การสกัดวิตามินอีจากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าว

Extraction of Vitamin E from Distillate of Rice Bran Oil

อาจารย์ธิดารัตน์ หน่อสุวรรณ
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่

RAJABHAT CHIANG MAI
Research Journal

การสกัดวิตามินอีจากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าว

Extraction of Vitamin E from Distillate of Rice Bran Oil

อาจารย์ธิดารัตน์ หน่อสุวรรณ
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่

บทคัดย่อ

การสกัดวิตามินอีจากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าว ด้วยสัดส่วนของดิสทิลเลตต่ออะซิโตไนไตรล์เท่ากับ 1:4 (w/v) โดยวิธี winterization ที่อุณหภูมิ 0 และ -20°C ตามลำดับ ทำบริสุทธิ์สารสกัดที่ได้ด้วยการทำซาพอนิฟิเคชันแบบเย็น (cold saponification) วิเคราะห์หาปริมาณวิตามินอีด้วยเทคนิค Reversed-phase HPLC พบว่า ความเข้มข้นของวิตามินอี เท่ากับ 6,788.186±55.039 mg/kg สารสกัดวิตามินอีที่สกัดได้จากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวเข้มข้น 0.1 mg/kg มีค่า DPPH scavenging effect สูงที่สุดเท่ากับ 98.178±0.004% และมากกว่าแอลฟา-โทโคเฟอรอลสังเคราะห์, BHT, TBHQ และ BHA ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และสามารถยับยั้งการเกิดเปอร์ออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิกได้มากกว่า 90% ภายในเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อทดสอบโดยวิธี reducing power และ วิธี ferric thiocyanate นอกจากนี้ยังมีสมบัติต้านการเกิดออกซิเดชันและความสามารถในการจับอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์มากกว่าแอลฟา-โทโคเฟอรอลสังเคราะห์ BHT TBHQ และ BHA ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

คำสำคัญ : การสกัด วิตามินอี โทโคเฟอรอล ดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าว BHT TBHQ และ BHA

Abstract

The extraction of vitamin E from rice bran oil deodorizer distillate with distillate to acetonitrile ratios of 1:4 w/v by winterization at temperatures of 0 and -20°C respectively, purified extracted vitamin E by cold saponification. Vitamin E concentration in the extract was determined using Reversed-phase HPLC. The concentration of extracted vitamin E was 6,788.186±55.039 mg/kg. The maximum DPPH scavenging effect of 0.1 mg/kg extracted vitamin E was 98.178±0.004% and significantly ($p \leq 0.05$) greater than synthetic α-tocopherol, BHT, TBHQ and BHA respectively. According to the methods of reducing power and ferric thiocyanate, the extract with vitamin E concentration of 0.1 mg/kg could inhibit the peroxidation of linoleic more than 90% in 24 hours. The antioxidative properties and superoxide scavenging activity of the extracted vitamin E was significantly ($p \leq 0.05$) greater than synthetic α-tocopherol, BHT, TBHQ and BHA respectively.

Keyword : Extraction, Vitamin E, Tocopherol, Distillate of rice bran oil, BHT, TBHQ and BHA

บทนำ

ข้าว (*Oryza sativa* Linn.) เป็นผลผลิตทางการเกษตรที่สำคัญของเอเชีย จึงทำให้ข้าวเป็นอาหารที่สำคัญที่สุดของคนในเอเชีย ผลิตภัณฑ์หลักจากการสีข้าวคือเมล็ดข้าว (endosperm) ซึ่งมีประมาณ 70% และผลพลอยได้จากการสีข้าวประกอบด้วย แกลบข้าว (rice husk) 20% ซึ่งเป็นเปลือกของข้าวสาร รำข้าว (rice bran) 8% และจมูกข้าว (rice germ) 2% รำข้าวเป็นแหล่งผลิตน้ำมันรำข้าวหรือนำไปขายเป็นอาหารสัตว์ (Hoed *et al*., 2006)

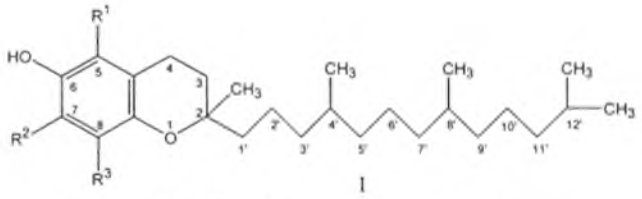
รำข้าว หมายถึง ส่วนเยื่อหุ้มผล เยื่อหุ้มเมล็ด นิวเซลสัส ชั้นแอลิวโรน ชั้นซับแอลิวโรน และคัพภะของเมล็ดข้าว (อรอนงค์ นัยวิกุล, 2547) รำข้าวได้จากการสีข้าว ซึ่งจะได้ประมาณ 8-10% ของน้ำหนักข้าวเปลือกทั้งหมด (นัยนา บุญทวียุวัฒน์ และเรวดี จงสุวัฒน์, 2545) องค์ประกอบของรำข้าวขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของข้าว เทคนิคการสีข้าว และวิธีการทำให้เกิดความเสถียร (stabilization) ของข้าว รำข้าวเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติ (natural antioxidant) ที่สำคัญ ได้แก่ โทโคเฟอรอล (tocopherol) โทโคไตรอีนอล (tocotrienol) และโอรีซานอล (oryzanols) รำข้าวสามารถลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดได้โดยเฉพาะในส่วนของ low-density lipoprotein (LDL) ทำให้ลดความเสี่ยงของโรคหัวใจ นอกจากนี้ ยังสามารถลดการเกิดของนิ่วในร่างกายได้ (Iqbal *et al*., 2005)

ดิสทิลเลต (distillate) จากน้ำมันรำข้าวดิบ เป็นส่วนที่ได้จากกระบวนการกำจัดกลิ่น (deodorization) ซึ่งเป็นกระบวนการกำจัดสารที่ให้กลิ่นและรสชาติในน้ำมันรำข้าวของกระบวนการผลิตน้ำมันรำข้าวบริโภค ดิสทิลเลตประกอบด้วย สเตอรอล (sterol) กรดไขมันอิสระ (free fatty acid) สควอลีน (squalene) และวิตามินอีทั้งโทโคเฟอรอลและโทโคไตรอีนอล (Verleyen, 2001) องค์ประกอบหลักของดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวดิบคือกรดไขมันอิสระและสารที่ซาพอนิไฟน์ไม่ได้ ส่วนไฟโตสเตอรอล (phytosterols) พบค่อนข้างสูงประมาณ 14.8% และองค์ประกอบของสเตอรอลที่พบในดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวนั้นแตกต่างจากที่พบในน้ำมันรำข้าว เช่น δ^5 - unsaturated 4-desmethylsterols (campesterol, stigmasterol และ β-sitosterol) พบในดิสทิลเลตสูงมากประมาณ 70% ของสเตอรอลรวมทั้งหมด (Hoed *et al*., 2006)

ดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวดิบมีความเข้มข้นของวิตามินอีรวม โทโคเฟอรอลรวม และ โทโคไตรอีนอลรวมเท่ากับ 31.5, 14.9 และ 16.6 mg/g ตามลำดับ (Ko *et al*., 2008) หรือดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวดิบมีความเข้มข้นของวิตามินอีรวมเท่ากับ 19.4 mg/g (ธิดารัตน์ หน่อสุวรรณ, 2550) และ วราพร พงค์ธรกุลพานิช (2543) พบแอลฟา-โทโคเฟอรอล (α-tocopherol) และแกมมา-โทโคเฟอรอล (γ-tocopherol) ในดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวดิบประมาณ 2,001 และ 3,414% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณในน้ำมันรำข้าวดิบ (crude rice bran oil) 100% ซึ่งดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวดิบมีความเข้มข้นของวิตามินอีรวม โทโคเฟอรอลรวม และโทโคไตรอีนอลรวมมากกว่าปริมาณความเข้มข้นของวิตามินอีรวมในน้ำมันรำข้าวดิบ 15.8 เท่าตัว โดยมีอยู่ในปริมาณ 1.5-2.0 mg/g (Cherukuri *et al*., 1999) และในปัจจุบันดิสทิลเลตได้ถูกนำไปทำเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าไม่มากนัก เช่น นำไปขายเป็นอาหารสัตว์ อุตสาหกรรมสบู่ หรือนำไปจำหน่ายในราคาถูก

วิตามินอี คือ จุลธาตุอาหาร (*micronutrient*) หรือสารอาหารที่มีความจำเป็นต่อร่างกายที่มีสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ละลายได้ดีในไขมันและน้ำมัน วิตามินอีประกอบด้วยอนุพันธ์ของแอลฟา-, เบตา-, แกมมา- และเดลตา-โทโคเฟอรอล (α-, β-, γ-, and δ-tocopherol) และอนุพันธ์ของ แอลฟา-, เบตา-, แกมมา- และเดลตา-โทโคไตรอีนอล (α-, β-, γ-, and δ-tocotrienol) ดังรูป 1 และ 2 ตามลำดับ ซึ่งในโครงสร้างของวงแหวน 6-chromanol ของกลุ่มโทโคเฟอรอลจะถูกแทนที่ด้วยหมู่เมทิล (methyl group) ที่ตำแหน่ง 5, 7 และ 8 โดยที่ตำแหน่งที่ 2 เป็น C16 saturated side chain ส่วนกลุ่มโทโคไตรอีนอลนั้นจะมีพันธะคู่ที่ตำแหน่ง 3', 7' และ 11' ของ side chain ซึ่งโทโคเฟอรอลและโทโคไตรอีนอลในรูปแบบเฉพาะต่าง ๆ นั้นจะแตกต่างกันที่จำนวนและตำแหน่งของหมู่เมทิลบนวงแหวน 6-chromanol โดยแอลฟา-โทโคเฟอรอลและแอลฟา-โทโคไตรอีนอลนั้นจะถูกแทนที่ด้วยหมู่เมทิล 3 หมู่ เบตา-โทโคเฟอรอล เบตา-

