในการนำไปวิเคราะห์กับสารสกัดตัวอย่างคือ y = 4.2914x - 0.0203 กำหนดให้ค่า y คือค่าการดูดกลืนแสง และค่า x คือ Gallic acid equivalents (ภาพที่ 2)

จากการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของสารสกัดจากเมล็ดข้าวเหนียวสังข์หยดที่ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 และ 1.4 mg/ml พบว่าสารสกัดจากเมล็ดข้าวเหนียวสังข์หยดมีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมเฉลี่ย 0.013 ± 0.001, 0.022 ± 0.001, 0.029 ± 0.001, 0.037 ± 0.002, 0.046 ± 0.001, 0.056 ± 0.001 และ 0.064 ± 0.002 mg Gallic acid ตามลำดับ (ภาพที่ 3) โดยสารสกัดจากเมล็ดข้าวเหนียวสังข์หยดมีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมเฉลี่ย 0.295 ± 0.040 mg/g rice



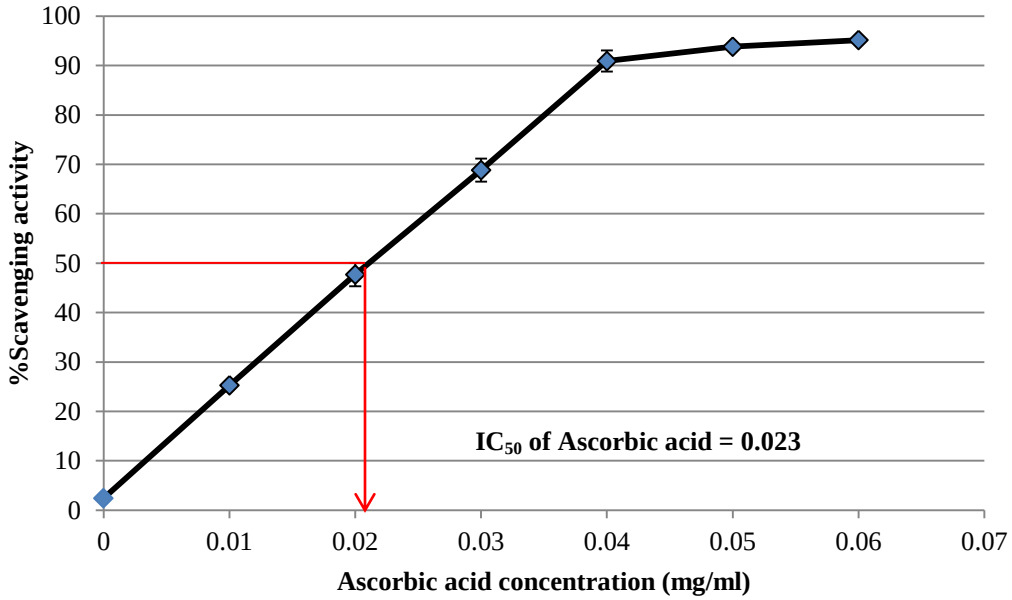
ภาพที่ 2 แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid



ภาพที่ 3 แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของสารสกัดจากเมล็ดข้าวเหนียวสังข์หยดที่ความเข้มข้นต่างๆ

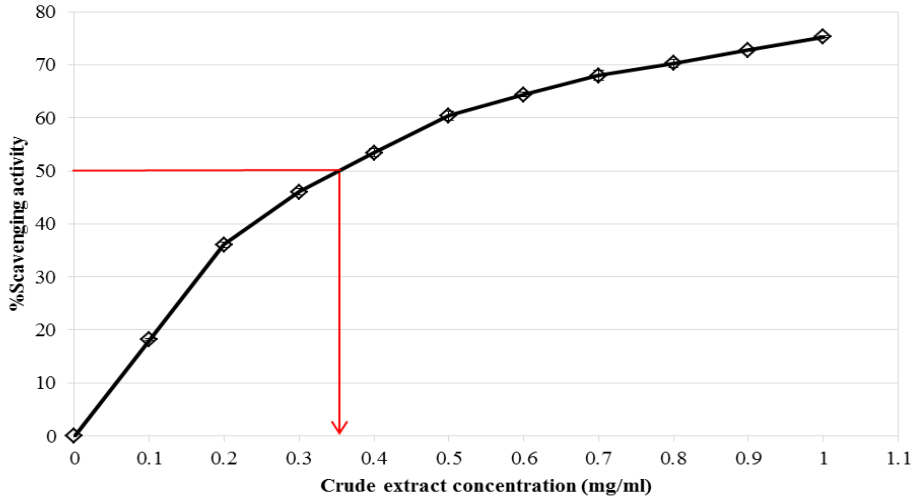
2.3 การทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ

จากการทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH method ของสารละลายมาตรฐาน Ascorbic acid ความเข้มข้น 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05 และ 0.06 mg/ml เพื่อคำนวณหาความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% (IC_{50}) ของอนุมูลอิสระเริ่มต้น โดยพบว่าค่า IC_{50} ของ Ascorbic acid คือ 0.023 mg/ml (ภาพที่ 4)

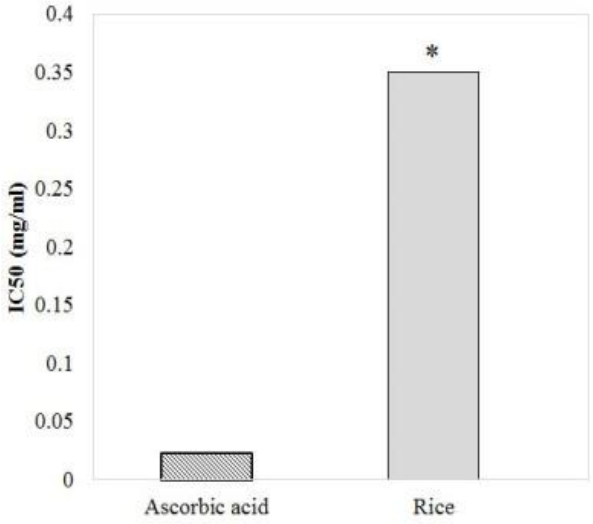


<u>ภาพที่ 4</u> แสดงความสามารถของสารละลายมาตรฐาน Ascorbic acid ในการกำจัดอนุมูลอิสระได้ 50% (IC_{50}) ของอนุมูลอิสระเริ่มต้น

จากการทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ (%Scavenging activity)ด้วยวิธี DPPH method ของสารสกัดเมล็ดข้าวเหนียวสังข์หยดที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 และ 1.0 mg/ml พบว่า %Scavenging activity เฉลี่ยของสารสกัดจากเมล็ดข้าวเหนียวสังข์หยดคือ 18.184 ± 0.195, 36.041 ± 0.486, 46.063 ± 0.554, 53.424 ± 0.761, 60.457 ± 0.874, 64.394 ± 0.458, 67.966 ± 0.952, 70.298 ± 0.808, 72.777 ± 0.173 และ 75.291 ± 0.157 ตามลำดับ และมีค่า IC_{50} ของสารสกัดจากเมล็ดข้าวเหนียวสังข์หยด คือ 0.35 mg/ml (ภาพที่ 5) เมื่อเปรียบเทียบ IC_{50} ของสารละลายมาตรฐาน Ascorbic acid กับสารสกัดจากเมล็ดข้าวเหนียวสังข์หยด จะเห็นได้ว่า IC_{50} ของสารสกัดจากเมล็ดข้าวเหนียวสังข์หยด มีค่ามากกว่า IC_{50} ของสารละลายมาตรฐาน Ascorbic acid อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$ (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 5 แสดงความสามารถของสารสกัดจากเมล็ดข้าวเหนียวสังข์หยดในการกำจัดอนุมูลอิสระได้ 50% (IC_{50}) ของอนุมูลอิสระเริ่มต้น

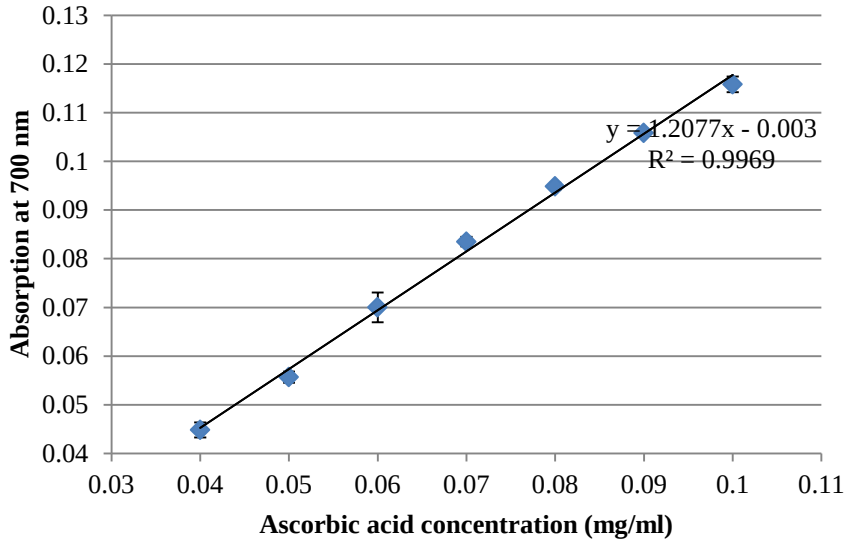


ภาพที่ 6 แสดง IC_{50} ของสารละลายมาตรฐาน Ascorbic acid เปรียบเทียบกับสารสกัดจากเมล็ดข้าวเหนียวสังข์หยด ดอกจันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

2.4 การทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์เหล็ก

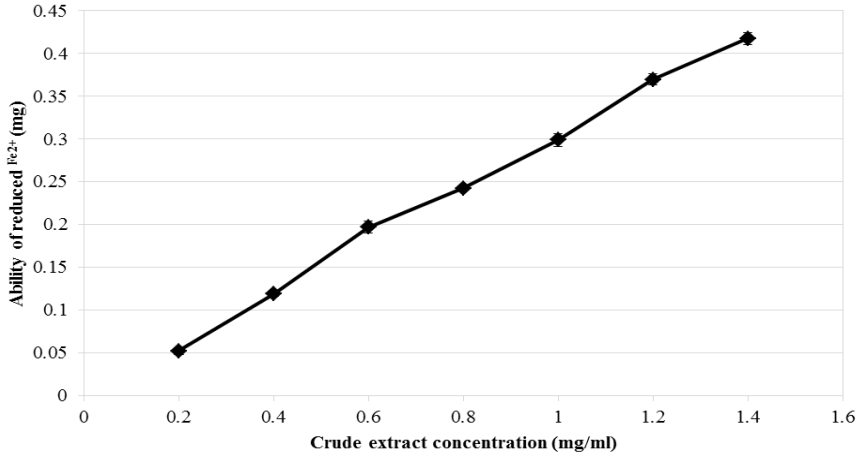
ทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กของสารละลายมาตรฐาน Ascorbic acid ด้วยวิธี FRAP assay โดยดัดแปลงจากวิธีการทดลองของ Hyun และคณะ จากการทดสอบสารละลายมาตรฐาน Ascorbic acid ที่ความเข้มข้น 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09 และ 0.10 mg/ml วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น

700 nm ได้กราฟมาตรฐาน R^2 = 0.9969 และได้สมการคือ y = 1.2077x - 0.003 กำหนดให้ค่า y คือค่าการดูดกลืนแสง และค่า x คือ Ascorbic acid equivalents (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 แสดงกราฟมาตรฐานของ Ascorbic acid ความเข้มข้นต่างๆ ในการรีดิวซ์เหล็ก

