

Thesis Title Antioxidant Activities, Carotenoid and Vitamin E components in bran
of Some Varieties of Thai Black Rice

Author Mrs. Muntana Nakornriab

Degree Doctor of Philosophy (Chemistry)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Sugunya Wongpornchai

Chairperson

Dr. Apiwat Baramee

Member

Dr. Pakawan Puangsombat

Member

ABSTRACT

Bran samples of three non-glutinous Thai black rice cultivars, namely, KHNBT, KHNBT No. 3, and 1000-11-2-26 and a glutinous cultivar, KHNBD, were studied for their antioxidative activities. The rice bran samples were first subjected to solvent extraction using 80% ethanol and 0.5% TFA-80% ethanol. The antioxidative activity was assessed by the thiocyanate method, an H_2O_2 -scavenging activity chemiluminescence system (XYZ system), Cu^{2+} /bathocuproine colorimetry (PAO) assay, metal ion chelating activity, and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical-scavenging activity assay. The inhibition of peroxidation by thiocyanate method was between 71-83%, the photon counts of light emission were in the range of 882-957, and the total antioxidant power is 3240-4077 $\mu\text{mol/L}$. At the antioxidant concentration of 5 mg/mL, the radical-scavenging activity is between 39.7-60.8%, and

metal chelating is 20.8-39.5 %. Overall, all of the rice brans possessed antioxidant properties in the following order: 1000-11-2-26 > KHNBD > KHNBT No. 3 > KHNBT.

Structural determination of carotenoid components was performed using supercritical fluid extraction (SFE) and subsequent analysis by high performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS) having electrospray ionization (ESI) interface. The appropriate SFE condition for extraction of carotenoids from the black rice bran samples comprised of the following parameters; temperature 45°C, pressure 6000 psi, amount of rice bran sample 2.5 g with the addition of methanol modifier at 13% of the sample cell volume and carbon dioxide was used as a supercritical fluid. These allowed the extraction time of 45 min to yield a yellow concentrated extract. Identification of carotenoids in the yellow rice extract was performed by comparing their MS/MS spectra with those of the standard reference material (SRM 3276) containing α -, β -, and γ -carotene. Only β -carotene was found in all the black rice bran samples, its contents in the rice bran samples were determined using LC-ESI-MS operated in selected ion monitoring (SIM) mode. Responses of the mass spectrometric detection in the SIM mode were linear, in the ranges of 0.30-1.2 $\mu\text{g/mL}$ ($r^2 = 0.9997$), with the limit of detection 0.10 $\mu\text{g/mL}$ and the limit of quantitation 0.60 $\mu\text{g/mL}$ of rice bran. Reproducibilities calculated as intraday and interday coefficients of variation were less than 4.0 % (RSD), the SFE extraction recoveries of β -carotene in all black rice bran extracts averaged 95.8%. β -Carotene was present in the bran of all black rice cultivars in the range of 33.5-41.5 mg/kg.

Finally, a series of vitamin E isomers; α -, β -, γ -, δ -tocopherols and α -, β -, γ -, δ -tocotrienols, were determined in bran of the four Thai black rice cultivars using

HPLC with diode array detector (DAD). The optimum condition for separation and quantification of each vitamin E isomers was as follows; a reverse phase ODS C-30 column (4.6×250 mm i.d., $5 \mu\text{m}$ particle size), methanol-water (97:3 v/v) mobile phase at a flow rate of 1.0 mL/min, and a UV detection at wavelength 295 nm. The elution times of α -, β -, γ -, δ -tocotrienol and δ -, γ -, β -, α - tocopherol, were at 12.9, 15.3, 16.1, 18.2, 20.9, 25.4, 27.2 and 31.3, min, respectively. The average percent recovery for all vitamin E isomers was 99.90. The contents of α -, β -, γ -, δ -tocotrienol and α -, β -, γ -, δ -tocopherol in the bran of all black rice cultivars were in the range of 0.08-71.88 $\mu\text{g/g}$. The method reproducibilities calculated by the intraday and interday experiments were 3.07 and 3.74 % RSD, respectively.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน องค์ประกอบแคโรทีนอยด์และวิตามินอีในรำของ
ข้าวดำพันธุ์ไทยบางพันธุ์

ผู้เขียน นางมัทนา นครเรียบ

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รองศาสตราจารย์ ดร. สุกัญญา วงศ์พรชัย

ประธานกรรมการ

ดร. อภิวัฒน์ บารมี

กรรมการ

ดร. ภควรรณ พวงสมบัติ

กรรมการ

บทคัดย่อ

รำข้าวเจ้าดำสามพันธุ์คือ พันธุ์ KHNBT, KHNBT No. 3, and 1000-11-2-26 และรำข้าวเหนียว
ดำหนึ่งพันธุ์คือ พันธุ์ KHNBD ได้ถูกนำมาหาฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน โดยเริ่มจากการสกัดรำข้าวด้วย
80% เอทานอล และ 0.5% ของกรดไทรฟลูโอโรอะซิติกกับ 80% เอทานอล ทดสอบฤทธิ์ต้านการ
เกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันโดยวิธีไทโอไซยานเนต ระบบดักจับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ด้วยการ
เรืองแสง (ระบบเอกซ์วายแซต) วิธีคอปเปอร์ทูโอออนต่อบาโรคลูโพรอิน คัลเลอร์มิเตอร์ (พีเอโอ)
ประสิทธิภาพในการจับประจุของไอออนโลหะ และการเกิดปฏิกิริยาการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
ต่อ DPPH พบว่าเปอร์เซ็นต์การออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชัน
ของลิปิดโดยวิธีไทโอไซยานเนต อยู่ระหว่าง 71-83 จำนวนโฟตอนของการเปล่งแสงอยู่ในช่วง 882-
957 และมีปริมาณรวมทั้งหมดของสารต้านออกซิเดชันอยู่ระหว่าง 3240.44-4077.77 มิลลิโมลต่อ
ลิตร ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตรมีเปอร์เซ็นต์ของความสามารถต้านออกซิเดชันอยู่ระหว่าง
39.68-60.85 และเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการจับกับไอออนของเหล็กได้ 20.80-39.56 ดังนั้น

สรุปลำดับสมบัติของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์สูงสุดจากรำข้าวพันธุ์ต่างๆ ได้ดังนี้ พันธุ์ 1000-11-2-26 มากกว่าพันธุ์ KHNBD มากกว่า พันธุ์ KHNBT No. 3 และมากกว่าพันธุ์ KHNBT

การหาโครงสร้างของสารประกอบแคโรทีนอยด์ทำโดยการสกัดสารด้วยของไหลวิกฤตยิ่งยวดยิ่ง และวิเคราะห์ด้วยลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์ที่มีอินเทอร์เฟซชนิดอิเล็กโตรสเปรย์ ออในเซชัน พบว่าสภาวะที่เหมาะสมของการสกัดด้วยของไหลวิกฤตยิ่งยวดยิ่งในการสกัดแคโรทีนอยด์ในตัวอย่างรำข้าวดำได้แก่ อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ความดัน 6000 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ปริมาณสารตัวอย่างที่ใช้ 2.5 กรัม ปริมาตรของเมทานอลที่ใช้เป็น โมดิฟายเออร์ ร้อยละ 13 ของ ปริมาตรช่องใส่ตัวอย่าง และใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นของไหลวิกฤตยิ่งยวดยิ่ง โดยใช้เวลาของการสกัดนาน 45 นาที ได้สารสกัดที่มีสีเหลือง การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแคโรทีนอยด์ในสารสกัดจากรำข้าวดำทำได้โดยการเปรียบเทียบ แมสสเปกตรัมที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมตรี-แมสสเปกโตรเมตรีของสารสกัด กับแมสสเปกตรัมของสารมาตรฐานแคโรทีนอยด์ (SRM 3276) ชนิด แอลฟา-แคโรทีน เบต้า-แคโรทีน และแกมมา-แคโรทีน พบเพียงเบต้า-แคโรทีน ในสารสกัดจากตัวอย่างรำข้าวดำ จากนั้นวิเคราะห์หาปริมาณของเบต้า-แคโรทีน ด้วยเครื่องมือ ลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์ที่มีอินเทอร์เฟซชนิดอิเล็กโตรสเปรย์ออในเซชันและเลือกเก็บข้อมูลแบบคัดเลือกอออน (เอสเอ็มไอ) ได้กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรงโดยมีค่าสัมประสิทธิ์เชิงเส้นตรงเท่ากับ 0.9997 ในช่วงความเข้มข้น 0.30-1.2 ไมโครกรัมต่อกรัม ปริมาณน้อยที่สุดของเบต้า-แคโรทีนที่สามารถตรวจวัดได้คือ 0.10 ไมโครกรัมต่อหนึ่งมิลลิกรัม และปริมาณน้อยที่สุดของรำข้าวที่สามารถวิเคราะห์ปริมาณของเบต้า-แคโรทีนได้คือ 0.6 กรัม ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของผลการวิเคราะห์ปริมาณเบต้า-แคโรทีนในตัวอย่างรำข้าวภายในวันเดียวกันและในแต่ละวันต่ำกว่า 4 % โดยมีค่าร้อยละโดยเฉลี่ยของการสกัดสำหรับการวิเคราะห์เบต้า-แคโรทีนในรำข้าวคือร้อยละ 95.8 จากการวิเคราะห์พบเบต้า-แคโรทีนในทุกตัวอย่างรำข้าวดำ อยู่ในช่วง 33.58-41.48 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

สุดท้ายทำการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินอีไอโซเมอร์ต่างๆ (แอลฟา เบต้า แกมมา เดลต้าโทโคฟีรอล และ แอลฟา เบต้า แกมมา เดลต้าโทโคไตรอีนอล) จากตัวอย่างรำข้าวดำโดยใช้ลิควิดโครมาโทกราฟี ที่มีระบบตรวจวัดสัญญาณแบบไดโอดแอเรย์ (ดีเอดี) พบสภาวะที่เหมาะสมของลิควิดโครมาโทกราฟี สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณไอโซเมอร์ได้แก่คอลัมน์แบบรีเวอร์สเฟส โอดีเอสซี สตามลึบที่มีขนาด 4.6×250 มิลลิเมตร เฟสเคลื่อนที่ ใช้สารละลายผสมของเมทานอลและน้ำในอัตราส่วน 97 ต่อ 3 มีอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ความยาวคลื่นของระบบตรวจวัดสัญญาณ 295 นาโนเมตร พบค่าร้อยละของการกลับคืนเฉลี่ยของทุกไอโซเมอร์ของวิตามินอีคือ 99.90 จากตัวอย่างรำข้าวพบปริมาณไอโซเมอร์ของวิตามินทั้งแปดตัว (แอลฟา เบต้า แกมมา เดลต้า โทโคไตรอีนอล และ แอลฟา เบต้า แกมมา เดลต้าโทโคฟีรอล) อยู่ในช่วง 0.08- 1.88

ไมโครกรัมต่อหนึ่งกรัม ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์คำนวณจากเปอร์เซ็นต์ค่าสัมประสิทธิ์ของการ
ผันแปรในหนึ่งวันและในแต่ละวันเท่ากับ 3.07 และ 3.74 % ตามลำดับ



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved