ผลของชนิดตัวทำละลายและความเข้มข้นของกรดซิตริกที่มีต่อการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากข้าวหอมนิล

เอนก หาลี[1*] และ บุณยกฤต รัตนพันธุ์[2]
มหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร ตำบลนครชุม อำเภอเมือง จ.กำแพงเพชร 62000

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากข้าวหอมนิล โดยตัวทำละลายที่ใช้คือ น้ำ เมทานอลและเอทานอล ร่วมกับการใช้กรดซิตริกความเข้มข้น 0, 0.05 และ 0.1 mol/dm^3 จากนั้นทำการศึกษาประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ 3 วิธีคือ ABTS, DPPH และ FRAP รวมถึงหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและแอนโทไซยานิน จากผลการทดลอง พบว่า การสกัดด้วยน้ำร่วมกับกรดซิตริกความเข้มข้น 0.1 mol/dm^3 ได้ปริมาณแอนโทไซยานินสูงที่สุดเท่ากับ 23.01 μg/ml นอกจากนี้ พบว่า การใช้น้ำให้ประสิทธิภาพในการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระได้ดีใกล้เคียงกับการสกัดด้วยเมทานอล แต่ได้ปริมาณแอนโทไซยานิน ค่า ABTS และ FRAP ที่สูงกว่ากรณีการสกัดด้วยเมทานอล

คำสำคัญ : การสกัด / สารต้านอนุมูลอิสระ / ข้าวหอมนิล / กรดซิตริก

* *Corresponding Author : Author : nek__ha@hotmail.co.th*

1 *อาจารย์ โปรแกรมวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*

2 *ผู้ช่วยศาสตราจารย์ โปรแกรมวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*

Effects of Solvent Type and Concentration of Citric Acid on the Extraction of Antioxidants from Hom Nin Rice

Anek Halee[1*] and Boonyakrit Rattanapun[2]

Kamphaeng Phet Rajabhat University, Tambon Nakornchum, Amphoe Muang, Kamphaeng Phet, 62000

Abstract

This research aimed to study the use of different solvents for the extraction of antioxidants from Hom nin rice. The solvents used were water, methanol and ethanol in combination with citric acid at concentrations of 0, 0.05 and 0.1mol/dm^3. The effectiveness of the antioxidants was measured by the ABTS DPPH and FRAP assays. The contents of phenolic compounds and anthocyanins were also determined. The results showed that the extracts obtained using water with 0.1 mol/dm^3 of citric acid exhibited the highest anthocyanin content (23.01 µg/ml). Water was noted to have similar extraction efficiency to methanol. However, using water as an extraction solvent led to the extract with higher anthocyanin content and antioxidant activity (via both the ABTS and FRAP assays) than by using methanol.

Keywords : Extraction / Antioxidant / Hom Nin Rice / Citric Acid

* *Corresponding Author : nek__ha@hotmail.co.th*

1 *Lecturer, Division of Food Science and Technology, Faculty of Science and Technology.*

2 *Assistant Professor, Division of Food Science and Technology, Faculty of Science and Technology.*

1. บทนำ

ข้าว (rice) จัดเป็นธัญพืชและเป็นผลผลิตที่สำคัญของประเทศไทย ซึ่งเป็นอาหารหลักของประชากรมากกว่าครึ่งโลก [1,2] นอกจากอุดมไปด้วยสารอาหารที่มีประโยชน์เช่น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน เยื่อใย วิตามินและแร่ธาตุ แล้วยังพบว่าข้าวมีองค์ประกอบที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายมนุษย์อีกหลายชนิดคือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) [3] โดยเฉพาะข้าวที่มีสี ได้แก่ ข้าวสีดำ สีม่วงและสีแดง เป็นต้น รงควัตถุสีม่วงดำหรือสีแดงที่พบในข้าวส่วนใหญ่เป็นสารกลุ่ม แอนโทไซยานิน [4] สายพันธุ์ข้าวมีสีที่น่าสนใจคือ ข้าวหอมนิลเพราะเป็นข้าวที่มีคุณค่าทางโภชนาการที่สูงกว่าข้าวสายพันธุ์อื่นได้แก่ มีปริมาณโปรตีน วิตามินและแร่ธาตุที่สูง [5] นอกจากนี้ยังพบว่า ข้าวหอมนิลมีสารที่มีประโยชน์หลายชนิด เช่น แกมมาออริซานอล (γ-oryzanol) โทโคเฟอรอล (tocopherols) โทโคไตรอินอล (tocotrienols) ไฟโตสเตอรอล (phytosterols) และกรดไฟติค (phytic acid) เป็นต้น [6] ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ สามารถช่วยลดการเสี่ยงของการเป็นโรคมะเร็ง ภาวะอุดตันของหลอดเลือดที่หล่อเลี้ยงเนื้อเยื่อหัวใจ รวมถึงการป้องกันโรค Alzheimer's โรคภูมิแพ้และเพิ่มระดับของเอชดีแอลคอเลสเตอรอลในเลือด [7] นอกจากนี้ในข้าวหอมนิลยังมี แอนโทไซยานิน ซึ่งเป็นรงควัตถุชนิดหนึ่งมีรายงานการวิจัยพบว่า รงควัตถุกลุ่มนี้มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าวิตามินซี วิตามินอีและเบต้าแคโรทีน (beta-carotene) โดยแอนโทไซยานินสามารถลดไขมันอุดตันในเส้นเลือดลดระดับคอเลสเตอรอล ในร่างกายมนุษย์ ป้องกันโรคหัวใจและโรคความดันโลหิตสูงยับยั้งการเจริญเติบของเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ ในร่างกาย เช่น มะเร็งปอด เต้านม กระเพาะอาหารและเม็ดเลือดขาวและยังป้องกันไวรัส HSV-1 เป็นต้น [8] มีรายงานการวิจัยที่ศึกษาถึงการใช้ประโยชน์จากพืชชนิดอื่นที่มีส่วนประกอบของแอนโทไซยานินเพื่อสุขภาพและเป็นสีผสมอาหาร เช่น สีม่วงจากข้าวเหนียวดำ [9] สีแดงจากกระเจี๊ยบแดง เป็นต้น ซึ่งการใช้ประโยชน์จากพืชดังกล่าวได้มาจากการสกัด โดยการสกัดมีด้วยกันหลายวิธี แต่วิธีที่ได้รับความนิยมคือการใช้ตัวทำละลายในการสกัด เนื่องจากเป็นวิธีการที่ง่าย ค่าใช้จ่ายค่อนข้างต่ำ ตัวทำละลายที่นิยมนำมาใช้สกัดมีด้วยกันหลายชนิด ได้แก่ น้ำ เอทานอล เมทานอล อะซิโตนและเฮกเซน เป็นต้น ซึ่งสอดคล้องกับ Sharma และคณะ [10] ได้ทำการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระและสารประกอบฟีนอลิกในน้ำผลไม้โดยใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกัน พบว่า การใช้น้ำ เอทานอล เมทานอล และอะซิโตน มีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระและสารประกอบฟีนอลิกที่สูงใกล้เคียงกันอยู่ในช่วง 21.3-26.0 GAE mg/100 ml และร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ 63.4-84.0 ตามลำดับ ทั้งนี้การเลือกใช้ตัวทำละลายขึ้นอยู่กับกลุ่มของสารที่ต้องการสกัด นอกจากนี้ยังนิยมใช้กรดมาช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดเพราะช่วยในการทำลายผนังเซลล์ของพืชทำให้สารต้านอนุมูลอิสระถูกปลดปล่อยออกมาได้มากขึ้นและทำให้สารต้านอนุมูลอิสระบางชนิด เช่น แอนโทไซยานินมีความคงตัวมากขึ้น โดยกรดที่นิยมใช้ ได้แก่ กรดไฮโดรคลอลิก กรดซิตริกและกรดอะซิติก โดย Routray และ Orsat [11] ได้ใช้กรดซิตริกช่วยในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกและแอนโทไซยานิน จากใบของต้นบลูเบอรี่ พบว่า ปริมาณสารประกอบ ฟีนอลิกและแอนโทไซยานินเพิ่มขึ้นเมื่อใช้กรดซิตริกช่วยสกัด นอกจากนี้ Kim และคณะ [12] ได้ศึกษาใช้กรดไฮโดรคลอริก กรดซัลฟิวริกและกรดอะซิติก ในการสกัด Paclitaxel จากพืชเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพบว่า การใช้กรดช่วยสกัดมีปริมาณ Paclitaxel สูงกว่าไม่ใช้กรดช่วยเช่นกัน แต่งานวิจัยนี้เลือกใช้กรดซิตริกเพราะเป็นกรดอินทรีย์ที่ปลอดภัยและกลิ่นไม่แรง

ดังนั้น การสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากข้าวหอมนิลจึงจำเป็นที่ต้องหาชนิดของตัวทำละลายและความเข้มข้นของกรดที่ใช้ในการช่วยสกัดเพื่อให้ได้ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด ซึ่งเป็นวิธีการสำคัญที่จะนำสารต้านอนุมูลอิสระมาใช้ประโยชน์ เนื่องจากมีต้นทุนในการผลิตที่ต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับการสกัดด้วยวิธีการอื่น นอกจากนี้ยังเป็นแนวทางในการเพิ่มมูลค่าให้แก่ผลิตผลทางการเกษตร และสามารถประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารต่อไป

2. วัตถุดิบและวิธีการทดลอง

2.1 การคัดเลือกตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ ข้าวหอมนิล (Oryza sativa L.) จากบ้านหนองปิ้งไก่ ตำบลนาบ่อคำ

อำเภอเมือง จังหวัดกำแพงเพชร ใช้ข้าวหอมนิลที่ผ่านการสีแบบกะเทาะเปลือก หลังจากสีไม่เกิน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาบดตัวอย่างให้ละเอียดและทำการร่อนผ่านตะแกรงขนาด 100 mesh เก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสม ในการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระต่อไป

2.2 การสกัดสารต้านอนุมูลอิสระ

การสกัดสารต้านอนุมูลอิสระมีการศึกษา 2 ปัจจัย คือ ชนิดของตัวทำละลาย ได้แก่ น้ำ เอทานอล เมทานอล และระดับความเข้มข้นของกรดซิตริกที่ใช้ได้แก่ 0, 0.05 และ 0.1 mol/dm^3 (M) ซึ่งพบว่าสารละลายดังกล่าวมีค่า pH เท่ากับ 6.89, 2.27 และ 2.07 ตามลำดับ การสกัดทำโดยการชั่งตัวอย่าง ข้าวหอมนิล 5 กรัม สกัดด้วยตัวทำละลาย 50 มิลลิลิตรจากนั้นนำไปเขย่าบนเครื่อง shaker ที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 และทำการสกัดด้วยวิธีเดิมอีกครั้ง นำสารสกัดที่ได้ทั้งสองครั้งรวมกัน ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตรด้วย ตัวทำละลายที่ใช้ [13,14] นำสารสกัดจากข้าวหอมนิลไปทดสอบสมบัติต่อไป

2.3 การทดสอบสมบัติของสารสกัดจากข้าวหอมนิล

นำสารสกัดข้าวหอมนิลที่ได้ไปทำการทดสอบสมบัติต่างๆ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยมีการทดสอบดังนี้

2.3.1 วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกด้วยเทคนิค Folin-Ciocalteu method โดยใช้ gallic acid เป็นสารมาตรฐานเริ่มจากปิเปตสารสกัดตัวอย่างปริมาตร 200 µl ใส่ในหลอดทดลองเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu ปริมาตร 800 µl และเติมน้ำกลั่นปริมาตร 4 ml ผสมให้เข้ากันเติมสารละลาย Na_2CO_3 ความเข้มข้นร้อยละ 7.5 ปริมาตร 2 ml เขย่าให้เข้ากัน 2 นาทีเติมน้ำกลั่น 3 ml ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิ ห้อง 2 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 nm สำหรับ blank ใช้น้ำกลั่นแทนสารสกัดตัวอย่างและใช้ gallic acid ที่ความเข้มข้น 5, 10, 20, 50, และ 100 ppm เป็นสารมาตรฐาน รายงานผลในหน่วยของ mg of gallic acid ต่อตัวอย่างข้าวหอมนิล 1 g [15]

2.3.2 Total anthocyanin content โดยใช้เทคนิค pH differential method บัฟเฟอร์ที่ใช้คือ KCl pH 1 และ CH_3COONa pH 4.5 ดัดแปลงจากวิธีการของ Wrolstad และ Giusti [16] ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 และ 700 nm. ตามลำดับ คำนวณในรูป cyanidin-3-glucoside โดยมีวิธีการคำนวณดังนี้

$$\text{Anthocyanins(mg/100g)} = (A \times Mw \times 1000)/(\varepsilon \times 1)$$