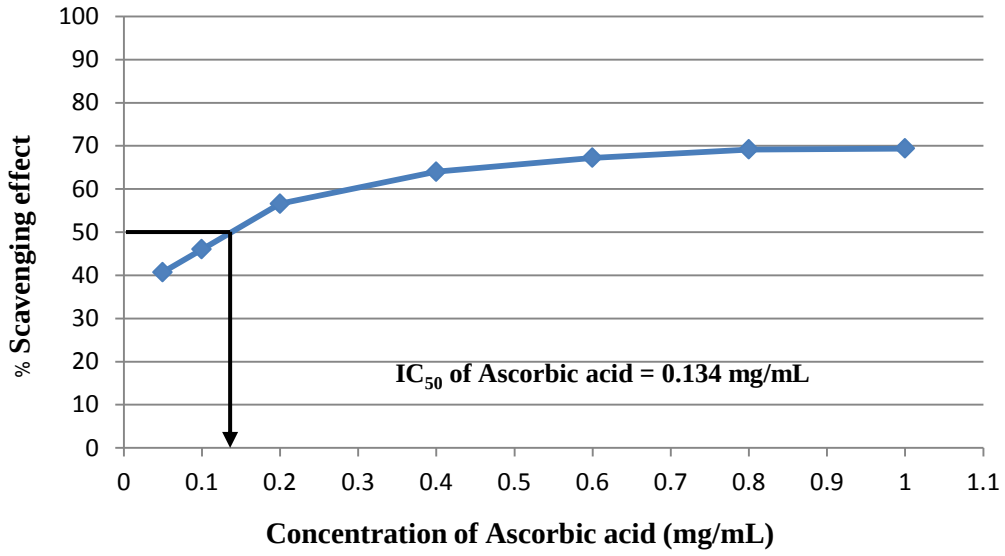
จากการทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กของสารสกัดเมล็ดข้าวเหนียวสังข์หยดที่ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 และ 1.4 mg/ml พบว่าสารสกัดจากเมล็ดข้าวเหนียวสังข์หยดมีความสามารถในการรีดิวซ์เหล็ก คือ 0.052 ± 0.004, 0.119 ± 0.003, 0.197 ± 0.007, 0.242 ± 0.001, 0.298 ± 0.007, 0.368 ± 0.006 และ 0.417 ± 0.007 mg Ascorbic acid ตามลำดับ (ภาพที่ 8) โดยสารสกัดจากเมล็ดข้าวเหนียวสังข์หยดมีความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฉลี่ย 1.761 ± 0.121 mg/g rice



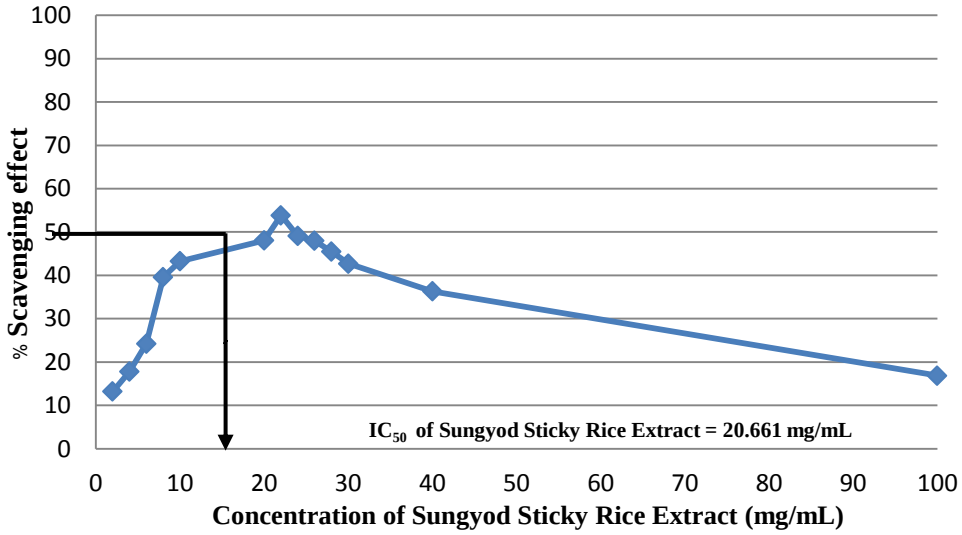
ภาพที่ 8 แสดงความสามารถในการรีดิวซ์เหล็ก ของสารสกัดจากเมล็ดข้าวเหนียวสังข์หยดที่ความเข้มข้นต่างๆ

2.5 Hydrogen peroxide scavenging activity

จากการทดสอบการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยใช้วิธี Horseradish peroxidase assay ของสารละลายมาตรฐาน Ascorbic acid ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 mg/mL พบว่า % Scavenging effect ของสารละลายมาตรฐาน Ascorbic acid เฉลี่ยคือ 40.72, 46.01, 56.58, 64.02, 67.24, 69.15 และ 69.39 ตามลำดับ จากนั้นนำค่าที่ได้มาเขียนกราฟโดยแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % scavenging effect และความเข้มข้นของ Ascorbic acid เพื่อหาความเข้มข้นที่สามารถกำจัดได้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 50% ของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เริ่มต้น (IC_{50}) จากกราฟพบว่าค่า IC_{50} ของ Ascorbic acid มีค่าเท่ากับ 0.134 mg/mL (ภาพที่ 9) ส่วนผลการทดสอบการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของสารสกัดข้าวกล้องข้าวเหนียวสังข์หยดที่ความเข้มข้น 2, 4, 6, 8, 10, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 40 และ 100 mg/mL พบว่า % Scavenging effect ของสารสกัดข้าวกล้องข้าวเหนียวสังข์หยดเฉลี่ยคือ 13.21, 17.79, 24.24, 39.60, 43.26, 48.04, 53.84, 49.07, 47.97, 45.48, 42.70, 36.29 และ 16.85 ตามลำดับ เมื่อนำค่าเฉลี่ยที่ได้มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % scavenging effect และความเข้มข้นของสารสกัดข้าวกล้องข้าวเหนียวสังข์หยดพบว่าค่า IC_{50} ของสารสกัดข้าวกล้องข้าวเหนียวสังข์หยดมีค่าเท่ากับ 20.661 mg/mL (ภาพที่ 10)



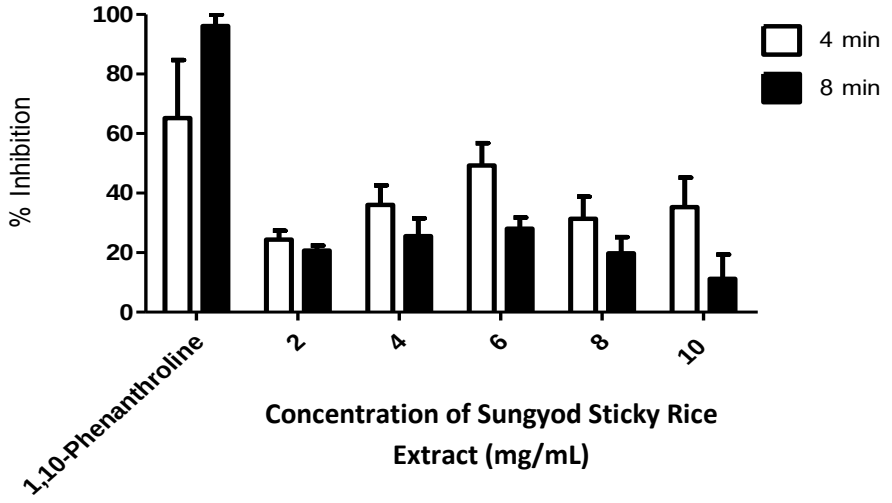
<u>ภาพที่ 9</u> แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Ascorbic acid และค่าเฉลี่ยร้อยละของความสามารถในการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และค่า IC_{50}



