ผลของอายุผลิตภัณฑ์ต่อปริมาณแอนโทไซยานินและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในข้าวเมล็ดสี 4 สายพันธุ์

อฑิตยา โรจนสโรช[1*], พรพรรณ โพธิ์ไกร[1], ปิลันธนา เลิศสถิตธนกร[2], ปิยะ วงณ์ญาณิน[1]

[1]สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา กรุงเทพมหานคร
[2]สาขาวิชาการแพทย์แผนไทย คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา กรุงเทพมหานคร
[*]Corresponding author email: atittaya.ro@bsru.ac.th

ได้รับบทความ: 26 เมษายน 2564
ได้รับบทความแก้ไข: 5 ตุลาคม 2564
ยอมรับตีพิมพ์: 12 ตุลาคม 2564

บทคัดย่อ

การรับประทานอาหารที่มีสารต้านอนุมูลอิสระปริมาณสูงช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดโรคไม่ติดต่อเรื้อรังหลายชนิด อย่างไรก็ตาม สารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้มักเสื่อมสลายลงได้จากปฏิกิริยาสลายตัวและปัจจัยหลายประการ ส่งผลให้ประโยชน์ที่ควรได้รับลดลง งานวิจัยนี้ได้ศึกษาปัจจัยด้านอายุผลิตภัณฑ์ที่มีต่อปริมาณโพลีฟีนอล แอนโทไซยานิน และคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของข้าวเมล็ดสี 4 สายพันธุ์ได้แก่ ข้าวเหนียวดำ ข้าวหอมนิล ข้าวไรซ์เบอร์รี่ และข้าวหอมมะลิแดง ซึ่งได้รับความนิยมรับประทานทดแทนข้าวขัดสีเพื่อส่งเสริมสุขภาพ โดยเปรียบเทียบปริมาณสารออกฤทธิ์ด้วยวิธี Folin Ciocalteau phenol assay (FCP) และ Vanillin assay รวมทั้งตรวจวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS และ FRAP จากกลุ่มข้าวเมล็ดสีเก่ามีอายุผลิตภัณฑ์เกิน 180 วัน และกลุ่มข้าวเมล็ดสีใหม่ซึ่งมีอายุผลิตภัณฑ์ไม่เกิน 180 วัน ผลการตรวจวิเคราะห์พบว่า ข้าวเหนียวดำใหม่มีปริมาณโพลิฟีนอล และคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี ABTS และ FRAP สูงกว่าข้าวเหนียวดำเก่า (p-value = 0.044, 0.010 และ 0.001 ตามลำดับ) ข้าวหอมนิลใหม่มีปริมาณแอนโทไซยานินและคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ABTS สูงกว่าข้าวหอมนิลเก่า (p-value = 0.008 และ 0.024 ตามลำดับ) การวิจัยครั้งนี้ไม่พบความแตกต่างของ

ปริมาณโพลีฟีนอล แอนโทไซยานิน และคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ระหว่างกลุ่มข้าวเก่าและข้าวใหม่ จากข้าวสายพันธุ์ไรซ์เบอร์รี่และข้าวหอมมะลิแดง ผลการวิจัยสรุปได้ว่า อายุผลิตภัณฑ์จัดเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อปริมาณสารออกฤทธิ์ในข้าวเมล็ดสี อย่างไรก็ตาม ผลดังกล่าวแปรผันตามกับสายพันธุ์ของข้าวเมล็ดสี จำเป็นต้องทำการตรวจสอบปัจจัยที่เกี่ยวข้องเพิ่มเติมต่อไป

คำสำคัญ: ข้าวเมล็ดสี / อายุผลิตภัณฑ์ / โพลีฟีนอล / แอนโทไซยานิน / สารต้านอนุมูลอิสระ

The Effects of Shelf-life on Anthocyanins Content and Antioxidant Activity of 4 Pigmented Rice Species

Atittaya Rocejanasaroj[1*], Phornpun Phokrai[1], Pirunthana Lertsatitthanakorn[2], Piya Wongyanin[1]

[1]Department of Medical Technology, Faculty of Science and Technology, Bansomdejchaopraya Rajabhat University, Bangkok
[2]Department of Thai Traditional Medicine, Faculty of Science and Technology, Bansomdejchaopraya Rajabhat University, Bangkok
[*]Corresponding author email: atittaya.ro@bsru.ac.th

Received: 26 April 2021
Revised: 5 October 2021
Accepted: 12 October 2021

Abstract

Increased intake of antioxidant-rich food has been reported to decrease the risk of non-communicable diseases (NCDs). However, these antioxidants may deteriorate through several degradation reactions or by many of several factors which consequently decrease their health-promoting effects. This study aimed to examine the effect of product shelf-life on polyphenol, anthocyanin, and their antioxidant properties in 4 pigmented rice including black sticky rice, Hom-Nin black rice, Riceberry rice and Red Jasmine rice which have become mainstream and may replace the white (polished) ones. Polyphenol and anthocyanin content were measured by Folin-Ciocalteau phenol and vanillin assay, along with total antioxidant capacity measured by ABTS and FRAP method in two different types of rice: those storage periods were less than 180 days as new rice and those were longer than 180 days as aged rice. The results revealed that new black sticky rice had polyphenol content and antioxidant activity both measured by

ABTS and FRAP assay significantly higher than aged black sticky rice (*p*-value = 0.044, 0.010 and 0.001 respectively). New Hom-Nin black rice had anthocyanin content and inhibitory activity against ABTS radical higher when compared to the aged rice (*p*-value = 0.008 and 0.024 respectively). However, no statistically significant difference in polyphenol, anthocyanin or antioxidant activity between new and aged Riceberry rice or Red Jasmine rice. Based on these results, one might conclude that active compounds in pigmented rice could be affected by storage time. However, there might be many varieties of each pigmented rice. Further study to identify these factors were required.