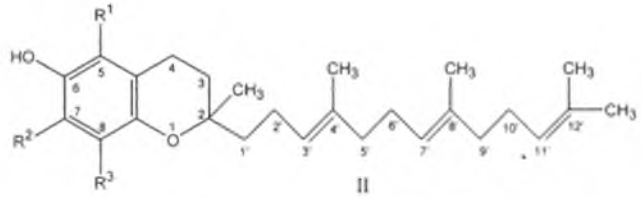
โทโคไตรอีนอล แกมมา-โทโคเฟอรอล และแกมมา-โทโคไตรอีนอลจะถูกแทนที่ด้วยหมู่เมทิล 2 หมู่ และเดลตา-โทโคเฟอรอล และเดลตา-โทโคไตรอีนอลจะถูกแทนที่ด้วยหมู่เมทิล 1 หมู่ (Yoshida *et al.*, 2007, Eitenmiller and Lee, 2004)



I

$R^1 = R^2 = R^3 = H$	Tocol
$R^1 = R^2 = R^3 = CH_3$	α–Tocopherol
$R^1 = R^3 = CH_3$; $R^2 = H$	β-Tocopherol
$R^1 = H$; $R^2 = R^3 = CH_3$	γ–Tocopherol
$R^1 = R^2 = H$; $R^3 = CH_3$	δ-Tocopherol

รูป 1 แอลฟา-, เบตา-, แกมมา- และเดลตา-โทโคเฟอรอล
ที่มา : Eitenmiller and Lee (2004)



II

$R^1 = R^2 = R^3 = H$	Tocotrienol
$R^1 = R^2 = R^3 = CH_3$	α–Tocotrienol
$R^1 = R^3 = CH_3$; $R^2 = H$	β-Tocotrienol
$R^1 = H$; $R^2 = R^3 = CH_3$	γ–Tocotrienol
$R^1 = R^2 = H$; $R^3 = CH_3$	δ-Tocotrienol

รูป 2 แอลฟา-, เบตา-, แกมมา- และเดลตา-โทโคไตรอีนอล
ที่มา : Eitenmiller and Lee (2004)

วิตามินอีมีลักษณะเป็นน้ำมันข้นหนืด สีเหลือง ละลายได้ดีในน้ำมัน มีสูตรโมเลกุล $C_{29}H_{50}O_2$ มวลโมเลกุล 430 g/mol (นิธิยา รัตนาปนนท์, 2548) วิตามินอีเป็นสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติ ที่มีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร ยา และเครื่องสำอาง โดยแอลฟา-โทโคเฟอรอล เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพมากกว่า เบตา-โทโคเฟอรอล แอลฟา-โทโคไตรอีนอล แกมมา-โทโคเฟอรอล เบตา-โทโคไตรอีนอล และเดลตา-โทโคเฟอรอล ตามลำดับ (Cheong *et al.*, 2008) ซึ่งในปัจจุบันประเทศไทยต้องนำวิตามินอีเข้าจากต่างประเทศในราคาสูงมาก โทโคเฟอรอล และโทโคไตรอีนอล เป็นสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติที่มีบทบาทสำคัญในการเก็บรักษาอาหาร และการป้องกันโรค ซึ่งโทโคเฟอรอลและโทโคไตรอีนอลสามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของเอซิลกลีเซอรอล (acylglycerol peroxidation) โดยการจับกับอนุมูลอิสระ สามารถยับยั้งการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลในตับ มีฤทธิ์เป็น

สารต้านมะเร็ง เพิ่มระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย และลดการเสื่อมสภาพของเซลล์ โทโคเฟอรอล และโทโคไตรอีนอล ยังทำหน้าที่เป็นสารต่อต้านการจับตัวแข็งของเลือดมีประสิทธิภาพในการฟื้นฟูสภาพผิวหนัง และสามารถป้องกันการเกิดโรคอัลไซเมอร์ในผู้สูงอายุได้ (Chu *et al*., 2003) นอกจากนี้ แอลฟา-, แกมมา- และเดลตา-โทโคเฟอรอล สามารถลดการอักเสบเนื่องมาจากกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ ๆ ของก้อนมะเร็ง (inflammatoryangiogenesis) ใน microvascular endothelial cells ของมนุษย์ (Wells *et al*., 2010) แอลฟา-โทโคเฟอรอล เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ ที่พบภายในเซลล์ (intracellular antioxidant) เนื่องจากแอลฟา-โทโคเฟอรอล มีสมบัติในการยับยั้งการเกิดเปอร์ออกไซด์ของกรดไขมันไม่อิ่มตัว (polyunsaturated fatty acid) ในเยื่อหุ้มของสิ่งมีชีวิต (biological membrane) (Choi and Lee, 2009) นอกจากนี้ แอลฟา-โทโคเฟอรอล ยังเป็นสารต้านอนุมูลอิสระชนิดที่สามารถหยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (chain-breaking antioxidant) และเป็นตัวเหนี่ยวนำเอนไซม์ในเฟสที่ 2 (phase II enzyme inducer) ที่มีผลปกป้องภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุลที่เหนี่ยวนำมาจากสารอะโครลีน (acrolein-induced oxidative stress) และการทำงานผิดปกติของไมโทคอนเดรียในเซลล์เยื่อบุจอตาชั้นนอก (retinal pigment epithelial cells) ของมนุษย์ (Feng *et al*., 2010)

สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ ได้แก่ BHT และ BHA ซึ่งใช้มากในกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ในอุตสาหกรรม ทั้งอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องสำอาง มีฤทธิ์ทำลายตับ และเป็นสารก่อมะเร็ง ดังนั้น สารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติจึงมีบทบาทสำคัญในการทำลาย reactive oxygen species และอนุมูลอิสระอื่น ๆ ส่งผลให้โรคต่าง ๆ และการหืนของอาหารเนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันนั้นเกิดขึ้นได้ช้าลง (Senevirathne *et al*., 2006)

ในปัจจุบันสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติยังคงมีราคาแพง และมีข้อจำกัดต่อการใช้ในผลิตภัณฑ์บางประเภทมากกว่าสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ซึ่งสามารถใช้ได้ในวงกว้างกว่า แต่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) อยู่ในระดับกลางถึงสูง ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาตินั้นมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระอยู่ในช่วงกว้าง และได้รับการยอมรับว่าเป็นสารที่ไม่เป็นอันตราย มีแนวโน้มที่จะมีการใช้เพิ่มมากขึ้น สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้อย่างกว้างขวาง นอกจากนี้ สารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติยังมีความสามารถในการละลายได้ในช่วงกว้าง และนำมาใช้ในอุตสาหกรรมมากขึ้น แต่สำหรับสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์นั้นมีรายงานพบว่าเป็นสารก่อมะเร็ง นอกจากนี้สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ยังมีความสามารถในการละลายน้ำต่ำ ปัจจุบันสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์จึงได้รับความสนใจที่นำมาใช้ลดลง (Pokorny *et al*., 2001)

การแยกวิตามินอี สามารถแยกได้จากวัตถุดิบหลายชนิด และแยกโดยวิธีการต่าง ๆ เช่น การสกัดโดยใช้ตัวทำละลายอุณหภูมิต่ำ (low temperature solvent extraction) (Ko *et al*., 2008; ธิดารัตน์ หน่อสุวรรณ, 2550) การใช้ตัวทำละลาย (solvent extraction) (Chen and Bergman 2005; Delgado-Zamaneno *et al*., 2004; Almeida *et al*., 2001) การไฮโดรไลซิสด้วยด่าง (saponification) (Kim 2005; Park *et al*., 2004; Ryynanen *et al*., 2004; Almeida *et al*., 2001) วิธี enzymatic hydrolysis neutralization (Chu *et al*., 2002) โมเลคิวลาร์ ดิสทิลเลชัน (molecular distillation) (Qureshi *et al*., 1997) และวิธีซูเปอร์คริทิคอลฟลูอิดโครมาโทรกราฟฟี (supercritical fluid chromatography) (Mendes *et al*., 2005; Szulczewska-Remi *et al*., 2004; Mendes *et al*., 2002; Carlucci *et al*., 2001; Hadolin *et al*., 2001) เป็นต้น

Ko *et al*. (2008) ได้ศึกษาการสกัดวิตามินอีทั้งโทโคเฟอรอล และโทโคไตรอีนอลจากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าว โดยใช้ตัวทำละลายอะซีโตไนไตรล์ที่อุณหภูมิ -40°C และเวลาในการสกัดเท่ากับ 24 ชั่วโมง ได้วิตามินอีรวม (แอลฟา-, เบตา-, แกมมา-, และเดลตา-โทโคเฟอรอลและโทโคไตรอีนอล) เท่ากับ 89.9 mg/g ธิดารัตน์ หน่อสุวรรณ (2550) ได้ศึกษาการสกัดวิตามินอีจากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าว โดยใช้เฮกเซนที่อุณหภูมิต่ำด้วยเครื่องสกัดต้นแบบ (พัชรินทร์ ระวียัน และคณะ, 2551) (ใช้สำหรับการสกัดแคโรทีนอยด์จากน้ำมันปาล์มดิบและวิตามินอีจากดิสทิลเลต