ภาพที่ 10 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดข้าวกล้องข้าวเหนียวสังข์หยดและค่าเฉลี่ยร้อยละของความสามารถในการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และค่า IC_{50}

3. การศึกษาความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสของสารสกัด

จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสของสารสกัดข้าวกล้องข้าวเหนียวสังข์หยดในช่วงเวลา 4 และ 8 นาที พบว่าในช่วง 4 นาทีมีค่าเฉลี่ย %Inhibition ข้าวกล้องข้าวเหนียวสังข์หยดที่ความเข้มข้น 2, 4, 6, 8 และ 10 mg/mL เป็น 24.40, 36.02, 49.31, 31.38 และ 35.26 ตามลำดับ โดยมีแนวโน้มค่าเฉลี่ย %Inhibition เพิ่มขึ้น เมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้นจนถึง 6 mg/mL ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นที่มีค่าเฉลี่ย %Inhibition เพิ่มขึ้นสูงที่สุด จากนั้นมีแนวโน้มค่าเฉลี่ย %Inhibition ลดลงที่ความเข้มข้น 8 และ 10 mg/mL ($p \geq 0.05$) จากการคำนวณหาค่าเฉลี่ยร้อยละของความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสในช่วงเวลา 8 นาที มีค่าเฉลี่ย % Inhibition ของข้าวกล้องข้าวเหนียวสังข์หยดที่ความเข้มข้น 2, 4, 6, 8 และ 10 mg/mL เป็น 20.71, 25.54, 28.08, 19.82 และ 11.20 ตามลำดับ โดยมีแนวโน้มค่าเฉลี่ย %Inhibition เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้นจนถึง 6 mg/mL ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่มีค่าเฉลี่ย %Inhibition เพิ่มขึ้นสูงที่สุด จากนั้นมีแนวโน้มค่าเฉลี่ย %Inhibition ลดลงที่ความเข้มข้น 8 และ 10 mg/mL ($p \geq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบช่วงเวลา 4 และ 8 นาที ของสารสกัดข้าวกล้องข้าวเหนียวสังข์หยดพบว่าในช่วงเวลา 4 นาทีที่ความเข้มข้น 2, 4, 6, 8 และ 10 mg/mL มีค่าเฉลี่ย %Inhibition มากกว่าช่วงเวลา 8 นาที ส่วนกลุ่ม positive control คือ 1,10-Phenanthroline มีค่าเฉลี่ย %Inhibition เท่ากับ 65.18 และ 96.12 ในช่วงเวลา 4 และ 8 นาที ตามลำดับ (ภาพที่ 11)



<u>ภาพที่</u> 11 แสดงร้อยละของความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสของสารสกัดข้าวกล้องข้าวเหนียวสังข์หยดที่ความเข้มข้นต่างๆ ในช่วงเวลา 4 และ 8 นาที

อภิปรายและวิจารณ์ผลการวิจัย

จากการศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระแอนโทไซยานินซึ่งเป็นเม็ดสี สะสมอยู่บริเวณเปลือกข้าวหรือส่วนของรำข้าว ทำให้ปรากฏเป็นสีต่างๆ กล่าวคือข้าวสีดำ สีน้ำตาล และสีแดงประกอบด้วยสารหลักของแอนโทไซยานินคือ cyanidin-3-glucoside (C3G) และ penonidin-3-glucoside (P3G) โดย C3G มีปริมาณถึง 93% ของแอนโทไซยานินทั้งหมด ความแตกต่างของปริมาณสารแอนโทไซยานินขึ้นอยู่กับความแตกต่างทางพันธุกรรม ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด และปัจจัยอื่นๆ เช่น แสงแดด เป็นต้น ข้าวสีดำมีปริมาณแอนโทไซยานินและสารประกอบฟีนอลในปริมาณมาก กว่าข้าวสีขาว และสีแดง (Ryu, S.N., Park, S.Z. and Ho, C.T, 1998) จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าสารสกัดเมล็ดข้าวกล้องข้าวเหนียวสังข์หยดมีปริมาณแอนโทไซยานินเฉลี่ยเท่ากับ 19.566 μg/g โดยแอนโทไซยานินเป็นรงควัตถุที่พบในพืช จัดอยู่ในกลุ่มสารประกอบฟีนอล ที่มีโครงสร้างประกอบด้วยแอนโทไซยานิดินหรืออะไกลโคนกับน้ำตาลและแอซิล เมื่อมีหมู่ของน้ำตาลมาสร้างพันธะกับแอนโทไซยานิดินที่ตำแหน่งที่ 3 และ 5 เรียกโครงสร้างนี้ว่าแอนโทไซยานิน นอกจากนี้การทดลองพบว่าสารสกัดข้าวกล้องข้าวเหนียวสังข์หยดมีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมเฉลี่ยเท่ากับ 0.295 mg/g ซึ่งสารประกอบฟีนอลพบได้ในพืชหลายชนิด มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนของอนุพันธ์เบนซีนและมีหมู่ไฮดรอกซิลต่ออยู่ มีฤทธิ์เป็นสารต้านออกซิเดชัน ทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระและไอออนของโลหะที่สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันและโมเลกุลอื่นๆ โดยใช้ตัวเองเป็นตัวรับอนุมูลอิสระทำให้ยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่ที่มีอนุมูลอิสระเป็นสาเหตุ มีรายงานการศึกษาพบว่าข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีเข้มจะมีใยอาหาร ธาตุแคลเซียม สารโพลีฟีนอล และสารต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีอ่อน โดยเฉพาะข้าวที่มีสีแดงเข้มเกือบดำจะมีธาตุเหล็ก สารโพลีฟีนอลและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าข้าวสายพันธุ์อื่นๆ (Ardiansyah, Shirakawa H, Koseki T, Hashizume K, 2007) เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการต้านหรือกำจัดอนุมูลอิสระพบว่าสารสกัดเมล็ดข้าวกล้องข้าวเหนียวสังข์หยดมีความสามารถในการรีดิวซ์เหล็ก