Keywords: Pigmented rice / Shelf-life / Polyphenol / Anthocyanin / Antioxidants

บทนำ

ข้าวเมล็ดสี (*Oryza sativa* L.) เป็นหนึ่งในอาหารที่ได้รับความนิยมในการบริโภคเพิ่มขึ้น การศึกษาหลายฉบับรายงานว่า นอกจากข้าวเมล็ดสีจะประกอบด้วยสารออกฤทธิ์ อาทิเช่น สารประกอบกรดฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ สารในกลุ่มโทโคฟีรอล (Tocopherols) และโทโคไตรอีนอล (Tocotrienols) สารประกอบ Steryl ferulates (γ-Oryzanol) และสารประกอบกรดไฟทิก (Phytic acid) รวมถึงแร่ธาตุและวิตามิน เช่นเดียวกับที่พบในข้าวสายพันธุ์อื่น ๆ แล้ว [1] ส่วนเยื่อหุ้มเมล็ดของข้าวเมล็ดสียังประกอบด้วยสารประกอบในกลุ่มแอนโทไซยานิน (Anthocyanin) และโปรแอนโทไซยานิน (Proanthocyanidin) ซึ่งเป็นสารรงควัตถุสีม่วงแดง [2-4] แอนโทไซยานินเป็นฟลาโวนอยด์ที่พบมากผักผลไม้ที่มีสีแดงน้ำเงินม่วง ปัจจุบันมีการค้นพบสารประกอบแอนโทไซยานินในธรรมชาติแล้วมากกว่า 635 ชนิด [5] โดยที่พบเป็นหลักมี 6 ชนิดคือ Cyanidin, Delphinidin, Malvidin, Peonidin, Petunidin และ Pelargonidin [6] ผลการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยง สัตว์ทดลองพบว่า แอนโทไซยานินนั้นมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ โดยมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ [7] ยับยั้งการเกิดและพัฒนาของมะเร็งหลายชนิด [8,9] ป้องกันการเกิดโรคหลอดเลือดและหัวใจ [10,11] สามารถปรับสมดุลระบบเมตาบอลิซึมและมีส่วนช่วยในการควบคุมน้ำหนัก โรคเบาหวาน และภาวะอ้วน [12] ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้มีความสัมพันธ์เชื่อมโยงกับคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของแอนโทไซยานิน ผลการศึกษาของวาริน แสงกิติโกมลและคณะ [13] พบว่า แอนโทไซยานินที่สกัดจากข้าวเหนียวดำ ข้าวสีนิล และข้าวแดงสายพันธุ์ไทย สามารถปรับการแสดงออกของยีน LDLR ในเซลล์ตับเพาะเลี้ยง สอดคล้องกับการศึกษาของ Xia และคณะ [14,15] ซึ่งพบว่า สารสกัดข้าวสีนิลสามารถลดระดับ Total cholesterol และ Non-HDL cholesterol (HDL-C) ในซีรัมสัตว์ทดลอง นอกจากนี้ Daiponmak และคณะ [16] พบว่า สารโปรแอนโทไซยานินจากข้าวแดงมีฤทธิ์ในการต้านปฏิกิริยา Glycation สอดคล้องกับการศึกษาของ Guo และคณะ [17] ซึ่งพบว่า สารสกัดข้าวสีนิลมีฤทธิ์เพิ่มความไวต่อฮอร์โมนอินซูลินในสัตว์ทดลองได้ นอกจากนี้ การศึกษาของ Nam และคณะ [18,19] ยังพบว่า สารสกัดข้าวเมล็ดสีพันธุ์ Suwon 415 สามารถยับยั้งเอนไซม์ Xanthine oxidase activity และยับยั้งปฏิกิริยา Lipid peroxidation การวิจัยเชิงทดลองทางคลินิกพบว่า กลุ่มประชากรที่บริโภคผักผลไม้ที่มีองค์ประกอบของแอนโทไซยานินปริมาณมากมีความชุกของโรคไม่ติดต่อเรื้อรังน้อยกว่ากลุ่มประชากรที่บริโภคผักผลไม้ที่มีแอนโทไซยานินต่ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ [20,21] ดังนั้น การบริโภคผักผลไม้ที่มีสารประกอบแอนโทไซยานินสูงจึงอาจมีส่วนช่วยในป้องกันโรคเรื้อรังต่าง ๆ และอาจนำมาพัฒนาเป็นอาหารเสริมสุขภาพได้

อย่างไรก็ตาม แม้โครงสร้างโมเลกุลแอนโทไซยานินจะมีความเสถียรสูง แต่กลับพบว่าแอนโทไซยานินในผักผลไม้จะเกิดการสลายตัวเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงปัจจัยสภาวะแวดล้อม โดยเฉพาะจากขบวนการปรุงอาหารทั้งการเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรด-ด่าง สารประกอบองค์ประกอบอื่นที่ประกอบในอาหารชนิดนั้น และอุณหภูมิความร้อนที่ใช้ประกอบอาหาร [22-25] อัตราการสลายตัวของแอนโทไซยานินนั้นยังขึ้นกับชนิดและหมู่ฟังก์ชั่นที่มาเกาะบนโครงสร้างแอนโทไซยานินในอาหารนั้นด้วย [26] นอกจากขบวนการปรุงอาหารแล้ว อายุและวิธีการจัดเก็บผลิตภัณฑ์ผักผลไม้เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีบทบาทต่อปริมาณแอนโทไซยานิน โดยพบว่าแอนโทไซยานินในผักผลไม้หลายชนิดจะมีอัตราการสลายตัวลดปริมาณลงไปเรื่อย ๆ แปรผันตามระยะเวลาการเก็บรักษา [27] สำหรับแอนโทไซยานินในข้าวเมล็ดสีนั้น ในขณะนี้ ยังไม่มีการศึกษาปัจจัยด้านอายุผลิตภัณฑ์ที่มีผลต่อปริมาณและประสิทธิภาพของแอนโทไซยานิน คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณแอนโทไซยานินและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในข้าวเมล็ดสี 4 สายพันธุ์ที่นิยมในการบริโภคในประเทศไทยได้แก่ ข้าวหอมนิล ข้าวไรซ์เบอร์รี่ ข้าวแดง และข้าวเหนียวดำ เนื่องจากอายุผลิตภัณฑ์เป็นปัจจัยที่ผู้บริโภคสามารถใช้พิจารณาในการเลือกซื้อข้าวเมล็ดสีที่มีคุณภาพได้ด้วยตนเอง ผลการวิจัยครั้งนี้ยังสามารถใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาและเป็นฐานข้อมูลในการแนะนำส่งเสริมสุขภาพต่อผู้บริโภคเพื่อให้ได้รับประโยชน์จากการรับประทานข้าวเมล็ดสีอย่างสูงสุดต่อไป