ของน้ำมันปาล์ม) โดยใช้อัตราส่วนของดิสทิลเลตต่อเฮกเซน เท่ากับ 1:4 (w/v) อุณหภูมิ -10°C และอัตราการกวน 500 รอบต่อนาที ซึ่งจะได้ค่าความเข้มข้นของโทโคเฟอรอลอนุพันธ์แอลฟา เบตา แกมมา และเดลตา และโทโคไตรอีนอลอนุพันธ์แอลฟา แกมมา และเดลตา ตลอดจนวิตามินอีรวม เท่ากับ 2843.74, 149.28, 2039.59, 215.37, 622.03, 8079.52, 668.98 และ 14618.51 mg/kg ตามลำดับ และมีค่า relative recovery เท่ากับ 81.8, 89.7, 83.2, 92.6, 81.1, 82.4, 91.4 และ 82.9% ตามลำดับ

งานวิจัยนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อปรับปรุงวิธีการสกัดวิตามินอี และหาสภาวะการสกัดที่เหมาะสมที่สุด ซึ่งเป็นวิธีการสกัดอย่างง่าย และเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่เหมาะสมสำหรับอุตสาหกรรมขนาดเล็ก และในงานวิจัยนี้ยังศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดวิตามินอีที่สกัดได้จากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวดิบ เปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ ดังนั้นงานวิจัยนี้ จึงมีประโยชน์อย่างยิ่งต่อการเพิ่มมูลค่าของการผลิตน้ำมันรำข้าวเพื่อการส่งออก ลดการนำเข้าวิตามินอีจากต่างประเทศ ทดแทนการใช้สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ด้วยสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติ และยังเป็นการลดต้นทุนในการสกัดวิตามินอีอีกด้วย

ระเบียบวิธีวิจัย

วัตถุดิบ

ดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าว (บริษัทน้ำมันบริโภคไทย จำกัด, ประเทศไทย)

วิธีการศึกษา

1. ศึกษาอัตราส่วนระหว่างดิสทิลเลตกับอะซิโตไนไตรล์ ที่เหมาะสมในการสกัดแอลฟา-, แกมมา- และเดลตา-โทโคเฟอรอล จากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าว โดยวิธี winterization

ทำการสกัดวิตามินอีจากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวด้วยตัวทำละลายอะซิโตไนไตร์ (Ko *et al*., 2008) ด้วยวิธี winterization โดยใช้สารผสมที่มีอัตราส่วนของดิสทิลเลตต่ออะซิโตไนไตรล์ เท่ากับ 1:1, 1:2, 1:3 และ 1:4 (w/v) โดยในแต่ละอัตราส่วนจะใช้อะซิโตไนไตรล์ที่อุณหภูมิ 0 และ -20°C ตามลำดับ ทำบริสุทธิ์สารสกัดที่ได้ด้วยการทำซาพอนิฟิเคชันแบบเย็น (cold saponification) (AOCS, 1997) วิเคราะห์หาปริมาณ แอลฟา-, แกมมา- และเดลตา-โทโคเฟอรอล ด้วยเทคนิค Reversed-phase HPLC (RP- HPLC) (Rangkadilok *et al*., 2010)

2. ศึกษาสมบัติการจับอนุมูลอิสระ (scavenging activity) และสมบัติต้านการเกิดออกซิเดชัน (antioxidant activity) ของสารสกัดวิตามินอีที่สกัดจากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวโดยใช้อะซิโตไนไตรล์ด้วยวิธี winterization เปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์

2.1 ศึกษาสมบัติการจับอนุมูลอิสระ (scavenging activity) 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ของสารสกัดวิตามินอีที่สกัดจากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าว และเปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ คือ แอลฟา-โทโคเฟอรอลสังเคราะห์, butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT) และ *tert*-butylhydroquinone (TBHQ)

นำสารสกัดวิตามินอีที่สกัดจากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวโดยใช้อะซิโตไนไตรล์ด้วยวิธี winterization มาศึกษาสมบัติการจับอนุมูลอิสระ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) โดยนำวิตามินอีและสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (แอลฟา-โทโคเฟอรอล, BHA, BHT และ TBHQ) ละลายในส่วนผสมของคลอโรฟอร์ม และเมทานอล ในอัตราส่วน 2:1 (v/v) และเติมลงไปในสารละลายของ DPPH radical ในเมทานอลเข้มข้น 0.2 mM นำส่วนผสม

ไปตั้งทิ้งไว้ในที่มืด ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำไปวิเคราะห์สมบัติการจับอนุมูลอิสระ degree of free radical scavenging activity โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm (Kim, 2005)

2.2 การวิเคราะห์ค่า reducing power ของสารสกัดวิตามินอีที่สกัดจากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวโดยใช้อะซิโตไนไตรล์ด้วยวิธี winterization

นำสารละลายตัวอย่างวิตามินอีที่สกัดจากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวโดยใช้ อะซิโตไนไตรล์ด้วยวิธี winterization มาศึกษาสมบัติ reducing power โดยผสมกับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 M pH 6.6 และโพแทสเซียมเฟอริคไซยาไนด์ ($K_3Fe(CN)_6$) 1%w/v นำสารละลายผสมไปบ่มที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 20 นาที มาเติม 10%v/v trichloroacetic acid นำไปเหวี่ยงแยกที่ 4,500 รอบต่อนาที ที่ 25°C เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายส่วนบนมาผสมกับน้ำกลั่น และเฟอริคคลอไรด์ ($FeCl_3$) 0.1%w/v นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 nm (Kim, 2005)

2.3 ศึกษาสมบัติการต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (antioxidant activity) ในปฏิกิริยาการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิกของสารสกัดวิตามินอีที่สกัดจากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวโดยใช้อะซิโตไนไตรล์ด้วยวิธี winterization โดย ferric thiocyanate method และวิเคราะห์ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ โดยวิธี thiobarbituric acid เปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (แอลฟา-โทโคเฟอรอลสังเคราะห์, BHA, BHT และ TBHQ)

นำวิตามินอีที่สกัดจากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวโดยใช้อะซิโตไนไตรล์ด้วยวิธี winterization มาศึกษาสมบัติการต้านการเกิดออกซิเดชัน ในปฏิกิริยาการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก โดยเติมสารอิมัลชันของกรดลิโนเลอิก 0.02 M pH 7.0 และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 M pH 7.0 ลงไปในสารละลายของวิตามินอีที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 5 วัน ทำการวัดค่าเปอร์ออกไซด์ (peroxide value) ทุก ๆ 24 ชั่วโมง ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 nm และมาวิเคราะห์ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ด้วยวิธี thiobarbituric acid test โดยนำสารละลายตัวอย่างวิตามินอีผสมกับสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก 20%v/v และสารละลายกรดไทโอบาบิทิวริก วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 nm (Kim, 2005)

2.4 สมบัติการจับอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ (superoxide radical scavenging activity) ของสารสกัดวิตามินอีที่สกัดจากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวโดยใช้อะซิโตไนไตรล์ด้วยวิธี winterization โดยศึกษาที่ความเข้มข้นของสารสกัดวิตามินอีที่มีค่า reducing power สูง และค่าการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันที่วัดโดย ferric thiocyanate method และ thiobarbituric acid test ที่มีค่าสูงสุด เปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (แอลฟา-โทโคเฟอรอลสังเคราะห์, BHA, BHT และ TBHQ)

ผสมส่วนผสมของการทำปฏิกิริยา ซึ่งประกอบด้วยโซเดียมคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ 0.05 M pH 10.5 แซนทีน 3 mM เกลือเอธิลีน ไดอะมีนเตตระอะซีติคแอซิดไดโซเดียม (EDTA2Na) 3 mM โบวีนซีรัมอัลบูมิน 0.15% nitroblue tetrazolium salt (NBT) 0.75 mM และสารละลายตัวอย่างวิตามินอีอิมัลชัน 0.1 mL ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเริ่มปฏิกิริยาโดยการเติม 6 mU ของ แซนทีนออกซิเดส (xanthine oxidase : XOD) และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติมคอปเปอร์คลอไรด์ ($CuCl_2$) 6 mM วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 nm (Senevirathne *et al*., 2006; Kim, 2005; และ Nagai *et al*., 2003)

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

1. ศึกษาอัตราส่วนระหว่างดิสทิลเลตกับอะซิโตไนไตรล์ที่เหมาะสมในการสกัดแอลฟา-, แกมมา- และเดลตา-โทโคเฟอรอล จากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าว โดยวิธี winterization

การสกัดวิตามินอีจากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวด้วยตัวทำละลายอะซิโตไนไตรล์ที่อุณหภูมิต่ำด้วยวิธี winterization ที่อุณหภูมิ 0°C และ -20°C ตามลำดับ โดยผสมดิสทิลเลตต่ออะซิโตไนไตรล์ที่อัตราส่วน 1:4 (w/v) ทำบริสุทธิ์สารสกัดที่ได้ด้วยการทำซาพอนิฟิเคชันแบบเย็น (cold saponification) (AOCS, 1997) วิเคราะห์ความเข้มข้นของวิตามินอีด้วยเทคนิค RP-HPLC (Reversed-phase high performance liquid chromatography) (Rangkadilok *et al.*, 2010) สามารถสกัดวิตามินอีที่มีความเข้มข้นของโทโคเฟอรอลรวมมากที่สุด ซึ่งมีความเข้มข้นของแอลฟา-, แกมมา-, เดลตา-โทโคเฟอรอล และโทโคเฟอรอลรวมเท่ากับ 3,999.977±45.732, 1,901.207±9.335, 887.002±4.049 และ 6,788.186±55.039 (mg/kg) ตามลำดับ ความเข้มข้นของแอลฟา-, แกมมา-, เดลตา-โทโคเฟอรอล, และโทโคเฟอรอลรวม (mg/kg) ที่สกัดจากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวด้วยวิธี winterization ที่อัตราส่วนของดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวดิบต่ออะซิโตไนไตรล์ในอัตราส่วน 1:1, 1:2, 1:3, และ 1:4 แสดงดังตาราง 1