เฉลี่ยเท่ากับ 1.716 mg/g และการต้านอนุมูลอิสระ DPPH มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.35 mg/g จากการศึกษาผลของการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของสารสกัดข้าวกล้องข้าวเหนียวสังข์หยดพบว่าเมื่อให้ความเข้มข้นของสารสกัดข้าวกล้องข้าวเหนียวสังข์หยดเพิ่มขึ้น มีค่าเฉลี่ยร้อยละในการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นและเมื่อถึงจุดที่สารสกัดทำปฏิกิริยาการกับสารที่ใช้ถึงจุดอิ่มตัว แล้วหลังจากนั้นปฏิกิริยาจะค่อย ๆ ลดลงจึงทำให้สารสกัดข้าวกล้องข้าวเหนียวสังข์หยดที่ความเข้มข้น 24 mg/mL เริ่มมีค่าเฉลี่ยร้อยละในการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลดลงเรื่อย ๆ จนถึงความเข้มข้น 100 mg/mL โดยแสดงฤทธิ์ในการกำจัดไฮโดรเจเปอร์ออกไซด์ในรูปของค่า IC_{50} ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถไปกำจัดหรือลดฤทธิ์ของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ครึ่งหนึ่งของความเข้มข้นเริ่มต้น ดังนั้นยิ่งค่า IC_{50} ของสารสกัดมีค่าน้อย ๆ แสดงว่าสารสกัดมีประสิทธิ์ภาพหรือสามารถไปกำจัดหรือลดฤทธิ์ของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ดี จากการทดลองพบว่า สารสกัดข้าวกล้องข้าวเหนียวสังข์หยดที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 20.661 mg/mLและเมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน Ascorbic acid ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.134 mg/mL โดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นหนึ่งในอนุมูลอิสระซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาในขั้น Initiation step ซึ่งเป็นปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ซึ่งเกิดการแตกพันธะของ Hydrogen peroxide (H_2O_2) กลายเป็นอนุมูล Hydroxyl ($HO^{\cdot}$) จากการทดสอบพบว่าสารสกัดข้าวกล้องข้าวเหนียวสังข์หยดมีฤทธิ์ในการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้หรือสามารถลดฤทธิ์ของอนุมูลอิสระได้ด้วยกลไกลการยับยั้งหรือทำลายอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น (Scavenging antioxidant) ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระจะไปเปลี่ยน H_2O_2 ไปเป็นผลิตภัณฑ์คือ H_2O และ O_2 มีรายงานการศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถพบได้ในข้าวได้แก่ ฟีนอล, ฟลาโวนอยด์, แอนโทไซยานิน, วิตามินอี และγ-oryzanol (Goufo and Trindade, 2014). ในการศึกษาครั้งนี้ทำการศึกษาสารประกอบแอนโทไซยานินและสารประกอบฟีนอลรวมซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่พบในข้าวกล้องข้าวเหนียวสังข์หยด ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้ทำหน้าที่ปกป้องเซลล์จากการถูกทำลายโดยอนุมูลอิสระ โดยความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของแอนโทไซยานินขึ้นอยู่กับโครงสร้างพื้นฐานของแอนโทไซยานิน เช่นแอนโทไซยานินที่มี o-dihydroxyl จะทำหน้าที่ให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระ ซึ่งจะสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระเร็วกว่าสารตั้งต้นชนิดอื่น จากการศึกษาความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสโดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป ซึ่งเป็น collagenase (EC 3.4.24.3) ที่ได้จาก *Clostridium histolyticum* โดยทำงานร่วมกับ FALGPA ซึ่งเป็นซับสเตรทที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นมา (Arulmozhi et al., 2007) collagenase เป็นเอนไซม์ที่ใช้แคลเซียมและสังกะสีในการทำปฏิกิริยา (calcium-dependent zinc-containing endopeptidases) และมี 1,10-Phenanthroline เป็น inhibitor ซึ่งคุณสมบัติของ inhibitor เป็น metal chelating agent คือสารคีเลต ซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์สามารถจับกับแร่ธาตุประจุบวก ได้แก่ เหล็ก, สังกะสี, แมงกานีส เป็นต้น โดยสารคีเลตจะล้อมไอออนของธาตุที่เป็นโลหะหนักไว้ ทำให้ไม่สามารถทำปฏิกิริยากับสารอื่นๆได้ จากการศึกษาการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสของสารสกัดข้าวกล้องข้าวเหนียวสังข์หยด พบว่าสารสกัดข้าวกล้องข้าวเหนียวสังข์หยดที่ความเข้มข้น 6 mg/mL มี % inhibition สูงสุด ในเวลาที่ 4 นาที และ 8 นาที ซึ่งอาจเป็นผลจากในข้าวกล้องข้าวเหนียวสังข์หยดมีปริมาณสารประกอบฟีนอลซึ่งมีคุณสมบัติเป็น metal chelating agent ทำให้สามารถยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสได้และช่วงเวลาที่สามารถยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสได้ดีคือ 4 นาที มีการรายงานการวิจัย พบว่าสาร flavonoids, catechines, polyphenols (resveratrol) หรือ steroids สามารถยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสได้ (Sin and Kim, 2005) โดยมีการศึกษาสารฟลาโวนอยด์ในธรรมชาติที่ประกอบไปด้วย flavanones, flavones, isoflavones และ flavonols พบว่าสาร flavonols สามารถยับยั้งเอนไซม์ collagenase ได้มากกว่า flavones/ isoflavones โดย