วัสดุและวิธีการ

สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารประกอบโพลีฟีนอล แอนโทไซยานิน และคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระได้แก่ Folin-Ciocalteu reagents, Sodium carbonate, Sodium acetate, Gallic acid, Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid), ABTS (2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid), Vanillin, Catechin, TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine), Iron (III) chloride hexahydrate, Iron (II) sulfate heptahydrate, Methanol และ Potassium persulfate โดยสารเคมีที่ใช้ในการทดลองทั้งหมดนี้เป็นชนิดคุณภาพวิเคราะห์ (Analytical grade) หรือเทียบเท่าจากบริษัทผู้ผลิต Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

การเก็บตัวอย่างข้าวเมล็ดสี

ตัวอย่างข้าวเมล็ดสี 4 สายพันธุ์ได้แก่ ข้าวหอมนิล ข้าวไรซ์เบอร์รี่ ข้าวหอมมะลิแดง และข้าวเหนียวดำ สายพันธุ์ละ 12 ตัวอย่าง จะถูกสุ่มเลือกจากร้านค้าจำหน่ายในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล โดยเลือกเฉพาะผลิตภัณฑ์ที่มีการระบุวันเดือนปีที่ผลิตและ

วันหมดอายุที่ชัดเจน และแบ่งผลิตภัณฑ์ข้าวเมล็ดสีออกเป็น 2 กลุ่มเพื่อศึกษาเปรียบเทียบ ได้แก่ กลุ่มผลิตภัณฑ์ข้าวเมล็ดสีที่เพิ่งผลิตออกจำหน่ายหรือมีอายุของผลิตภัณฑ์น้อยกว่า 6 เดือน จำนวน 24 ตัวอย่าง (ข้าวเมล็ดสีใหม่) และกลุ่มผลิตภัณฑ์ข้าวเมล็ดสีที่วางจำหน่ายนานแล้วหรือมีอายุของผลิตภัณฑ์มากกว่า 6 เดือน (ข้าวเมล็ดสีเก่า) จำนวน 24 ตัวอย่าง

การเตรียมตัวอย่างข้าวเมล็ดสี

นำตัวอย่างข้าวเมล็ดสีมาบดให้ละเอียดแล้วกรองผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร ผงตัวอย่างข้าวเมล็ดสีจำนวน 5 กรัม จะถูกผสมกับตัวทำละลาย 80% เมทานอล ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เพื่อสกัดสารประกอบโพลีฟีนอลและสารออกฤทธิ์ที่สำคัญอื่นด้วยเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Shaking incubator) ที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมง โดยทำการสกัดตัวอย่างข้าวซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง หรือจนกว่าจะสังเกตพบว่า สารละลายที่สกัดได้ไม่มีสีออกมาเพิ่มเติม จากนั้นกรองสารสกัดข้าวเมล็ดสีที่ได้ผ่านกระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 ไมโครเมตรเพื่อขจัดฝุ่นตะกอนที่ไม่ละลายน้ำออก ก่อนทำการระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator) ที่ความดัน 200 มิลลิบาร์ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แรงหมุน 70 รอบต่อนาที จนตัวทำละลายถูกระเหยออกหมดแล้วละลายผงสารสกัดข้าวเมล็ดสีด้วย Milli-Q water ตัวอย่างละ 30 มิลลิลิตร เก็บไว้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณสารโพลีฟีนอล แอนโทไซยานิน และและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดข้าวเมล็ดสีต่อไป

การวิเคราะห์ปริมาณสารโพลีฟีนอลที่มีในสารสกัดข้าวเมล็ดสีด้วยวิธี Folin Ciocalteau phenol assay (FCP)

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดด้วยเทคนิค FCP นี้ [28] อ้างอิงกับปฏิกิริยาการถ่ายโอนอิเล็กตรอนเดี่ยว โดยโพลีฟีโนลิกในสารสกัดนั้นจะสามารถรีดิวซ์สารละลาย Folin Ciocalteau phenol reagent ที่มีสีเหลืองให้เปลี่ยนเป็นสารละลายสีน้ำเงิน โดยความเข้มของสีสารละลายที่เกิดขึ้นจะแปรผันตามปริมาณโพลีฟีนอลที่มีในตัวอย่างสารสกัด การทดลองเริ่มโดยผสมสารสกัดข้าวเมล็ดสีหรือสารมาตรฐาน 500 ไมโครลิตรกับ 10% Folin-Ciocalteu reagent 500 ไมโครลิตร จากนั้นตั้งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที แล้วเติม Na_2CO_3 ความเข้มข้น 10 มิลลิโมล ปริมาตร 350 ไมโครลิตรแล้วตั้งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องต่ออีก 20 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร โดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน รายงานค่าปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลรวมในหน่วยมิลลิโมลสมมูลของกรดแกลลิกต่อกิโลกรัมของสารตัวอย่างแห้ง (mM Gallic acid equivalent (GAE)/kg DW)

การตรวจวัดปริมาณสารประกอบแอนโทไซยานินที่มีในสารสกัดข้าวเมล็ดสีด้วยวิธี Vanillin assay

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบในกลุ่มโปรแอนโทไซยานิดินและแอนโทไซยานินในสารสกัดข้าวเมล็ดสีนี้ดัดแปลงจากเทคนิคของ Sun และคณะ [29] เมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นกรด สายพอลิเมอร์ของโปรแอนโทไซยานิดินและแอนโทไซยานินจะเกิดปฏิกิริยาการสลายตัวได้เป็นโมโนเมอร์ที่สามารถทำปฏิกิริยาต่อกับสารประกอบวานิลลิน เกิดเป็นผลิตภัณฑ์สารประกอบเชิงซ้อนแวนนาลินแอดดัก (Vanillin adduct) ที่มีสีชมพูแดง ความเข้มของสีสารละลายที่เกิดขึ้นจะแปรผันตามปริมาณโปรแอนโทรไซยานิดินและแอนโทไซยานินที่มีในตัวอย่างสารสกัด การทดลองจะเริ่มโดยผสมสารสกัดข้าวเมล็ดสี 1 มิลลิลิตรกับ Vanillin reagent 2 มิลลิลิตร ในสภาวะที่เป็นกรด (Vanillin 1 กรัมใน 70% H_2SO_4 100 มิลลิลิตร) แล้วตั้งทิ้งไว้ที่มืด อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร โดยใช้คาเทชินเป็นสารมาตรฐาน รายงานค่าปริมาณแอนโทไซยานินรวมในหน่วยมิลลิโมลสมมูลของคาเทชินต่อกิโลกรัมของสารตัวอย่างแห้ง (mM Catechin equivalent (CAE)/kg DW)

การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดตัวอย่างข้าวเมล็ดสีด้วยวิธี 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzoline-6-sulfonic acid) หรือ ABTS method

ABTS assay เป็นการวัดความสามารถของสารทดสอบในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของสารประกอบ 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical ในหลอดทดลอง หาก ABTS radical ซึ่งมีสีน้ำเงิน ถูกรีดิวซ์โดยสารต้านอนุมูลอิสระจะกลับไปอยู่ในรูป ABTS ที่ไม่มีสี ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจะแปรผันกับความเข้มของสีน้ำเงินของ $ABTS^{\bullet+}$ ที่ลดลง ในการทดสอบนี้จะกำหนดให้ค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นของ $ABTS^{\bullet+}$ ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร มีค่าเท่ากับ 0.7 ± 0.02 ปฏิกิริยาจะเริ่มจากการผสมสารสกัดข้าวเมล็ดสี 75 ไมโครลิตร กับสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ ความเข้มข้น 7 มิลลิโมล (มี Potassium persulfate ความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลเป็นองค์ประกอบ) 1,425 ไมโครลิตร จากนั้นตั้งปฏิกิริยาในที่มืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงหลังการทำปฏิกิริยา นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้นี้หักลบจากค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้น นำค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงมาคำนวณหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้โทรลอกซ์เป็นสารมาตรฐาน รายงานฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหน่วยไมโครโมลสมมูลของโทรลอกซ์ต่อกิโลกรัมของสารตัวอย่างแห้ง (μM Trolox equivalent (TE)/kg DW)

การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดตัวอย่างข้าวเมล็ดสี ด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

การวิเคราะห์ความสามารถในการจ่ายอิเล็กตรอนของสารทดสอบด้วยวิธี Ferric reducing/antioxidant power (FRAP) นี้ดัดแปลงจากวิธีของ Benzie และคณะ [30] หากสารสกัดตัวอย่างมีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนหรือมีคุณสมบัติเป็นสาร Reducing agent จะสามารถเปลี่ยนสารประกอบ Fe(III)-TPTZ complex ซึ่งมีสีเหลืองให้อยู่ในรูป Fe(II)-TPTZ complex ซึ่งมีสีน้ำเงิน โดยความสามารถในรีดิวซ์ของสารสกัดจะแปรผันกับความเข้มของสีน้ำเงินที่เกิดขึ้น การทดลองจะเริ่มโดยผสมสารสกัดข้าวเมล็ดสี 60 ไมโครลิตรกับสารละลาย FRAP reagent 1.8 มิลลิลิตร ตั้งปฏิกิริยาในที่มืด อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร โดยใช้สารละลาย $Fe(II)SO_4$ เป็นสารมาตรฐาน รายงานฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหน่วยไมโครโมลสมมูลของเฟอร์รัส (Ferrous) ต่อกิโลกรัมของสารตัวอย่างแห้ง (μM Fe(II)/kg DW)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์แต่ละตัวอย่างจะทำการตรวจซ้ำ 3 ครั้ง แสดงผลการทดลองในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม SPSS (Statistical Package for the Social Science) Version 15.0 เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแต่ละกลุ่มตัวอย่างด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One way ANOVA) โดยกำหนดระดับความเชื่อมั่น 95% หรือกลุ่มตัวอย่างจะมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญเมื่อ $p \leq 0.05$

ผลการศึกษา

อายุผลิตภัณฑ์ข้าวและปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลและสารประกอบแอนโทไซยานินรวมในสารสกัดข้าวเมล็ดสี 4 สายพันธุ์

ผลการเก็บข้อมูลอายุผลิตภัณฑ์ข้าวเมล็ดสีทั้ง 24 ตัวอย่างพบว่า กลุ่มผลิตภัณฑ์ข้าวเมล็ดสีใหม่มีอายุผลิตภัณฑ์เฉลี่ย 3.5 เดือน และผลิตภัณฑ์ข้าวเมล็ดสีเก่ามีอายุผลิตภัณฑ์เฉลี่ย 12.3 เดือน

ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลและแอนโทไซยานินรวมในตัวอย่างสารสกัดข้าวเมล็ดสี 4 สายพันธุ์แสดงในตารางที่ 1 เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารสำคัญในตัวอย่างข้าวเมล็ดสีทั้งหมดพบว่า ข้าวเหนียวดำมีปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลเฉลี่ยและแอนโทไซยานินเฉลี่ยสูงที่สุด ข้าวไรซ์เบอร์รี่มีปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลเฉลี่ยและแอนโทไซยานินเฉลี่ยรองลงมา ข้าวหอมนิลและข้าวหอมมะลิแดงมีปริมาณ

สารประกอบโพลีฟีนอลและสารแอนโทไซยานินใกล้เคียงกัน สารสกัดข้าวเมล็ดสีที่ตรวจพบปริมาณสารโพลีฟีนอลและแอนโทไซยานินสูงที่สุดได้แก่ ตัวอย่างข้าวเหนียวดำใหม่ โดยมีระดับสารประกอบโพลีฟีนอล 41.21 ± 2.68 mM GAE/kg DW และแอนโทไซยานิน 5.51 ± 1.69 mM CAE/kg DW ตามลำดับ ข้าวเมล็ดสีที่ตรวจพบปริมาณสารโพลีฟีนอลต่ำที่สุดได้แก่ ข้าวหอมมะลิแดงเก่า โดยมีระดับสารประกอบโพลีฟีนอล 4.48 ± 0.86 mM GAE/kg DW และข้าวเมล็ดสีที่ตรวจพบปริมาณแอนโทไซยานินต่ำที่สุดได้แก่ ข้าวหอมนิลเก่า ซึ่งมีสารประกอบแอนโทไซยานิน 0.40 ± 0.19 mM CAE/kg DW เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลและแอนโทไซยานินรวมเฉลี่ยตามอายุผลิตภัณฑ์ข้าวสีของสายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิดพบว่า ตัวอย่างข้าวเหนียวดำใหม่มีปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลมากกว่าตัวอย่างข้าวเหนียวดำเก่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.044) ข้าวหอมนิลใหม่มีปริมาณสารประกอบแอนโทไซยานินมากกว่าตัวอย่างข้าวหอมนิลเก่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p= 0.008)