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

Mw = 449.2 g/mol for cyanidin-3-glucoside

ε = 26900 molar extinction coefficient in L/mol/cm for cyanidin-3-glucoside

1 = pathlength in cm

1000 = conversion from g to mg

2.3.3 ประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากข้าวหอมนิล

โดยการทดสอบประสิทธิภาพในการต้านสารอนุมูลอิสระใช้ 3 วิธีคือ

- ABTS ปิเปตสารสกัดตัวอย่างปริมาตร 150 µl ใส่ในหลอดทดลองเติมสารละลาย ABTS ปริมาตร 2850 µl ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมงวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm คำนวณในรูปของ µmol/g of TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) [17] สำหรับ blank ใช้น้ำกลั่นแทนสารสกัดตัวอย่าง และใช้ Trolox ความเข้มข้น 25, 50, 100, 300, และ 600 µM เป็นสารมาตรฐานรายงานผลในหน่วยของ µmol Trolox ต่อตัวอย่างข้าวหอมนิล 1 g

- DPPH radical scavenging ability โดยใช้ 2,2- diphenyl - 1 - picryl - hydrazyl radical (DPPH) เป็นอนุมูลอิสระคำนวณในรูปของ µmol/g of TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) [18] เริ่มจากปิเปตสารสกัดตัวอย่างปริมาตร 150 µl ใส่ในหลอดทดลองเติมสารละลาย DPPH เข้มข้น 0.6 mM ปริมาตร

3 ml ผสมให้เข้ากันเก็บในที่มืดอุณหภูมิห้อง 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank แทนสารสกัดตัวอย่างและใช้ Trolox ความเข้มข้น 25, 50, 100, 300, และ 600 μM เป็นสารมาตรฐานรายงานผลในหน่วยของ μmol Trolox ต่อตัวอย่างข้าวหอมนิล 1 g

- Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) เริ่มจากปิเปตสารสกัดตัวอย่างปริมาตร 150 μl ใส่ในหลอดทดลองเติมสารละลาย FRAP ปริมาตร 2850 μl ผสมให้เข้ากันเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm คำนวณในรูปของ μmol/g of TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) [19] สำหรับ blank ใช้น้ำกลั่นแทนสารสกัดตัวอย่าง และใช้ Trolox ความเข้มข้น 25, 50, 100, 300, และ 600 μM เป็นสารมาตรฐานรายงานผลในหน่วยของ ตmol Trolox ต่อตัวอย่างข้าวหอมนิล 1 g

2.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

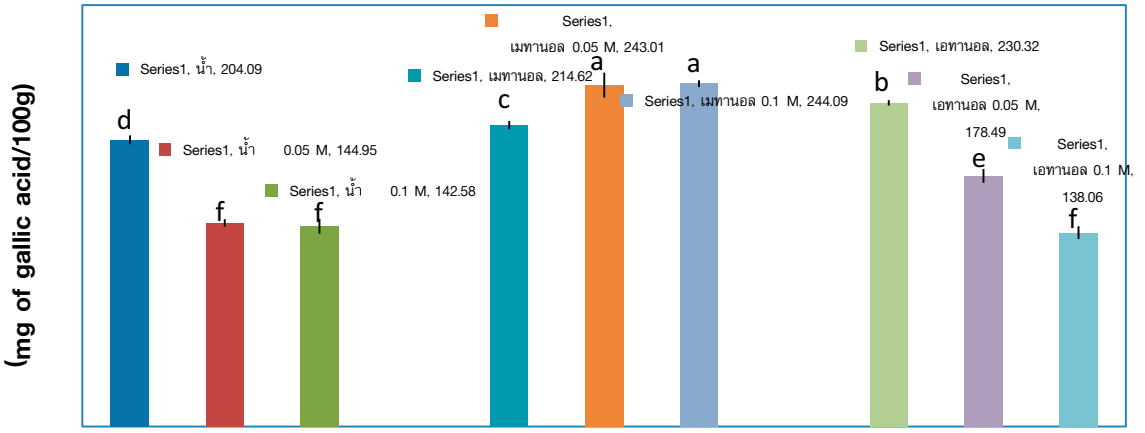
ทำการทดลอง 3 ซ้ำวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล (ANOVA) โดยการจัดสิ่งทดลองแบบ Factorial และวางแผนการทดลองแบบ CRD สำหรับการวิเคราะห์สมบัติทุกด้านทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยใช้โปรแกรม SPSS Version 17.0

