Antioxidant and Antiglycation Activities of Pigmented Thai Rice Husk Extracts

Sasichay Rakchim[1] and Kanyanath Piumngam[2*]

[1]*Graduate Program in Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University, Rangsit Campus, Pathum Thani Province, Thailand*
[2]*Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University, Rangsit Campus, Pathum Thani Province, Thailand*

Abstract

Diabetes is one of the non-communicable diseases (NCDs) group which are the leading cause of death worldwide. High levels of blood glucose may induce the glycation of sugars and proteins both inside and outside the cell, leading to the formation of advanced glycosylation end products (AGEs), thereby reducing the elasticity of blood vessels and promoting more oxidation in the cells. Nowadays, there is growing interest in natural health care and more research has begun on rice, an important economic crop in Thailand, in the treatment of diabetes and its complications. However the study of the rice husks is still not very extensive. This work aimed to study the antioxidant activity by 2,2-diphenyl-1- picrylhydrazyl (DPPH) assay and the antiglycation property by *in vitro* BSA-glucose assay in crude extracts from 4 types of Thai rice husks containing pigments: Khao Dawk Mali Rice, Sangyod Rice, Riceberry Rice, and Black Sticky Rice. The rice husks were extracted by 2 methods: extraction with 70% ethanol (maceration) and extraction by decoction. The results showed that the anti-oxidant and antiglycation activities were significantly higher in ethanolic extracts than in the decoction extracts ($p < 0.05$). Black Sticky Rice husk extract had the highest anti-oxidant activity with IC_{50} = 139.76 ± 52.07 μg/mL, when compared to the standard substance butylated hydroxytoluene (BHT) (IC_{50} = 161.38 ± 33.75 μg/mL). Moreover, it also had the highest antiglycation effect, with IC_{50} = 234.69 ± 29.02 μg/mL, when compared to aminoguanidine (AG) (IC_{50} = 430.23 ± 6.03 μg/mL), which is used as AGE formation inhibitor. These may correspond to the highest amount of the total phenolic compounds content (60.60 ± 3.57 mg GAE/g) and the total anthocyanin content

***Corresponding author E-mail address:** mim9_p@yahoo.com
Received: 21 April 2023 Revised: 3 June 2023 Accepted: 12 June 2023

#in2 66-4.indd 8845 29/2/2567 BE 11:59

(2.064 ± 0.2 mg/L) in Black Sticky Rice husk extract. This study may provide information for the development of drugs and dietary supplements for diabetic patients.

Keywords: Anthocyanin, Antioxidant, Antiglycation, Diabetes, Pigmented Thai rice husk

#in2 66-4.indd 8846 29/2/2567 BE 11:59

ฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระและการต้านไกลเคชันของสารสกัดจากแกลบข้าวไทยที่มีรงควัตถุ

ศศิฉาย รักฉิม[1] และ กัญญาณัฐ เปี่ยมงาม[2*]

[1]บัณฑิตศึกษา สาขาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จังหวัดปทุมธานี
[2]ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จังหวัดปทุมธานี

บทคัดย่อ

โรคเบาหวานเป็นโรคไม่ติดต่อเรื้อรังซึ่งเป็นสาเหตุอันดับต้นในการเสียชีวิตของคนทั่วโลก น้ำตาลในเลือดที่สูงจะเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยาไกลเคชันระหว่างน้ำตาลกับโปรตีนทั้งภายในและภายนอกเซลล์จนทำให้เกิดสาร advanced glycosylation end products (AGEs) ทำให้ความยืดหยุ่นของหลอดเลือดลดลง และเกิดออกซิเดชันในเซลล์มากขึ้น ปัจจุบันเริ่มมีการศึกษาการใช้ข้าวซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของไทยในการรักษาโรคเบาหวานอย่างกว้างขวางขึ้น แต่การศึกษาในส่วนของแกลบข้าวยังมีไม่มาก งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay และฤทธิ์ต้านการเกิดไกลเคชันด้วยวิธี *In-vitro* BSA-glucose assay ในสารสกัดหยาบจากแกลบข้าวไทยที่มีรงควัตถุ 4 ชนิดคือ ข้าวหอมมะลิ ข้าวสังข์หยด ข้าวไรซ์เบอร์รี และข้าวเหนียวดำ โดยเปรียบเทียบผลจากการสกัดด้วย 2 วิธี คือ สกัดด้วยสารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 และสกัดด้วยการต้มในน้ำพบว่า การสกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านการเกิดไกลเคชันได้ดีกว่าการต้มอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยสารสกัดจากแกลบข้าวเหนียวดำมีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระดีที่สุด มีค่า IC_{50} = 139.76 ± 52.07 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรซึ่งมีฤทธิ์ดีกว่าสารมาตรฐานบิวทิเลเตทไฮดรอกซีโทลูอีน (BHT) (IC_{50} = 161.38 ± 33.75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และมีฤทธิ์ต้านการเกิดไกลเคชันดีที่สุด มีค่า IC_{50} = 234.69 ± 29.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีฤทธิ์ดีกว่าอะมิโนกัวนิดีน (AG) ที่ใช้เป็นสารต้านไกลเคชัน (IC_{50} = 430.23 ± 6.03 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) สอดคล้องกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (60.60 ± 3.57 มิลลิกรัม gallic acid equivalent (GAE) ต่อกรัม) และปริมาณแอนโทไซยานินรวม (2.064 ± 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร) ที่พบสูงสุดในสารสกัดจากแกลบข้าวเหนียวดำ ผลการศึกษาดังกล่าวอาจเป็นแนวทางในการนำไปพัฒนาเป็นยาและอาหารเสริมสำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวาน

คำสำคัญ: ต้านอนุมูลอิสระ ต้านไกลเคชัน โรคเบาหวาน แกลบข้าวไทยที่มีรงควัตถุ แอนโทไซยานิน

***ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address:** mim9_p@yahoo.com
รับบทความ: 21 เมษายน 2566 แก้ไขบทความ: 3 มิถุนายน 2566 รับตีพิมพ์บทความ: 12 มิถุนายน 2566

#in2 66-4.indd 8847 29/2/2567 BE 11:59

บทนำ

โรคเบาหวานเป็นหนึ่งในกลุ่มโรค non-communicable diseases (NCDs) ที่สำคัญและมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกปี สาเหตุของโรคเกิดจากปัจจัยเสี่ยงด้านพฤติกรรมและปัจจัยเสี่ยงที่เกี่ยวข้องกับกลุ่มอาการเมแทบอลิก เช่น ความดันโลหิตสูง โรคอ้วน สมาพันธ์เบาหวานนานาชาติ (The International Diabetes Federation: IDF) รายงานสถานการณ์โรคเบาหวานในภาคพื้นแปซิฟิกตะวันตก ในปี พ.ศ. 2564 ว่าประเทศไทยมีผู้เป็นโรคเบาหวาน 6.1 ล้านคน ซึ่งมากเป็นอันดับ 4 รองจาก จีน อินโดนีเซีย และญี่ปุ่น[1]

การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าระดับน้ำตาลในเลือดที่สูงขึ้นจะส่งผลให้ร่างกายเพิ่มกระบวนการไกลโคไลซิส เพื่อรักษาสมดุลของน้ำตาลในเลือด โดยออกซิเจนที่ถูกใช้ไปในกระบวนการนี้จะเปลี่ยนไปเป็นน้ำและออกซิเจนที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระ ซึ่งทำให้เกิดภาวะ oxidative stress และมีการกระตุ้นการสร้าง protein kinase C และกระบวนการไกลเคชันระหว่างน้ำตาลกับโปรตีนทั้งภายในและภายนอกเซลล์จนทำให้เกิดสาร advanced glycosylation end products (AGEs) สาร AGEs นี้เป็นสารพิษที่ไม่ละลายน้ำและอยู่ในร่างกายเป็นเวลานาน นอกจากนี้ สาร AGEs จะจับกับอีลาสตินและคอลลาเจนทำให้ความยืดหยุ่นของหลอดเลือดลดลง เกิดการทำลายเนื้อเยื่อในร่างกาย และมีสารอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น ซึ่งทำให้ร่างกายสร้างสารต้านอนุมูลอิสระมากขึ้นเพื่อกำจัดอนุมูลอิสระเหล่านั้น เมื่อเกิดสารซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนขึ้นภายในเซลล์ เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (SOD) จะเปลี่ยนอนุมูลอิสระเป็นไฮโดรเจนเปอร์-ออกไซด์ ซึ่งจะถูกเปลี่ยนไปเป็นออกซิเจนและน้ำโดยการเร่งของเอนไซม์คาทาเลสและกลูตาไทโอนเปอร์-ออกซิเดส แต่เมื่อมีการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระมากขึ้น ยีนที่สร้างเอนไซม์เหล่านี้จะเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงทำให้สร้างเอนไซม์ได้น้อยลงส่งผลให้มีสารอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น ทำให้เกิดผลกระทบต่อร่างกายโดยเฉพาะในผู้ป่วยโรคเบาหวาน นั่นคือ ทำให้มีการเพิ่มปริมาณกรดไขมันและโฮโมซิสเตอีนในเลือด และเกิดภาวะดื้อต่ออินซูลิน ซึ่งส่งผลให้ผู้เป็นโรคเบาหวานมีระดับน้ำตาลในเลือดสูงเป็นเวลานาน ควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดได้ยาก และเสี่ยงต่อการเกิดโรคแทรกซ้อนจากโรคเบาหวาน[2, 3]

การวิจัยเกี่ยวกับสารสกัดจากธรรมชาติที่ช่วยในการรักษาโรคเบาหวานและอาการแทรกซ้อนของโรคเบาหวาน เริ่มมีการศึกษาในข้าวซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของไทยและมีการส่งออกมากเป็นอันดับสองของโลกรองจากประเทศอินเดียในปี พ.ศ. 2561[4] ได้แก่ การศึกษาปริมาณฟลาโวนอยด์ สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากข้าวไทย[5] การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและสารประกอบฟีนอลิกในแกลบ รำข้าวและเมล็ดข้าว[6] การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและคุณลักษณะของโพลีฟีนอลจากแกลบข้าวพื้นเมืองล้านนาและความสัมพันธ์กับคุณสมบัติของเมล็ดข้าว[7] และการเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและแอนโทไซยานินในกลุ่มข้าวดิบและข้าวสุก 4 ชนิด เป็นต้น[8] นอกจากนี้การศึกษาเกี่ยวกับข้าวต่างสีพบว่ามีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน เช่น การศึกษาสารโพลีฟีนอลอิสระและองค์ประกอบทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระของข้าวสายพันธุ์ที่มีสีและไม่มีสีของประเทศไต้หวัน[9] หรือการศึกษาความสามารถในการต้านไกลเคชันและการต้านอนุมูลอิสระของข้าวไทย 15 สายพันธุ์ ซึ่งพบว่าข้าวที่มีสีมักจะมีคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและการต้านไกลเคชันมากกว่าข้าวที่ไม่มีสี[10] แต่การศึกษาในแกลบซึ่งเป็นส่วนที่มีมูลค่าน้อยยังมีไม่มาก ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะนำส่วนแกลบของข้าวหอมมะลิ ข้าวสังข์หยด ข้าวไรซ์เบอร์รี และข้าวเหนียวดำ ซึ่งเป็นข้าวไทยที่มีสีแตกต่างกัน