ตาราง 1 ความเข้มข้น (mg/kg) ของแอลฟา-, แกมมา-, เดลตา-โทโคเฟอรอล และโทโคเฟอรอลรวม ที่สกัดจากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวที่อัตราส่วนของดิสทิลเลต : อะซิโตรไนไตรล์แตกต่างกัน

ดิสทิลเลต : อะซิโตรไนไตรล์	ความเข้มข้น (mg/kg)			
	แอลฟา-โทโคเฟอรอล	แกมมา-โทโคเฟอรอล	เดลตา-โทโคเฟอรอล	โทโคเฟอรอลรวม
1:1	1,577.572±33.653	980.140±10.751	387.753±1.611	2,945.465±32.946
1:2	2,072.096±68.895	1,175.588±7.279	503.415±3.208	3,751.099±65.461
1:3	3,810.748±84.209	1,438.396±9.252	668.159±2.976	5,583.223±88.742
1:4	3,999.977±45.732	1,901.207±9.335	887.002±4.049	6,788.186±55.039
ดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวดิบ	1,098.35±1.712	598.044±7.266	322.318±11.268	2,018.713±18.869

การสกัดวิตามินอีจากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวด้วยตัวทำละลายอะซิโตไนไตรล์ที่อุณหภูมิต่ำด้วยวิธี winterization ที่อุณหภูมิ 0°C และ -20°C ตามลำดับ ของงานวิจัยนี้ได้ความเข้มข้นของแอลฟา-, แกมมา-, และเดลตา-โทโคเฟอรอลรวม เท่ากับ 6,788.186±55.039 (mg/kg) เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Ko *et al.* (2008) ได้ใช้อัตราส่วนของดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวต่ออะซิโตไนไตรล์สูงถึง 1:20 (w/v) และอุณหภูมิในการสกัดที่ -20 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงในการสกัดวิตามินอีจากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าว โดยได้ความเข้มข้นของแอลฟา-, แกมมา-, และ เดลตา- โทโคเฟอรอลรวม มากที่สุด เท่ากับ 21,000 mg/kg ถึงแม้ว่าการสกัดวิตามินอีจากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวโดยวิธี winterization ที่อุณหภูมิ 0 และ -20 °C ตามลำดับ ในงานวิจัยฉบับนี้จะได้ความเข้มข้นของโทโคเฟอรอลรวม (แอลฟา-, แกมมา-, และ เดลตา-โทโคเฟอรอล) น้อยกว่าการสกัดวิตามินอีจากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวของ Ko *et al.* (2008) แต่งานวิจัยฉบับนี้ใช้อัตราส่วนของดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวต่ออะซิโตไนไตรล์

เท่ากับ 1:4 (w/v) และอุณหภูมิในการสกัดที่ 0 และ -20 °C ตามลำดับ โดยระยะเวลาในการสกัดที่แต่ละอุณหภูมิเพียง 2 ชั่วโมงเท่านั้น การกรองสารสกัดที่ได้ทุกขั้นตอนมีการควบคุมอุณหภูมิที่ -22 °C จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาทำบริสุทธิ์ด้วยวิธี cold saponification ก่อนการวิเคราะห์ด้วย HPLC

นอกจากนี้ ความเข้มข้นของโทโคเฟอรอลอนุพันธ์ต่าง ๆ ที่สกัดได้จากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวด้วยตัวทำละลายอะซิโตรไนไตรล์ที่อุณหภูมิ 0 และ -20 °C ของงานวิจัยนี้ มีค่ามากกว่าความเข้มข้นของโทโคเฟอรอลอนุพันธ์ต่าง ๆ ที่สกัดจากรำข้าวโดยการไฮโดรไลซิสด้วยโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 80% โดยพบว่ารำข้าวมีปริมาณแอลฟา- และแกมมา-โทโคเฟอรอลเท่ากับ 68.29 และ 40.05 mg/kg ตามลำดับ และมีปริมาณแอลฟา- และแกมมา-โทโคไตรอีนอลเท่ากับ 78.71 และ 98.24 mg/kg ตามลำดับ (Kim, 2005) นอกจากนี้ การสกัดวิตามินอีจากน้ำมันรำข้าวด้วยของไหลเหนือวิกฤตที่อุณหภูมิ 40°C และความดัน 200 bar พบว่าปริมาณความเข้มข้นของวิตามินอีรวมที่สกัดได้มีค่าเท่ากับ 9,391.2 mg/kg (Sarmento *et al*., 2006) และการสกัดวิตามินอีจากน้ำมันรำข้าวด้วยแอลกอฮอล์ที่อุณหภูมิ 25-77°C พบว่ามีปริมาณความเข้มข้นของวิตามินอีรวมเท่ากับ 4,000 mg/kg (Cherukuri *et al*., 1999)

2. ศึกษาสมบัติการจับอนุมูลอิสระ (scavenging activity) และสมบัติต้านการเกิดออกซิเดชัน (antioxidant activity) ของสารสกัดวิตามินอีที่สกัดจากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวโดยใช้อะซิโตไนไตรล์ด้วยวิธี winterization เปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์

2.1 ศึกษาสมบัติการจับอนุมูลอิสระ (scavenging activity) 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ของสารสกัดวิตามินอีที่สกัดจากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าว และเปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ ได้แก่ แอลฟา-โทโคเฟอรอลสังเคราะห์, butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT) และ *tert*-butylhydroquinone (TBHQ) (Kim, 2005)

สารสกัดวิตามินอีที่สกัดได้จากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวด้วยวิธี winterization ที่อัตราส่วนของดิสทิลเลตต่ออะซิโตไนไตรล์เท่ากับ 1:4 ที่ความเข้มข้น 0.1 mg/kg มีสมบัติการจับอนุมูลอิสระ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ดีที่สุด โดยให้ค่า DPPH scavenging effect (%) สูงที่สุด เท่ากับ 98.178±0.004% ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นของวิตามินอีที่ต่ำที่สุดที่ให้ค่า DPPH scavenging effect (%) สูงที่สุด และมีค่าคงที่ถึงแม้ความเข้มข้นของวิตามินอีเพิ่มสูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับวิตามินอีที่สกัดได้จากรำข้าว โดยการไฮโดรไลซิสด้วยโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 80% พบว่าต้องใช้ความเข้มข้นของวิตามินอีถึง 160 mg/kg จึงจะสามารถจับอนุมูลอิสระ 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl ได้เท่ากับ 95.170±0.284% (Kim, 2005) เนื่องจากวิตามินอีที่สกัดได้จากรำข้าวของ Kim (2005) ประกอบด้วยแอลฟา- และแกมมา-โทโคเฟอรอล เท่ากับ 68.29 และ 40.05 mg/kg ตามลำดับ จึงทำให้ Kim (2005) ต้องใช้ความเข้มข้นของวิตามินอีที่สกัดได้จากรำข้าวสูงกว่าวิตามินอีที่สกัดได้จากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าว นอกจากนี้ ในงานวิจัยนี้ วิตามินอีที่สกัดได้ยังมีค่า DPPH scavenging effect (%) สูงกว่า Iqbal และคณะ (2005) โดยพบว่าสารสกัดจากรำเมล็ดข้าวสาลีพันธุ์ต่าง ๆ ในประเทศปากีสถาน มีสมบัติการจับอนุมูลอิสระ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl ได้เท่ากับ 51-79% โดยสารสกัดจากรำเมล็ดข้าวสาลีมีปริมาณของโทโคเฟอรอล เท่ากับ 22-26 mg/kg และโทโคไตรอีนอล เท่ากับ 59-74 mg/kg

นอกจากนี้ที่ความเข้มข้น 0.1 mg/kg วิตามินอีที่สกัดได้ยังมีค่า DPPH scavenging effect (%) มากกว่าแอลฟา-โทโคเฟอรอลสังเคราะห์, BHT, TBHQ และ BHA ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยที่ BHT, TBHQ และ BHA มีค่า DPPH scavenging effect (%) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ซึ่งจากการศึกษาสมบัติการจับอนุมูลอิสระ DPPH ในเมทานอลเข้มข้น 0.2 mM ของสารสกัดวิตามินอีที่สกัดได้จากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวที่ความเข้มข้น 0.1 mg/kg พบว่ามีค่าความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ DPPH สูงกว่าสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (แอลฟา-โทโคเฟอรอลสังเคราะห์, BHT, TBHQ และ BHA) มาก เนื่องจาก