แสดงให้เห็นว่า C-3-hydroxyl group สามารถทำให้มีการยับยั้งได้สูงขึ้น โดยสาร Quercetin ที่เป็น flavonols มีค่า IC_{50} เท่ากับ 286 μM จากผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่า flavonoids บางชนิดโดยเฉพาะ flavonols อาจป้องกันการสลายคอลลาเจนโดยการยับยั้งเอนไซม์ collagenase ในผิวหนังที่อักเสบ (Chatatikun and Chiabchalard, 2017) นอกจากนี้สารประกอบฟีนอลในธรรมชาติยังสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสได้ มีการศึกษาพบว่า สารสกัดจากทับทิม *(P. granatum)* มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสได้ 11% และเอนไซม์ elastase ได้ 14.64% (Kumud and Sanju, 2018) และจากการศึกษาสูตรน้ำผลไม้รวมที่สกัดจากทับทิม *(Punica granatum)* แปะก๊วย (*Ginkgo biloba*) มะเดื่อฝรั่ง (*Ficus carica*) และลูกหม่อน *(Morus alba*) พบว่าที่ความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดน้ำผลไม้รวม 5 μg/mL สามารถยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสได้ 67.45% ซึ่งการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสอาจเกิดจากการเสริมฤทธิ์กันของสารโพลีฟีนอล ส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์คอลลาจีเนส (Dasgupta, et al., 2009) การศึกษาสารแคเทชิน (catechin) เป็นสารในกลุ่มสารประกอบ ฟีนอล ประเภทพอลิฟีนอล ในกลุ่มฟลาโวนอยด์พบได้มากในใบชา โดยการศึกษาพบว่าสารสกัดจากชาขาวและชาเขียวมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสได้สูงคือ 87% และ 47% ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเสริมฤทธิ์กันของสารแคเทชินอาจจับกับ Zn^{2+} ไอออน ภายในเอนไซม์คอลลาจีเนสเพื่อป้องกันการจับกับซับสเตรททำให้ไม่มีการทำงานของเอนไซม์ (Wettasinghe and Shahidi, 1999) และการศึกษาสาร catechin และ epigallocatechin gallate (EGCG) ในการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสที่ส่งผลต่อคอลลาเจน พบว่ามีการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส 70% และ 88% ตามลำดับ โดยมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทุติยภูมิของเอนไซม์คอลลาจีเนส ซึ่ง EGCG ที่มีการยับยั้งเอนไซม์ได้สูงอาจเป็นผลมาจากพันธะ hydrogen และ hydrophobic interaction ที่มีผลกับเอนไซม์คอลลาจีเนส (Hartmann, et al., 2015)

สรุปผลการวิจัย

สารสกัดข้าวกล้องข้าวเหนียวสังข์หยดมีองค์ประกอบของแอนโทไซยานินและฟีนอลรวมซึ่งมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ และมีความสามารถในการรีดิวซ์เหล็ก นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจิเนสโดยเมื่อใช้ความเข้มข้นของสารสกัด 6 mg/mL เป็นเวลา 4 นาทีจะสามารถยับยั้งเอนไซม์คอลลาจิเนสได้ดีที่สุดคือร้อยละ 49.31%

ข้อเสนอแนะ

ควรมีการศึกษางานวิจัยต่อยอดในการศึกษาเกี่ยวกับรายละเอียดโครงสร้างของสารสำคัญในสารสกัดข้าวกล้องข้าวเหนียวสังข์หยด และศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับสารสกัดจากข้าวในการยับยั้งเอนไซม์ชนิดอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการทำลายโครงสร้างเนื้อเยื่อผิวหนัง เช่น elastase และ hyaluronidase เพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ครีมหรืออาหารเสริมต่างๆ

ผลผลิต

- **บทความวิจัย ตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติ**

  ได้แก่ Semangoen T, Khawsuk W, Simanon N, Soiphet T, Homjai W, Boonchaleaw B, Seangchan P, **Nuurai P**. 2018. Antioxidant effect of unpolished Sung-Yod sticky rice prevent ethylene glycol-induced renal pathology in rats. Chula Med J; 62: 451-464.

รายงานสรุปการเงิน

เลขที่โครงการระบบบริหารงานวิจัย 2560A10802175 สัญญาเลขที่ 135/2560

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งเอนไซม์ collagenase ของสารสกัดจากข้าวเหนียวสังข์หยด

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน (อ./ดร./ผศ./รศ./ศ.).....ปริญญาพร หนูอุไร.....

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2559 ถึงวันที่ 31 ตุลาคม พ.ศ. 2561

ระยะเวลาดำเนินการ...2.....ปี .1. เดือน ตั้งแต่วันที่ ..... 1 ตุลาคม พ.ศ. 2559.....

<u>รายรับ</u>

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 (50%) .....112,500..... บาท เมื่อวัน เดือน ปี..22 พฤศจิกายน 2559..

งวดที่ 2 (40%) .....90,000..... บาท เมื่อวัน เดือน ปี....19 กรกฎาคม 2560..

งวดที่ 3 (10%) .....22,500..... บาท เมื่อวัน เดือน ปี 30 ตุลาคม 2561*

* อยู่ระหว่างการเบิกจ่าย

รวม .....225,000.....บาท..

<u>รายจ่าย</u>

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน
1. ค่าตอบแทน	22,300	22,300	0
2. ค่าจ้าง	0	0	0
3. ค่าวัสดุ	160,650	176,150	-15,500
4. ค่าใช้สอย	20,000	4,500	+15,500
5. ค่าครุภัณฑ์	0	0	0

6. ค่าใช้จ่ายอื่น ๆ เงินทุนอุดหนุนการวิจัยเป็นค่าสาธารณูปโภคร้อยละ 10	22,550	22,550	0
รวม	225,000	225,000	0

ปริญญาพร หนูอุไร

(นางสาวปริญญาพร หนูอุไร)

ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

เอกสารอ้างอิง

กรมเจรจาการค้าระหว่างประเทศ. มปป. *ข้าว* [Online]. แหล่งเข้าถึง www.thaifta.com/thaifta/Portals/0/file/ascn_rice1.doc สืบค้นเมื่อ [12/03/2556]

ข้าวคู่ครัวคนไทย [Online]. แหล่งเข้าถึง http://www.naturezoneathome.com/article?id =18883 &lang=th/ สืบค้นเมื่อ [10/03/2556]

คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา. 2555. *ข้าวกล้องRCช่วยควบคุมเบาหวานและไขมัน* [Online]. แหล่งเข้าถึงhttp://www.calintertrade.co.th/th/app/news_detail.php?id=37/สืบค้นเมื่อ [16/03/2556]