มาศึกษาฤทธิ์การยับยั้งออกซิเดชันและไกลเคชันในผู้ป่วยโรคเบาหวาน เพื่อนำความรู้ที่ได้ไปใช้ในการส่งเสริมสุขภาพด้านอาหารในการป้องกันและบรรเทาภาวะแทรกซ้อนของโรคเบาหวาน หรือต่อยอดไปสู่การพัฒนายารักษาโรคเบาหวานในอนาคต

วัสดุและวิธีการ

1. การเตรียมสารสกัดจากแกลบ

แกลบข้าว 4 ชนิด ที่นำมาทดสอบ ได้แก่ แกลบข้าวหอมมะลิ (*Oryza sativa* L. cv. Khao Hom Mali 105) จากจังหวัดศรีสะเกษ แกลบข้าวสังข์หยด (*Oryza sativa* L. cv. Sangyod) จากจังหวัดพัทลุง แกลบข้าวเหนียวดำ (*Oryza sativa* var. glutinosa) จากจังหวัดขอนแก่น และแกลบข้าวไรซ์เบอร์รี (*Oryza sativa* L. cv. Riceberry) จากจังหวัดพิจิตร ซึ่งมีแหล่งที่มาจากเกษตรกรผู้ปลูกและสีข้าวเองโดยตรง และไม่มีการปนเปื้อนจากแกลบข้าวชนิดอื่น นำแกลบที่ล้างทำความสะอาดและทำให้แห้งแล้วมาบด และนำไปสกัดด้วย 2 วิธี คือ (1) การสกัดด้วยเอทานอล นำแกลบ 5 กรัม หมักในเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นกรองแยกกากและนำส่วนของเหลวมาทำให้แห้งด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงระเหยสารแบบสุญญากาศ (Vacufuge Concentrator system) (2) การสกัดด้วยการต้ม นำแกลบ 5 กรัม ต้มในน้ำปริมาตร 50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปกรองและทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งด้วยหลักการแช่เยือกแข็งภายใต้สุญญากาศ (Freeze Dryer, dry LABCONCO Freeze Dry System) เก็บสารสกัดที่ -20 องศาเซลเซียส

2. การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งออกซิเดชันโดยวิธี DPPH assay

ทดสอบสารสกัดด้วยวิธี DPPH assay[11] โดยนำสารสกัดจากแกลบของข้าวหอมมะลิ ข้าวสังข์หยด ข้าวเหนียวดำ และข้าวไรซ์เบอร์รี ที่สกัดด้วยเอทานอลและสกัดด้วยการต้ม ที่ความเข้มข้น 1, 5, 25, 50,100, 250, 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาทำปฏิกิริยากับสารละลาย 2,2-diphenyl-1- picrylhydrazyl (DPPH) ซึ่งเป็นสารอนุมูลอิสระที่มีสีม่วง ปริมาตร 100 ไมโครลิตร โดยมี butylated hydroxytoluene (BHT) เป็นสารมาตรฐาน นำไปไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร นำค่าที่วัดได้มาลบด้วยค่า sample blank ของสารสกัดจากแกลบแต่ละชนิดเพื่อลดการรบกวนจากสีของแกลบ แล้วนำมาคำนวณค่าร้อยละการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (%radical scavenging) โดยใช้สมการ

$$\text{ค่าร้อยละการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ} = [(AB - AA) / AB] \times 100$$

เมื่อ AA = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารที่ทดสอบผสมกับ DPPH

AB = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารละลาย DPPH

3. การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric

วิธี Folin-Ciocalteu colorimetric ดัดแปลงจากวิธีของ Chan SW, พ.ศ. 2552[12] โดยการนำสารสกัดจากแกลบข้าวที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตรใส่ลงใน 96 well plate เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu เข้มข้นร้อยละ 10 (โดยปริมาตร) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้น

ร้อยละ 7.5 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าที่วัดได้มาลบด้วยค่า sample blank ของสารสกัดจากแกลบแต่ละชนิดเพื่อลดการรบกวนจากสีของแกลบ นำค่าที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก และคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

4. การหาปริมาณแอนโทไซยานิน โดยวิธี pH differential

การหาปริมาณแอนโทไซยานินโดยวิธี pH differential ดัดแปลงจากวิธีมาตรฐาน AOAC, พ.ศ. 2548[13] เตรียมสารสกัดจากแกลบความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สองชุด ชุดที่หนึ่งนำมาทำปฏิกิริยากับสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.025 โมลาร์ พีเอช 1.0 และชุดที่สองนำมาทำปฏิกิริยากับสารละลายโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.4 โมลาร์ พีเอช 4.5 ในอัตราส่วน 1:10 โดยใส่สารสกัดจากแกลบ 100 ไมโครลิตร ต่อสารละลายบัฟเฟอร์ 900 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร และ 700 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาคำนวณค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้สูตร

$$A = (A_{510nm} - A_{700nm})_{pH1.0} - (A_{510nm} - A_{700nm})_{pH4.5}$$

แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาปริมาณแอนโทไซยานินจากสูตร

ปริมาณแอนโทไซยานิน (มิลลิกรัมต่อลิตร) = $(A \times MW \times DF \times 1000) / \varepsilon \times l$