ตารางที่ 1 ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลและแอนโทไซยานินในสารสกัดข้าวเมล็ดสี 4 สายพันธุ์แยกตามอายุของผลิตภัณฑ์

สายพันธุ์ข้าวเมล็ดสี	**อายุผลิตภัณฑ์**	Total polyphenol content (mM GAE/kg DW)	Total anthocyanin content (mM CAE/kg DW)
		Mean (±SD)	Mean (±SD)
ข้าวเหนียวดำ	เก่า*	29.91 (15.24)[a]	5.45 (1.76)
ข้าวเหนียวดำ	ใหม่	41.21 (2.68)[a]	5.51 (1.69)
ข้าวหอมนิล	เก่า	4.62 (1.73)	0.40 (0.19)[b]
ข้าวหอมนิล	ใหม่	5.48 (0.65)	0.59 (0.03)[b]
ข้าวไรซ์เบอร์รี่	เก่า	14.88 (2.96)	5.13 (1.88)
ข้าวไรซ์เบอร์รี่	ใหม่	13.35 (0.90)	4.51 (0.49)
ข้าวหอมมะลิแดง	เก่า	4.48 (0.86)	0.70 (0.16)
ข้าวหอมมะลิแดง	ใหม่	5.04 (2.68)	0.54 (0.39)

*เก่า=ข้าวเมล็ดสีที่มีอายุผลิตภัณฑ์มากกว่า 6 เดือน จำนวน 6 ตัวอย่าง ใหม่=ข้าวเมล็ดสีที่มีอายุผลิตภัณฑ์น้อยกว่า 6 เดือน จำนวน 6 ตัวอย่าง อักษร a, b บ่งชี้ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (α=0.05)

คุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดข้าวเมล็ดสี 4 สายพันธุ์

ผลการตรวจวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค ABTS method และเทคนิค FRAP method ในตัวอย่างสารสกัดข้าวเมล็ดสี 4 สายพันธุ์แสดงในตารางที่ 2 เมื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างข้าวเมล็ดสีทั้งหมด พบว่า ข้าวเหนียวดำมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเมื่อตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ABTS และ FRAP สูงที่สุด ข้าวไรซ์เบอร์รี่ ข้าวหอมนิล และข้าวหอมมะลิแดงมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระรองลงมาตามลำดับ ข้าวเมล็ดสีที่ตรวจพบคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดได้แก่ ตัวอย่างข้าวเหนียวดำใหม่ โดยมีระดับ ABTS value เท่ากับ 580.67 ± 11.10 μM TLE/kg DW และ FRAP value เท่ากับ 389.12 ± 69.30 μM Fe(II)E/kg DW ตามลำดับ ข้าวเมล็ดสีที่ตรวจพบคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระเมื่อตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ABTS ต่ำที่สุดได้แก่ ข้าวหอมนิลเก่า โดยมีระดับ ABTS value เท่ากับ 7.73 ± 0.52 μM TLE/kg DW และข้าวเมล็ดสีที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระเมื่อตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FRAP ต่ำที่สุดได้แก่ ข้าวหอมมะลิแดงใหม่ โดยมีระดับ FRAP value เท่ากับ 45.35 ± 2.34 μM Fe(II)E/kg DW เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเฉลี่ยตามอายุผลิตภัณฑ์ข้าวสีสายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิดพบว่า ข้าวเหนียวดำใหม่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระทั้งการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี ABTS และ FRAP มากกว่าตัวอย่างข้าวเหนียวดำเก่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.010 และ 0.001 ตามลำดับ) และข้าวหอมนิลใหม่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเมื่อตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี ABTS มากกว่าตัวอย่างข้าวหอมนิลเก่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.24)

ตารางที่ 2 คุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระเมื่อตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี ABTS และ FRAP จากสารสกัดข้าวเมล็ดสี 4 สายพันธุ์แยกตามอายุของผลิตภัณฑ์

สายพันธุ์ข้าวเมล็ดสี	อายุผลิตภัณฑ์	Antioxidant activity	
		ABTS value (μM TLE/kg DW)	FRAP value (μM Fe(II)E/kg DW)
		Mean (±SD)	Mean (±SD)
ข้าวเหนียวดำ	เก่า*	566.55 (9.45)[a]	219.14 (113.95)[b]
ข้าวเหนียวดำ	ใหม่	580.67 (11.1)[a]	389.12 (69.30)[b]
ข้าวหอมนิล	เก่า	7.73 (0.52)[c]	85.78 (28.46)
ข้าวหอมนิล	ใหม่	9.32 (1.36)[c]	104.67 (14.25)
ข้าวไรซ์เบอร์รี่	เก่า	286.27 (4.45)	217.24 (24.67)
ข้าวไรซ์เบอร์รี่	ใหม่	285.58 (5.83)	206.12 (8.66)
ข้าวหอมมะลิแดง	เก่า	88.47 (27.79)	45.35 (2.34)
ข้าวหอมมะลิแดง	ใหม่	165.21 (16.33)	112.92 (2.04)

*เก่า=ข้าวเมล็ดสีที่มีอายุผลิตภัณฑ์มากกว่า 6 เดือน จำนวน 6 ตัวอย่าง ใหม่=ข้าวเมล็ดสีที่มีอายุผลิตภัณฑ์น้อยกว่า 6 เดือน จำนวน 6 ตัวอย่าง อักษร a, b บ่งชี้ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (α=0.05)

