

P-P28

การวิเคราะห์ปริมาณแกมมาอริซานอลจากสารสกัดข้าวด้วยวิธีไอออนแพร์โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

วิชญ์ ธงไชย* และกมลทิพย์ สิงห์แก่น

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

*Corresponding author, email; wisanuthongchai@hotmail.com

บทคัดย่อ

ได้พัฒนาไอออนแพร์โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงสำหรับวิเคราะห์ปริมาณแกมมาอริซานอลจากสารสกัดข้าว นำตัวอย่างข้าวมาทำการสกัดและแยกโดยใช้คอลัมน์วิเคราะห์ชนิด Chromolith® Flash RP-18 ขนาด 4.6x25 มิลลิเมตร ได้ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมของการวิเคราะห์ สารละลายตัวอย่างวิเคราะห์ที่อุณหภูมิห้องด้วยระบบการแยกแบบ gradient elution ด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ผสมระหว่าง CTAB ความเข้มข้น 1.8 มิลลิโมลาร์ และเมทานอล อัตราการไหลเท่ากับ 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที สารละลายที่แยกถูกตรวจวัดด้วยแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 330 นาโนเมตร ได้กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นเท่ากับ 1–50 มิลลิกรัมต่อลิตร ($R^2 = 0.996$) ของแกมมาอริซานอล ได้ค่าขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดแกมมาอริซานอล เท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถใช้วิเคราะห์ปริมาณแกมมาอริซานอลในตัวอย่างสารสกัดข้าวได้

คำสำคัญ: แกมมาอริซานอล, สารสกัดข้าว, ไอออนแพร์โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

DETERMINATION OF GAMMA ORYZANOL FROM RICE EXTRACT WITH ION-PAIR LIQUID CHROMATOGRAPHIC METHOD

Wisanu Thongchai* and Gamornthip Singkaen

Faculty of Science and Technology Pibulsongkram Rajabhat University

*Corresponding author, email; wisanuthongchai@hotmail.com

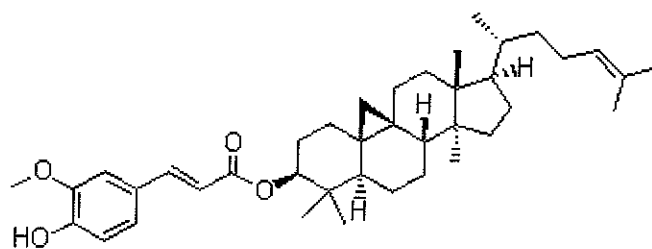
Abstract

Ion-pair liquid chromatographic method for the determination of gamma oryzanol from rice extracts was developed. The rice sample was extracted and then separated by using Chromolith® Flash RP-18, 4.6x25 mm as analytical column. The chromatographic conditions were also optimized. The analyte was performed at room temperature in gradient elution mode, using a mixture of 1.8 mM CTAB and methanol as a mobile phase. The flow rate was set at 2.0 mL/min. The effluent from the analytical column was detected at 330 nm. Linear calibration curve was obtained over the range 1–50 mg/L ($R^2 = 0.996$) for gamma oryzanol. The limit of detection was found to be 1 mg/L of gamma oryzanol. The method was applied to the determination of gamma oryzanol in rice extracts.

Keywords: Gamma oryzanol, Rice extract, Ion-pair liquid chromatography

บทนำ

ไอออนแพร์โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (ion pair liquid chromatography) เป็นเทคนิคที่ใช้แยกสารจำพวกไอออน (ionic compounds) และสารที่สามารถแตกตัวเป็นไอออน (ionizable compounds) โดยเฉพาะอย่างยิ่งจำพวกกรดแก่และเบสแก่ ซึ่งไม่สามารถถูก suppressed ให้อยู่ในรูป nonionic ในช่วง pH 2-8 ซึ่งเป็นช่วง pH ที่ใช้กับ reversed phase column ที่มี silica เป็นวัสดุพื้น (silica-based column) ไอออนแพร์โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง เกิดจากการที่ counter ion ไปจับกับไอออนของสารตัวอย่าง (solute ion) ในวัฏภาคเคลื่อนที่ เกิด ion-pair complex ในรูป nonionic ซึ่งจะดูดซับ (adsorb) บนคอลัมน์ที่เป็นพวก hydrocarbon ได้ดี ถ้าความยาวของหมู่ alkyl ใน counter ion เพิ่มขึ้น ion-pair ที่เกิดจะมีขั้วน้อยลง ซึ่งจะ retain บนคอลัมน์ได้นานและถูกชะออกมาช้ากว่าสารในรูปไอออน