เมื่อ A = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ใส่บัฟเฟอร์

MW = 449.2 กรัมต่อโมล (ค่ามวลโมเลกุลของ ไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์)

ε = 26,900 ลิตรต่อโมลต่อเซนติเมตร

l = 1 เซนติเมตร (ความกว้างของคิวเวต)

DF = 10 (diluton factor)

5. การทดสอบความสามารถการต้านไกลเคชันด้วยวิธี *In-vitro* BSA-glucose assay

ทดสอบความสามารถการต้านไกลเคชัน ด้วยวิธี *In-vitro* BSA-glucose assay[14] โดยเตรียม bovine serum albumin (BSA) ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมกับน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ที่ละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซไลน์ (PBS) เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 แล้วเติมสารสกัดจากแกลบของข้าวหอมมะลิ ข้าวสังข์หยด ข้าวเหนียวดำและข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และอะมิโนกัวนิดีน ซึ่งเป็นตัวควบคุมเชิงบวก (positive control) บ่มไว้เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส วัดค่าการดูดกลืนแสงฟลูออเรส-เซนต์โดยสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น excitation เท่ากับ 370 นาโนเมตร และความยาวคลื่น emission เท่ากับ 440 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาคำนวณร้อยละการยับยั้งการเกิดไกลเคชันและหาค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งการเกิดไกลเคชันได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) ตามสมการ

ร้อยละการยับยั้งการเกิดไกลเคชัน = (Ac - As) / Ac x 100

เมื่อ Ac = ค่าการดูดกลืนแสงฟลูออเรสเซนต์ของปฏิกิริยาที่ไม่มีสารสกัด

As = ค่าการดูดกลืนแสงฟลูออเรสเซนต์ของปฏิกิริยาที่มีสารสกัด

6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้นำมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยการหาค่าเฉลี่ย (Mean) ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยใช้ค่า standard deviation (SD) วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลด้วย ANOVA จากการทำการทดลอง 3 ซ้ำ (triplicate) และทำ 3 การทดลองแยกกันอย่างอิสระ คำนวณค่าความแตกต่างทางสถิติโดย *t*-test ($p < 0.05$)

ผลการศึกษา

1. ผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH assay

DPPH assay เป็นวิธีทดสอบความสามารถการยับยั้งออกซิเดชันโดยการทำปฏิกิริยาทดสอบกับ DPPH ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่เสถียรและเป็นสารละลายสีม่วง ดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่นประมาณ 520 นาโนเมตร ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยากับสารที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระทำให้ DPPH ได้รับไฮโดรเจนอะตอม สารละลายจะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระของแกลบข้าว 4 ชนิด พบว่า การสกัดด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 ให้สารที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมากกว่าวิธีการต้ม โดยพบว่าค่า IC_{50} ของสารสกัดจากแกลบข้าวหอมมะลิ ข้าวสังข์หยด และข้าวไรซ์เบอร์รีที่สกัดด้วยเอทานอลและการต้ม มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน BHT พบว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดแกลบข้าวเหนียวดำมีประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด ทั้งจากการสกัดด้วยเอทานอล (IC_{50} = 139.76 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และที่สกัดด้วยการต้ม (IC_{50} = 182.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) รองลงมาคือ สารสกัดจากแกลบข้าวสังข์หยด แกลบข้าวไรซ์เบอร์รี และแกลบข้าวหอมมะลิ ตามลำดับ ยิ่งกว่านั้น สารสกัดจากแกลบข้าวเหนียวดำที่สกัดด้วยเอทานอลมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่าสารมาตรฐาน BHT โดยมีค่า IC_{50} ที่ต่ำกว่า ค่า IC_{50} ของสารมาตรฐาน BHT ผลการทดสอบทางสถิติพบว่าสารสกัดจากแกลบข้าวเหนียวดำที่สกัดทั้งสองวิธีมีค่า IC_{50} ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน BHT แสดงว่าสารสกัดจากแกลบข้าวเหนียวดำที่สกัดทั้งสองวิธีมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเทียบเคียงได้กับสารมาตรฐาน BHT (Table 1)

2. ผลการทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

ผลการทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดโดยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric อาศัยหลักการที่สารประกอบฟีนอลิกแตกตัวได้เป็นไอออนลบของฟีนอเลท ไอออนลบดังกล่าวจะรีดิวซ์สารละลาย Folin-Ciocalteu เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนฟอสโฟทังสติก-ฟอสโฟโมลิบดิกซึ่งมีสีน้ำเงินและดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ทำให้สามารถวัดปริมาณของสารประกอบทั้งหมดที่มีหมู่ไฮดรอกซิลในโมเลกุลได้[15] ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากแกลบของข้าวหอมมะลิ ข้าวสังข์หยด ข้าวเหนียวดำ และข้าวไรซ์เบอร์รีที่สกัดด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ

70 และสกัดด้วยการต้ม เทียบกับค่ามาตรฐานของกรดแกลลิก (Fig. 1) พบว่าแกลบที่สกัดด้วยเอทานอลมีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงกว่าแกลบที่สกัดด้วยการต้มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยสารสกัดเอทานอลจากแกลบของข้าวเหนียวดำมีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงที่สุด คือ มีปริมาณฟีนอลิกรวมเทียบเท่ากับ 60.60 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักตัวอย่างแห้ง 1 กรัม ส่วนแกลบของข้าวเหนียวดำที่สกัดด้วยการต้ม มีปริมาณฟีนอลิกรวมเทียบเท่ากับ 45.54 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักตัวอย่างแห้ง 1 กรัม ตามด้วย แกลบข้าวสังข์หยด แกลบข้าวหอมมะลิและแกลบข้าวไรซ์เบอร์รี ตามลำดับ (Table 2)

3. ผลการหาปริมาณแอนโทไซยานินโดยวิธี pH differential

การหาปริมาณแอนโทไซยานินโดยวิธี pH differential เป็นการวัดปริมาณแอนโทไซยานินในรูปโมโนเมอร์ทั้งหมดโดยอาศัยหลักการการเปลี่ยนโครงสร้างของแอนโทไซยานินเมื่อค่าพีเอชเปลี่ยน โดยที่พีเอช 1.0 แอนโทไซยานินจะอยู่ในรูปออกโซเนียมซึ่งเป็นโครงสร้างที่มีสี ส่วนที่พีเอช 4.5 แอนโทไซยานินจะอยู่ในรูปเฮมิคีทอลซึ่งไม่มีสี วิธีนี้ใช้การวัดค่าการดูดกลืนแสงของแอนโทไซยานินที่พีเอช 1.0 หักลบด้วยค่าการดูดกลืนแสงที่พีเอช 4.5 เพื่อลดการรบกวนจากสารอื่น ๆ[13] ซึ่งผลการหาปริมาณแอนโทไซยานินโดยวิธี pH differential พบว่าสารสกัดจากแกลบที่สกัดด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 มีปริมาณแอนโทไซยานินรวมมากกว่าสารสกัดจากแกลบที่สกัดด้วยการต้มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยสารสกัดจากแกลบข้าวเหนียวดำมีปริมาณแอนโทไซยานินรวมสูงที่สุด ตามด้วยสารสกัดจากแกลบข้าวไรซ์เบอร์รี แกลบข้าวหอมมะลิ และแกลบข้าวสังข์หยด ตามลำดับ (Table 3)

4. ผลการทดสอบความสามารถการต้านไกลเคชันด้วยวิธี *In-vitro* BSA-glucose assay

ผลการทดสอบความสามารถการต้านไกลเคชันด้วยวิธี *In-vitro* BSA-glucose assay โดยใช้ BSA จากลูกวัวที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับอัลบูมินในเลือดของมนุษย์ทำปฏิกิริยากับน้ำตาลกลูโคสจนเกิดกระบวนการไกลเคชัน แล้ววัดปริมาณ AGEs ที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์ พบว่าสารสกัดแกลบที่สกัดด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 มีความสามารถยับยั้งการเกิดไกลเคชันได้มากกว่าสารสกัดแกลบที่สกัดด้วยการต้มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยสารสกัดจากแกลบข้าวเหนียวดำมีความสามารถยับยั้งการเกิดไกลเคชันได้มากที่สุด รองลงมาคือแกลบข้าวไรซ์เบอร์รี แกลบข้าวสังข์หยด และแกลบข้าวหอมมะลิ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน AG พบว่าสารสกัดจากแกลบข้าวเหนียวดำและแกลบข้าวไรซ์เบอร์รีที่สกัดด้วยเอทานอล มีความสามารถยับยั้งการเกิดไกลเคชันได้มากกว่าสารมาตรฐาน AG อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในขณะที่สารสกัดเอทานอลจากแกลบข้าวสังข์หยดและสารสกัดด้วยน้ำจากแกลบข้าวเหนียวดำ มีความสามารถยับยั้งการเกิดไกลเคชันได้ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากสารมาตรฐาน AG ส่วนสารสกัดจากแกลบชนิดอื่นสามารถยับยั้งการเกิดไกลเคชันได้น้อยกว่าสารมาตรฐาน AG อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (Table 4)

#in2 66-4.indd 8852 29/2/2567 BE 11:59

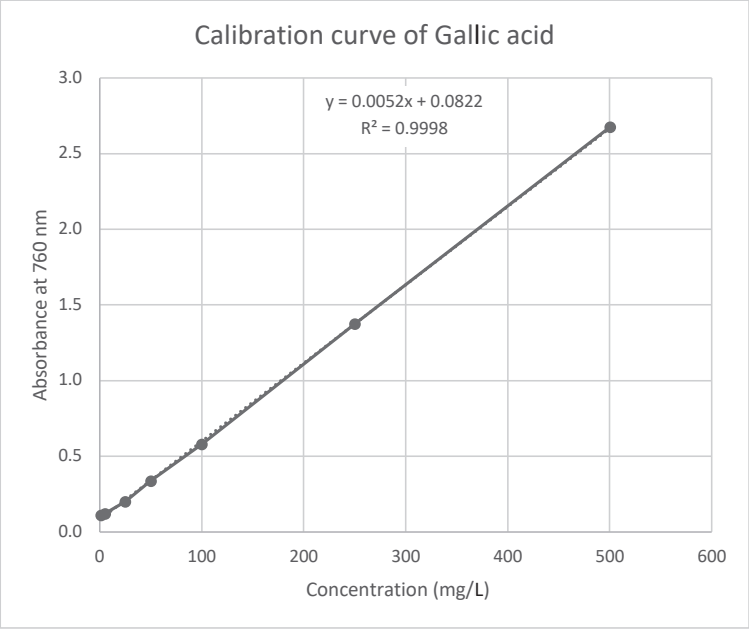

Fig. 1 Calibration curve of standard gallic acid for determination of total phenolic contents. Gallic acid at the concentrations of 1, 5, 25, 50, 100, 250, 500 and 1,000 mg/L was used as a standard for determination of total phenolic contents by using the Folin–Ciocalteu colorimetric method.