วิจารณ์

ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารองค์ประกอบในเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพจากข้าวเมล็ดสี 4 สายพันธุ์พบว่า ข้าวเหนียวดำมีปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอล แอนโทไซยานิน และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด ข้าวไรซ์เบอร์รี่มีปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอล แอนโทไซยานิน และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ รองมา ข้าวหอมนิลและข้าวหอมมะลิแดงมีปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอล แอนโทไซยานิน และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระน้อยที่สุด ผลการศึกษาปริมาณสารโพลีฟีนอลในข้าวเมล็ดสีเปรียบเทียบส่วนเนื้อเมล็ดข้าว (Endosperm) เยื่อหุ้มเมล็ดข้าวหรือชั้นรำข้าว (Aleurone layer หรือ Rice bran) และเปลือกข้าว (Rice husk) พบว่า สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะอยู่ในชั้นเยื่อหุ้มเมล็ดสูงที่สุด [31] และจากการศึกษาลักษณะจุลกายวิภาคศาสตร์ในส่วนเยื่อหุ้มเมล็ดของข้าว (*Oryza sativa* L.) พบว่า เยื่อหุ้มเมล็ดข้าวนั้นมีเซลล์ Aleurone เรียงตัวได้มากกว่า 1 ชั้น [32] ถูกควบคุมโดยยีน OsROS1 เป็นหลัก [33] ซึ่งได้รับอิทธิพลต่อการแสดงออกจากปัจจัยหลายประการ [34,35] ส่งผลให้ข้าวเมล็ดสีแต่ละสายพันธุ์มีส่วนของชั้นเยื่อหุ้มเมล็ดและปริมาณสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกัน สอดคล้องกับงานวิจัยของ Pitija และคณะ [36] ซึ่งทำการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณสารแอนโทไซยานินในข้าวเมล็ดสีสายพันธุ์ไทยหลายชนิดพบว่า ข้าวไรซ์เบอร์รี่และข้าวสายพันธุ์

ลูกผสมข้าวไรซ์เบอร์รี่ มีปริมาณสารประกอบแอนโทไซยานินและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าข้าวหอมนิล ดังนั้น ข้าวเมล็ดสีที่มีส่วนเยื่อหุ้มเมล็ดหนา เช่น ข้าวเหนียวดำจึงมีปริมาณแอนโทไซยานินและสารต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับข้าวเมล็ดสีที่มีชั้นเยื่อหุ้มเมล็ดบางกว่า

เมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณสารองค์ประกอบในเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพระหว่างข้าวเมล็ดสีเก่าและข้าวเมล็ดสีใหม่ที่วางจำหน่าย 4 สายพันธุ์พบว่า อายุผลิตภัณฑ์ข้าวไรซ์เบอร์รี่และข้าวหอมมะลิแดงนั้นไม่มีผลต่อปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอล แอนโทไซยานิน รวมถึงสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี ABTS และ FRAP อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในการเปรียบเทียบอายุผลิตภัณฑ์ข้าวเหนียวดำพบว่า ข้าวเหนียวดำใหม่นั้นมีปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่มากกว่าข้าวเหนียวดำเก่า อย่างไรก็ตาม ปริมาณแอนโทไซยานินในข้าวเหนียวดำทั้งสองกลุ่มไม่มีความแตกต่างกัน ผลการทดสอบนี้บ่งชี้ว่า ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดข้าวเหนียวดำในการวิจัยครั้งนี้เป็นผลที่เกิดจากสารประกอบโพลีฟีนอล ในปัจจุบัน มีการค้นพบและระบุชนิดของสารประกอบแอนโทไซยานินในข้าวเมล็ดสีแล้วมากกว่า 18 ชนิด Cyanidin-3-O-glucoside และ Peonidin-3-O-glucoside เป็นแอนโทไซยานินองค์ประกอบหลักในข้าวเมล็ดสีหลายชนิด ทั้งข้าวเหนียวดำ ข้าวไรซ์เบอร์รี่ และข้าวหอมมะลิแดง [16,37,38] เป็นแอนโทไซยานินที่มีความคงตัวมากที่สุด แม้อยู่ในสภาวะที่เป็นกรดด่างหรืออุณหภูมิสูง [26] อย่างไรก็ตาม ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบแอนโทไซยานินในข้าวหอมนิลพบว่า ข้าวหอมนิลใหม่มีปริมาณแอนโทไซยานินและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ มากกว่าข้าวหอมนิลเก่า ซึ่งบ่งชี้ว่า แอนโทไซยานินในข้าวหอมนิลนั้นมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ แต่อาจมีโครงสร้างหรือมีปัจจัยร่วมที่ส่งผลให้ไวต่อการเกิดปฏิกิริยาสลายตัวได้สูง จึงตรวจพบปริมาณน้อยลงเมื่อมีระยะเวลาการเก็บผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มขึ้น ซึ่งปัจจัยที่เร่งขบวนการสลายตัวของแอนโทไซยานินนอกจากปัจจัยภายนอกแล้วยังอาจเกิดจากปัจจัยภายในข้าวหอมนิลเอง เช่น จากการทำปฏิกิริยากับสารองค์ประกอบชนิดอื่นภายในเซลล์ [39,40] หรือเกิดจากการถูกเอนไซม์ภายในเซลล์ Aleurone เร่งปฏิกิริยาตัดโครงสร้างโมเลกุลและหมู่ฟังก์ชั่นออก [41-45]

อย่างไรก็ตาม อายุผลิตภัณฑ์ข้าวหอมนิลไม่มีผลต่อปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลและสารต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลองนั้น สามารถแบ่งกลไกการเกิดปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระออกเป็น 2 ประเภทคือ ปฏิกิริยาการแลกเปลี่ยนไฮโดรเจนอะตอม (Hydrogen atom transfer (HAT)-based reaction) และปฏิกิริยาการถ่ายโอนอิเล็กตรอนเดี่ยว (Single electron transfer (SET)-based reaction) การตรวจวิเคราะห์