ภาพที่ 1 โครงสร้างโมเลกุลของสารแกมมาออริซานอล

สารแกมมาออริซานอลทำหน้าที่เพิ่มระดับไขมันชนิดดีให้แก่ร่างกาย ซึ่งไขมันชนิดนี้จะไปขจัดไขมันคอเลสเตอรอล ซึ่งก่อให้เกิดโทษต่อร่างกาย) และไตรกลีเซอไรด์ในเส้นเลือด ทำให้ลดการตีตันของหลอดเลือด เพิ่มการไหลเวียนของโลหิตและยังมีฤทธิ์ในการลดความเครียด ทำให้อวัยวะสำคัญต่างๆ เช่น ตับ ไต หัวใจ สมอง ตับอ่อน เป็นต้น มีเลือดไปเลี้ยงมากขึ้น และที่เสื่อมสภาพก็กลับฟื้นตัวและทำงานได้อีกครั้ง ช่วยลดอัตราการเสี่ยงต่อการเป็นโรคหัวใจ โรคตับ โรคไต โรคเบาหวาน โรคความดันโลหิตสูง และโรคความจำเสื่อม เป็นต้น และจัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระอีกชนิดหนึ่ง ซึ่งเป็นที่สันนิษฐานกันว่าสารต้านอนุมูลอิสระช่วยลดความเสี่ยงต่อการเป็นโรคหัวใจ เนื่องจากสารต้านอนุมูลอิสระช่วยป้องกันการทำลายหลอดเลือดหัวใจจากอนุมูลอิสระ นอกจากนี้ยังช่วยลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคที่เกิดจากอนุมูลอิสระ เช่น โรคมะเร็ง และโรคอื่นๆ ได้อีกด้วย ช่วยลดคอเลสเตอรอล โดยการลดการดูดซึมคอเลสเตอรอลในลำไส้ เพิ่มไขมันที่ดีคือ ไตรกลีเซอไรด์ จึงเป็นการช่วยลดความเสี่ยงต่อการเป็นโรคหัวใจอีกทางหนึ่ง นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึงการ ช่วยรักษาอาการของสตรีในวัยหมดประจำเดือน ช่วยให้การทำงานของระบบประสาทที่ควบคุมน้ำย่อยทำงานได้เป็นปกติขึ้นในสตรีวัยหมดประจำเดือน ได้มีการสกัดเอาแต่เฉพาะสารแกมมาออริซานอลมาใช้ในทางการรักษาโรคบางชนิดมานานแล้ว แต่อย่างไรก็ตามก็ได้รับการรับประทานเป็นยานั้นต้องมีความระมัดระวังเป็นพิเศษกว่าในการรับประทานจากอาหาร นอกจากนี้ยังเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) ที่มีประสิทธิภาพมากกว่าวิตามินอีถึง 6 เท่า และมีความเสถียรที่สุดเมื่อเทียบกับวิตามินซีและอี ซึ่งอนุมูลอิสระนั้นเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคมะเร็งและโรคหลอดเลือดหัวใจตีตัน นอกจากนี้ยังเป็นสารป้องกันแสงยูวี

แกมมาออริซานอลเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่พบได้สูงในรำข้าว โครงสร้างจะคล้ายการผสมระหว่าง ferulic acid esters ของ triterpene alcohol กับ phytosterols แกมมาออริซานอลจัดเป็นสาร hypolipidemic และ antiatherogenic เนื่องจากมีฤทธิ์ลดเกล็ดเลือดเกาะผนังหลอดเลือด ยับยั้งการเกิดผังพืดในหลอดเลือด aortic และยับยั้งแอลดีแอลออกซิเดชัน ปัจจุบันออริซานอลยังมีความสำคัญมากขึ้น ในการใช้เป็นยา อาหารเสริมสุขภาพ และเครื่องสำอาง งานวิจัยนี้มุ่งเน้นที่จะพัฒนาวิธีการสกัดและวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากน้ำมันรำข้าว เนื่องจากวิธีการสกัดที่มีการนำมาใช้สกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืชสมุนไพรเพื่อให้ได้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สนใจสามารถแยกออกจากสารอื่นๆ ได้อย่างเป็นปกติ และมีความบริสุทธิ์ค่อนข้างสูง ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะพัฒนาเทคนิคการสกัดโดยใช้เทคนิคไอออนแพร์โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง มาใช้ในการสกัดแยกสารออกฤทธิ์ที่สนใจ

วิธีดำเนินการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยและพัฒนา มีขั้นตอนการวิจัยโดยแต่ละขั้นตอนมีวิธีดำเนินการวิจัย ดังนี้

2.1 เครื่องมือและสารเคมีสำหรับการทดลอง

เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง รุ่น Shimadzu-10 A ประกอบด้วยปั๊ม (pump) รุ่น LC-10 AD เครื่องตรวจวัดรุ่น SPD-10 A คอลัมน์วิเคราะห์ชนิด Chromolith®Flash RP-18, endcapped, 4.6x25 มิลลิเมตร เครื่อง UV-Visible spectrophotometer และ เครื่อง pH-meter รุ่น MP-220

สารเคมีและตัวอย่างประกอบด้วยแกมมาออริซานอล บริษัท Chemical Standard, Tokyo, Japan เมทานอล (HPLC grade) บริษัท Merck, Germany อะซิโตนไทรล์ (HPLC grade) บริษัท Lap-Scan, Island สาร Sodium dodesyl sulphate (SDS) บริษัท เอส.เค.เทรดดิ้ง สาร Cetyl trimethylammonium bromide (CTAB) บริษัท Fluka AG, Buchs, Switzerland สาร Polyoxyethylene dodecyl ether (Brij 35) บริษัท Sigma-Aldrich AG, Buchs, Switzerland และตัวอย่างน้ำมันรำข้าวสกัด

2.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานแกมมาออริซานอล

ชั่งสารมาตรฐานแกมมาออริซานอลน้ำหนัก 10 มิลลิกรัม ละลายด้วยอะซิโตนไทรล์ เทใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร แล้วปรับด้วยอะซิโตนไทรล์จนครบปริมาตร จะได้สารละลายมาตรฐานแกมมาออริซานอลที่มีความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร และเจือจางให้ได้สารละลายมาตรฐานแกมมาออริซานอลในช่วงความเข้มข้น 1-50 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.3 การเตรียม วัสดุภาชนะเคลื่อนที่เพื่อทดสอบหา วัสดุภาชนะเคลื่อนที่ที่เหมาะสม

2.3.1 การเตรียม Brij 35 ความเข้มข้น 1.8 มิลลิโมลาร์ ปริมาณ 500 มิลลิลิตร

ชั่ง Brij 35 น้ำหนัก 1.1025 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 500 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาณจนครบปริมาตรจะได้สารละลาย Brij 35 ความเข้มข้น 1.8 มิลลิโมลาร์

2.3.2 การเตรียม CTAB ความเข้มข้น 1.8 มิลลิโมลาร์ ปริมาณ 500 มิลลิลิตร

ชั่ง CTAB น้ำหนัก 0.328 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 500 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาณจนครบปริมาตรจะได้สารละลาย CTAB ความเข้มข้น 1.8 มิลลิโมลาร์

2.3.3 การเตรียม SDS ความเข้มข้น 1.6 มิลลิโมลาร์ ปริมาณ 500 มิลลิลิตร

ชั่ง SDS น้ำหนัก 2.365 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 500 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาณจนครบปริมาตรจะได้สารละลาย SDS ความเข้มข้น 1.6 มิลลิโมลาร์