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

3.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดจากข้าวหอมนิล

เมื่อได้สารสกัดจากข้าวหอมนิลแล้วจึงทำการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก โดยคำนวณในรูปของ milligram of gallic acid แสดงดังรูปที่ 1 จากผลการทดลองพบว่า ชนิดของตัวทำละลายและความเข้มข้นของกรดซิตริกมีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่สกัดได้จากข้าวหอมนิลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยการสกัดด้วยเมทานอลมีแนวโน้มของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงที่สุด รองลงมาคือ เอทานอลและน้ำ ตามลำดับ นอกจากนี้ พบว่า ปัจจัยทั้งสองคือ ชนิดของตัวทำละลายและความเข้มข้นของกรดซิตริกมีปฏิสัมพันธ์กัน โดยการสกัดด้วยน้ำและเอทานอล จะมีแนวโน้มของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกลดลงเมื่อใช้กรดซิตริกที่ความเข้มข้นที่สูงขึ้น ส่วนการสกัดด้วยเมทานอลจะมีแนวโน้มของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงขึ้นเมื่อใช้กรดซิตริกที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นตามลำดับแสดงว่า น้ำและเอทานอลมีปฏิสัมพันธ์เชิงลบกับความเข้มข้นของกรดซิตริกส่วนเมทานอลมีปฏิสัมพันธ์เชิงบวกกับกรดซิตริก ซึ่งการสกัดด้วยเมทานอลร่วมกับกรดซิตริกความเข้มข้น 0.1 M ได้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงที่สุดคือ 244.09 milligram of gallic acid ส่วนปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่สูงที่สุดของการสกัดด้วยน้ำและเอทานอล พบว่า การสกัดด้วยน้ำและเอทานอลที่ไม่ใช้กรดซิตริกช่วยสกัดได้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเท่ากับ 204.09 และ 230.32 milligram of gallic acid ตามลำดับ ถือว่ามีปริมาณที่ไม่ต่างกันมากนัก สาเหตุที่เป็นเช่นนี้เพราะสารประกอบฟีนอลิกที่พบได้ในพืชเกือบทุกชนิด ส่วนใหญ่อยู่ในรูปแบบที่มีขั้วละลายน้ำได้ [20] ซึ่งการสกัดสารประกอบฟีนอลิกมักใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เพราะต่างก็เป็นสารอินทรีย์เหมือนกันจึงเกิดการละลายกันตามหลักการละลายกันได้ (like dissolves like) ตัวทำละลายอินทรีย์ที่นิยมใช้สำหรับสกัดสารประกอบฟีนอลิกได้แก่ เมทานอลเอทานอล [21] นอกจากนี้ยังเป็นสารที่มีความปลอดภัยกว่าตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดอื่น ซึ่งผลการทดลองที่ได้มีความสอดคล้องกับการทดลองของ Arab และคณะ [22] ได้ทำการศึกษาชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากข้าว 2 สายพันธุ์คือ Fajr และ Tarem ตัวทำละลายที่ใช้คือ เมทานอล เอทานอล และเอทิลอะซิเตท พบว่า การใช้เมทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงที่สุด รองลงมาคือเอทานอลและเอทิลอะซิเตท ตามลำดับ รวมถึง Tan และคณะ [23] ได้ศึกษาการใช้น้ำและเมทานอลในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากข้าวสายพันธุ์ temukut พบว่า การสกัดด้วยเมทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงกว่าการสกัดด้วยน้ำ นอกจากนี้ Pinelo และคณะ [24] ได้ทำการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากขี้เลื่อยจากต้นสนโดยใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกันคือ น้ำ เมทานอล และเอทานอล พบว่า การสกัดด้วยเมทานอลได้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุด รองลงมาคือการสกัดด้วยเอทานอลและน้ำ ตามลำดับ เช่นเดียวกับ Jianmei และคณะ [25] ได้

ทำการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากผิวของถั่วลิสงโดยใช้น้ำ เมทานอล และเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 80 พบว่าการสกัดด้วยเมทานอลได้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุด รองลงมาคือการสกัดด้วยเอทานอลและน้ำ โดยมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกคำนวณในรูปของ milligram of gallic acid ต่อตัวอย่างแห้ง 1 กรัม เป็น 90.1 89.9 และ 56.7 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังได้ผลการทดลองที่สอดคล้องกับ Bahar และคณะ [26] ที่ได้ศึกษาผลของเอทานอลร่วมกับกรดซิตริกที่มีต่อการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากผลมะกอก โดยใช้กรด ซิตริกเข้มข้นร้อยละ 30 ปริมาตร 5 10 และ 15 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักตัวอย่าง 1 กิโลกรัม พบว่า การใช้กรดซิตริก 10 มิลลิลิตรในการช่วยสกัดมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงที่สุดแต่เมื่อใช้กรดซิตริกในปริมาณสูงขึ้นกลับพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมีปริมาณลดลง ทั้งนี้เป็นเพราะการใช้กรดมาช่วยในการสกัดมีผลทำให้ผนังเซลล์ของพืชแตกออกได้ง่ายส่งผลให้สารประกอบฟีนอลิกหรือสารสำคัญถูกปลดปล่อยออกมาได้มากขึ้น แต่การใช้กรดในปริมาณที่มากเกินไปมีผลทำให้โครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกถูกทำลายและไปจับกับโพลิแซคคาไรด์ ที่อยู่ในพืชได้เป็นสารประกอบตัวอื่นที่ไม่ใช่สารประกอบฟีนอลิกส่งผลให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกลดลง นอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นว่า ตัวทำละลายแต่ละชนิดยังมีความเข้มข้นของกรดซิตริกที่เหมาะสมแตกต่างกันอีกด้วย

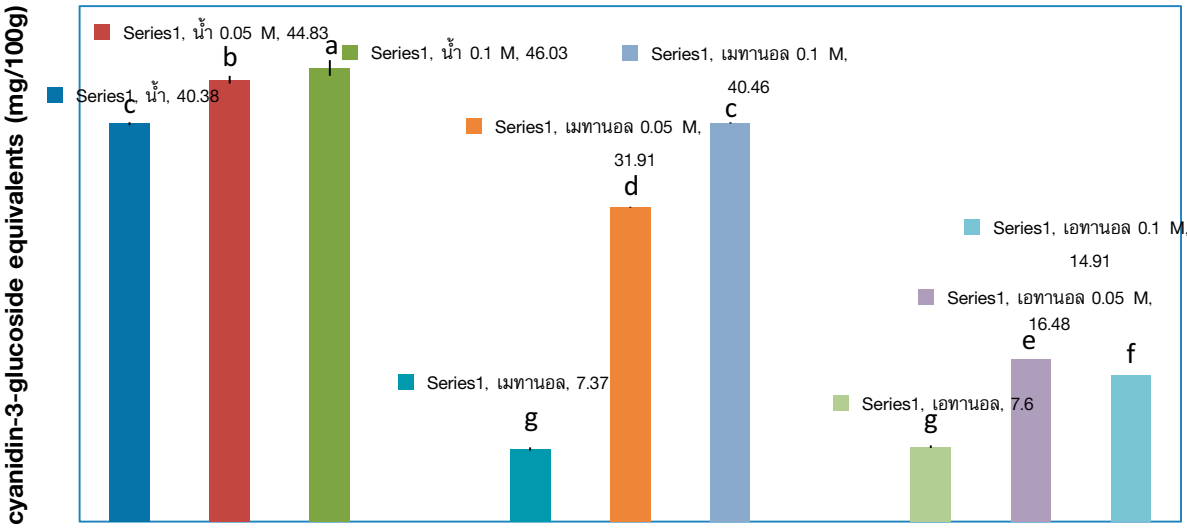


รูปที่ 1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่สกัดจากข้าวหอมนิลโดยใช้ตัวทำละลายร่วมกับการใช้กรดซิตริกความเข้มข้นต่างกัน

