**บทที่ 4**

**ผลการทดลอง**

**4.1 การศึกษาหาความชื้นของรำข้าว**

 ความชื้นในรำข้าวจะส่งผลต่อปริมาณสารอาหารต่าง ๆ ที่มีอยู่ในตัวอย่างรำข้าว เนื่องจากการเก็บรำข้าวไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน จะส่งผลให้รำข้าวเกิดกลิ่นเหม็นหืน (Rancidity) เพราะเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของไขมัน จึงสามารถป้องกันได้โดยใช้ความร้อนเพื่อยับยั้งเอนไซม์ไลเพสและ การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ทั้งนี้เพื่อรักษาองค์ประกอบกรดไขมันและปริมาณสารสำคัญ (Loypimai et al., 2009)

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ทำการวิเคราะห์ความชื้นโดยวิธีการอบแห้งด้วยตู้อบ (Air dry oven) ซึ่งให้ผลแสดงในตารางที่ 4.1

**ตารางที่ 4.1** % ความชื้นของรำข้าวทั้ง 3 ชุมชน

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **แหล่งที่มา** | **น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)** | **% ความชื้น** |
| สวายจีก | 2.0011  | 17.6736 ± 0.2653 |
| สนวนนอก | 2.0827  | 10.8657 ± 0.4258 |
| โคกเมือง | 2.0025  | 10.6866 ± 0.3436 |

 จากผลการวิเคราะห์พบว่า รำข้าวจาก สวายจีกมีความชื้นสูงที่สุด รองลงมาคือ สนวนนอกและรำข้าวจากโคกเมืองมีความชื้นน้อยที่สุด จากนั้นจึงนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่า %สิ่งแห้ง ดังแสดงในตารางที่ 4.2 พบว่ามีค่า 88.9188 88.7261 และ 82.0248 ตามลำดับ

**ตารางที่ 4.2** % วัตถุแห้งของรำข้าว

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **แหล่งที่มา** | **น้ำหนักตัวอย่าง(หลังอบ)****(กรัม)** | **% วัตถุแห้ง** |
| สวายจีก | 1.8479± 0.0088 | 88.9188 ± 0.0068 |
| สนวนนอก | 1.7806± 0.0068 | 88.7261 ± 0.0088 |
| โคกเมือง | 1.6414± 0.0053 | 82.0248 ± 0.0053 |

**4.2 การสกัดรำข้าวด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ**

ขั้นตอนนี้ได้ทำการใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิดในการสกัดคือ เมทานอล เอทานอล และ เอทิลอะซิเตต โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาตัวทำละลายชนิดที่เหมาะสมในการสกัดที่ส่งผลต่อปริมาณของสารสำคัญในรำข้าวกลุ่มชนิดที่มีขั้วสูง ซึ่งอาจรวมถึงปริมาณของสารโปลีฟีนอลที่มีอยู่ในรำข้าวอีกด้วย

จากการทดลองพบว่ารำข้าวจาก 3 แหล่งที่มา ให้ระดับ % Yield ของสารสกัดหยาบ เมื่อใช้ตัวทำละลายเมทานอลสูงที่สุด รองลงมา คือ เอทานอลและเอทิลอะซิเตต ตามลำดับ ดังแสดงใน ตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.1 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ F. Arab et.al., (2011) ที่ได้ศึกษาสารออกฤทธิ์และกลไกต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากรำข้าวของประเทศอิหร่าน 2 สายพันธุ์ โดยใช้ ตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิดดังที่กล่าวมาข้างต้นและเห็นอย่างชัดเจนตรงกันว่าตัวทำละลายอินทรีย์ ชนิดเมทานอลจะให้ %Yield ของสารสกัดหยาบมากที่สุดและตัวทำละลายอื่น ๆ จะให้ผลรองลงมาตามลำดับเช่นกัน แสดงข้อมูลดังตารางที่ 4.3 และภาพที่ 4.1-4.2

**ตารางที่ 4.3** % Yield ของสารสกัดหยาบ

|  |  |
| --- | --- |
| **แหล่งที่มา** | **% Yield ของสารสกัดหยาบ**  |
| **เมทานอล** | **เอทานอล** | **เอทิลอะซิเตต** |
| สวายจีก | 25.995 ± 5.2587 | 13.562 ± 3.4894 | 11.888 ± 3.2562 |
| สนวนนอก | 14.887 ± 0.8414 | 13.391 ± 2.6601 | 9.590 ± 1.0685 |
| โคกเมือง | 7.6290 ± 0.9611 | 6.0590 ± 0.6614 | 4.857 ± 0.8714 |