2.4 การเตรียมตัวอย่างข้าว

2.4.1 การสกัดน้ำมันรำข้าว

ก. การสกัดด้วยตัวทำละลายที่ร้อนด้วยเครื่อง soxhlet extractor วิธีการสกัดทำได้โดยชั่งข้าวตัวอย่างที่บดละเอียดแล้ว ใส่ขวดก้นกลมกระดาษ (thimble) จำนวน 4 ขวดๆ ละ 50 กรัม รวมตัวอย่างทั้งหมดจำนวน 200 กรัม จากนั้นนำไปสกัดด้วยตัวทำละลายที่ร้อนดังนี้คือ hexane, methanol, 95% ethanol และ ethyl acetate เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยใช้เครื่อง soxhlet apparatus และนำสารสกัดที่ได้มาตั้งทิ้งไว้เพื่อให้ตัวทำละลายระเหยออกไปให้หมด จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปชั่งน้ำหนักและเก็บไว้ในภาชนะที่ปิดสนิทและป้องกันแสงและเก็บไว้ในตู้เย็น แล้วนำน้ำหนักที่ได้ไปคำนวณหาร้อยละของตัวอย่างที่สกัดได้ และเก็บตัวอย่างไว้ทดสอบ

ข. การสกัดแบบแช่เย็นด้วยตัวทำละลาย การแช่และระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator วิธีการสกัดทำได้โดยชั่งข้าวตัวอย่างที่บดละเอียดแล้ว 200 กรัม ใส่ขวดแก้วสำหรับสกัดโดยการแช่ เติมตัวทำละลายดังนี้ hexane, methanol, 95% ethanol และ ethyl acetate จำนวน 400 มิลลิลิตร และเขย่าให้ตัวอย่างผสมกับตัวทำละลาย แล้วแช่ทิ้งไว้ 7 วัน แล้วนำสารสกัดที่ได้มากรอง แล้วนำไประเหยด้วยเครื่อง rotary evaporator เพื่อเอาตัวทำละลายออกให้หมด จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปชั่งน้ำหนักและเก็บไว้ในภาชนะที่ปิดสนิทและป้องกันแสงและเก็บไว้ในตู้เย็น แล้วนำน้ำหนักที่ได้ไปคำนวณหาร้อยละของตัวอย่างที่สกัดได้ และเก็บตัวอย่างไว้ทดสอบ

2.5 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของระบบไอออนเพอร์โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

2.5.1 การศึกษาความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสงสูงสุดของแกมมาออริซานอล

เจือจางสารละลายมาตรฐานแกมมาออริซานอล จากความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ได้ความเข้มข้นเป็น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วนำสารละลายมาตรฐานแกมมาออริซานอลไปวัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer แล้วบันทึกค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดเพื่อนำไปใช้วิเคราะห์หาปริมาณแกมมาออริซานอล

2.5.2 การศึกษาชนิดของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสม

ในการศึกษาชนิดของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ ทำได้โดยการเตรียมวัฏภาคเคลื่อนที่จากสารลดแรงตึงผิวชนิดต่างๆ แล้วทดสอบโดยใช้สารละลายมาตรฐานแกมมาออริซานอล ฉีดเข้าไปสู่ระบบ และคำนวณค่า retention factor (k) และสังเกตลักษณะของพีคที่ได้ในแต่ละวัฏภาคเคลื่อนที่ในการวิเคราะห์

2.5.3 การศึกษาสัดส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสม

ในการทำการทดสอบสัดส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสม สำหรับการวิเคราะห์ ทำได้โดยการเตรียมวัฏภาคเคลื่อนที่จากสารลดแรงตึงผิวชนิดต่างๆ ดังตารางที่ 1 แล้วทดสอบโดยใช้สารละลายมาตรฐานแกมมาออริซานอล ฉีดเข้าไปสู่ระบบ และคำนวณค่า retention factor (k) และสังเกตลักษณะของพีคที่ได้ในแต่ละวัฏภาคเคลื่อนที่ในการวิเคราะห์

ตารางที่ 1 การศึกษาสัดส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่

Methanol (%)	CTAB (%)	Time (min)
90	10	0
95	5	2
95	5	5
100	0	10

2.5.4 การทดสอบความมีประสิทธิภาพของตัวทำละลายอินทรีย์ที่เติมลงไปในระบบ

ทำการทดสอบความมีประสิทธิภาพของตัวทำละลายอินทรีย์ที่เติมลงไปในระบบวัฏภาคเคลื่อนที่ โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ ผสมลงไปในวัฏภาคเคลื่อนที่ แล้วทดสอบโดยใช้สารละลายมาตรฐานแกมมาออริซานอล ฉีดเข้าไปสู่ระบบ และคำนวณค่า retention factor (k) และสังเกตลักษณะของพีคที่ได้ในแต่ละวัฏภาคเคลื่อนที่ในการวิเคราะห์

2.5.5 การทดสอบอัตราการไหลที่เหมาะสม

เมื่อทำการเลือกชนิดและความเข้มข้นของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสมแล้ว จากนั้นก็ทำการศึกษาอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสม โดยการปรับอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ให้มีอัตราการไหลต่างๆ กันตั้งแต่ 1-2.5 มิลลิเมตรต่อนาที แล้วทดสอบโดยใช้สารละลายมาตรฐานแกมมาออริซานอล ฉีดเข้าไปสู่ระบบ แล้วทำวิเคราะห์ผลที่ได้โดยเลือกอัตราการไหลที่เหมาะสมที่สุดจากค่าการแยกของพีค (resolution) และเวลาที่วิเคราะห์

2.5.6 การสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve)

ทำกราฟมาตรฐานทำได้โดยการปิเปตสารละลายมาตรฐานแกมมาออริซานอล ให้มีช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 1-50 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วนำไปฉีดเข้าสู่ระบบและวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ทำการฉีดสารละลายความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ อ่านบันทึกค่าพื้นที่ใต้พีค และนำไปคำนวณและสร้างกราฟมาตรฐานที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกับความเข้มข้นต่างๆ กับค่าพื้นที่ใต้พีค