Table 1 Antioxidant activity of rice husk extract by DPPH assay (IC_{50} values).

Rice husk extract	IC_{50} (µg/mL) Extract with 70% ethanol	IC_{50} (µg/mL) Extract with decoction	*p* value[a]	*p* value[b]	*p* value[c]
Khao Dawk Mali rice husk	510.44 ± 68.68	731.20 ± 68.85	0.027	0.001	< 0.001
Sangyod rice husk	333.64 ± 9.21	488.69 ± 71.40	0.020	0.001	0.002
Riceberry rice husk	481.85 ± 26.90	571.27 ± 17.44	0.008	< 0.001	< 0.001
Black sticky rice husk	139.76 ± 52.07	182.02 ± 45.30	0.349	0.579	0.561
BHT	161.38 ± 33.7				

All analyses are from 3 independent experiments with triplicate measurements. Data were presented as mean ± SD. Statistical analysis of differences was performed using independent sample *t*-tests, and the statistically significant difference was at $p < 0.05$. BHT, butylated hydroxytoluene; [a]indicates the *p* value among data of different extraction methods in the same type of extracts; [b]indicates the *p* value among the different types of 70% ethanolic extract data compared with the BHT; [c]indicates the *p* value among the different types of decoction extract data compared with the BHT.

Table 2 Total phenolic contents of rice husk extract by Folin–Ciocalteu colorimetric assay.

Rice husk extract	Total phenolic contents (mg GAE/ g) 70% ethanol extract	Total phenolic contents (mg GAE/ g) extract with decoction	*P* value
Khao Dawk Mali rice husk	37.72 ± 1.66	20.03 ± 3.39	0.001
Sangyod rice husk	53.55 ± 4.43	30.47 ± 7.77	0.011
Riceberry rice husk	28.42 ± 3.51	19.58 ± 0.19	0.048
Black sticky rice husk	60.60 ± 3.57	45.54 ± 2.31	0.004

All analyses are from 3 independent experiments with triplicate measurements. Data were presented as mean ± SD. Statistical analysis of differences was performed using independent sample *t*-tests, and the statistically significant difference was at $p < 0.05$. *P* value shows statistical differences analysis of data in different extraction methods in the same type of extracts.

Table 3 Total anthocyanin of rice husk extract by pH differential assay.

Rice husk extract	Total anthocyanin (mg/L) 70% ethanol extract	Total anthocyanin (mg/L) extract with decoction	*P* value
Khao Dawk Mali rice husk	1.129 ± 0.14	0.518 ± 0.16	0.008
Sangyod rice husk	0.603 ± 0.23	0.174 ± 0.07	0.037
Riceberry rice husk	1.711 ± 0.43	0.633 ± 0.10	0.042
Black sticky rice husk	2.064 ± 0.20	0.8791 ± 0.10	0.003

All analyses are from 3 independent experiments with triplicate measurements. Data were presented as mean ± SD. Statistical analysis of differences was performed using independent sample *t*-tests, and the statistically significant difference was at $p < 0.05$. *P* value shows statistical differences analysis of data in different extraction methods in the same type of extracts.

Table 4 Inhibition of advanced glycation end products of rice husk extract by *In-vitro* BSA-glucose assay.

Rice husk extract	IC_{50} (µg/mL) Extract with 70% ethanol	IC_{50} (µg/mL) Extract with decoction	*P* value[a]	*P* value[b]	*P* value[c]
Khao Dawk Mali rice	689.31 ± 58.08**	725.47 ± 31.83**	0.327	0.002	< 0.001
Sangyod rice husk	394.23 ± 49.62	641.258 ± 7.95**	0.001	0.280	< 0.001
Riceberry rice husk	258.55 ± 16.89**	515.82 ± 21.67**	0.001	0.006	0.001
Black sticky rice husk	234.69 ± 29.02**	440.88 ± 12.93	0.000	< 0.001	0.167
Aminoguanidine (AG)	430.23 ± 6.03				

All analyses are from 3 independent experiments with triplicate measurements. Data were presented as mean ± SD. Statistical analysis of differences was performed using independent sample *t*-tests, and the statistically significant difference was at $p < 0.05$. [a]indicates the *P* value among data of different extraction methods in the same type of extracts; [b]indicates the *P* value among the different types of 70% ethanolic extract data compared with AG; [c]indicates the *P* value among the different types of decoction extract data compared with AG.