3.2 ปริมาณแอนโทไซยานินของสารสกัดจากข้าวหอมนิล

การศึกษาปริมาณแอนโทไซยานินของสารสกัดจากข้าวหอมนิลได้ผลการทดลองดังรูปที่ 2 พบว่า การสกัดด้วยน้ำมีปริมาณแอนโทไซยานินสูงที่สุด รองลงมาคือ เมทานอลและ เอทานอล ตามลำดับ ทั้งนี้เพราะแอนโทไซยานินละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้วซึ่ง น้ำเป็นตัวทำละลายที่มีสภาพมีขั้วแรงที่สุด รองลงมาคือเมทานอลและเอทานอล นอกจากนี้พบว่า ชนิดของตัวทำละลายและความเข้มข้นของกรดซิตริก มีผลต่อปริมาณแอนโทไซยานิน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยการสกัดด้วยน้ำร่วมกับกรดซิตริกความเข้มข้น 0.1 M มีปริมาณแอนโทไซยานินสูงที่สุดคือ 23.01 μg/ml ส่วนการสกัดแอนโทไซยานินด้วยตัวทำละลายชนิดอื่นพบว่ามีปริมาณแอนโทไซยานินอยู่ในช่วง 3.69-22.42 μg/ml นอกจากนี้ พบว่า ปัจจัยทั้งสองคือ ชนิดของตัวทำละลายและความเข้มข้นของกรดซิตริกมีปฏิสัมพันธ์กัน โดยการสกัดด้วยน้ำ เมทานอลและเอทานอลจะมีแนวโน้มของปริมาณแอนโทไซยานินเพิ่มขึ้น เมื่อใช้กรดซิตริกที่ความเข้มข้นที่สูงขึ้น แสดงว่าน้ำ เมทานอลและเอทานอลมีปฏิสัมพันธ์เชิงบวกกับความเข้มข้นของกรดซิตริก ซึ่งข้าวหอมนิลเป็นข้าวที่มีสีดำซึ่งอุดมไปด้วยแอนโทไซยานิน

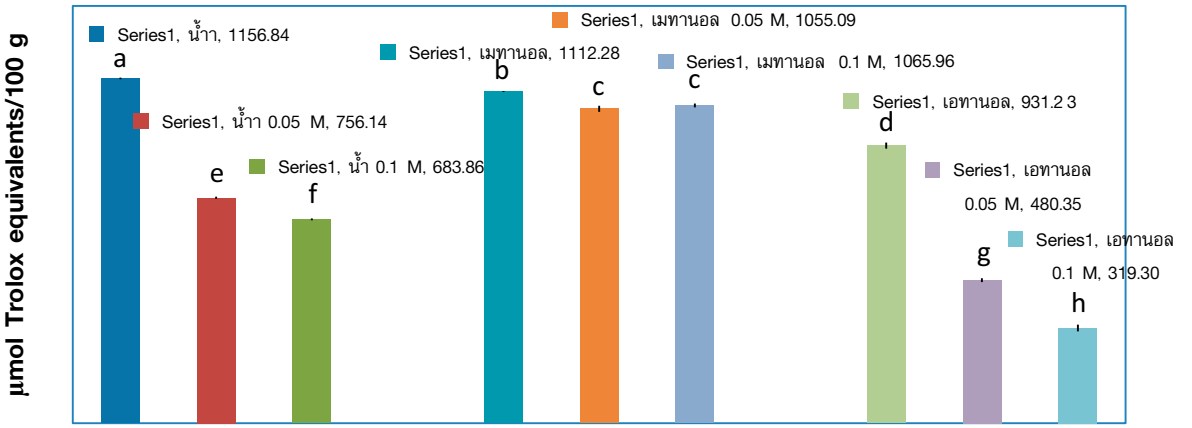
ซึ่งเป็นรงควัตถุกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่พืชสังเคราะห์ขึ้น [4] แอนโทไซยานินเป็นสารที่มีความสามารถในการจับกับอนุมูลอิสระในร่างกายได้ดีกว่าวิตามินซี วิตามินอีและเบต้าแคโรทีน หลายเท่า [27] ถือเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูงที่ได้จากธรรมชาติ [28] โดยแอนโทไซยานินละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้ว โดยเฉพาะในน้ำ นอกจากนี้การใช้กรดในการช่วยสกัดมีผลในการช่วยย่อยผนังเซลล์ของพืชตัวอย่างและทำให้แอนโทไซยานินถูกปลดปล่อยออกมากประสิทธิภาพในการสกัดสูงขึ้น นอกจากนี้แอนโทไซยานินจะมีความคงตัวมากขึ้นถ้าอยู่ในสารละลายกรด [29] ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Li และคณะ [30] ได้ทำการศึกษาการใช้ไมโครเวฟช่วยสกัดแอนโทไซยานินร่วมกับกรด ซิตริก จากเปลือกองุ่น โดยศึกษาผลของกำลังไฟ ความเข้มข้นของกรดซิตริก อัตราส่วนระหว่างสารตัวอย่างและตัวทำละลาย และระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดที่มีต่อปริมาณแอนโทไซยานิน ผลการทดลองพบว่า ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณแอนโทไซยานินมากที่สุดคือ ความเข้มข้นของกรดซิตริก ระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดกำลังไฟที่ใช้ในการสกัด อัตราส่วนระหว่างสารตัวอย่างและตัวทำละลายตามลำดับ โดยเมื่อความเข้มข้นของกรดเพิ่มขึ้นทำให้ปริมาณแอนโทไซยานินที่สกัดได้เพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย



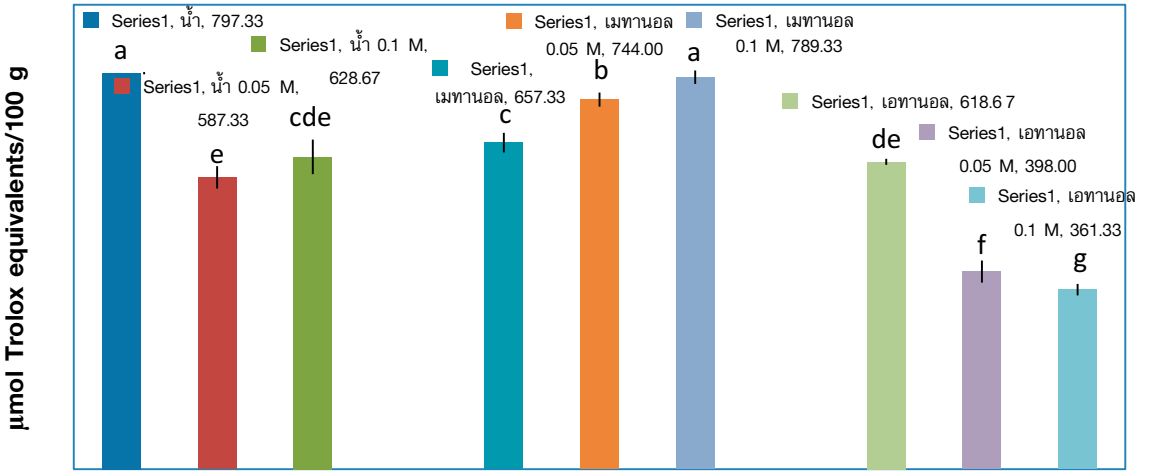
รูปที่ 2 ปริมาณแอนโทไซยานินที่สกัดจากข้าวหอมนิลโดยใช้ตัวทำละลายร่วมกับการใช้กรดซิตริกความเข้มข้นต่างกัน

