

## การศึกษาปริมาณแอนโทไซยานินในข้าวเหนียวดำ โดยใช้วิธี HPLC และ spectrophotometric

### A study of anthocyanin content in black glutinous rice using HPLC and spectrophotometric methods

ช่อแก้ว อนิลบล<sup>1</sup>, ปรมเมศ บรรเทิง<sup>1\*</sup>, จิรวัดน์ สนิทชน<sup>1</sup> และ พัชริน ส่องศรี<sup>1</sup>

Chorkaew Aninbon<sup>1</sup>, Poramate Banterng<sup>1\*</sup>, Jirawat Sanitchon<sup>1</sup> and Patcharin Songsri<sup>1</sup>

**บทคัดย่อ:** HPLC และ spectrophotometric methods เป็นวิธีการที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการวัดปริมาณแอนโทไซยานินทั้งในด้านอุตสาหกรรมอาหารและการวิจัยทางวิทยาศาสตร์ วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้คือ ศึกษาปริมาณแอนโทไซยานิน ในข้าวเหนียวดำ 9 สายพันธุ์ ได้แก่ KKU-GL-BL-05-001, KKU-GL-BL-05-003, KKU-GL-BL-05-008, KKU-GL-BL-06-034, KKU-GL-BL-06-043, เหนียวดำ Gs. no. 00621, เหนียวดำ Gs. no. 09475, เหนียวดำ Gs. no. 21427, ข้าวดำ Gs. no. 87090 และประชากรชั่วรุ่นที่ 1 และ 2 ที่เกิดจากการผสมระหว่าง เหนียวดำ Gs. no.09475 และ กข6 วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแอนโทไซยานินที่วัดได้จากทั้งสองวิธี โดยสกัดสารแอนโทไซยานินและนำสารที่สกัดได้ไปวัดปริมาณแอนโทไซยานินโดยวิธี HPLC และ spectrophotometric จากนั้นนำค่าที่วัดได้จากทั้งสองวิธีไปศึกษาความสัมพันธ์ ผลการศึกษาพบว่า ความแตกต่างของปริมาณแอนโทไซยานินระหว่างสองวิธีอยู่ในช่วง 9.34-44.17 mg/100g seed และพบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ( $P \leq 0.01$ ) ระหว่างปริมาณแอนโทไซยานินที่วัดได้จากทั้งสองวิธี โดยมีค่าสหสัมพันธ์ (correlation coefficient) เท่ากับ 0.93 ดังนั้นผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า วิธี spectrophotometric สามารถนำมาใช้วัดปริมาณแอนโทไซยานินในข้าวได้ ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย ใช้เวลาน้อยและราคาถูกกว่าวิธีการวัดแบบ HPLC

**คำสำคัญ:** สารประกอบฟลาโวนอยด์ cyanidin 3-glucoside เนื้อเยื่อชั้น aleurone การสกัดแอนโทไซยานิน

**Abstract:** HPLC and spectrophotometric methods are commonly used by researchers and the food industry for quantifying anthocyanins. The objective of this study was to quantify anthocyanin contents using HPLC and spectrophotometric methods for nine black glutinous rice varieties (KKU-GL-BL-05-001, KKU-GL-BL-05-003, KKU-GL-BL-05-008, KKU-GL-BL-06-034, KKU-GL-BL-06-043, Niewdam Gs. no. 00621, Niewdam Gs. no. 09475, Niewdam Gs. no. 21427 and Khaokam Gs. no. 87090) and F<sub>1</sub> and F<sub>2</sub> population for a cross between Niewdam Gs. no. 09475 and RD6. The correlation between anthocyanin contents observed from HPLC and spectrophotometric methods was also calculated. Anthocyanin extract was analyzed with HPLC and spectrophotometric methods and establish the correlation value between anthocyanin contents from two different analytical methods. The results indicated that the difference of anthocyanin contents between two methods were in the range of

<sup>1</sup>ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น 40002

<sup>1</sup>Department of Plant Science and Agricultural Resources, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

\*Corresponding author: bporam@kku.ac.th

9.34-44.17 mg/100g seed. The correlation coefficient value between two analytical methods was 0.93 with highly significance ( $P \leq 0.01$ ). This result suggests that spectrophotometric method can be used to determine anthocyanin content in rice and it would be simpler and cheaper method as well as less time consuming than HPLC method.