วิจารณ์

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์การต้านไกลเคชันกับความสัมพันธ์ของปริมาณแอนโทไซยานินในแกลบที่มีรงควัตถุโดยเปรียบเทียบแกลบข้าว 4 ชนิด นอกจากนี้ยังศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ของสารสกัดจากการสกัดด้วยวิธีที่แตกต่างกันในข้าวชนิดเดียวกัน โดยการสกัดด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 และการสกัดด้วยการต้ม จากงานวิจัยนี้พบว่าสารสกัดจากเอทานอลมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารสกัดด้วยน้ำ เนื่องจากสารจำพวก โพลีฟีนอล ฟลาโวนอยด์ และควิโนน เป็นสารที่มีสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและเป็นสารที่มีขั้วจึงสกัดออกมาในเอทานอลได้มากกว่าในน้ำ[16, 17] ข้อดีของการสกัดด้วยเอทานอล คือ ไม่ยุ่งยากและไม่ต้องผ่านความร้อนที่อาจไปทำลายสารสำคัญบางชนิดของพืชที่นำมาทดสอบ แต่ข้อเสียคือใช้เวลาในการหมักนาน ส่วนข้อดีของการต้มคือ ทำได้ง่าย ไม่ยุ่งยาก ใช้เวลาไม่นาน แต่ข้อเสียคือความร้อนอาจทำลายสารสำคัญบางชนิดได้ ซึ่งเราสามารถนำองค์ความรู้นี้ไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์หรือเครื่องดื่มบำรุงสุขภาพได้ โดยผลการวิจัยพบว่าแกลบที่สกัดด้วยเอทานอลมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ต้านไกลเคชันและมีปริมาณแอนโทไซยานินมากกว่าแกลบชนิดเดียวกันที่สกัดด้วยการต้มอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยสารประกอบฟีนอลิกเป็นสารส่วนใหญ่ที่พบในพืชมีคุณสมบัติเป็นสารที่มีขั้ว ทำให้ละลายได้ดีในแอลกอฮอล์ โครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกเป็นวงแหวนแอโรแมติกที่มีหมู่ไฮดรอกซิล ดังนั้นเมื่อสารละลาย DPPH ซึ่งเป็นสารอนุมูลอิสระมาดึงไฮโดรเจนอะตอมของสารประกอบฟีนอลิก ทำให้สารละลาย DPPH จะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง ดังที่เห็นจากงานวิจัยของ Pietta และคณะ[18]

ผลการวิจัยพบว่าแกลบของข้าวเหนียวดำมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุด รองลงมาคือแกลบข้าวสังข์หยด แกลบข้าวหอมมะลิ และแกลบข้าวไรซ์เบอร์รี ตามลำดับ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Huang และคณะ ในปี พ.ศ. 2555[9] ส่วนผลการหาปริมาณแอนโทไซยานินโดยวิธี pH differential พบว่าสารสกัดจากแกลบข้าวเหนียวดำมีปริมาณแอนโทไซยานินมากที่สุด รองลงมาคือแกลบข้าวไรซ์เบอร์รี แกลบข้าวหอมมะลิและแกลบข้าวสังข์หยด สอดคล้องกับงานวิจัยของ ชัชวิน และคณะ ปี พ.ศ. 2563 ที่ระบุว่าสีของเปลือกข้าวที่มีสีดำหรือแดงจะมีปริมาณแอนโทไซยานินมากกว่าเปลือกข้าวที่มีสีน้ำตาลอ่อน เนื่องจากมีสารฟีนอลิกหลักคือ anthocyanin cyanidin-3-O-b-D-glucoside และ peonidin-3-O-b-D-glucoside[8]

ส่วนผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งไกลเคชัน พบว่าแกลบข้าวเหนียวดำมีความสามารถในการยับยั้งไกลเคชันมากที่สุด รองลงมาคือแกลบข้าวไรซ์เบอร์รี แกลบข้าวสังข์หยดและแกลบข้าวหอมมะลิ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Daiponmak และคณะ ในปี พ.ศ. 2557 ที่ศึกษาความสามารถการต้านไกลเคชันและการต้านอนุมูลอิสระของข้าวไทย 15 สายพันธุ์ โดยมีข้าวสีม่วง 9 ชนิด ข้าวสีขาว 4 ชนิด และข้าวสีแดง 2 ชนิด และพบว่าข้าวสีม่วงพันธุ์ข้าวก่ำไร่ (ข้าวก่ำหรือข้าวเหนียวดำ) มีความสามารถการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด และการยับยั้งสาร AGE สูงที่สุด รองลงมาคือข้าวกลุ่มสีแดง และข้าวกลุ่มสีขาว ตามลำดับ และยังพบว่าปริมาณฟีนอลิกรวมและความสามารถการต้านอนุมูลอิสระมีความสัมพันธ์กับความสามารถการต้านไกลเคชัน เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกจะป้องกันการสร้าง AGE โดยกำจัดสารอนุมูลอิสระในขณะที่เกิดไกลเคชันและยังยับยั้งการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนด้วย[10] นอกจากนี้ Wan Ju Yeh และคณะ ในปี พ.ศ. 2560 ได้ศึกษาความสามารถและกลไกของสารโพลีฟีนอลในการต้านไกลเคชัน พบว่าสารโพลีฟีนอลสามารถต้านไกลเคชันได้หลายทาง เช่น ยับยั้งการเกิด ROS ในระหว่างไกลเคชัน ยับยั้ง Schiff base และ Amadori products ทำลายพิษของสารเมธิลไกลออกซัลด้วยเอนไซม์ไกลออกซิเลส หรือยับยั้งการจับกันระหว่าง AGE และตัวรับ (receptor for advanced glycation end products; RAGE) ซึ่งจะช่วยป้องกันการเกิดภาวะ oxidative stress และการสร้าง ROS ที่จะไปกระตุ้นการอักเสบ[19]