สารสกัดวิตามินอีที่สกัดได้นั้นนอกจากจะประกอบด้วยโทโคเฟอรอลอนุพันธ์ต่าง ๆ แล้วยังมี แอลฟา-, เบตา-, แกมมา- และ เดลตา-โทโคไตรอีนอล เป็นองค์ประกอบด้วย อีกทั้งในดิสทิลเลตยังมีโอรีซานอล (oryzanol) ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญที่พบเฉพาะในรำข้าว (Lerma-García *et al*., 2009, Zigoneanu *et al*., 2008, Wilson *et al*., 2007, and Zhou *et al*., 2002) อีกด้วย และนอกจากนี้ยังมีงานวิจัยพบว่า แอลฟา-โทโคเฟอรอลมีสมบัติการจับอนุมูลอิสระ DPPH มากกว่า BHT มาก ๆ เนื่องจากมีค่าคงที่อัตราของปฏิกิริยาอันดับที่สอง (second-order rate constants) ของปฏิกิริยาระหว่างอนุมูลอิสระ DPPH และสารต้านอนุมูลอิสระมากกว่าอีกด้วย (Suja *et al*., 2004) ซึ่ง Suja *et al*. (2004) ได้ศึกษาสมบัติการจับอนุมูลอิสระ DPPH ของสารประกอบที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในงา (*Sesamum indicum* L.) พบว่า ค่าคงที่อัตราของปฏิกิริยาอันดับที่สอง (second-order rate constants) ของปฏิกิริยาระหว่างอนุมูลอิสระ DPPH และสารต้านอนุมูลอิสระของ sesamol (สารต้านอนุมูลอิสระในงา) มีค่ามากกว่าแอลฟา-โทโคเฟอรอล และ BHT ตามลำดับ โดยมีค่าเท่ากับ 4.00, 3.71 และ 0.37 $\mu M^{-1}S^{-1} \times 10^{-5}$ ตามลำดับ ทำให้ sesamol มีสมบัติการจับอนุมูลอิสระ DPPH มากกว่าแอลฟา-โทโคเฟอรอล และ BHT ตามลำดับ โดยทั้ง sesamol และแอลฟา-โทโคเฟอรอลมีสมบัติการจับอนุมูลอิสระ DPPH มากกว่า BHT มาก ๆ นอกจากนี้สารละลายอนุมูลอิสระ DPPH ในเมทานอลที่มีความเข้มข้น 0.2 mM ในงานวิจัยนี้มีความเข้มข้นมากกว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (แอลฟา-โทโคเฟอรอลสังเคราะห์, BHT, TBHQ และ BHA) ทำให้มีค่า DPPH scavenging effect (%) น้อยกว่า สารสกัดวิตามินอีมาก นอกจากนี้ Papuc *et al*. (2008) พบว่า สารสกัดจาก sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) ที่สกัดด้วยเอทานอล มีสมบัติการจับอนุมูลอิสระ DPPH (ความเข้มข้น 6 mM) มากกว่าสารสกัดจาก sea buckthorn ด้วยตัวทำละลายผสมของน้ำและอะซีโตน และมากกว่า BHA และ BHT ตามลำดับโดยมีค่าเท่ากับ 94.7±3.2%, 74.7±2.6%, 54.8±2.4% และ 50.2±3.3% ตามลำดับ

2.2 การวิเคราะห์ค่า reducing power ของสารสกัดวิตามินอีที่สกัดจากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวโดยใช้อะซิโตไนไตรล์ด้วยวิธี winterization

ค่าความสามารถของการรีดิวส์ของสารสกัดวิตามินอีที่สกัดได้แปรผันตามความเข้มข้นของวิตามินอีที่เพิ่มขึ้น และมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยความเข้มข้นของวิตามินอี 0.1 mg/kg มีความสามารถในการรีดิวส์ได้สูงที่สุด ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Kim (2005) พบว่าวิตามินอีที่สกัดได้จากรำข้าวโดยการไฮโดรไลซิสด้วยโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 80% นั้นจะใช้ความเข้มข้นเท่ากับ 160 mg/kg จึงจะมีความสามารถในการรีดิวส์ได้สูงใกล้เคียงกันกับความสามารถในการรีดิวส์ของวิตามินอีที่สกัดได้จากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวโดยวิธี winterization ในการศึกษานี้ หรือวิตามินอีที่สกัดได้จากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวโดยใช้เฮกเซนที่อุณหภูมิต่ำ (ธิดารัตน์ หน่อสุวรรณ, 2550) ต้องใช้ความเข้มข้นของวิตามินอีเท่ากับ 10 mg/kg จึงจะมีความสามารถในการรีดิวส์ได้สูงใกล้เคียงกันกับความสามารถในการรีดิวส์ของสารสกัดวิตามินอีที่สกัดได้จากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวโดยวิธี winterization ในการศึกษานี้

2.3 ศึกษาสมบัติต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (antioxidant activity) ในปฏิกิริยาการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิกของสารสกัดวิตามินอีที่สกัดจากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวโดยใช้อะซิโตไนไตรล์ด้วยวิธี winterization โดย ferric thiocyanate method และวิเคราะห์ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์โดยวิธี thiobarbituric acid เปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (แอลฟา-โทโคเฟอรอลสังเคราะห์, BHA, BHT และ TBHQ)

สารสกัดวิตามินอีที่สกัดได้จากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวที่ความเข้มข้นเพียง 0.1 mg/kg สามารถยับยั้งการเกิดเปอร์ออกไซด์ได้มากกว่า 90% ภายใน 24 ชั่วโมง ความสามารถในการรีดิวส์ของสารสกัดวิตามินอี

ที่สกัดได้มีความสัมพันธ์กับการยับยั้งการเกิดเปอร์ออกไซด์ 99.03% เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Kim (2005) พบว่า ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) ระหว่างความสามารถในการรีดิวส์กับการยับยั้งการเกิดเปอร์ออกไซด์ (%) เท่ากับ 0.9953 แสดงว่าความสามารถในการรีดิวส์ของวิตามินอีที่สกัดได้มีความสัมพันธ์กับการยับยั้งการเกิดเปอร์ออกไซด์ (%) เท่ากับ 99.53%

สมบัติการต้านอนุมูลอิสระที่ความเข้มข้น 0.1 mg/kg ของสารสกัดวิตามินอีที่สกัดได้ เปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ พบว่า วิตามินอีที่สกัดจากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าว โดยวิธี winterization มีความสามารถในการยับยั้งการเกิดเปอร์ออกไซด์ (%) สูงที่สุด รองลงมาคือแอลฟา-โทโคเฟอรอลสังเคราะห์ BHT TBHQ และ BHA ตามลำดับ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 98.5±0.01, 74.2±0.04, 72.5±0.03, 71.6±0.02 และ 59.9±0.03 ตามลำดับ ณ วันที่ 4 ของการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก แสดงดังตาราง 2

ตาราง 2 การยับยั้งการเกิดเปอร์ออกไซด์ของสารต้านอนุมูลอิสระชนิดต่าง ๆ

ระยะเวลาการเก็บ (วัน)	การยับยั้งการเกิดเปอร์ออกไซด์ (%) ของสารต้านอนุมูลอิสระชนิดต่าง ๆ				
	BHA	BHT	TBHQ	α-tocopherol	วิตามินอีที่สกัดได้
0	6.5±0.05	10.6±0.01	8.8±0.02	14.7±0.01	19.7±0.01
1	53.8±0.03	60.0±0.02	59.6±0.03	65.2±0.01	91.7±0.03
2	56.1±0.02	68.1±0.01	67.7±0.01	69.1±0.03	94.7±0.02
3	57.7±0.01	70.3±0.04	70.1±0.01	71.7±0.02	96.9±0.01
4	59.9±0.03	72.5±0.03	71.6±0.02	74.2±0.04	98.5±0.01
5	54.7±0.02	69.1±0.02	67.7±0.03	72.5±0.03	98.6±0.01

หมายเหตุ ตัวเลขที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

Naima *et al.* (2011) พบว่าสารสกัดจากพืช *Origanum glandulosum* ทางตอนเหนือของประเทศอัลจีเรีย ซึ่งประกอบด้วยสารประกอบฟีโนลิก (phenolic compound) กรดฟีโนลิก และ ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) มีสมบัติการจับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เท่ากับ 60.78% ซึ่งสูงกว่า BHT, แอลฟา-โทโคเฟอรอล และ BHA ตามลำดับ โดยมีค่าเท่ากับ 25, 23 และ 19% ตามลำดับ และยังพบว่าสารสกัดจากพืชดังกล่าวมีความสามารถในการจับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ มากกว่าการจับอนุมูลอิสระ DPPH อีกด้วย สาร catechin ในชาเขียว แอลฟา-โทโคเฟอรอล และ เควอซิทิน (quercetin) ยังมีสมบัติการป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของคอเลสเตอรอลและเบตา-ซิโทสเตอรอล (β-sitosterol) สูงกว่า BHT (Xu *et al.*, 2009) นอกจากนี้สาร catechins ในชาเขียวยังมีฤทธิ์ในการป้องกันการเกิดออกซิเดชันของ conjugated linolenic acid มากกว่า BHT (Yang *et al.*, 2009) หรือสารสกัดจาก rosemary มีประสิทธิภาพในการป้องกันการเกิดออกซิเดชันของไขมันและน้ำมันได้มากกว่า BHA และ BHT โดยการรักษาค่า thiobarbutyric acid-reactive substance (TBARS) ให้ต่ำในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกดิบแช่แข็ง (Sebranek *et al.*, 2005)

สารสกัดวิตามินอีที่สกัดได้จากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.1 mg/kg มีฤทธิ์การต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของวิตามินอีโดยการยับยั้งการเกิดมาลอนไดอัลดีไฮด์ (ผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยา

ออกซิเดชันอันดับที่สอง) ที่มีค่าสูงกว่าสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ชนิดอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เนื่องจากมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 nm ต่ำที่สุด แสดงว่าสามารถยับยั้งมาลอนไดอัลดีไฮด์ที่เกิดขึ้นได้สูงที่สุด โดยสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ที่มีฤทธิ์การต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันรองลงมาคือ แอลฟา-โทโคเฟอรอลสังเคราะห์, BHT, TBHQ และ BHA ตามลำดับ โดยความเข้มข้นของมาลอนไดอัลดีไฮด์ที่เกิดขึ้นในแต่ละสิ่งทดลองนั้นได้นำมาเปรียบเทียบกับวิธีวิเคราะห์ด้วยวิธีเฟอริกไทโอไซยาเนต ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวมีความสัมพันธ์กันกับวิธีวิเคราะห์ด้วยวิธีเฟอริกไทโอไซยาเนต โดยพบว่า สารสกัดวิตามินอีที่สกัดจากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีความแรงมากกว่าในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิกเมื่อเปรียบเทียบกับ แอลฟา-โทโคเฟอรอลสังเคราะห์, BHT, TBHQ และ BHA ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากวิตามินอีที่สกัดได้นั้น มีระดับของปริมาณโทโคไตรอีนอลสูงกว่า หรืออาจเป็นผลของ synergistic effect ของโทโคเฟอรอลและโทโคไตรอีนอล นอกจากนี้โทโคเฟอรอล และโทโคไตรอีนอลมีความสามารถในการแทรกแซงปฏิกิริยาแบบลูกโซ่ของอนุมูลอิสระได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยการให้ฟีโนลิกไฮโดรเจนกับอนุมูลเพอร์รอกซีของไขมัน (lipid peroxy radical) แต่อย่างไรก็ตาม โทโคเฟอรอล และโทโคไตรอีนอลมีระดับของการต้านอนุมูลอิสระมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับความแตกต่างของอาหาร และระบบของสิ่งมีชีวิต (Kim, 2005)