2.5.7 ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง (linear range)

ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นที่สูงและต่ำกว่ากราฟมาตรฐาน โดยเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่ใช้วิเคราะห์ และคำนวณ R-square โดยการปิเปตสารละลายมาตรฐาน

แกมมาอริซานอลมีความเข้มข้น 1-500 มิลลิกรัมต่อลิตร และทุกๆความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานผสมแล้ว ปรับปริมาตรด้วยอะซิโตนไทรล์ แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ทำซ้ำความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ อ่านพื้นที่ใต้พีค และทำการสร้างกราฟมาตรฐาน โดยการสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกับค่าพื้นที่ใต้พีคที่วิเคราะห์ได้

2.6 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (method validation)

2.6.1 ความแม่นยำ (precision)

ศึกษาความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ โดยแยกการศึกษาเป็น 2 ประเด็น คือ

ประเด็นแรกศึกษา repeatability คือ ศึกษาความแม่นยำภายในวันเดียว โดยทำการวิเคราะห์ ปริมาณแกมมาอริซานอลในตัวอย่างข้าวที่เตรียมไว้ ทำการวัดซ้ำทั้งหมดตัวอย่างละ 7 ซ้ำ

ประเด็นที่สองศึกษา reproducibility คือ การศึกษาความแม่นยำระหว่างวัน โดยทำการทดลอง เช่นเดียวกับการศึกษา repeatability เปรียบเทียบความแตกต่างของผลการทดลองระหว่างวันของการทำการ วิเคราะห์

การหาความแม่นยำทำได้โดยการฉีดสารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 10, 20 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยการปิเปตสารละลายมาตรฐานแกมมาอริซานอลมีความเข้มข้น 10, 20 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรด้วยอะซิโตนไทรล์ ทำการฉีดความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ ในวันเดียวและระหว่างวัน เพื่อ เปรียบเทียบผลและคำนวณหาค่า S.D และ %R.S.D

2.6.2 ความถูกต้อง (accuracy)

การศึกษาความถูกต้องทำได้โดยใช้ Standard addition method ในการหาความถูกต้องของ วิธีวิเคราะห์โดยการคำนวณได้จากค่า % recovery เมื่อเติมสารละลายมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นต่างๆ กันลงไป ในสารละลายตัวอย่าง

2.6.3 ศึกษาขีดจำกัดของการตรวจวัด (limit of detection) และขีดจำกัดของการวิเคราะห์ ปริมาณ (limit of quantitation)

ศึกษาขีดจำกัดของการตรวจวัด โดยทำการลดความเข้มข้นของตัวอย่างลงไปเรื่อยๆ จนเมื่อวัด ความสูงพื้นของตัวอย่าง เทียบกับ noise (signal to noise ratio) แล้วได้ค่าประมาณ 2-3 เท่า นั่นคือ ความเข้มข้น ต่ำสุดที่วิธีวิเคราะห์จะสามารถตรวจพบได้และการศึกษาขีดจำกัดของการวิเคราะห์ปริมาณ เมื่อวัดความสูงของพีค ของตัวอย่าง เทียบกับ noise (signal to noise ratio) แล้วได้ค่าประมาณ 10 เท่า นั่นคือ ความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธี วิเคราะห์จะสามารถวิเคราะห์ปริมาณได้

ผลการวิจัย

3.1 ผลการเลือกความยาวคลื่นสูงสุดในการตรวจวัดปริมาณแกมมาอริซานอลด้วยวิธีไอออนแพร์โคร มาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงในการวิเคราะห์ปริมาณตัวอย่างสารสกัดจากน้ำมันรำข้าว

จากการศึกษาค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารละลายมาตรฐานแกมมาอริซานอล โดยการเตรียม สารละลายมาตรฐานแกมมาอริซานอลที่มีความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วเจือจางด้วยอะซิโตนไทรล์ให้ ได้สารละลายมาตรฐานแกมมาอริซานอลที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง สูงสุดด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นตั้งแต่ 200-400 นาโนเมตร พบว่าค่าการ ดูดกลืนแสงสูงสุดของสารละลายมาตรฐานแกมมาอริซานอลมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 330 นาโนเมตร สารที่สนใจให้ค่า sensitivity ที่ดีที่สุดที่ความยาวคลื่นนี้

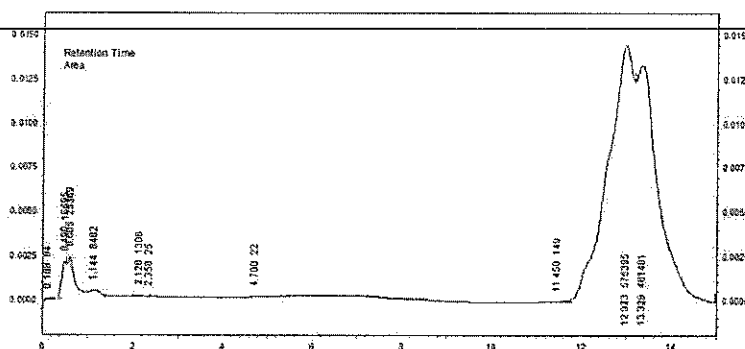
3.2 การศึกษาชนิดของสารละลาย surfactance ของการเกิดไมเซลล์สำหรับใช้เป็นตัวชะในเทคนิคไอออน แพร์โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงเพื่อแยกสารละลายแกมมาอริซานอล

3.2.1 ผลการศึกษาหาชนิดและความเข้มข้นของสารละลายลดแรงตึงผิว

สารละลาย surfactance ที่นำมาศึกษา มี 3 ชนิดคือ sodium dodecyl sulphate (SDS), polyoxyethylene dodecyl ether (Brij 35) และ cetyl trimethylammonium bromide (CTAB)