สรุป

จากการศึกษาพบว่าแกลบที่สกัดด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านไกลเคชันได้มากกว่าแกลบที่สกัดด้วยวิธีต้ม เนื่องจากแอลกอฮอล์เป็นตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารที่มีขั้วได้ดีกว่าน้ำจึงเป็นไปได้ว่าสารสำคัญที่ออกฤทธิ์จะเป็นสารที่มีขั้ว ในขณะที่แกลบข้าวเหนียวดำที่มีสีเข้มที่สุดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านไกลเคชันได้มากกว่าแกลบข้าวหอมมะลิ แกลบข้าวสังข์หยด และแกลบข้าวไรซ์เบอร์รีที่มีสีอ่อน เนื่องจากมีสารฟีนอลิกและแอนโทไซยานินมากกว่า ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกมีความสำคัญในการยับยั้งไกลเคชัน อันเป็นกระบวนการที่เกิดในโรคเบาหวานและนำไปสู่ภาวะแทรกซ้อนจากโรคเบาหวานได้ ดังนั้นจึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจในการศึกษาว่าสารใดเป็นสารหลักที่ออกฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระต่อไป นอกจากนี้ระยะของแกลบข้าวที่นำมาศึกษาและแหล่งที่มาของแกลบก็อาจมีผลต่อการทดลองแตกต่างกัน ซึ่งสามารถนำไปต่อยอดในการศึกษาต่อไป รวมถึงเป็นแนวทางในการพัฒนาเป็นยาอาหารเสริม ตลอดจนผลิตภัณฑ์บำรุงสุขภาพต่าง ๆ ในอนาคต

#in2 66-4.indd 8856 29/2/2567 BE 11:59

เอกสารอ้างอิง

1. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 10th ed. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation; 2021.
2. Wacharapat P. Changes of pulpal and periapical tissue in a patient with diabetes mellitus. Songklanakarin Dent J 2014; 2: 20-37. (in Thai)
3. Asmat U, Abad K, Ismail K. Diabetes mellitus and oxidative stress-A concise review. Saudi Pharm J 2016; 24: 547-53.
4. Thai Rice Exporters Association. Report on rice export situation Trends and direction of rice exports in 2019 [cited 2020 Jan 2]. Available from: http://www.thai-riceexporters.or.th/Press%20release/2019/TREA%20Press%20Release%20Thai%20Rice%20Situation%20&%20Trend%20Year%202019-30012019.pdf.
5. Semsang N, Keawlangkar N, Chanthachai W. Antioxidant capacities and phenolic compounds of the husk, bran and endosperm of Thai rice [cited 2020 Jan 13]. Available from: http://www.research.cmru.ac.th/research59/ris/download.php?download_file=article&no=545
6. Butsat S, Siriamornpun S. Antioxidant capacities and phenolic compounds of the husk, bran and endosperm of Thai rice. Food Chem 2010; 119: 606-13.
7. Wisetkomolmat J, Arjin C, Hongsibsong S, *et al*. Antioxidant activities and characterization of polyphenols from selected northern Thai rice husks: relation with seed attributes. Rice Sci 2023; 30: 148-59.
8. Petchlert C, Sangprathum T. Comparison of phenolic and anthocyanin content among four differences of raw and cooked rice. Naresaun Phayao J 2020; 13: 36-41. (in Thai)
9. Shao-Hua Huang, Lean-Teik Ng. Quantification of polyphenolic content and bioactive constituents of some commercial rice varieties in Taiwan. J Food Compos Anal 2012; 26: 122-7.
10. Daiponmak W, Senakun C, Siriamornpun S. Antiglycation capacity and antioxidant activities of different pigmented Thai rice. Int J Food Sci 2014; 49: 1805-10.
11. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature 1958; 29: 1199-200.
12. Chan SW, Lee CY, Yap CF, Wan Alda WM, Ho CW. Optimisation of extraction conditions for phenolic compounds from limau purut (*Citrus hystrix*) peels. Int Food Res J 2009; 16: 203-13.
13. Lee J, Durst RW, Wrolstad RE, *et al*. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. J AOAC Int 2005; 88: 1269-78.

14. Piumngam K. *In vitro* study of antioxidant, anti-glycation and anti-inflammatory effect of Thai medicinal plants for Diabetic Patients. J Med Tech Assoc Thailand 2020; 48: 7504-18. (in Thai)
15. Ford L, Theodoridou K, Sheldrake G, Walsh P. A critical review of analytical methods used for the chemical characterisation and quantification of phlorotannin compounds in brown seaweeds. Phytochem Anal 2019; 30: 587-99.
16. Radoslaw P, Henryk Z, Danuta C, Krzysztof G. Antioxidant activity of ethanolic and aqueous extracts of *Uncaria tomentosa (Willd.)* DC. J Ethnopharmacol 2006; 104: 18-23.
17. Mustarichie R, Runadi D, Ramdhani D. The antioxidant activity and phytochemical screening of ethanol extract, fractions of water, ethyl acetate and n-hexane from mistletoe tea (*Scurrula atropurpureabl. dans*). Asian J Pharm Clin Res 2017; 10: 343-7.
18. Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. J Nat Prod 2000; 63: 1035-42.
19. Wan-Ju Y, Shih-Min H, Wei-Hwa L, Chi-Hao W. Polyphenols with antiglycation activity and mechanisms of action: A review of recent findings. J Food Drug Anal 2017; 25: 84-92.