ด้วยวิธี FRAP จะเป็นตรวจวัดความสามารถในการรีดิวซ์หรือเกิดปฏิกิริยาส่งผ่านอิเล็กตรอนให้สารคู่ปฏิกิริยาเป็นหลัก ในขณะที่วิธี ABTS นั้นจะตรวจวัดความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระทั้งแบบ SET และ HAT [46] ผลการทดสอบข้าวหอมนิลที่ได้บ่งชี้ว่า สารสกัดข้าวหอมนิลใหม่มีสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถออกฤทธิ์ผ่านกลไกการแลกเปลี่ยนไฮโดรเจนอะตอมได้มากกว่า แต่สารดังกล่าวเกิดปฏิกิริยาสลายตัวได้ง่ายจึงส่งผลให้พบปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระดังกล่าวนี้แตกต่างจากสารสกัดข้าวหอมนิลเก่า ดังเช่นในการศึกษาสารประกอบแอนโทไซยานินจากต้น *Hibiscus sabdariffa* ของ Sinela และคณะ [47] พบว่า Delphinidin 3-O-sambubioside เกิดการสลายตัวได้ง่ายกว่า Cyanidin 3-O-sambubioside นอกจากนี้ ในการศึกษาของ Yan และคณะ [48,49] พบว่า หากแอนโทไซยานินในข้าวเมล็ดสีถูกเอนไซม์ Acetyl-CoA carboxylase เร่งปฏิกิริยา Acylation จะเกิดเป็นสารประกอบ Acylating anthocyanin ที่สลายตัวได้ง่าย ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่า ชนิดของแอนโทไซยานินในข้าวหอมนิลนั้นแตกต่างจากข้าวเมล็ดสีสายพันธุ์อื่นที่นำมาทดสอบหรืออาจมีปัจจัยในข้าวหอมนิลที่ส่งผลให้เกิดการสลายตัวของแอนโทไซยานิน ส่งผลให้ปริมาณแอนโทไซยานินในข้ามหอมนิลลดลงแปรผันตามระยะเวลาการเก็บผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มขึ้น

สรุป

จากผลการทดสอบทั้งหมดพบว่า อายุผลิตภัณฑ์นับเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลและแอนโทไซยานินในข้าวเมล็ดสี ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ อย่างไรก็ตาม จำนวนตัวอย่างและสายพันธุ์ข้าวเมล็ดสีในการศึกษาครั้งนี้ยังมีจำนวนน้อย รวมทั้งสารสกัดข้าวเมล็ดสีในการวิจัยนี้นั้นเป็นสารสกัดแบบหยาบ ซึ่งอาจทำให้การแปลผลมีความคลาดเคลื่อนไปจากความจริง จึงควรเพิ่มจำนวนตัวอย่างข้าวในการศึกษาและจำเป็นต้องทำการตรวจและจำแนกชนิดของสารประกอบแอนโทไซยานิน และสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอื่นในข้าวเมล็ดสีแต่ละสายพันธุ์เพิ่มเติมต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Goufo P, Trindade H. Rice antioxidants: phenolic acids, flavonoids, anthocyanins, proanthocyanidins, tocopherols, tocotrienols, γ-oryzanol, and phytic acid. Food Sci Nutr 2014;2:75-104.
2. Hao J, Zhu H, Zhang Z, Yang S, Li H. Identification of anthocyanins in black rice (*Oryza sativa* L.) by UPLC/Q-TOF-MS and their *in vitro* and *in vivo* antioxidant activities. J Cereal Sci 2015;64:92-9.

3. Pedro AC, Granato D, Rosso ND. Extraction of anthocyanins and polyphenols from black rice (*Oryza sativa* L.) by modeling and assessing their reversibility and stability. Food Chem 2016;191:12-20.
4. He S, Lou Q, Shi J, Sun H, Zhang M, Li Q. Water extraction of anthocyanins from black rice and purification using membrane separation and resin adsorption. J Food Process Pres 2017;41:e13091.
5. He J, Giusti MM. Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. Annu Rev Food Sci T 2010;1:163-87.
6. Mattioli R, Francioso A, Mosca L, Silva P. Anthocyanins: a comprehensive review of their chemical properties and health effects on cardiovascular and neurodegenerative diseases. Molecules 2020;25:3809.
7. Vendrame S, Klimis-Zacas D. Anti-inflammatory effect of anthocyanins via modulation of nuclear factor-**K**B and mitogen-activated protein kinase signaling cascades. Nutr Rev 2015;73:348-58.
8. Zhou L, Wang H, Yi J, Yang B, Li M, He D, et al. Anti-tumor properties of anthocyanins from *Lonicera caerulea* 'Beilei' fruit on human hepatocellular carcinoma: *in vitro* and *in vivo* study. Biomed Pharmacother 2018;104:520-9.
9. Joshi R, Rana A, Kumar V, Kumar D, Padwad YS, Yadav SK, et al. Anthocyanins enriched purple tea exhibits antioxidant, immunostimulatory and anticancer activities. J Food Sci Technol 2017;54:1953-63.
10. Hassellund SS, Flaa A, Kjeldsen SE, Seljeflot I, Karlsen A, Erlund I, et al. Effects of anthocyanins on cardiovascular risk factors and inflammation in pre-hypertensive men: a double-blind randomized placebo-controlled crossover study. J Hum Hypertens 2013;27:100-6.
11. Hollands WJ, Armah CN, Doleman JF, Perez-Moral N, Winterbone MS, Kroon PA. 4-Week consumption of anthocyanin-rich blood orange juice does not affect LDL-cholesterol or other biomarkers of CVD risk and glycaemia compared with standard orange juice: a randomised controlled trial. Brit J Nutr 2018;119:415-21.
12. Lee YM, Yoon Y, Yoon H, Park HM, Song S, Yeum KJ. Dietary Anthocyanins against obesity and inflammation. Nutrients 2017;9:1089.