Kim (2005) ได้ศึกษาสมบัติการยับยั้งการเกิดมาลอนไดอัลดีไฮด์ของวิตามินอีที่สกัดได้จากรำข้าวเปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระชนิดต่าง ๆ ได้แก่ แอลฟา-โทโคเฟอรอลสังเคราะห์ของ Sigma aldrich และสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (BHA, BHT, TBHQ และ PG) ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 160 mg/kg ในกรดลิโนเลอิก ณ วันที่ 5 ของการบ่มโดยวิธีทดสอบด้วยกรดไทโอบาบิทิวลิก พบว่าสมบัติการยับยั้งมาลอนอัลดีไฮด์ที่เกิดขึ้นโดยวิตามินอีที่สกัดได้จากรำข้าวไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับ BHT และ BHA

2.4 สมบัติการจับอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ (superoxide radical scavenging activity) ของวิตามินอีที่สกัดจากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวโดยใช้อะซิโตไนไตรล์ด้วยวิธี winterization โดยศึกษาที่ความเข้มข้นของวิตามินอีที่มีค่า reducing power สูง และค่าการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันที่วัดโดย ferric thiocyanate method และ thiobarbituric acid test ที่มีค่าสูงสุด เปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (แอลฟา-โทโคเฟอรอลสังเคราะห์, BHA, BHT และ TBHQ) (Senevirathne *et al*., 2006; Kim, 2005; และ Nagai *et al*., 2003)

การจับอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ของวิตามินอี ที่สกัดจากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าว เปรียบเทียบกับแอลฟา-โทโคเฟอรอลสังเคราะห์ และสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ ได้แก่ BHA, BHT และ TBHQ ที่ความเข้มข้น 0.1 mg/kg พบว่าวิตามินอีที่สกัดจากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าว แอลฟา-โทโคเฟอรอลสังเคราะห์ BHT และ TBHQ มีสมบัติการจับอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์มากกว่า 50% โดยวิตามินอีที่สกัดจากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวมีสมบัติการจับอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์สูงที่สุด รองลงมา คือ แอลฟา-โทโคเฟอรอลสังเคราะห์ BHT TBHQ และ BHA ตามลำดับ ซึ่ง BHT และ TBHQ มีสมบัติการจับอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แสดงดังตาราง 3 โดยวิตามินอีที่สกัดได้จากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวในงานวิจัยนี้มีสมบัติการจับอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ เท่ากับ 68.7%

ตาราง 3 สมบัติการจับอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ (%) ของวิตามินอีที่สกัดได้ เปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ที่ความเข้มข้น 0.1 mg/kg

สารต้านอนุมูลอิสระ	การจับอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ (%)
BHA	48.6±0.8427
BHT	52.8±0.8626
TBHQ	51.4±0.7685
α-tocopherol	57.3±0.5237
วิตามินอีที่สกัดได้	68.7±0.6842

Kim (2005) ได้ศึกษาสมบัติการจับอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ของวิตามินอีที่สกัดจากรำข้าว โดยใช้ปฏิกิริยารีดักชันของ NBT เปรียบเทียบกับแอลฟา-โทโคเฟอรอลสังเคราะห์ของ Sigma aldrich และสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ ได้แก่ BHA, BHT, TBHQ และ PG ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 160 mg/kg พบว่า BHT, BHA, TBHQ, PG แอลฟา-โทโคเฟอรอลสังเคราะห์ และวิตามินอีที่สกัดได้จากรำข้าวมีสมบัติการจับอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์มากกว่า 50% โดย BHT, BHA และวิตามินอีที่สกัดได้จากรำข้าวของ Kim (2005) มีสมบัติการจับอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์สูงกว่า TBHQ, PG และแอลฟา-โทโคเฟอรอลสังเคราะห์ ซึ่ง BHT, BHA และวิตามินอีที่สกัดได้จากรำข้าวมีสมบัติการจับอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) โดยวิตามินอีที่สกัดได้จากรำข้าวของ Kim (2005) มีสมบัติการจับอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ ประมาณ 65.0% แต่วิตามินอีที่สกัดได้จากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวในงานวิจัยนี้มีสมบัติการจับอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ เท่ากับ 68.7%

ธิดารัตน์ หน่อสุวรรณ (2550) ได้ศึกษาสมบัติการจับอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ของวิตามินอีที่สกัดจากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวโดยใช้เฮกเซนที่อุณหภูมิต่ำ เปรียบเทียบกับแอลฟา-โทโคเฟอรอลสังเคราะห์ของ Sigma aldrich และสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ ได้แก่ BHA, BHT, TBHQ และ PG ที่ความเข้มข้น 10 mg/kg ผลการศึกษาพบว่า วิตามินอีที่สกัดจากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าว แอลฟา-โทโคเฟอรอลสังเคราะห์ BHA และ BHT มีสมบัติการจับอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์มากกว่า 50% โดยวิตามินอีที่สกัดจากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวมีสมบัติการจับอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับแอลฟา-โทโคเฟอรอลสังเคราะห์ และสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ชนิดอื่น ๆ โดยพบว่าวิตามินอีที่สกัดจากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวมีสมบัติการจับอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์สูงที่สุด รองลงมา คือ BHA และแอลฟา-โทโคเฟอรอลสังเคราะห์ ซึ่ง BHA และแอลฟา- โทโคเฟอรอลสังเคราะห์มีสมบัติการจับอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) กับ BHT และยังพบว่า TBHQ และ PG มีสมบัติการจับอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์น้อยที่สุด และไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

ดังนั้น ในงานวิจัยนี้ ณ ความเข้มข้น 0.1 mg/kg วิตามินอีที่สกัดได้มีค่า DPPH scavenging effect (%) มากกว่าแอลฟา-โทโคเฟอรอลสังเคราะห์, BHT, TBHQ และ BHA ตามลำดับ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 98.2, 19.1, 10.1, 10.0 และ 9.8 ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$) โดยที่ BHT, TBHQ และ BHA มีค่า DPPH scavenging effect (%) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) นอกจากนี้ วิตามินอีที่สกัดจากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวของงานวิจัยนี้ มีความสามารถในการยับยั้งการเกิดเปอร์ออกไซด์ (%) สูงที่สุด รองลงมาคือแอลฟา-โทโคเฟอรอลสังเคราะห์ BHT TBHQ และ BHA ตามลำดับ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 98.5±0.01, 74.2±0.04, 72.5±0.03,

71.6±0.02 และ 59.9±0.03 ตามลำดับ ณ วันที่ 4 ของการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก และวิตามินอีที่สกัดจากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวยังมีสมบัติการจับอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์สูงที่สุด รองลงมา คือ แอลฟา-โทโคเฟอรอลสังเคราะห์ BHT TBHQ และ BHA ตามลำดับ ซึ่ง BHT และ TBHQ มีสมบัติการจับอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) เนื่องจาก TBHQ (2-(1,1-dimethylethyl)-1,4-benzenediol) มีประสิทธิภาพในการต้านการเกิดออกซิเดชันได้ดีกว่าสารต้านอนุมูลอิสระอื่น ๆ ได้แก่ BHA (ส่วนผสมของ 2-tert-butyl-4-methoxyphenol และ 3-tert-butyl-4-methoxyphenol ซึ่งมากกว่า 90% จะอยู่ในรูป 3-isomer) และ BHT (2,6-di-tert-butyl-p-cresol หรือ 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methylphenol) เป็นต้น แต่ TBHQ มีความสามารถละลายในน้ำมันและไขมันได้ปานกลาง (5-10%) ส่วน BHT จะให้ประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชันได้ต่ำกว่า BHA เนื่องจากมีหมู่ tert-butyl อยู่รอบหมู่ไฮดรอกซิลถึง 2 หมู่ อีกทั้งในสภาวะที่มีเหล็กอยู่ด้วย BHT อาจจะทำให้เกิดสีเหลืองในผลิตภัณฑ์ได้ เนื่องจากเกิดการสร้างสาร stilbenequinone ขึ้น ซึ่ง BHA สามารถละลายได้ดีในน้ำมันและไขมัน แต่ BHT สามารถละลายในน้ำมันและไขมันได้ดีกว่า BHA (โอภา วัชระคุปต์, 2549 และ JECFA, 2005) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงพบว่า BHT และ TBHQ มีสมบัติต้านอนุมูลอิสระต่าง ๆ ดังกล่าวไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) และมีค่ามากกว่า BHA อีกด้วย แต่สำหรับวิตามินอีที่สกัดจากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวของงานวิจัยนี้ มีสมบัติการจับอนุมูลอิสระ DPPH และอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ ตลอดจนสมบัติการต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันสูงกว่าสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ทั้งแอลฟา-โทโคเฟอรอลสังเคราะห์ BHT TBHQ และ BHA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$) อาจมีผลร่วมมาจากสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของโทโคไตรอีนอลอนุพันธ์ต่าง ๆ และโอรีซานอล (oryzanol) ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญที่พบมากในดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าว