**Key words:** flavonoids, cyanidin 3-glucoside, aleurone layer, anthocyanin extraction

## บทนำ

ปัจจุบันนี้ ผู้บริโภคมีความต้องการอาหารที่มาจากธรรมชาติและมีประโยชน์ต่อสุขภาพเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากอาหารเหล่านี้มีองค์ประกอบทางเคมีที่เป็นยา สามารถช่วยลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคต่างๆ ได้ ความต้องการที่มากขึ้นนี้จึงผลักดันให้มีการศึกษาถึงองค์ประกอบทางเคมีของพืชชนิดต่างๆ เพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะข้าวเหนียวดำ (black glutinous rice) หรือที่เรียกกันทั่วๆ ไปว่า “ข้าวดำ” ที่มีองค์ประกอบทางเคมีที่มีชื่อว่า แอนโทไซยานิน ซึ่งเป็นรงควัตถุที่พบมากในบริเวณเยื่อหุ้มเมล็ด มีรายงานว่าแอนโทไซยานินเป็นสารที่มีคุณสมบัติต้านมะเร็งทำให้เซลล์ในร่างกายทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ ป้องกันการเกิดโรคความดันโลหิตสูง โรคเบาหวาน และโรคหัวใจ ลดการอักเสบของผิวหนัง ลดริ้วรอยทำให้ผิวพรรณสดใส และทำให้เซลล์สมองทำงานได้ดี (พิเชษฐ, 2544) ในการวัดปริมาณแอนโทไซยานินนั้น วิธีการที่ใช้มีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูงเนื่องจากอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้มีราคาแพง และต้องใช้นักวิเคราะห์ที่มีความชำนาญเป็นพิเศษ เช่นการวัดโดยวิธี HPLC (Takeoka and Dao, 2002; Lee et al., 2008) แต่ในปัจจุบันได้มีวิธีการที่ง่าย รวดเร็ว และมีความแม่นยำในการใช้วัดปริมาณแอนโทไซยานิน นั่นคือการวัดโดยวิธี spectrophotometric ซึ่งถูกใช้อย่างกว้างขวางทางด้านวิทยาศาสตร์และอุตสาหกรรม (AOAC International, 2006) ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษานี้คือ ศึกษาปริมาณแอนโทไซยานินในข้าวเหนียวดำโดยวิธี spectrophotometric และ HPLC และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแอนโทไซยานินที่วัดได้จากทั้งสองวิธี

## วิธีการศึกษา

ข้าวเหนียวดำที่ใช้ในการศึกษาประกอบด้วย 9 สายพันธุ์ คือ KKU-GL-BL-05-001, KKU-GL-BL-05-003, KKU-GL-BL-05-008, KKU-GL-BL-06-034, KKU-GL-BL-06-043, เหนียวดำ Gs.no. 00621, เหนียวดำ Gs.no. 09475, เหนียวดำ Gs.no. 21427, ข้าวดำ Gs.no. 87090 และประชากรชั่วรุ่นที่ 1 และ 2 ( $F_1$  และ  $F_2$  ตามลำดับ) ที่เกิดจากการผสมระหว่างสายพันธุ์เหนียวดำ Gs. no. 09475 และ กข6 (ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว) โดยปลูกข้าวเหนียวดำ 9 สายพันธุ์ ในฤดูนาปี 2553 ที่นาเกษตรกร จ. ขอนแก่น วางแผนการทดลองแบบ RCB มี 3 ซ้ำ และปลูกประชากรชั่วรุ่นที่ 1 และ 2 ที่เกิดจากการผสมระหว่างสายพันธุ์เหนียวดำ Gs. no. 09475 และ กข6 ที่แปลงทดลองของหมวดพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยมีการดูแลจัดการตามคำแนะนำของการปลูกข้าวในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภายหลังจากเก็บเกี่ยว นำเมล็ดมาทำความสะอาด และตากให้แห้ง จากนั้นนำมาวิเคราะห์ปริมาณสารแอนโทไซยานินจำนวน 3 ซ้ำ โดยการบดตัวอย่างให้ละเอียดจนมีลักษณะคล้ายแป้ง กรองด้วยตะแกรงกรอง จากนั้นนำตัวอย่างที่บดละเอียดแล้ว ชั่งน้ำหนัก 0.5 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำละลายด้วย ethanol-0.1%TFA (Trifluoroacetic acid) ปริมาณ 25 มิลลิลิตรลงในตัวอย่าง ทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำสารสกัดมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายลงในขวดรูปชมพู่ ปรับปริมาตรสารละลายให้ครบ 25 มิลลิลิตรโดยใช้สารสกัด จากนั้นกรองสารละลายตัวอย่างด้วย nylon membrane filter 0.45

ไมครอน1 ครั้ง แบ่งสารละลายออกเป็น 2 ส่วน นำไปวัดโดยวิธี HPLC และวิธี spectrophotometric (AOAC International, 2006)