**ภาพที่ 4.1** % yield ของสารสกัดหยาบจากรำข้าวทั้ง 3 แหล่งที่มา

 ทำการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ

**ภาพที่ 4.2** ระดับปริมาณของ %Yield ของสารสกัดหยาบจากรำข้าวทั้ง 3 แหล่งที่มา

ดังนั้นในขั้นตอนนี้จึงสามารถสรุปในเบื้องต้นได้ว่าสารสกัดที่ได้จากรำข้าวทั้ง 3 แหล่งที่มานั้นส่วนใหญ่คือสารที่มีขั้วสูงเนื่องจากสามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายเมทานอล (จากรูปที่ 4.1-4.2) และสามารถเรียงลำดับ %Yield จากมากไปน้อย ดังนี้ (1) สวายจีก (2)บ้านสนวนนอกและ (3) บ้านโคกเมือง

และเนื่องด้วยวัตถุประสงค์หลักของงานวิจัยนี้คือสนใจที่จะศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ(Bioactive compounds) กลุ่มกรดฟีนอลิกซึ่งมีรายงานว่าในรำข้าวจะพบในปริมาณมากกว่าพืชผัก ผลไม้ ถั่ว และผลไม้แห้งชนิดอื่นๆ (Wu et al., 2004) จึงได้ทำการคัดเลือกสารสกัดหยาบจาก ตัวทำละลายเมทานอลของรำข้าวทั้ง 3 แหล่งที่มาศึกษาและทำการวิเคราะห์ต่อไปในขั้นตอนที่ 4.3

**4.3** **การศึกษาปริมาณโปลีฟีนอลรวมของสารสกัดรำข้าว**

ในขั้นตอนนี้ได้ทำการหาปริมาณสารโปลีฟีนอลรวมของสารสกัดรำข้าวทั้ง 3 แหล่งที่มา ที่ผ่านการสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล จึงได้ทำการสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ พบว่าให้ค่าสมการความเป็นเส้นตรง y = 0.0006x + 0.00004

มีค่าความชัน R² เท่ากับ 0.9995 แสดงดังภาพที่ 4.3

**ภาพที่ 4.3** กราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก

จากนั้นจึงทำการเตรียมสารสกัดรำข้าวจากตัวทำละลายเมทานอลทั้ง 3 แหล่งที่มา ตามขั้นตอน ที่ 3.8.4 เพื่อหาปริมาณสารโปลีฟีนอลรวมจากสูตร

 mg GAE/g DW =

 w คือ น้ำหนักของสารสกัดรำข้าว (g)

 Slope คือ ความชันที่ได้จากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก

 Volume คือ ปริมาตรของสารสกัดทั้งหมด (ml)

 Dilution คือ ค่าการเจือจางตัวอย่างก่อนนำวิเคราะห์

ค่า W หรือน้ำหนักของสารสกัดรำข้าวจาก 3 แหล่งที่มา โดยใช้ตัวทำละลายเมทานอล ในการสกัด มีค่าเรียงตามลำดับจากบ้านสวายจีก บ้านสนวนนอกและบ้านโคกเมือง ดังนี้ 0.0194 0.0188 และ 0.0197 กรัม และมีค่าการดูดกลืนแสง (OD765) เท่ากับ 0.0349 0.0229 และ 0.0198 ตามลำดับ โดยปริมาตรรวมทั้งหมด(Volume) เท่ากับ 4.9 มิลลิลิตร มีค่าการเจือจางก่อนนำมาวิเคราะห์ (Dilution) เท่ากับ 4 และมีค่าความชันที่ได้จากกราฟมาตรฐาน กรดแกลลิก (slope) 0.0006

เมื่อทำการคำนวณหาค่าปริมาณสารโปลีฟีนอลรวม (mg GAE/g DW) ของสารสกัดรำข้าวจาก ตัวทำละลายเมทานอลทั้ง 3 แหล่งที่มา บ้านสวายจีก บ้านสนวนนอกและบ้านโคกเมือง มีค่าดังนี้ 58.33 39.70 และ 32.70 แสดงดังภาพที่ 4.4 และค่าต่าง ๆ สรุปไว้ในตารางที่ 4.4

**ภาพที่ 4.4** ปริมาณสารโปลีฟีนอลรวมในตัวอย่างสารสกัดรำข้าวทั้ง 3 แหล่งที่มา

 ในขั้นตอนนี้จึงสามารถสรุปได้ว่าปริมาณสารโปลีฟีนอลรวมจากสารสกัดรำข้าวจากบ้านสวายจีกมีค่าสูงที่สุดรองลงมาคือบ้านสนวนนอกและบ้านโคกเมือง และเมื่อเทียบจากค่า %Yield จากตารางที่ 4.3 จากนั้นจึงทำการวิเคาะห์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่อไปในขั้นตอนที่ 4.4