คุณค่าของข้าวเหนียว. (2554). *คุณค่าของข้าวเหนียวช่วยบำรุงผิวพรรณ* [Online]. แหล่งเข้าถึง http://dhammarice.com/th/ความรู้เรื่องข้าว/คุณค่าของข้าวเหนียวช่วยบำรุงผิวพรรณ./สืบค้นเมื่อ [20/03/2556]

จังหวัดพัทลุง. (2556). *ข้าวสังข์หยด* [Online]. แหล่งเข้าถึง http://www.phatthalung.go.th/otop/detail/6 สืบค้นเมื่อ [12/06/2558]

ธวัชชัย แถวถาทำ. (2547). Effect of Gamma Oryzanol in Purple Glutinous Rice Bran on Immune Response in Male Mice (*Mus musculus*). *เอกสารประกอบการประชุม First Agriculture Biotechnology โรงแรมรีเจนท์ กรุงเทพฯ.*

ธัญพืช. (2543). *การจำแนกข้าว* [Online]. แหล่งเข้าถึง http://www.baanjomyut.com/library_2/extension-2/cereals/01_2.html/สืบค้นเมื่อ [20/04/2556]

ประโยชน์ของข้าวเหนียวดำ และข้าวกล้อง. (2012). *ประโยชน์ของข้าวเหนียวดำ และข้าวกล้อง* [Online]. แหล่งเข้าถึงhttp://zawadios.exteen.com/20120725/entry-2/สืบค้นเมื่อ [16/03/2556]

ผาณิต รุจิรพิสิฐ, วิชชุดา สังข์แก้ว และเสาวนีย์ เอี้ยวสกุลรัตน์. (2555). คุณค่าทางโภชนาการของข้าว 9 สายพันธุ์. *Agricultural Science Journal,* 43(2), 173-176.

วรนุช ศรีเจษฎารักข์. 2550. *การผลิตสารประกอบทางชีวภาพจากข้าวกล้องงอก. ใน: จดหมายข่าวมหาวิทยาลัยขอนแก่น 5 ก.พ. 2552. ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น* [Online]. แหล่งเข้าถึง http://202.12.97.4/kkunews/index/สืบค้นเมื่อ [17/03/2556]

วาริช ศรีละออง. 2001. *รงควัตถุในข้าวมีความสำคัญอย่างไร*[Online]. แหล่งเข้าถึง http://www.charpa.co.th/articles/rice_pigments.php/สืบค้นเมื่อ [1/04/2556]

ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี. 2007. คุณค่าทางโภชนาการ ข้าวสังข์หยดพัทลุง. *ข้าวสังข์หยด* [Online]. แหล่งเข้าถึง http://www.ricesiam.com/page01.php/ สืบค้นเมื่อ [20/03/2556]

ศูนย์สารสนเทศวิทยาศาสตร์ละเทคโนโลยี สำนักหอสมุดและศูนย์สารสนเทศวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, กรมวิทยาศาสตร์บริการ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. (2553). *ประมวลสารสนเทศพร้อมใช้ แอนโทไซยานิน (Anthocyanin)* [Online]. แหล่งเข้าถึง siweb.dss.go.threpack fulltextIR21.pdf/ สืบค้นเมื่อ [08/01/2556]

อมรรัตน์ ถนนแก้ว. (2552). การพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพจากข้าวสังข์หยด. *สำนักงานวิจัยและพัฒนามหาวิทยาลัยทักษิณ รายงานประจำปี 2552.*

Ardiansyah, Shirakawa, H., Koseki, T., Hashizume, K., (2007). The driselase-treated fraction of rice barn is a more effective dietary factor to improve hypertension, glucose and lipid metabolism in stroke-prone spontaneously hypertensive rats compared to ferulic acid. *Br J Nutr*, 97(1), 67-76.

Arulmozhi, S., Ashok, P., Mazumder, P.M., et al. (2007). In Vitro Antioxidant and Free Radical Scavenging Activity of *Alstonia scholaris* Linn. R.Br. Iranaian. *Journal of Pharmacology and Therapetics*, 6,191-196.

Butsat, S. and Siriamornpun, S. (2011). Antioxidant capacities and phenolic compounds of the husk, bran and endosperm of Thai rice. *Food Chemistry*, 119(2), 606-613.

Chatatikun, M. and Chiabchalard, A. (2017). Thai plants with high antioxidant levels free radical scavenging activity antityrosinase and anti-collagenase activity. *Chatatikun and Chiabchalard BMC Complementary and Alternative Medicine*. 17(487), 1-9.

Chen, P.N., Kuo, W.H., Chiang, C.L., Chiou, H.L., Hsieh, Y.S., and Chu, S.C. (2006). Black rice anthocyanins inhibit cancer cells invasion via repressions of MMPs and u-PA expression. *Chemico-Biological Interactions*, 163(3), 218–229.

Chi, H.Y., Lee, C.H., Kim, K.H., Kim, S.L., and Chung, I.M. (2007). Analysis of phenolic compounds and antioxidant activity with H4IIE cells of three different rice grain varieties. *European Food Research and Technology*, 225, 887-893.

Choi, S. P., Kang, M. Y., Koh, H. J., Nam, S. H., and Friedman, M. (2007). Antiallergic activities of pigmented rice bran extracts in cell assays. *Journal of Food Science*, 72(9), S719–S726.

Dasgupta, J., Kar, S., Remmen, H.V., et al. (2009). Age-dependent increases in interstitial collagenase and MAP Kinase levels are exacerbated by superoxide dismutase deficiencies. *Exp Gerontol*, 44(8), 503-10.

Feri, M., and Becker, K. (2005). Rice Biodiversity and Nutrients. *Institute of Animal Production in the Tropics and Subtropics, University of Hohenheim, Germany* [Online] แหล่งเข้าถึง http://www.greenpeace.org/raw/content/international/press/reports/rice-biodiversity-nutrients.pdf/ สืบค้นเมื่อ [16/03/2556]

Goufo, P., Trindade, H. (2014). Rice antioxidants: phenolic acids, flavonoids, anthocyanins, proanthocyanidins, tocopherols, tocotrienols, γ-oryzanol, and phytic acid. Food Sci Nutr, 2, 75-104.

Gregorio, G.B. (2002). Progress in breeding for trace minerals in staple crops. *Journal of Nutrition*, 132, 500–502.

Hartmann, A., Gostner, J., Fuchs, J.E., et al. (2015). Inhibition of Collagenase by Mycosporine-like Amino Acids from Marine Sources. *Planta Med*, 81(10), 813-20.

Hyun-Il, J., Geun-Seoup, S., Eun-In, Y., Young, Y. and Young-Soo, K. (2012). Antioxidant activities and phenolic compounds of pigmented rice bran extracts. *Journal of Food Sciences*, 77(7), 759-764.

Imam, M.U., Siti Nor Asma Musa, Azmi, N.H., and Ismail, M. (2012). Effects of White Rice, Brown Rice and Germinated Brown Rice on Antioxidant Status of Type 2 Diabetic Rats. *International Journal of Molecular Sciences,* 13, 12952-12969.

Iswarya, S., Radhakrishnan, N., Kavitha, V., Mandal, A.B, and Gnanamani, A. (2014). Collagenase inhibition activity of Indian medical plants: An approach to moderate collagen turnover. *Int. J. Bioassays*, 3 (05), 2075-2078.

Kennedy, G. and Burlingame B. 2003. Analysis of food composition data on rice from a plant genetic resources perspective*. Food Chemistry*, 80, 589 – 596.

Kumud, M. and Sanju, N. (2018). In-vitro evaluation of antioxidant, anti-elastase, anti-collagenase, anti-hyaluronidase activities of safranal and determination of its sun protection factor in skin photoaging. *Bioorganic Chemistry*, 77, 159-167.

Kuo, C.C., Chiang, W.C., Liu, G.P., Chien, Y.L., Chang, J.Y., Lee, C.K., Lo, J.M., Huang, S.L., Shih, M.C., Kuo, Y.H. (2002). 2, 2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical-scavenging active components from adlay (*Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf) hulls. *J. Agric. Food Chem*, 50: 5850–5855.

Lee, J.C., Kim, J.D., Hsieh, F.H., and Eun, J.B. (2008). Production of black rice cake using ground black rice and medium-grain brown rice. *International Journal of Food Science and Technology*, 43(6), 1078–1082.

Liu, R.H. (2004). Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention mechanism of action. *Journal of Nutrition*, 134, 3479S–3485S

Liu, R.H. (2007). Whole grain phytochemicals and health. Journal of Cereal Science, 46, 207–219

Madhan, B., Krishnamoorthy, G., Rao, J., R., and Nair, B., U. (2007). Role of green tea polyphenols in the inhibition of collagenolytic activity by collagenase. *International Journal of Biological Macromolecules,* 41, 16-22.

Muntana, N. and Prasong, S. (2010). Study on total phenolic contents and their antioxydant activity of Thai white, red and black rice bran extracts. *Pakistan Journal of Biological sciences*, 13(4), 170-174.

Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucose-amine. *Jpn. J. Nutr,* 44, 307–315.

Pintha, K., Yodkeeree, S., Pitchakarn, P., and Limtrakul, P. (2014). Anti-invasive Activity against Cancer Cells of Phytochemicals in Red Jasmine Rice (*Oryza sativa* L.). *Asian Pac J Cancer Prev,* 15 (11), 4601-4607.

Plaitho, Y., Kangsadalampai K. and Sukprasansap, M. (2012). The protective effect of Thai fermented pigmented rice on urethane induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(2), 91-98.

Ryu, S.N., Park, S.Z. and Ho, C.T., (1998). Performance liquid chromatographic determination of anthocyanin pigments in some varites of black rice. *J of Food and Drug Analysis*, 6 (4), 729-736.

Sangkitikomol, W., Tencomnao, T., Rocejanasaroj, A. (2010) Effects of Thai black sticky rice extract on oxidative stress and lipid metabolism gene expression in HepG2 cells. *Genet Mol Res*, 9(4), 2086-95.

Shao, Y., Zhang, G. and Bao, J. (2011). Total phenolic content and antioxidant capacity of rice grains with extremely small size. AJAR, 6(10), 2289-2293.

Sin, Y. B., and Hyun Pyo Kim, P. H. (2005). Inhibition of Collagenase by Naturally-Occurring Flavonoids. *Arch Pharm Res,* 28(10), 1152-1155.

Sompong, R., Siebenhandl-Ehn, S., Linsberger-Martin, G. and Berghofer, G. E. (2011). Physicochemical and antioxidative properties of red and black rice varieties from Thailand, China and Sri Lanka. *Food Chemistry*, 124, 132-140

Sutharut, J. and Sudarat, J. (2012). Total anthocyanin content and antioxidant activity of germinated colored rice. *International Food Research Journal*, 19(1), 215-221.

Suttajit, M., Immark S., Teerajan S., Suttajit S. and Chiyasut C. (2006). Antioxidative activity and polyphenol content in different varieties of Thai rice grains. *Proceedings of Asia Pacific Clinical Nutrition Society. Joint 8thISCN and 5thAPCNS conference 2006* [Online]. แหล่งเข้าถึง http://www.healthy eating club.com/APJCN/ Volume15/Vol15 apcns/ Vol15 apcns.html/ สืบค้นเมื่อ [09/03/2556]

Suwannalert, P. and Rattanachitthawat, S. (2011). High levels of phytophenolics and antioxidant activities in oryza sativa-unpolished thai rice strain of leum phua. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 10(4), 431-436.

Thring, S.A.T., Hili, P., and Naughton, P.D. (2009). Anti-collagenase, anti-elastase and anti-oxidant activities of extracts from 21 plants. *BMC Complementary and Alternative Medicin,.* 9, 27ใ

Thunnop, L., Charles, F., Shoemaker, Sakda, J. and Vanna, T. (2011). Antioxidants and Antioxidant activity of several pigmented rice brans.*Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 193-199.

Wettasinghe, M., and Shahidi, F. (1999). Antioxidant and free radical-scavenging properties of ethanolic extracts of defatted borage (*Borago officinalis* L.) seeds. *Food Chem*, 67(4), 399-414.

Zhang, M., GUO, B., Zhange, R., Chi. J., We, Z.., XU, A., Zhange, Y. and Tang, X. (2006). Separation, Purification and identification of antioxidant compositions in black rice. *Agricultural Sciences in China*, 5(6), 431-440.