3.3 ประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากข้าวหอมนิล

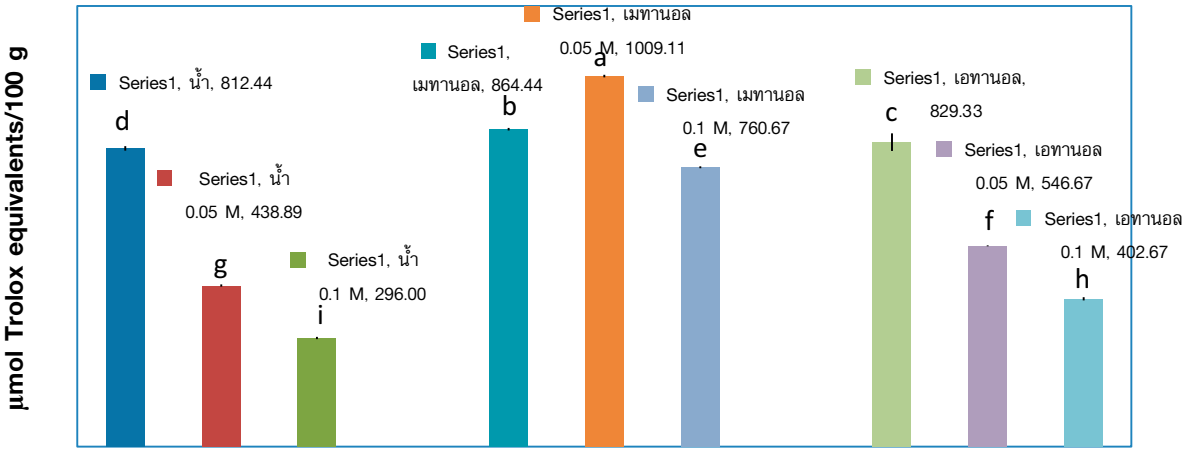
ทำการศึกษาประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากข้าวหอมนิล โดยทำการทดสอบ 3 วิธีคือ ABTS DPPH และ FRAP ซึ่งแต่ละวิธีได้ผลการทดลองดังรูปที่ 3 4 และ 5 ตามลำดับ



รูปที่ 3 ประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระที่สกัดจากข้าวหอมนิลโดยใช้ตัวทำละลายร่วมกับการใช้กรดซิตริกความเข้มข้นต่างกัน ทดสอบด้วยวิธี ABTS



รูปที่ 4 ประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระที่สกัดจากข้าวหอมนิลโดยใช้ตัวทำละลายร่วมกับการใช้กรดซิตริกความเข้มข้นต่างกัน ทดสอบด้วยวิธี DPPH



รูปที่ 5 ประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระที่สกัดจากข้าวหอมนิลโดยใช้ตัวทำละลายร่วมกับการใช้กรดซิตริกความเข้มข้นต่างกัน ทดสอบด้วยวิธี FRAP

จากผลการทดลองพบว่า ชนิดของตัวทำละลายและความเข้มข้นของกรดซิตริกมีผลต่อประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากข้าวหอมนิลด้วยวิธี ABTS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) นอกจากนี้ พบว่า ปัจจัยทั้งสองคือ ชนิดของตัวทำละลายและความเข้มข้นของกรดซิตริกมีปฏิสัมพันธ์กัน โดยการสกัดด้วยน้ำและเอทานอลและเมทานอล จะมีแนวโน้มของประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระลดลงอย่างชัดเจนเมื่อใช้กรดซิตริกที่ความเข้มข้นที่สูงขึ้น ตามลำดับ

จากรูปที่ 4 แสดงประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากข้าวหอมนิลด้วยวิธี DPPH พบว่า ชนิดของตัวทำละลายและความเข้มข้นของกรดซิตริกมีผลต่อประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) นอกจากนี้ พบว่า ปัจจัยทั้งสองมีปฏิสัมพันธ์กัน โดยการสกัดด้วยน้ำและเอทานอล จะมีแนวโน้มของประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระลดลงเมื่อใช้กรดซิตริกที่ความเข้มข้นที่สูงขึ้น ส่วนการสกัดด้วยเมทานอลจะมีแนวโน้มของประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นเมื่อใช้กรดซิตริกที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นตามลำดับซึ่งมีผลการทดลองที่สอดคล้องกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

การทดสอบประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากข้าวหอมนิลด้วยวิธี FRAP พบว่า ชนิดของตัวทำละลายและความเข้มข้นของกรดซิตริกมีผลต่อประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) นอกจากนี้ ปัจจัยทั้งสองมีปฏิสัมพันธ์ต่อกัน โดยการสกัดด้วยน้ำและเอทานอลจะมีแนวโน้มของประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระลดลงเมื่อใช้กรดซิตริกที่ความเข้มข้นที่สูงขึ้น ส่วนการสกัดด้วยเมทานอลจะมีแนวโน้มของประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นเมื่อใช้กรดซิตริกเข้มข้น 0.05 M และมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระเมื่อใช้กรดซิตริกที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นเป็น 0.1 M

เมื่อพิจารณาการทดสอบประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากข้าวหอมนิลทั้ง 3 วิธีแล้วพบว่ามีผลการทดลองที่สอดคล้องกัน โดยชนิดของตัวทำละลายและความเข้มข้นของกรดซิตริกที่ใช้ในการสกัดมีผลต่อประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระเมทานอลมีแนวโน้มในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกและสารต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่าน้ำและเอทานอล ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจาก การใช้แอลกอฮอล์ในการสกัดจะมีความจำเพาะเจาะจงกว่าการใช้น้ำ ทำให้สารสกัดที่ได้เป็นสารเฉพาะกลุ่มและเมทานอล มีขนาดโมเลกุลที่เล็กกว่ารวมทั้งมีสภาพขั้วที่แรงกว่าเอทานอลทำให้สามารถแพร่กระจายเข้าสู่ชั้นของผนังเซลล์พืชได้ดีกว่า ทำให้สกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีขั้วออกมาได้ดีกว่า ส่วนน้ำมีความสามารถในการสกัดและละลายสารต่างๆ ออกมาได้หลากหลายกว่ารวมถึงองค์ประกอบของแป้ง น้ำตาลและอื่นๆ โดยเฉพาะสารที่

มีขั้วเพราะน้ำเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วสูง ซึ่งฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกขึ้นอยู่กับจำนวนหมู่ ไฮดรอกซิลและสมบัติในการดึงอิเลกตรอนของหมู่คาร์บอกซิลิก ในโมเลกุล ทำให้ความสามารถในการให้ไฮโดรเจนลดลง [20] และหมู่ฟังก์ชันดังกล่าวเป็นหมู่ที่บ่งบอกความมีขั้วของโมเลกุล ทำให้การใช้น้ำสกัดได้สารต้านอนุมูลอิสระที่หลากหลายและมากกว่าซึ่งให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเพราะสารต้านอนุมูลอิสระที่พบในข้าวส่วนใหญ่เป็นสารประกอบฟีนอลิกและถูกตรึงในเซลลูโลส ลิกนิน และโปรตีน เช่น ferulic acid ถูกตรึงมากถึงร้อยละ 93 ของปริมาณทั้งหมด [21,31] ส่วนการใช้กรดช่วยในการสกัดสามารถทำลายผนังเซลล์ของพืชและทำให้สารสำคัญถูกปลดปล่อยออกมา นอกจากนี้ ปัจจัยทั้งสองคือ ชนิดของตัวทำละลายและความเข้มข้นของกรดซิตริกมีปฏิสัมพันธ์กัน โดยการสกัดด้วยน้ำและ เอทานอล จะมีแนวโน้มของประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระลดลงเมื่อใช้กรดซิตริกที่ความเข้มข้นที่สูงขึ้น ส่วนการสกัดข้าวหอมนิลด้วยเมทานอลจะมีแนวโน้มของประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นเมื่อใช้กรดซิตริกที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น แสดงว่า น้ำและเอทานอลมีปฏิสัมพันธ์เชิงลบกับความเข้มข้นของกรดซิตริก ส่วนเมทานอลมีปฏิสัมพันธ์เชิงบวกกับกรดซิตริกสอดคล้องกับ Jianmei และคณะ [25] ได้ทำการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากผิวของถั่วลิสงโดยใช้ น้ำและเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 80 ทดสอบสารต้านอนุมูอิสระวิธี ABTS พบว่า การสกัดด้วยน้ำได้สารสกัดที่มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระดีกว่าการสกัดด้วยเอทานอลโดยมีสารต้านอนุมูลอิสระคำนวณในรูปของ μmol Trolox equivalents ต่อตัวอย่างแห้ง 1 กรัม เป็น 4.10 และ 3.39 ตามลำดับ Pinelo และคณะ [24] ได้ทำการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากเปลือกอัลมอนด์โดยใช้ น้ำ เมทานอลและเอทานอลทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระวิธี DPPH พบว่าการสกัดด้วยเมทานอลได้สารสกัดที่มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระดีกว่าการสกัดด้วยน้ำและ เอทานอล ตามลำดับ เช่นเดียวกับ Anwar และคณะ [32] ได้ทำการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากกะหล่ำดอกที่ผ่านการทำแห้งด้วยการผึ่งลม ตากแดด และใช้ตู้อบ โดยใช้ เมทานอลและเอทานอลในการสกัด แล้วทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระวิธี DPPH พบว่า การสกัดด้วยเมทานอลได้สารสกัดที่มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระดีกว่าการสกัดด้วยเอทานอลทั้งกะหล่ำดอกที่ผ่านการทำแห้งด้วยการผึ่งลมตากแดดและใช้ตู้อบ

4. สรุป

จากผลการทดลองพบว่า ชนิดของตัวทำละลายและความเข้มข้นของกรดซิตริกมีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระรวมถึงปริมาณแอนโทไซยานินโดยการสกัดด้วยน้ำและเมทานอล ทำให้ได้สารสกัดที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูงใกล้เคียงกันแต่เมื่อใช้กรดซิตริกมาช่วยสกัดพบว่ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระลดลง ส่วนปริมาณแอนโทไซยานิน พบว่าการสกัดด้วยน้ำมีปริมาณสูงที่สุดและเมื่อมีการใช้กรดซิตริกมาช่วยสกัดพบว่า ทำให้ได้ปริมาณสูงขึ้นตามลำดับ

5. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้ทำการวิจัยขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร ที่สนับสนุนทุนในการวิจัยครั้งนี้ รวมถึงศูนย์ส่งเสริมและตรวจสอบการผลิตตามมาตรฐานความปลอดภัยทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร ที่ช่วยอำนวยความสะดวกในเรื่องเครื่องมือและวัสดุทางวิทยาศาสตร์สำหรับการทดลอง

6. เอกสารอ้างอิง

1. Danielski, L., Zetzl, C., Hense, H. and Brunner, G., 2005, “A Process Line for the Production of Raffinated Rice Oil from Rice Bran,” *Supercritical Fluids*, 34, pp. 133–141.

2. Xia, X.D., Ling, M.J., Xia, M., Hou, M.J., Wang, Q, Zhu, H.L. and Tang, Z.H., 2006, “An anthocyanin-rich Extract from Black Rice Enhances Atherosclerotic Plaque Stabilization in Apolipoprotein E-deficient Mice,” *Nutrition*, 136, pp. 2220–2225.

3. Min, B., McClung, A. M. and Chen, M.H., 2011, "Phytochemicals and Antioxidant Capacities in Rice Brans of Different Color," *Food Science*, 76, pp.117–126.

4. Yawadio, R., Tanimori, S. and Morita, N., 2007, "Identification of Phenolic Compounds Isolated from Pigmented Rices and their Aldose Reductase Inhibitory Activities," *Food Chemistry*, 101, pp. 1616-1625.