Kim (2005) ได้ศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ และแอนติออกซิแดนท์แอคติวิตีของวิตามินอีในรำข้าว โดยวัดค่าการต้านอนุมูลอิสระของวิตามินอีต่ออนุมูลอิสระ 1,1-diphemyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) ที่ความเข้มข้นของวิตามินในช่วง 2.5-640 mg/kg และศึกษาสมบัติความเป็นแอนติออกซิแดนท์ โดยการใช้ reducing power method และ ferric thiocyanate method (FTC) ที่ความเข้มข้น 0, 2.5, 10, 40 และ 160 mg/kg จากผลการทดลองพบว่าค่าการต้านอนุมูลอิสระของวิตามินอีเพิ่มขึ้น เมื่อความเข้มข้นของวิตามินอีเพิ่มสูงขึ้น และมีค่าคงที่ตั้งแต่ความเข้มข้นของวิตามินอีที่ 160 mg/kg ขึ้นไป นอกจากนี้ที่ความเข้มข้นของวิตามินอีที่ 160 mg/kg ยังมีค่าการยับยั้งการเกิด peroxidation ของกรดลิโนเลอิกสูง และเมื่อเปรียบเทียบวิตามินอีที่สกัดจากรำข้าวที่ความเข้มข้น 160 mg/kg กับสารประกอบฟีนอลสังเคราะห์ทั้ง butylated hydroxytoluene (BHT, 160 mg/kg) และ butylated hydroxyanisole (BHA, 160 mg/kg) พบว่าค่า Superoxide radical scavenging activity และ antioxidant activity ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

Gadow *et al.*, (1997) ได้ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของ Aspalathin เปรียบเทียบกับสารประกอบฟีนอลใน Rooibos Tea (*Aspalathus linearis*) แอลฟา-โทโคเฟอรอล BHT และ BHA โดยวิธีการฟอกจางสีเบตา-แคโรทีน (β-carotene bleaching) การจับอนุมูลอิสระ DPPH (α,α-diphenyl-β-picrylhydrazyl) และ automated rancimat methods พบว่า BHT มีสมบัติการยับยั้งการฟอกจางสีของเบตา-แคโรทีนมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระอื่น ๆ นอกจากนี้ยังพบว่า caffeic acid และ aspalathin มีสมบัติการจับอนุมูลอิสระ DPPH และมีอัตราการจับอนุมูลอิสระมากที่สุด ตามลำดับ aspalathin มีฤทธิ์การต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันและน้ำมันน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ BHT และแอลฟา-โทโคเฟอรอล แต่ aspalathin มีสมบัติการจับอนุมูลอิสระ DPPH มากกว่า BHT และแอลฟา-โทโคเฟอรอล

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

สภาวะที่ดีที่สุด ในการสกัดวิตามินอีจากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวคือ อัตราส่วนระหว่างดิสทิลเลตต่อเอธิโตไนไตรล์เท่ากับ 1:4 (w/v) สกัดที่อุณหภูมิ 0 และ -20°C ตามลำดับ ทำบริสุทธิ์สารสกัดที่ได้ด้วยการทำซาพอนิฟิเคชันแบบเย็น (cold saponification) วิเคราะห์หาปริมาณวิตามินอีด้วยเทคนิค Reversed-phase HPLC พบว่า ความเข้มข้นของวิตามินอีรวม (แอลฟา-, แกมมา- และเดลตา-โทโคเฟอรอล) เท่ากับ 6,788.186±55.039 mg/kg วิตามินอีที่สกัดได้จากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวเข้มข้น 0.1 mg/kg มีค่า DPPH scavenging effect สูงที่สุดเท่ากับ 98.178±0.004% และมากกว่าแอลฟา-โทโคเฟอรอลสังเคราะห์, BHT, TBHQ และ BHA ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และสามารถยับยั้งการเกิดเปอร์ออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิกได้มากกว่า 90% ภายในเวลา 24 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังมีสมบัติต้านการเกิดออกซิเดชันและความสามารถในการจับอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์มากกว่าแอลฟา-โทโคเฟอรอลสังเคราะห์ BHT TBHQ และ BHA ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัย บริษัทน้ำมันบริโภคไทย จำกัด ที่สนับสนุนดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าว ศูนย์วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ และสาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ที่สนับสนุนให้งานวิจัยสำเร็จอย่างสมบูรณ์

เอกสารอ้างอิง

ธิดารัตน์ หน่อสุวรรณ. (2550). **สมบัติของวิตามินอีที่สกัดจากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวโดยใช้เฮกเซนที่อุณหภูมิต่ำ.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

นัยนา บุญทวียุวัฒน์ และเรวดี จงสุวัฒน์. (2545). **น้ำมันรำข้าวทางเลือกเพื่อสุขภาพของคนไทย.** กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์.

นิธิยา รัตนาปนนท์. (2548). **วิทยาศาสตร์การอาหารของไขมันและน้ำมัน.** กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์.

บริษัทน้ำมันบริโภคไทย จำกัด. (2011). [online]. Available : http://www.thaiedibleoil.com/thai/detail_01.html. [2011, Jan 22].

พัชรินทร์ ระวียัน, ประมวล ศรีกาหลง และเกรียงไกร สร้อยนาค. (2551). **การสกัดวิตามินอีจากดิสทิลเลตของน้ำมันปาล์มโดยใช้ตัวทำละลายที่อุณหภูมิต่ำ.** (รายงานฉบับสมบูรณ์เสนอต่อสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย).

วราพร พงศ์ธรกุลพานิช. (2543). **การวิเคราะห์เอกลักษณ์และปริมาณโทโคเฟอรอลและโอรีซานอลในกระบวนการผลิตน้ำมันรำข้าว.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

อรอนงค์ นัยวิกุล. (2547). **ข้าว.** วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

โอภา วัชระคุปต์. (2549). **สารต้านอนุมูลอิสระ (Radical Scavenging Agents).** กรุงเทพฯ : พี.เอช.พริ้นซ์.

Almeida, M. E. M., Rusig, O., and Guzman, E. C. (2001). **Tocopherols extraction from soybean oil deodorizer distillate by saponification: the effect of acetone/water.solution composition.** IFT Annual Meeting-New Orleans, Louisiana.

AOCS. (1997). **Official methods and recommended Practices of the American Oil Chemists' Society** (5th ed.). Washington, DC: American Oil Chemists' Society Press. (Method Ce 8-89).

Carlucci, G., Mazzeo, P., Governatore, S.D., Giacomo, G.D., and Re G.D. (2001). Liquid chromatographic method for the analysis of tocopherols in malt. sprouts with supercritical fluid extraction. **J. Chromatogr.** A, 935, 87-91.

Chen, M.H., and Bergman, C.J. (2005). A rapid procedure for analyzing rice bran. tocopherol, tocotrienol and γ-oryzanol contents. **J. Food Compos. Anal,** 18, 139-151.

Cheong, J. N., Tan, C. P., Che Man, Y. B., and Misran, M. (2008). α-Tocopherol nanodispersions : Preparation, characterization and stability evaluation. **J. Food Engineering,** 89, 204-209.

Cherukuri, V., Cheruvanky, R., Lynch, I., and MacPeak, D.L. (1999). **Process for obtaining micronutrient enriched rice bran oil.** Patent No.: 5, 989, 344.

Choi, Y., and Lee, J. (2009). Antioxidant and antiproliferative properties of a tocotrienol-rich fraction from grape seeds. **Food Chem,** 114, 1386-1390.

Chu, B.S., Baharin, B.S., and Quek, S.Y. (2002). Factors affecting pre-concentration. of tocopherols and tocotrienols from palm. fatty acid distillate by lipase-catalysed hydrolysis. **Food Chem,** 79, 55-59.

Chu, B.S., Quek, S.Y., and Baharin, B.S. (2003). Optimization of enzymatic.hydrolysis for concentration of vitamin E in palm fatty acid distillate. **Food Chem,** 80, 295-302.

Delgado-Zamarreno, M.M., Bustamante-Rangel, M., Sanchez-Perez, A., and Carabias-Martinez R. (2004). Pressurized liquid extraction prior to liquid. chromatography with electrochemical detection for the analysis of. vitamin E isomers in seeds and nuts. **J. Chromatogr.** A, 1056, 249-252.

Eitenmiller, R. and Lee, J. (2004). **Vitamin E: Food chemistry, composition, and analysis.** New York: Marcel Dekker, Inc.

Feng, Z., Liu, Z., Li, X., Jia, H., Sun, L., Tian, C., Jia, L. and Liu, J. (2010). α-Tocopherol is an effective Phase II enzyme inducer : protective effects on acrolein-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in human retinal pigment epithelial cells. **J. Nutr. Biochem,** 21, 1222-1231.

Gadow, A.V., Joubert, E. and Hansmann, C. F. (1997). Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of Rooibos Tea (*Aspalathus linearis*), α-Tocopherol, BHT, and BHA. **J. Agric. Food Chem,** 45, 632-638.

Hadolin, M., Skerget, M., Knez, Z., and Bauman, D. (2001). High pressure extraction. of vitamin E-rich oil from Silybum marianum. **Food Chem,** 74, 355-364.

Hoed, V.V., Depaemelaere, G, Ayala, J.V., Santiwattana, P., Verhé, R. and Greyt, W.D. (2006). Influence of chemical refining on the major and minor components of rice bran oil. **JAOCS,** 83. 315-321.