### ผลการศึกษาและวิจารณ์

ปริมาณของแอนโทไซยานินในข้าวเหนียวดำที่วัดจากทั้งสองวิธีการแสดงใน **Table 1** โดยพบว่าข้าวเหนียวดำสายพันธุ์เหนียวดำ Gs. no. 09475 มีปริมาณแอนโทไซยานิน สูงที่สุดเมื่อวัดโดยวิธี HPLC คือ 133.24 mg /100 g seed รองลงมาคือ KKU-GL-BL-06-043, เหนียวดำ Gs. no. 00621, ข้าวดำ Gs. no. 87090, KKU-GL-BL-06-034, เหนียวดำ Gs. no. 21427, KKU-GL-BL-05-008, KKU-GL-BL-05-001 และ KKU-GL-BL-05-003 โดยมีปริมาณแอนโทไซยานินเท่ากับ 101.02, 96.47, 69.01, 41.27, 38.96, 37.10, 12.52 และ 8.40 mg /100 g seed ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณแอนโทไซยานินที่ได้จากการวัดทั้ง 2 วิธี พบว่า ค่าที่วัดได้จากวิธี spectrophotometric จะสูงกว่าค่าที่วัดได้จากวิธี HPLC (**Table 1**) เนื่องจากวิธี spectrophotometric เป็นการวัดปริมาณแอนโทไซยานินรวม (total anthocyanin) ในขณะที่ HPLC เป็นการวัดปริมาณแอนโทไซยานินเฉพาะตามชนิดของสารละลายมาตรฐาน (standard solution) ที่ใช้ทดสอบซึ่งในการศึกษานี้คือ cyanidin 3-glucoside ซึ่งเป็นชนิดของแอนโทไซยานินที่พบมากที่สุดคนในพืช (Lee, 2008) แต่เมื่อพิจารณาถึงลำดับของแอนโทไซยานิน พบว่าข้าวเหนียวดำทั้ง 9 สายพันธุ์มีลำดับสอดคล้องกันเป็นส่วนใหญ่ ยกเว้นสายพันธุ์ KKU-GL-BL-05-0, KKU-GL-BL-06-034 และ Niewdam Gs. no. 21427 ที่ลำดับของพันธุ์มีการเปลี่ยนแปลง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะค่าที่วัดได้ค่อนข้างใกล้เคียงกันสำหรับสายพันธุ์ KKU-GL-BL-05-008, KKU-GL-BL-06-034 และ Niewdam Gs. no. 21427 จึงทำให้ลำดับพันธุ์ในทั้งสองวิธีการต่างกัน (**Table 1**) และผลจากการวัดแอนโทไซยานินโดยวิธี spectrophotometric พบว่า สายพันธุ์ เหนียวดำ

Gs. no. 09475 มีปริมาณแอนโทไซยานินสูงที่สุด คือ 172.83 mg /100 g seed รองลงมาคือ KKU-GL-BL-06-043 เหนียวดำ Gs. no. 00621 ข้าวดำ Gs. no. 87090 KKU-GL-BL-05-008 KKU-GL-BL-06-034 เหนียวดำ Gs. no. 21427 KKU-GL-BL-05-001 และ KKU-GL-BL-05-003 โดยมีปริมาณแอนโทไซยานินเท่ากับ 144.17, 121.90, 109.38, 81.27, 69.02, 66.24, 51.77 และ 17.74 mg /100 g seed ตามลำดับ เมื่อพิจารณาค่าความแตกต่างของทั้งสองวิธีพบว่า มีค่าความแตกต่างอยู่ในช่วง 9.34-44.17 mg /100 g seed (**Table 1**) และในประชากรข้าวรุ่นที่ 1 และ 2 ที่เกิดจากการผสมระหว่างเหนียวดำ Gs. no. 09475 และ กข6 จำนวน 137 ต้นพบว่า ปริมาณแอนโทไซยานินที่วัดโดยวิธี spectrophotometric ส่วนใหญ่มีค่าสูงกว่าการวัดโดยวิธี HPLC นอกจากนี้ยังพบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ( $P \leq 0.01$ ) ของปริมาณแอนโทไซยานินที่วัดได้จากทั้งสองวิธี โดยมีค่าสหสัมพันธ์ (correlation coefficient) เท่ากับ 0.93 (**Figure 1**)