5. Suzuki, M., Kimur, T., Yamagishi, K., Shinmoto, H. and Yamak, K., 2004, "Comparison of Mineral Contents in 8 Cultivars of Pigmented Brown Rice," *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 51, pp. 424-427.

6. Renuka, D.R. and Arumughan, C., 2007, "Phytochemical Characterization of Defatted Rice Bran and Optimization of a Process for their Extraction and Enrichment," *PubMed*, 98, pp. 3037-3043.

7. Imsanguan, P., Roaysubtawee, A., Borrak, R., Pongamphai, S., Douglas, S. and Douglas, P.L., 2008, "Extraction of α-Tocopherol and y-oryzanol from Rice Bran," *Food Science and Technology*, 41, pp. 1417-1424.

8. 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," *Chemicol-Biological Interactions*, 163, pp. 218-229.

9. Tananuwong, K. and Tewaruth, W., 2010, "Extraction and Application of Antioxidants from Black Glutinous Rice," *LWT-Food Science and Technology*, 43, pp. 476–481.

10. Sharma, S., Kori, S. and Parmar, A., 2015, "Surfactant Mediated Extraction of Total Phenolic Contents (TPC) and Antioxidants from Fruits Juices," *Food Chemistry*, 185, pp. 284-288.

11. Routray, W. and Orsat, V., 2014, "MAE of Phenolic Compounds from Blueberry Leaves and Comparisonwith other Extraction Methods," *Industrial Crops and Products*, 58, pp. 36-45.

12. Kim, G.J. and Kim, J.H., 2015, "Development of a Simultaneous Extraction and Acid Hydrolysis-process for Recovery of Paclitaxel from Plant Cell Cultures," *Process Biochemistry*, 50, pp. 279-284.

13. Graciele, D.C., Francilene, G.K.V., Cristiane, C., Luciano, V.G. and Roseane, F., 2011, "Optimization of the Extraction of Flavanols and Anthocyanins from the Fruit Pulp of Euterpeedulis using the Response Surface Methodology," Food *Research International*, 44, pp. 708–715.

14. Nontasan, S., Moongngarm, A. and Deeseenthum, S., 2012, "Application of Functional Colorant Prepared from Black Rice Bran in Yogurt," *APCBEE Procedia*, 2, pp. 62–67.

15. Singleton, V.L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventós, R.M., 1999, "Analysis of Total Phenols and other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-ciocalteu Reagent," *Methods in Enzymology*, 299, pp. 152–178.

16. Wrolstad, R.E. and Giusti, M.M., 2001, Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV–vis Spectroscopy, in R.E. Wrolstad (Ed.), *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, Wiley Inc., New York.

17. Arnao, M.B., Cano, A. and Acusta, M., 2001, "The Hydrophilic and Lipophilic Contribution to Total Antioxidant Activity," *Food Chemistry*, 7, pp. 239–244.

18. Nuengchamnong, N., Krittasilp, K. and Ingkaninan, K., 2009, "Rapid Screening and Identification of Antioxidants in Aqueous Extracts of Houttuyniacordata using LC–ESI–MS Coupled with DPPH Assay," *Food Chemistry*, 117, pp. 750–756.

19. Benzie, F.F. and Strain, J.J., 1996, "The

Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of 'Antioxidant Power': The FRAP Assay," *Analytical Biochemistry*, 239, pp. 70-76.

20. Moongngarm, A., 2012, Antioxidants in Cereals, Mahasarakham University, Mahasarakham (In Thai).

21. Jirum, J. and Srihanam, P., 2011, "Oxidants and Antioxidants : Sources and Mechanism," *Academic Journal of Kalasin Rajabhat University*, 1 (1), pp. 59-70.

22. Arab, F., Alemzadeh, I. and Maghsoud, V., 2011, "Determination of Antioxidant Component and Activity of Rice Bran Extract," *Scientia Iranica*, 18, pp. 1402-1406.

23. Tan, B.L., Norhaizan, M.E., Suhaniza, H.J., Lai, C.C., Norazalina, S. and Roselina, K., 2013, "Antioxidant Properties and Antiproliferative Effect of Brewers' Rice Extract (*temukut*) on Selected Cancer Cell Lines," *International Food Research Journal*, 20, pp. 2117-2124.

24. Pinelo, M., Rubilar, M., Sineiro, J. and Núñez, M.J., 2004, "Extraction of Antioxidant Phenolics from Almond Hulls (Prunus amygdalus) and Pine Sawdust (Pinus pinaster)," *Food Chemistry*, 85, pp. 267-273.

25. Jianmei, Y., Mohamed, A. and Ipek, G., 2004, "Effects of Processing Methods and Extraction Solvents on Concentration and Antioxidant Activity of Peanut Skin Phenolics," *Food Chemistry*, 90, pp. 199–206.

26. Bahar A., Fariba, D. and Patrizia P., 2009, "The Effect of Citric Acid on the Phenolic Contents of Olive Oil," *Food Chemistry*, 116, pp. 617–623.

27. 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, pp. 218-229.

28. Lee, J.H., 2010, "Identification and Quantification of Anthocyanins from the Grains of Black Rice (Oryza sativa L.) Varieties," *Food Science and Biotechnology*, 19, pp. 391–397.

29. Fuleki, T. and Francis, F.J., 1968, "Quantitative Methods for Anthocyanins. Extraction and Determination of Total Anthocyanin in Cranberries," *Food Science*, 33, pp. 72-77.

30. Li, Y., Han, L., Ma, R., Xu, X., Zhao, C., Wang, Z., Chen, F. and Hu, X., 2012, "Effect of Energy Density and Citric Acid Concentration on Anthocyanins Yield and Solution Temperature of Grape Peel in Microwave-assisted Extraction Process," *Food Engineering*, 109, pp. 274–280.

31. Adom, K.K. and Liu, R.H., 2002, "Antioxidant Activity of Grains," *Agricultural Food Chemistry*, 50, pp. 6182-6187.

32. Anwar, F., Kalsoom, U., Sultana, B., Mushtaq, M., Mehmood, T. and Arshad, H.A., 2013, "Effect of Drying Method and Extraction Solvent on the Total Phenolics and Antioxidant Activity of Cauliflower (Brassica oleracea L.) Extracts," *International Food Research Journal*, 20, pp. 653-659.