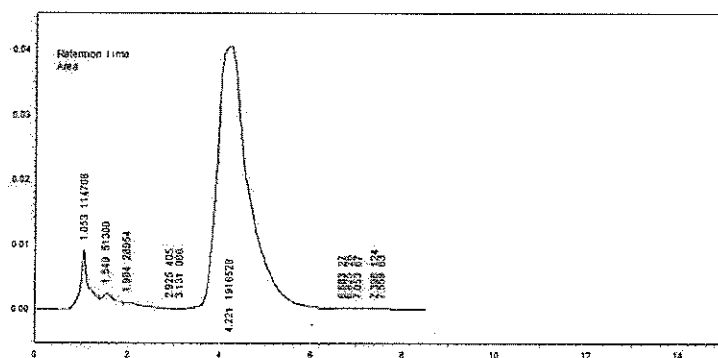
เมื่อนำสารละลาย SDS ความเข้มข้น 1.6 มิลลิโมลาร์ มาใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ในเทคนิคไอออน แพร์โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงที่อัตราการไหลเท่ากับ 2 มิลลิลิตรต่อนาที โดยใช้คอลัมน์ชนิด

Chromolith® Flash RP-18 endcapped, 4.6x25 มิลลิเมตร ตรวจวัดที่มีความยาวคลื่น 330 นาโนเมตร ปริมาตรสารละลายที่ฉีดเท่ากับ 20 ไมโครลิตร โดยฉีดสารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้แสดงโครมาโทแกรมดังรูปที่ 2 และพบว่า การฉีดสารละลายมาตรฐานแกมมาอริซานอล ซึ่งฟีกของสารละลายมาตรฐานแกมมาอริซานอล ไม่สามารถแยกได้ มีค่า retention factor ต่ำ และนอกจากนี้ยังมีปัญหาเรื่องฟอง ทำให้ไม่สามารถนำสารละลาย SDS มาใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่



ภาพที่ 2 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานแกมมาอริซานอล เมื่อใช้ SDS ที่ความเข้มข้น 1.6 มิลลิโมลาร์ เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่

เมื่อนำสารละลาย Brij 35 ความเข้มข้น 1.8 มิลลิโมลาร์ มาใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ที่อัตราการไหลเท่ากับ 2 มิลลิลิตรต่อนาที โดยใช้คอลัมน์ชนิด Chromolith® Flash RP-18 endcapped, 4.6x25 มิลลิเมตร ตรวจวัดที่มีความยาวคลื่น 330 นาโนเมตร ปริมาตรสารละลายที่ฉีดเท่ากับ 20 ไมโครลิตร โดยฉีดสารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้โครมาโทแกรมดังภาพที่ 3

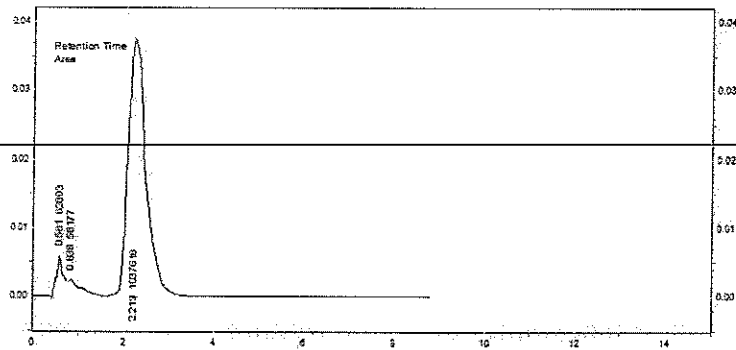


ภาพที่ 3 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานแกมมาอริซานอล เมื่อใช้ Brij 35 ที่ความเข้มข้น 1.8 มิลลิโมลาร์เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่

จากโครมาโทแกรมที่แสดงในภาพที่ 3 พบว่า การฉีดสารละลายมาตรฐานแกมมาอริซานอล ซึ่งฟีกของสารละลายมาตรฐานแกมมาอริซานอลแยกได้ดี แต่ฟีกมีหาง (tail) เล็กน้อย ทำให้ไม่สามารถนำสารละลาย Brij 35 มาใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่

เมื่อนำสารละลาย CTAB ความเข้มข้น 1.8 มิลลิโมลาร์ มาใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ที่อัตราการไหลเท่ากับ 2 มิลลิลิตรต่อนาที โดยใช้คอลัมน์ชนิด Chromolith® Flash RP-18 endcapped, 4.6x25 มิลลิเมตร ตรวจวัดที่มีความยาวคลื่น 330 นาโนเมตร ปริมาตรสารละลายที่ฉีดเท่ากับ 20 ไมโครลิตร โดยฉีดสารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้โครมาโทแกรมดังรูปที่ 4 พบว่าการฉีดสารละลายมาตรฐาน

แกมมาออริซานอล ซึ่งพืชของสารละลายมาตรฐานแกมมาออริซานอลแยกได้ดี จึงเลือกระบบนี้ใช้ในการวิเคราะห์ และมีค่า retention factor (k) และประสิทธิภาพของคอลัมน์ (column efficiency) ดังตารางที่ 3



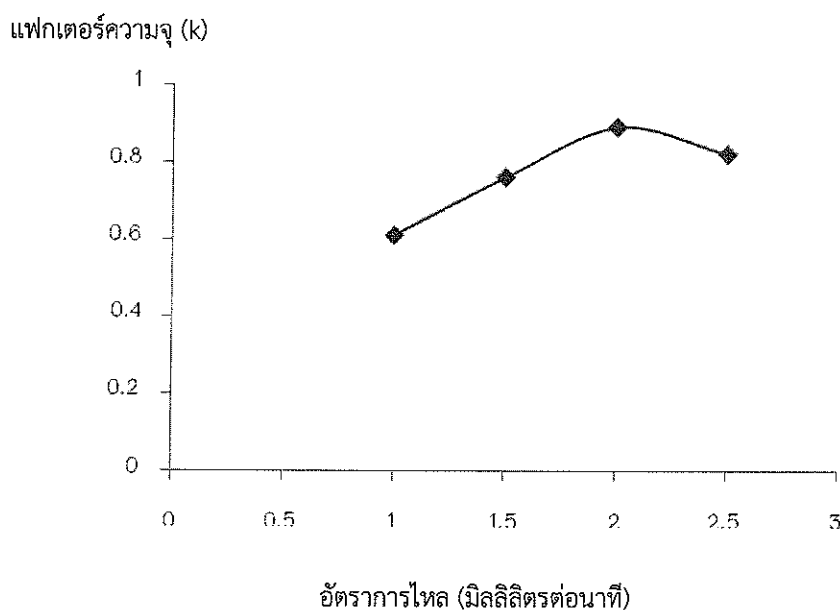
ภาพที่ 4 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานแกมมาออริซานอล เมื่อใช้ CTAB ที่ความเข้มข้น 1.8 มิลลิโมลาร์ เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่