**ตารางที่ 4.4** สรุปข้อมูลค่าต่างๆที่ใช้ในการคำนวณหาปริมาณสารโปลีฟีนอลรวมในตัวอย่างสารสกัด

 รำข้าวทั้ง 3 แหล่งที่มา

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **แหล่งที่มา****ของรำข้าว** | **น้ำหนักของ****สารสกัดรำข้าว** **(กรัม)** | **ค่าการเจือจางก่อนนำมาวิเคราะห์** | **ปริมาตรของ****สารสกัดทั้งหมด** **(ml)** | **ค่าการดูด****กลืนแสง****(OD)** | **ค่าปริมาณสาร****โปลีฟีนอลรวม** **(mg GAE/g DW)** |
| สวายจีก | 0.0194 | 4 | 4.9  | 0.0349 ± 0.0092 |  58.33  |
| สนวนนอก | 0.0188  | 4 | 4.9  | 0.0229 ± 0.0022 |  39.70  |
| โคกเมือง | 0.0197  | 4 | 4.9  | 0.0198 ± 0.0005 |  32.70  |

40

**4.4 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรำข้าวด้วยวิธีดีพีพีเอช (DPPH)**

 จากผลการทดลองที่ 4.3 พบว่าปริมาณของสารโปลีฟีนอลรวมทั้งหมดในสารสกัดรำข้าวจากหมู่บ้านสวายจีกมีปริมาณที่สูงที่สุดตามด้วยหมู่บ้านโคกเมืองและหมู่บ้านสนวนนอกตามลำดับ ดังนั้นในขั้นตอนนี้จึงได้ทำการทดสอบเพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรำข้าวต่อโดยเปรียบเทียบกับการใช้สารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid)ซึ่งปรับปรุงจากวิธีการของ Yingngam et al. (2014) โดยสร้างกราฟมาตรฐานของกรดแอสคอร์บิกที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ แล้วจึงทำการคัดเลือกช่วงความเป็นเส้นตรงที่เหมาะสม แสดงดังภาพกราฟมาตรฐานที่ 4.5

**ภาพที่ 4.5** กราฟมาตรฐานของกรดแอสคอร์บิก

จากนั้นจึงทำการคำนวณค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ DPPH เมื่อเทียบอยู่ในรูปของ กรดแอสคอร์บิก จากสูตร

mg Vitamin C/g DW=

 w คือ น้ำหนักของสารสกัดรำข้าว (g)

 Slope คือ ความชันที่ได้จากกราฟมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก

 Volume คือ ปริมาตรของสารสกัดทั้งหมด (ml)

 Dilution คือ ค่าการเจือจางตัวอย่างก่อนนำวิเคราะห์

ซึ่งก่อนจะทำการคำนวณหาค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ DPPH เมื่อเทียบอยู่ในรูปของ กรดแอสคอร์บิกจะต้องทราบค่า %Inhibition ของสารสกัดรำข้าวจากทั้ง 3 แหล่งที่มา ซึ่งแสดงค่าที่ใช้ในการคำนวณไว้ในตารางที่ 4.5 และผลของ %Inhibition แสดงในตารางที่ 4.6 และภาพที่ 4.6

จากสูตร

**Inhibition(%)** =

โดยที่

 A0 = ethanol 3 ml + DPPH 1 mL= 0.7088 ± 0.0024

A1 = sample 3 ml + DPPH 1 mL

 A2 = sample 3 ml + ethanol 1 mL

**ตารางที่ 4.5** ข้อมูลที่ใช้ในการคำนวณหาค่า %Inhibition ในสารสกัดจากรำข้าว

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **แหล่งที่มา****ของสารสกัดจาก****รำข้าว** | **A0****ethanol 3 ml + DPPH (1 ml)** | **A1** **sample 3 ml + DPPH (1 ml)** | **A2** **sample 3 ml + ethanol (1 ml)** |
| สวายจีก |  0.7088 ± 0.0024 | 0.1046 ± 0.0029 | 0.0051 ± 0.0001 |
| สนวนนอก | 0.0423 ± 0.0035 | 0.0081 ± 0.0001 |
| โคกเมือง | 0.3543 ± 0.0110 | 0.0069 ± 0.0001 |