Iqbal, S., Bhanger, M.I., and Anwar, F. (2005). Antioxidant properties and components of some commercially available varieties of rice bran in . Pakistan. **Food Chem,** 93, 265-272.

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). (2005). Gerneral. standard for food additives. **Codex Stan,** 192-1995.

Kim, J.S. (2005). Radical scavenging capacity and antioxidant activity of the E. vitamer fraction in rice bran. **J. Food Sci**, 70, 208-213.

Ko, S.-N., Lee, S.-M. and Kim, I.-H. (2008). The concentration of tocols from rice bran oil deodorizer distillate using solvent. **J. Lipid Sci and Tech.** 110, 914-919.

Lerma-García, M.J., Herrero-Martínez, J.M., Simó-Alfonso, E.F., Mendonça, C.R.B., and Ramis-Ramos, G. (2009). Composition, industrial processing and applications of rice bran γ-oryzanol. **Food Chem,** 115, 389-404.

Mendes, M.F., Pessoa, F.L.P., and Uller, A.M.C. (2005). Optimization of the process. of concentration of vitamin E from DDSO using supercritical CO_2. Brazilian **J. Chem Engineering,** 22, 83-91.

Mendes, M.F., Pessoa, F.L.P., and Uller, A.M.C. (2002). An economic evaluation. based on an experimental study of the vitamin E concentration present in. deodorizer distillate of soybean oil using supercritical CO_2. **J. Supercrit. Fluid,** 23, 257-265.

Nagai, T., Inoue, R., Inoue, H., and Suzuki, N. (2003). Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. **Food Chem,** 80, 29-33.

Naima, O., Fatiha, B., Fadila, M.B., and Mohamed, C. (2011). Antioxidant activity and separation of phenolic compounds of *Origanum glandulosum* from north Algeria by high performance liquid chromatography (HPLC). Afr. **J. Biotechnol,** 10, 3451-3454.

Papuc, C., Diaconescu, C., and Nicorescu, V. (2008). Antioxidant activity of sea buckthorn (*Hippophae Rhamnoides*) extracts compared with common food additives. **Roum. Biotechnol. Lett.,** 13, 4049-4053.

Pokorny, J., Yanishlieva, N., and Gordon, M. (2001). **Antioxidants in food practical.** applications. New York: CRC press.

Qureshi, A.A., Bradlow, B.A., Salser, W.A., and Brace, L.D. (1997). Novel tocotrienols of rice bran modulate cardiovascular disease risk. parameters of hypercholesterolemic humans. **J. Nutr. Biochem,** 8, 290-298.

Rangkadilok, N., Pholphana, N., Mahidol, C., Wongyai, W., Saengsooksree, K., Nookabkaew, S., and Satayavivad, J. (2010). Variation of sesamin, sesamolin and tocopherols in sesame (*Sesamum indicum* L.) seeds and oil products in Thailand. **Food Chem,** 122, 724–730.

Ryynanen, M., Lampi, A.M., Salo-Vaananen, P., Ollilainen, V., and Piironen, V. (2004). A small-scale sample preparation method with HPLC analysis for . determination of tocopherols and tocotrienols in cereals. **J. Food. Compos. Anal,** 17, 749-765.

Sarmento, C.M.P., Ferreira, S.R.S., and Hense, H. (2006). **Supercritical fluid extraction (SFE) of rice bran oil to obtain fractions enriched with tocopherols and tocotrienols.** *J. Chem. Engineering*, 23, 243-249.

Sebranek, J.G., Sewalt, V.J.H., Robbins, K.L., and Houser, T.A. (2005). Comparison of a natural rosemary extract and BHA/BHT for relative antioxidant effectiveness in pork sausage. **Meat Sci,** 69, 96-289.

Senevirathne, M., Kim, S.H., Siriwardhana, N., Ha, J.H., Lee, K.W., and Jeon, Y.J. (2006). Antioxidant potential of *Ecklonia cava* on reactive oxygen. species scavenging, metal chelating, reducing power and lipid peroxidation.inhibition. **Food Sci Tech Int,** 12, 27-38.

Suja, K.P., Jayalekshmy, A., and Arumughan, C. (2004). Free radical scavenging behavior of antioxidant compounds of sesame (*Sesamum indicum* L.) in DPPH• system. **J. Agric. Food Chem,** 52, 912-915.

Szulczewska-Remi, A., Nogala-Kalucka, M., Kwiatkowski, J., Lampart-Szczapa, E., and Rudzinska, M. (2004). **Preparation of tocochromanol concentrate. from red palm oil.** Industrial Chemistry Research Institite, Warsaw, Poland.

Verleyen, T., Verhe, R., Garcia, L., Dewettinck, K., and Huyghebaert, Greyt, W.D. (2001). Gas chromatographic characterization of vegetable oil.deodorization distillate. **J. Chromatogr A,** 921, 277-285.

Wells, S.R., Jennings, M.H., Rome, C., Hadjivassiliou, V., Papas, K.A., and Alexander, J.S. (2010). α-, γ-and δ-tocopherols reduce inflammatory angiogenesis in human microvascular endothelial cells. **J. Nutr. Biochem,** 21, 589–597.

Wilson, T.A., Nicolosi, R.J., Woolfrey, B., and Kritchevsky, D. (2007). Rice bran oil and oryzanol reduce plasma lipid and lipoprotein cholesterol concentrations.and aortic cholesterol ester accumulation to a greater extent than ferulic. acid. in hypercholesterolemic hamsters. **J. Nutr. Biochem,** 18, 105-112.

Xu, G., Guan, L., Sun, J. and Chen, Z.Y. (2009). Oxidation of cholesterol and β-sitosterol and prevention by natural antioxidants. **J. Agric. Food Chem,** 57, 9284-9292.

Yang, L., Cao, Y., Chen, J. N., and Chen, Z. Y. (2009). Oxidative stability of conjugated linolenic acids. **J. Agric. Food Chem,** 57, 4212–4217.

Yoshida, Y., Saito, Y., Jones, L. S., and Shigeri, Y. (2007). Chemical reactivities and physical effects in comparison between tocopherols and tocotrienols : physiological significance and prospects as antioxidant. **J. Biosci. Bioeng.,** 104, 439-445.

Zhou, Z., Robards, K., Helliwell, S., and Blanchard, C. (2002). Composition and functional properties of rice. **J. Food Sci and Tech,** 37, 849-868.

Zigoneanu, I.G., Williams, L., Xu, Z., and Sabliov, C.M.. (2008). Determination of antioxidant components in rice bran oil extracted by microwave-assisted method. **Bioresource Tech,** 99, 4910–4918.

บทปริทัศน์

เรื่อง การสกัดวิตามินอีจากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าว

โดย รองศาสตร์จารย์ ดร.วิบูลย์ รัตนาปนนท์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

วิตามินอี มีชื่อทางเคมีว่า โทโคเฟรอล (Tocopherol) มีความหมายว่า "การให้กำเนิดเด็ก" นั่นคือ ถ้าขาดวิตามินอีจะทำให้เกิดการแท้งลูก วิตามินอีจึงมีความจำเป็นในสตรีมีครรภ์ นอกจากนี้การขาดวิตามินอียังทำให้เม็ดเลือดแดงแตกง่าย ทำให้เป็นโรคโลหิตจางในคนได้ด้วย ถ้าสัตว์ทดลอง เช่น กระต่ายขาดวิตามินอีจะเป็นโรคกล้ามเนื้อขาว (white muscle disease) ต่อมามีการศึกษาวิตามินอีในระดับเซลล์ พบว่ามันมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการกำจัดอนุมูลอิสระ (free radicals) ที่เราเรียกว่า ซูเปอร์ออกไซด์ โดยวิตามินอีทำงานร่วมกับเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (SOD) วิตามินอีจัดเป็นสารแอนติออกซิเดนท์ (antioxidant) ที่สำคัญมากของร่างกาย

ปัจจุบันความต้องการวิตามินอีของร่างกายเราน่าจะสูงขึ้นเพราะการบริโภคอาหารของเราเปลี่ยนไปจากอดีตมาก โดยเราบริโภคผักผลไม้น้อยลง แต่บริโภคไขมันมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งไขมันประเภทไม่อิ่มตัว (Polyunsaturated fatty acid, PUFA) เมื่อไขมันเข้าสู่ร่างกายจะมีกระบวนการเมตะบอไลซ์ เกิดเป็นสารเปอร์ออกไซด์ (peroxide) และแตกตัวได้อนุมูลอิสระที่เรียกว่าซูเปอร์ออกไซด์ ทำให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ที่เกี่ยวข้องนำไปสู่การเกิดโรคต่าง ๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคหัวใจ โรคหลอดเลือดแดงแข็ง เป็นต้น

ดังนั้นข้อแนะนำให้บริโภควิตามินอีมากขึ้นเพื่อป้องกันโรคต่าง ๆ มีปรากฏให้เห็นทั่วไป โดยให้บริโภคในรูปของยาหรืออาหารเสริม หรือปรับปรุงการบริโภคอาหารให้มีวิตามินอีมากขึ้น เพื่อไปลดสารซูเปอร์ออกไซด์ในร่างกาย

การวิจัยที่เกี่ยวข้องกับวิตามินอีจึงควรสนับสนุน โดยเฉพาะเรื่องการผลิตวิตามินอีในราคาถูกเพื่อให้คนส่วนใหญ่ได้บริโภคอย่างทั่วถึง อย่างงานวิจัยชิ้นนี้น่าสนับสนุนมาก เพราะนำของที่ไม่ได้ใช้ประโยชน์แล้ว (Waste product) เช่น ดิสทิลเลตมาสกัดวิตามินอีและทำให้บริสุทธิ์ เพื่อนำไปทำอาหารเสริมได้ในอนาคต