ตารางที่ 3 แสดงค่า Retention factor (k) และประสิทธิภาพของคอลัมน์ (N)

สารมาตรฐาน	ค่าแฟกเตอร์ความจุ (Retention factor; k) และประสิทธิภาพของคอลัมน์ (column efficiency; N)		
	SDS	Brij 35	CTAB
Gamma oryzanol	0.53 ; 28.74	0.86 ; 36.17	1.3; 209.26

3.3 ผลการศึกษาอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่

จากการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายลดแรงตึงผิวของการเกิดไมเซลล์ เมื่อนำสารละลาย CTAB มาใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ เมื่อพล็อตค่าระหว่างค่าแฟกเตอร์ความจุ (k) กับอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 มิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ



ภาพที่ 5 แสดงค่าแฟกเตอร์ความจุ (k) กับอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่

ตารางที่ 4 แสดงค่า Retention factor (k) และประสิทธิภาพของคอลัมน์ efficiency (N) ของการศึกษ้อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่

สารมาตรฐาน	ค่าแฟกเตอร์ความจุ (Retention factor; k) และประสิทธิภาพของคอลัมน์ (column efficiency; N)			
	1.0 มิลลิลิตรต่อนาที	1.5 มิลลิลิตรต่อนาที	2.0 มิลลิลิตรต่อนาที	2.5 มิลลิลิตรต่อนาที
Gamma oryzanol	0.61 ; 39.40	0.76 ; 39.40	0.89; 39.72	0.82 ; 43.03

3.4 ผลจากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม

ผลจากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธี พบว่าใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ คือ CTAB (ไมเซลลาร์) ที่ความเข้มข้น 1.8 มิลลิโมลาร์ อัตราการไหลเท่ากับ 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรในการฉีดเท่ากับ 20 ไมโครลิตร ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 330 นาโนเมตร คอลัมน์ชนิด Chromolith®Flash RP-18 endcapped, 4.6x25 มิลลิเมตร และเวลาที่ใช้วิเคราะห์เท่ากับ 15 นาที

3.5 ผลการศึกษาขีดจำกัดของการตรวจวัด

จากการศึกษาขีดจำกัดของการตรวจวัดเพื่อดู sensitivity ของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณแกมมาออริซานอล โดยคำนวณจากกราฟมาตรฐานที่ทำการฉีดภายในวันเดียวและระหว่างวันของกราฟมาตรฐาน โดยคำนวณจากสมการ 3.3SD/S เมื่อ SD คือค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่คำนวณได้จากพื้นที่ใต้พีคของแกมมาออริซานอลแต่ละความเข้มข้น S คือ ค่าความชันที่ได้จากกราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้พีคที่วิเคราะห์ได้ พบว่าที่ความเข้มข้นที่ 1.9 มิลลิกรัมต่อลิตร ของแกมมาออริซานอล คือ ขีดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้

3.6 ผลการศึกษาขีดจำกัดของการวิเคราะห์ปริมาณ

จากการศึกษาขีดจำกัดของการวิเคราะห์ปริมาณเพื่อดู ขีดต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณได้ของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณแกมมาออริซานอล โดยคำนวณจากกราฟมาตรฐานที่ทำการฉีดภายในวันเดียวและระหว่างวันของกราฟมาตรฐาน โดยคำนวณจากสมการ 10SD/S เมื่อ SD คือค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่คำนวณได้จากพื้นที่ใต้พีคของแกมมาออริซานอลแต่ละความเข้มข้น S คือ ค่าความชันที่ได้จากกราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้พีคที่วิเคราะห์ได้ พบว่าที่ความเข้มข้นที่ 5.7 มิลลิกรัมต่อลิตร ของแกมมาออริซานอล คือขีดต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณได้

3.7 ผลการศึกษาความเป็นเส้นตรง

จากการศึกษาความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานที่ได้จากการทดลองทั้ง 2 วันพบว่าค่า R-square ของทั้ง 2 วันมีค่า 0.99 และมีความคงตัวของเส้นกราฟทั้ง 2 วันสูงโดยดูจากค่าความชันและ ค่า R-square

ตารางที่ 5 ผลการศึกษาความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานที่ได้จากการทดลอง

Day	Slope	intercept	R-square
Day 1	61385x	- 208019	0.996
Day 2	64446x	- 196859	0.995

3.8 ผลการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง

จากการศึกษาความช่วงความเป็นเส้นตรง โดยฉีดสารละลายมาตรฐานแกมมาออริซานอล ที่มีความเข้มข้นในช่วงความเข้มข้นของสารมาตรฐานตั้งแต่ 1-500 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วดูความเป็นเส้นตรง พบว่าพื้นที่ใต้พีคมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานแกมมาออริซานอล ในช่วงความเข้มข้น 1-50 มิลลิกรัมต่อลิตร

3.9 ความแม่นยำ (precision)

จากการฉีดสารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 5, 10 และ 15 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยเปิดสารละลายมาตรฐานแกมมาออริซานอลให้มีความเข้มข้น 5, 10 และ 15 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วย

อะซิโตนไทรล์ ทำการฉีดความเข้มข้นละ 7 ซ้ำในวันเดียวกันและระหว่างวัน เพื่อเปรียบเทียบผลและคำนวณหาค่า S.D และ %RSD ของผลการทดลองได้ %RSD ไม่เกิน 10% จะอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ ดังรายละเอียดผลการทดลองในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงค่า %RSD ในการศึกษาความแม่นยำ

ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	วิเคราะห์ภายในวันเดียว	วิเคราะห์ระหว่างวัน
	%RSD	%RSD
10	4.79	4.00
20	0.46	2.65
30	3.86	3.90
40	7.45	5.66

ดังนั้นผลการศึกษาความแม่นยำ โดยการนำข้อมูลเบื้องต้นมาแปลผลทางสถิติ แล้วได้ค่า %RSD ตามตารางที่ 6 ซึ่งมีค่า %RSD ไม่เกิน 10% ซึ่งยอมรับได้

4.10.2 ความถูกต้อง

จากการศึกษาความถูกต้องทำได้โดยใช้ Standard addition method ในการหาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์โดยคำนวณจากค่า % recovery เมื่อเติมสารมาตรฐานลงไปตัวอย่าง 3 ระดับความเข้มข้น โดยขวดหนึ่งไม่ต้องใส่สารละลายมาตรฐาน ปีเปตสารละลายมาตรฐานแกมมาอริซานอลให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 1–15 มิลลิกรัมต่อลิตร ฉีดสารละลายที่เตรียมไว้ขวดละ 3 ซ้ำ ในระบบ HPLC อ่านค่าพื้นที่ใต้พีคที่ได้ และคำนวณหาค่า % recovery ของแต่ละความเข้มข้น แล้วหา % recovery ได้ผลดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ตารางแสดงค่า % recovery ของการศึกษา accuracy ของตัวอย่างสารสกัดจากน้ำมันรำข้าว

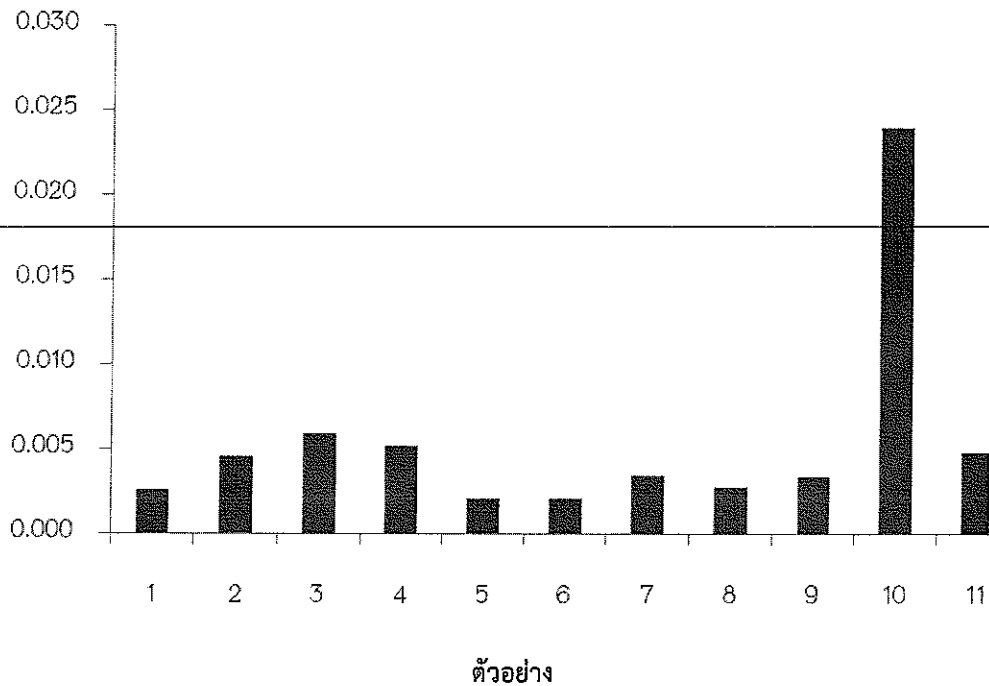
ตัวอย่าง	สารมาตรฐานที่เติมลงไป	% Recovery
น้ำมันรำข้าว	แกมมาอริซานอล 1 มิลลิกรัมต่อลิตร	107.64
น้ำมันรำข้าว	แกมมาอริซานอล 10 มิลลิกรัมต่อลิตร	118.45
น้ำมันรำข้าว	แกมมาอริซานอล 15 มิลลิกรัมต่อลิตร	101.22

สมการเส้นตรงของแกมมาอริซานอล คือ $y = 60076x - 66816$

จากผลการทดลองทดลองตัวอย่างสารสกัดน้ำมันรำข้าว โดยการเติมสารมาตรฐานแกมมาอริซานอลลงไป ในตัวอย่างในความเข้มข้นต่างๆ เมื่อทำการวิเคราะห์แล้วนำค่าได้พีคมาทำการแปลผลทางสถิติโดยการหาค่า % recovery อยู่ในช่วง 101.22-118.45 จึงจะยอมรับได้ จากตาราง % recovery ของแต่ตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้มี % recovery ไม่เกิน 80–120 % ดังนั้น วิธีนี้จึงยอมรับได้

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณแกมมาอริซานอล ในตัวอย่างสารสกัดจากน้ำมันรำข้าวโดยวิธีไอออนแพร์โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงจากการวิเคราะห์หาปริมาณแกมมาอริซานอล เมื่อนำสารละลาย CTAB มาใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ที่มีความเข้มข้น 1.8 มิลลิโมลาร์ และอัตราการไหลเป็น 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที โดยใช้คอลัมน์ชนิด Chromolith®Flash RP-18 endcapped ขนาด 4.6x25 มิลลิเมตร ตรวจวัดด้วยความยาวคลื่น 330 นาโนเมตร ปริมาตรสารละลายที่ฉีดเท่ากับ 20 ไมโครลิตร โดยฉีดสารละลายมาตรฐานแกมมาอริซานอลทั้งในตัวอย่างสารสกัดจากน้ำมันรำข้าว โดยวิธีไอออนแพร์โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยคำนวณจากสมการเส้นตรงของแกมมาอริซานอล ได้ผลการทดลองดังนี้

ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม



ภาพที่ 6 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณแกมมาออร์แกนอลในตัวอย่างข้าว