13. Sangkitikomol W, Tencomnao T, Rocejanasaroj A. Effects of Thai black sticky rice extract on oxidative stress and lipid metabolism gene expression in HepG2 cells. Genet Mol Res 2010;9:2086-95.
14. Hiemori M, Koh E, Mitchell AE. Influence of cooking on anthocyanins in black rice (Oryza sativa L. japonica var. SBR). J Agr Food Chem. 2009;57(5):1908-14.
15. Xia M, Ling WH, Ma J, Kitts DD, Zawistowski J. Supplementation of diets with the black rice pigment fraction attenuates atherosclerotic plaque formation in apolipoprotein e deficient mice. The J Nutr 2003;133:744-51.
16. Daiponmak W, Senakun C, Siriamornpun S. Antiglycation capacity and antioxidant activities of different pigmented Thai rice. Int J Food Sci Tech 2014;49:1805-10.
17. Guo H, Ling W, Wang Q, Liu C, Hu Y, Xia M, et al. Effect of anthocyanin-rich extract from black rice (*Oryza sativa* L. *indica*) on hyperlipidemia and insulin resistance in fructose-fed rats. Plant Food Hum Nutr 2007;62:1-6.
18. Nam SH, Choi SP, Kang MY, Kozukue N, Friedman M. Antioxidative, antimutagenic, and anticarcinogenic activities of rice bran extracts in chemical and cell assays. J Agr food Chem 2005;53:816-22.
19. Yean JN, Seok HN, Mi YK. Cholesterol-lowering efficacy of unrefined bran oil from the pigmented black rice (*Oryza sativa* L cv. Suwon 415) in hypercholesterolemic rats. Food Sci Biotechnol 2008;17:457-63.
20. D'Cunha NM, Georgousopoulou EN, Dadigamuwage L, Kellett J, Panagiotakos DB, Thomas J, et al. Effect of long-term nutraceutical and dietary supplement use on cognition in the elderly: a 10-year systematic review of randomised controlled trials. Brit J Nutr 2018;119:280-98.
21. Guo X, Yang B, Tan J, Jiang J, Li D. Associations of dietary intakes of anthocyanins and berry fruits with risk of type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. Eur J Clin Nutr 2016;70:1360-7.
22. Patras A, Brunton NP, O'Donnell C, Tiwari BK. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. Trends Food Sci Tech 2010;21:3-11.

23. Loypimai P, Moongngarm A, Chottanom P. Thermal and pH degradation kinetics of anthocyanins in natural food colorant prepared from black rice bran. J Food Sci Tech 2016;53:461-70.
24. Farr JE, Giusti MM. Investigating the Interaction of ascorbic acid with anthocyanins and pyranoanthocyanins. Molecules 2018;23:744.
25. Yamuangmorn S, Dell B, Prom-u-thai C. Effects of Cooking on anthocyanin concentration and bioactive antioxidant capacity in glutinous and non-glutinous purple rice. Rice Sci 2018;25:270-8.
26. Levy R, Okun Z, Shpigelman A. The Influence of chemical structure and the presence of ascorbic acid on anthocyanins stability and spectral properties in purified model systems. Foods 2019;8:207.
27. Olaya CM, Castaño MP, Garzón GA. Stability of anthocyanins from *Rubus glaucus* and *Solanum betaceum* Cav.dark-red strain as affected by temperature, storage and water activity. Acta Biol Colomb 2009;14:143-58.
28. Singletion VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reafent. Method Enzymol 1999;299:152-78.
29. Sun B, Ricardo-da-Silva JM, Spranger I. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. J Agr Food Chem 1998;46:4267-74.
30 Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Anal Biochem 1996;239:70-6.
31. Huang YP, Lai HM. Bioactive compounds and antioxidative activity of colored rice bran. J Food Drug Anal 2016;24:564-74.
32. Becraft PW, Yi G. Regulation of aleurone development in cereal grains. J Exp Bot 2010;62:1669-75.
33. Wu X, Liu J, Li D, Liu C-M. Rice caryopsis development I: Dynamic changes in different cell layers. J Integr Plant Biol. 2016;58(9):772-85.
34. Lang Z, Gong Z. A role of OsROS in aleurone development and nutrient improvement in rice. Proc Natl Acad Sci 2018;115:11659-60.

35. Bethke PC, Hwang YS, Zhu T, Jones RL. Global patterns of gene expression in the aleurone of wild-type and dwarf1 mutant rice. Plant Physiol 2006;140:484-98.
36. Pitija K, Nakornriab M, Sriseadka T, Vanavichit A, Wongpornchai S. Anthocyanin content and antioxidant capacity in bran extracts of some Thai black rice varieties. Food Sci Tech 2013;48:300-8.
37. Yoshimura Y, Zaima N, Moriyama T, Kawamura Y. Different Localization patterns of anthocyanin species in the pericarp of black rice revealed by imaging mass spectrometry. PLoS One 2012;7:e31285.
38. Chen XQ, Nagao N, Itani T, Irifune K. Anti-oxidative analysis, and identification and quantification of anthocyanin pigments in different coloured rice. Food Chem 2012;135:2783-8.
39. Li XD, Li J, Wang M, Jiang H. Copigmentation effects and thermal degradation kinetics of purple sweet potato anthocyanins with metal ions and sugars. Appl Biol Chem 2016;59:15-24.
40. Mei X, Qin H, Wang J, Wang G, Liu C, Cai Y. Studies on Physicochemical characteristics of anthocyanin from Super dark maize. J Food Nutr Res 2014;2:109-14.
41. Yamada Y, Nakayama M, Shibata H, Kishimoto S, Ikeda T. Anthocyanin production and enzymatic degradation during the development of dark purple and lilac paprika fruit. J Amer Soc Hort Sci 2019;144:329-38.
42. Wang Y, Zhang C, Li J, Xu Y. Different influences of β-glucosidases on volatile compounds and anthocyanins of Cabernet Gernischt and possible reason. Food Chem 2013;140:245-54.
43. Oren-Shamir M. Does anthocyanin degradation play a significant role in determining pigment concentration in plants?. Plant Sci 2009;177:310-6.
44. Barbagallo RN, Palmeri R, Fabiano S, Rapisarda P, Spagna G. Characteristic of β-glucosidase from Sicilian blood oranges in relation to anthocyanin degradation. Enzyme Microb Tech 2007;41:570-5.
45. Zipor G, Duarte P, Carqueijeiro I, Shahar L, Ovadia R, Teper-Bamnolker P, et al. In planta anthocyanin degradation by a vacuolar class III peroxidase in *Brunfelsia calycina* flowers. New Phytol 2015;205:653-65.

46. Alam MN, Bristi NJ, Rafiquzzaman M. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. Saudi Pharm J 2013;21:143-52.
47. Sinela A, Rawat N, Mertz C, Achir N, Fulcrand H, Dornier M. Anthocyanins degradation during storage of *Hibiscus sabdariffa* extract and evolution of its degradation products. Food Chem 2017;214:234-41.
48. Zhao CL, Yu YQ, Chen ZJ, Wen GS, Wei FG, Zheng Q, et al. Stability-increasing effects of anthocyanin glycosyl acylation. Food Chem 2017;214:119-28.
49. Fenger JA, Moloney M, Robbins RJ, Collins TM, Dangles O. The influence of acylation, metal binding and natural antioxidants on the thermal stability of red cabbage anthocyanins in neutral solution. Food Funct 2019;10:6740-51.