### สรุป

จากการวัดปริมาณแอนโทไซยานินโดยใช้วิธี HPLC และ spectrophotometric พบว่า เหนียวดำ Gs. no. 09475 มีปริมาณแอนโทไซยานินสูงที่สุดทั้งในสองวิธีการคือ 133.24 และ 172.83 mg/100g seed ตามลำดับ และความแตกต่างระหว่างสองวิธีการอยู่ในช่วง 9.34-44.17mg/100g seed นอกจากนี้ยังพบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ( $P \leq 0.01$ ) ระหว่างผลการวิเคราะห์โดยวิธี HPLC และวิธี spectrophotometric โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient) เท่ากับ 0.93 จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสามารถใช้วิธี spectrophotometric ในการวัดปริมาณแอนโทไซยานิน ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย ค่าใช้จ่ายต่ำและใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อยกว่า HPLC

ทำให้นักปรับปรุงพันธุ์สามารถคัดเลือกพันธุ์ในเชิงเปรียบเทียบได้รวดเร็วมากยิ่งขึ้น

**คำขอบคุณ**

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษา และวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สว.) สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรเพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน และศูนย์วิจัยปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อการเกษตรที่ยั่งยืนมหาวิทยาลัยขอนแก่น

**เอกสารอ้างอิง**

พิเชษฐ เทบ่ารุง. 2544. การสกัดแอนโทไซยานินสีจากเม่า. รายงานผลการวิจัย. สถาบันวิจัยและ

ฝึกอบรมการเกษตร สกลนคร. สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล.

AOAC International. 2006. Monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines. pH differential method. First Action 2005.

Lee, J., C. Rennaker, and R. Wrolstad. 2008. Correlation of two anthocyanin quantification methods: HPLC and spectrophotometric methods. Food Chemistry 110 : 782-786.

Takeoka, G. and L. Dao. 2002. Anthocyanins pp. 219-241. In W.J. Hurst (ed.), Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals. CRC Press. Boca Raton, Florida.

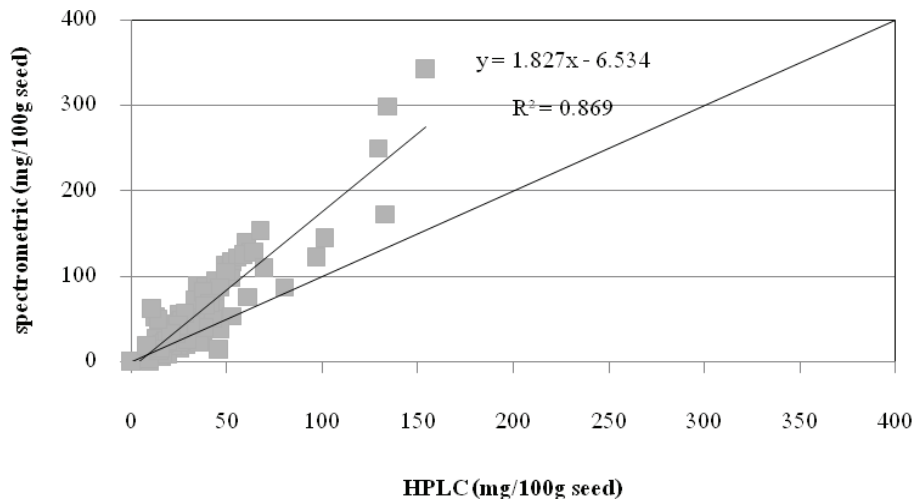
**Table 1** Analysis of anthocyanin content from rice grain using HPLC and spectrophotometric methods.

Variety	Anthocyanin content (mg/100g seed)		
	HPLC method	Spectrophotometric method	Different value obtained between two methods
KKU-GL-BL-05-001	12.52 e (8)	51.77 ef (8)	39.25
KKU-GL-BL-05-003	8.40 e (9)	17.74 f (9)	9.34
KKU-GL-BL-05-008	37.10 d (7)	81.27 cde (5)	44.17
KKU-GL-BL-06-034	41.27 d (5)	69.02 de (6)	27.75
KKU-GL-BL-06-043	101.02 b (2)	144.17 ab (2)	43.15
Niewdam Gs. no. 00621	96.47 b (3)	121.90 bc (3)	25.43
Niewdam Gs. no. 09475	133.24 a (1)	172.83 a (1)	39.59
Niewdam Gs. no. 21427	38.96 d (6)	66.24 de (7)	27.28
Khaokam Gs. no. 87090	69.01 c (4)	109.38 bcd (4)	40.37
F-test	**	**	
C.V. (%)	7.77	27.24	

\*\* Significantly different ( $P \leq 0.01$ )

Mean within the same column followed by the different letters are significantly different by DMRT ( $P \leq 0.01$ )

Numbers in parentheses show the ranking



**Figure 1** Relationship between anthocyanin contents (mg/100g seed) determined by HPLC and spectrophotometric methods obtained from 137 samples (n = 137).