- 1 และ 2 คือ ข้าวกล้องงอก พันธุ์พิษณุโลก และพันธุ์พวงเงิน สกัดด้วยวิธี Soxhlet extraction
- 3 และ 4 คือ ข้าวกล้องงอก พันธุ์พิษณุโลก และพันธุ์พวงเงิน สกัดด้วยวิธีการแช่เยือกด้วยตัวทำละลาย
- 5 และ 6 คือ ข้าวกล้อง พันธุ์พิษณุโลก และพันธุ์พวงเงิน สกัดด้วยวิธี Soxhlet extraction
- 7 และ 8 คือ ข้าวกล้อง พันธุ์พิษณุโลก และพันธุ์พวงเงิน สกัดด้วยวิธีการแช่เยือกด้วยตัวทำละลาย
- 9 และ 10 คือ ข้าวเหนียว พันธุ์ข้าวเก่า และข้าวพันธุ์ข้าวเก่า สกัดด้วยวิธี Soxhlet extraction
- 11 คือ ข้าวกล้องงอก พันธุ์พิษณุโลก สกัดด้วยวิธี Soxhlet extraction

ผลการสกัดน้ำมันรำข้าวทั้งสองวิธีพบว่า วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ด้วยเครื่อง Soxhlet extraction ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน พบว่าตัวทำละลายเฮกเซนที่สกัดน้ำมันรำข้าวและมีลักษณะของน้ำมันรำข้าวดีที่สุด จากรูปที่ 6 แสดงปริมาณแกมมาออร์แกนอลที่สกัดในตัวอย่างข้าวที่นำมาฉีดเข้าสู่ระบบ HPLC มีค่าเท่ากับ 0.0026 และ 0.0046 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม จากตัวอย่างข้าวกล้องงอก พันธุ์พิษณุโลก และพันธุ์พวงเงิน สกัดด้วยวิธี Soxhlet extraction 0.0060 และ 0.0052 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม จากตัวอย่างข้าวกล้องงอก พันธุ์พิษณุโลก และพันธุ์พวงเงิน สกัดด้วยวิธีการแช่เยือกด้วยตัวทำละลายเฮกเซน 0.0021 และ 0.0021 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม จากตัวอย่างข้าวกล้อง พันธุ์พิษณุโลก และพันธุ์พวงเงิน สกัดด้วยวิธี Soxhlet extraction 0.0035 และ 0.0028 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม จากตัวอย่างข้าวกล้อง พันธุ์พิษณุโลก และพันธุ์พวงเงิน สกัดด้วยวิธีการแช่เยือกด้วยตัวทำละลายเฮกเซน 0.0034 และ 0.0240 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม จากตัวอย่างข้าวเหนียว พันธุ์ข้าวเก่า และข้าวพันธุ์ข้าวเก่า สกัดด้วยวิธี Soxhlet extraction และ 0.0048 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม จากตัวอย่างข้าวกล้องงอก พันธุ์พิษณุโลก สกัดด้วยวิธี Soxhlet extraction ตามลำดับ

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

การนำเทคนิคไอออนแพร์ลิควิดโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงสำหรับวิเคราะห์ปริมาณแกมมาออร์แกนอลในตัวอย่างข้าว สกัดตัวอย่างแล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณโดยใช้คอลัมน์ชนิด Chromolith® Flash RP-18 endcapped ขนาด 4.6x25 มิลลิเมตร วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น CTAB อัตราการไหล 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 330 นาโนเมตร ได้ค่าปริมาณแกมมาออร์แกนอลที่สกัดจากน้ำมันรำข้าว มีค่าสูงสุดเท่ากับ

0.0240 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม จากตัวอย่างข้าวเหนียว พันธุ์ข้าวเก่า สกัดด้วยวิธี Soxhlet extraction ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน นับว่าเป็นวิธีที่ประยุกต์ใช้ที่มีความเฉพาะเจาะจงที่ดีอีกวิธีหนึ่ง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงครามที่สนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- ชัยภา โปธิพุกคณะ. 2552. วารสารเพื่อการวิจัยและพัฒนา องค์การเภสัชกรรม R&D Newsletter. ปีที่ 16 (ฉบับที่ 1 มกราคม-มีนาคม): 22-26
- ชัยญาวัจน์ บวรพงษ์สกุล. 2554. การออกแบบการทดลองและวิเคราะห์การแยกแถมมาออไรซานอลด้วยพอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุล. ปรินญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต.(วิศวกรรมเคมี). สาขาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาเคมี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- นพมาศ มั่นสวรากุล. 2545. การสำรวจปริมาณแถมมา-โอไรซานอลและวิตามินอีในข้าวไทยสายพันธุ์ต่างๆ. วิทยานิพนธ์ ปรินญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพ และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.
- ศลิษา โชคเหมาะ. 2546. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณแถมมาโอไรซานอลในรำข้าวและผลของปริมาณแถมมาโอไรซานอลต่อการเปลี่ยนแปลงค่ากรดของน้ำมันรำข้าว. วิทยานิพนธ์ปรินญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.
- Amaraporn K. Chunyawat B. and Attasak J. 2012. Synthesis of molecularly imprinted polymers from AnAc for the separation of γ -oryzanol. *Korean J. Chem. Eng.*, 29(9): 1279-1284.
- Boonsit P., Julsrigival S., Karladee D. 2010. Gamma oryzanol content in glutinous purple rice landrace varieties. *Chiang Mai University Journal of Natural Science*. 9 (1): 151-157.
- Butsat S. and Siriamornpun S. 2010. Antioxidant capacities and phenolic compounds of the husk, bran and endosperm of Thai rice. *Food chemistry*. 119 (2): 606-613.
- Lai P., Li K.Y., Lu S., Chen H.H. 2009. Phytochemicals and antioxidant activities of solvent extracts from Japannica rice bran. *Food Chemistry*. 117: 538-544.
- Watuny S., Amaraporn K., Attasak J. 2013. Synthesis of molecularly imprinted polymers for the separation of gamma-oryzanol by using methacrylic acid as functional monomer. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 699: 1-9.
- Zullaikeh S., Melwita E., Ju Y.H. 2009. Isolation of Gamma oryzanol from crude rice bran oil. *Bioresource Technology*. 100: 299-302.