**ตารางที่ 4.6** ค่า %Inhibition ในสารสกัดจากรำข้าว

|  |  |
| --- | --- |
| **แหล่งที่มาของรำข้าว** | **%Inhibition** |
| สวายจีก | 85.9669 ± 0.4080 |
| สนวนนอก | 95.1749 ± 0.4986 |
| โคกเมือง | 50.9875 ± 1.5535 |

**ภาพที่ 4.6** %Inhibition ของสารสกัดจากรำข้าว

จากการทดลองพบว่า % Inhibition ที่คำนวณได้ ของสารสกัดจากรำข้าวทั้ง 3 แหล่งที่มา มีค่าเรียงลำดับจากมากไปน้อย ดังนี้ บ้านสนวนนอก บ้านสวายจีก และบ้านโคกเมือง หลังจากนั้นจึงนำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหา ค่ากิจกรรมการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่าวิตามินซี (mg Vitamin C/g DW) พบว่าบ้านสวนนอกมีค่ามากที่สุดคือ 61.9050 ± 0.3094 mg Vitamin C/g DW รองลงมาคือบ้านสวายจีกและบ้านโคกเมืองตามลำดับ ดังแสดงข้อมูลในตารางที่ 4.7 และภาพที่ 4.7

**ภาพที่ 4.7** ค่ากิจกรรมการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่าวิตามินซี

(mg Vitamin C/g DW) ของตัวอย่างสารสกัดรำข้าวทั้ง 3 แหล่งที่มา

 ผลการทดลองในขั้นตอนนี้พบว่า %Inhibition และค่ากิจกรรมการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่าวิตามินซี (mg Vitamin C/g DW) ของบ้านสวายจีกและบ้านสนวนนอกมีค่าที่ใกล้เคียงกันแต่แตกต่างจากบ้านโคกเมือง ดังนั้นจึงได้ทำการทดสอบเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของค่ากิจกรรมการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่าวิตามินซี (mg Vitamin C/g DW) ของสารสกัดจากรำข้าวทั้ง 3 แหล่งโดยใช้สถิติ One Way ANOVA (F-test) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เพื่อวิเคราะห์ต่อไป

**4.5 การวิเคราะห์ข้อมูลฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทางสถิติ**

ในขั้นตอนนี้จะเป็นการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบจำแนกทางเดียว (One way analysis of variance : One way ANOVA) หรือใช้สถิติ F-test ด้วยโปรแกรม SPSS เพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของค่ากิจกรรมการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่าวิตามินซี (mg Vitamin C/g DW) สารสกัดรำข้าวของบ้านสวายจีก บ้านสนวนนอกและบ้านโคกเมือง พบว่าให้ค่า Sig. เท่ากับ 0.091 ซึ่งมากกว่าระดับนัยสำคัญ 0.05 ซึ่งหมายความว่าความแปรปรวนของกลุ่มตัวอย่างแต่ละกลุ่มเท่ากันไม่ฝ่าฝืนข้อตกลงเบื้องต้นของการใช้สถิติดังกล่าว จากนั้นจึงทำการเปรียบเทียบรายคู่ด้วยวิธีการของ Turkey เนื่องจากกลุ่มตัวอย่างแต่ละกลุ่มมีจำนวนเท่ากัน พบว่าค่ากิจกรรมการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเทียบเท่าวิตามินซี(mg Vitamin C/g DW) ของรำข้าวทั้ง 3 แหล่งที่มาคือ บ้านสวายจีก บ้านสนวนนอกและบ้านโคกเมืองแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.01

**ตารางที่ 4.7** สรุปข้อมูลค่าต่างๆที่ใช้ในการคำนวณหาค่ากิจกรรมการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่าวิตามินซี(mg Vitamin C/g DW) ของตัวอย่างสารสกัดรำข้าวทั้ง 3 แหล่งที่มา

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **แหล่งที่มาของรำข้าว** | **น้ำหนักของสารสกัดรำข้าว** **(กรัม)** | **ค่าการเจือจางก่อนนำมาวิเคราะห์** | **ปริมาตรของ****สารสกัดทั้งหมด** **(ml)** | **ค่าความชัน****(Slope)** | **ค่ากิจกรรมการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่าวิตามินซี** **(mg Vitamin C/g DW)** |
|  บ้านสวายจีก | 0.0194  | 4 | 4 | 1.3021 | 57.3491 ± 0.2584 |
|  บ้านสนวนนอก | 0.0198 | 4 | 4 | 1.3021 | 61.9050 ± 0.3094 |
|  บ้านโคกเมือง | 0.0197 | 4 | 4 | 1.3021 | 34.6574 ± 0.9690 |

45